

Protokol výzkumného projektu mezioborové spolupráce klinicko - výzkumných pracovišť a soukromého sektoru ke stanovení panelů nových nádorových markerů u karcinomu prostaty, ledvin, močového měchýře, pankreatu a tlustého střeva

Hanuš T.¹, Čapoun O.¹, Soukup V.¹, Sobotka R.¹, Svačina Š.², Žák A.³, Zima T.⁴, Kalousová M.⁴, Krška Z.⁵, Petruželka L.⁶

¹ Urologická klinika, ² III. interní klinika, ³ IV. interní klinika, ⁴ Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, ⁵ I. Chirurgická klinika 5, ⁶ Onkologická klinika

1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova v Praze a Všeobecná fakultní nemocnice v Praze



MINISTERSTVO
PRŮMYSLU A OBCHODU

Cíl projektu : Identifikace nových biomarkerů ze vzorků séra nebo moče pacientů u vybraných pěti onkologických onemocnění. Na projektu se podílejí klinická pracoviště fakultní nemocnice a lékařské fakulty spolu s akciovou laboratorní společností za finanční podpory z grantu Ministerstva průmyslu a obchodu ČR.

Metodika : Po analýze extenzivních literárních rešerší bylo identifikováno 140 biomarkerů s potenciálem uplatnit se v diagnostice nebo odhadu vývoje onemocnění u karcinomu prostaty, močového měchýře, ledviny, slinivky a tlustého střeva. Na základě statistické analýzy získaných výsledků měření bude pro každou diagnózu vybrána skupina biomarkerů, jejichž kombinace vykáže nejvyšší senzitivitu a specifitu pro predikci vývoje klinického stavu u každé vybrané diagnózy. Vybrané analyty budou použity pro vývoj multimarkerové eseje.

Výsledky : V rámci projektu bylo na pracovištích Urologické kliniky, Onkologické kliniky, 3. a 4. interní kliniky a 1. chirurgické kliniky naší fakultní nemocnice provedeno celkem 1295 odběrů krve nebo moče. U karcinomu prostaty tvoří kontrolní skupinu muži s negativní biopsií prostaty, u karcinomu měchýře skupina s negativní cystoskopií a cytologií. U karcinomu slinivky jsou testovány skupiny s malignitou, diabetem II. typu, chronickou pankreatitidou a zdraví pacienty. U karcinomu ledviny byl proveden kontrolní odběr s odstupem tří měsíců po operaci. Pro karcinom tlustého střeva vyšetřujeme skupinu s malignitou, s negativní koloskopií a se zánětlivým střevním onemocněním.

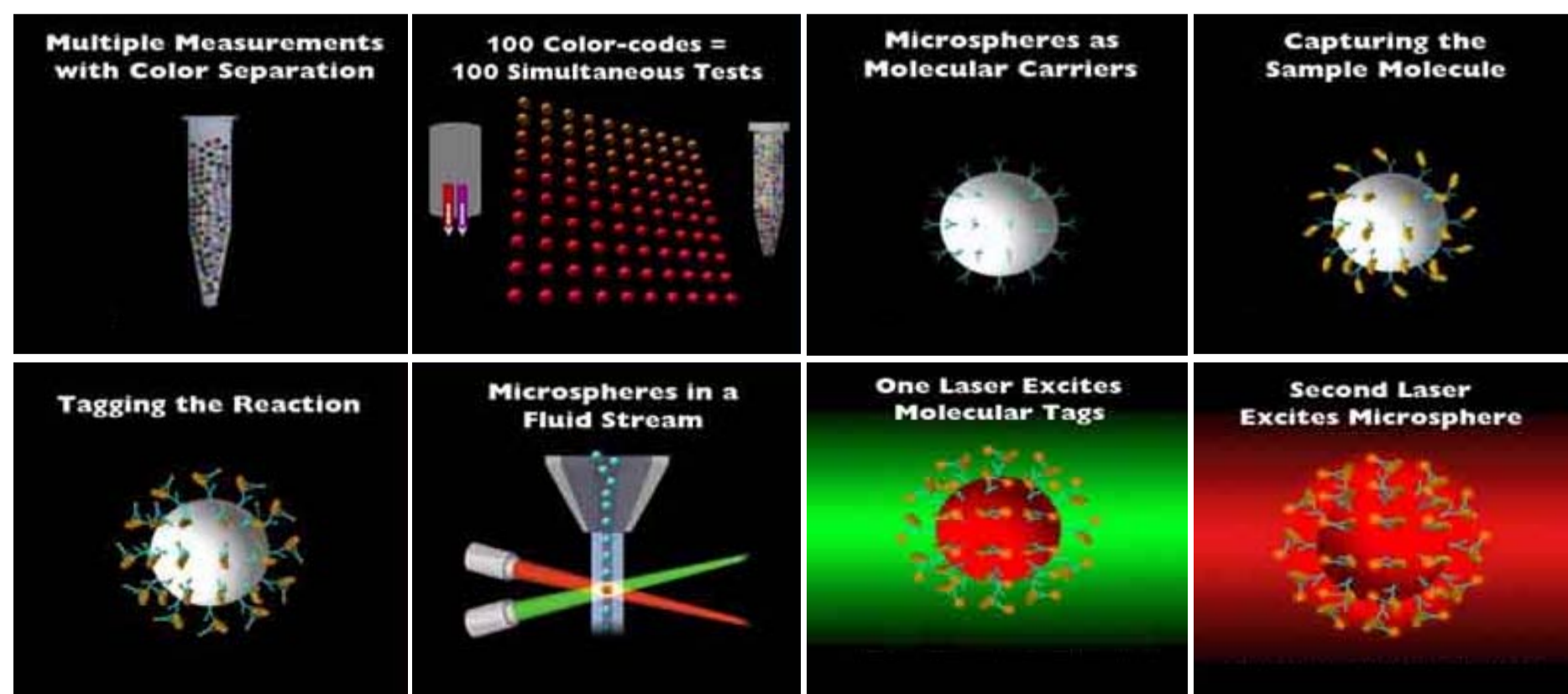
Obr. 1. Návrh biomarkerů hodnocených v projektu (výběr)

PROSTATA	LEDVINA	MĚCHÝŘ	PANKREAS	TLUSTÉ STŘEVO
complexed PSA	carbonic anhydrase 9	CXCL1	IGF-1	TIMP-1
proPSA	TuM2-PK	VEGF-A	IGF-2	Trail-R2
total PSA	MMP-9	CRT (calreticulin)	IGFBP-1	HNP1-3
freePSA	TK1p	HSP27	IGFBP-2	M-CSF
PSMA	TK1a	HSP60	IGFBP-3	MIF
PSP94	fibronectin	annexin V	CEACAM-1	MMP7
PSP94bp	hemopexin	ApoA1	Osteopontin	MMP9
KLK11	Hsp27	ApoA2	TIMP-1	VEGF-A
leptin	IGF-1	IL-13	CEA	VEGF-C
CRISP-3	ApoA2	chromogranin A	CA 19-9	IGF BP - 3
clusterin	S100P	NSE	CA 72-4	VEGF D
hepsin	TFF-2	alpha1-AT	plasminogen	prolactin
IGF-1	sRAGE	keratin 13	prealbumin	alpha1-antitrypsin
IGFBP-2	adipophilin	galectin-1	HIP-PAP (REG3A)	GDF15
sarcosine	DcR3	CD56	Midkin	VEGF D
periostrin	B7x	carbonic anhydrase 9	TFF-1	sICAM-1
alpha1-AT	NGAL	Angiogenin	REG-1alpha	sICAM-2
neopterin	UCHL1	proepithelin	S100A6	sICAM-3
cathepsin D	leptin	CEACAM1	OPG	EGF
sPLA2-IIa	parvalbumin	mucin-4	VNN1	IGF-1
ZAG	clusterin	retinoic-induced protein	lipocalin-2 (LCN2)	CHI3L1
	midkin	Resistin	plectin-1	S100A8
	TFF-1	gamma-synuclein	ULBP2	S100A9
	S100P	zinc-a2-glycoprotein	HSP27	HSP60
	CD117	A-FABP	MMP-9	HMGBl
	CD-10	cystatin B	ALCAM	IGFBP-2
	TPS	uromodulin	HSP 70	M2PK

Obr. 2. Forma hlášení výsledků u ca prostaty

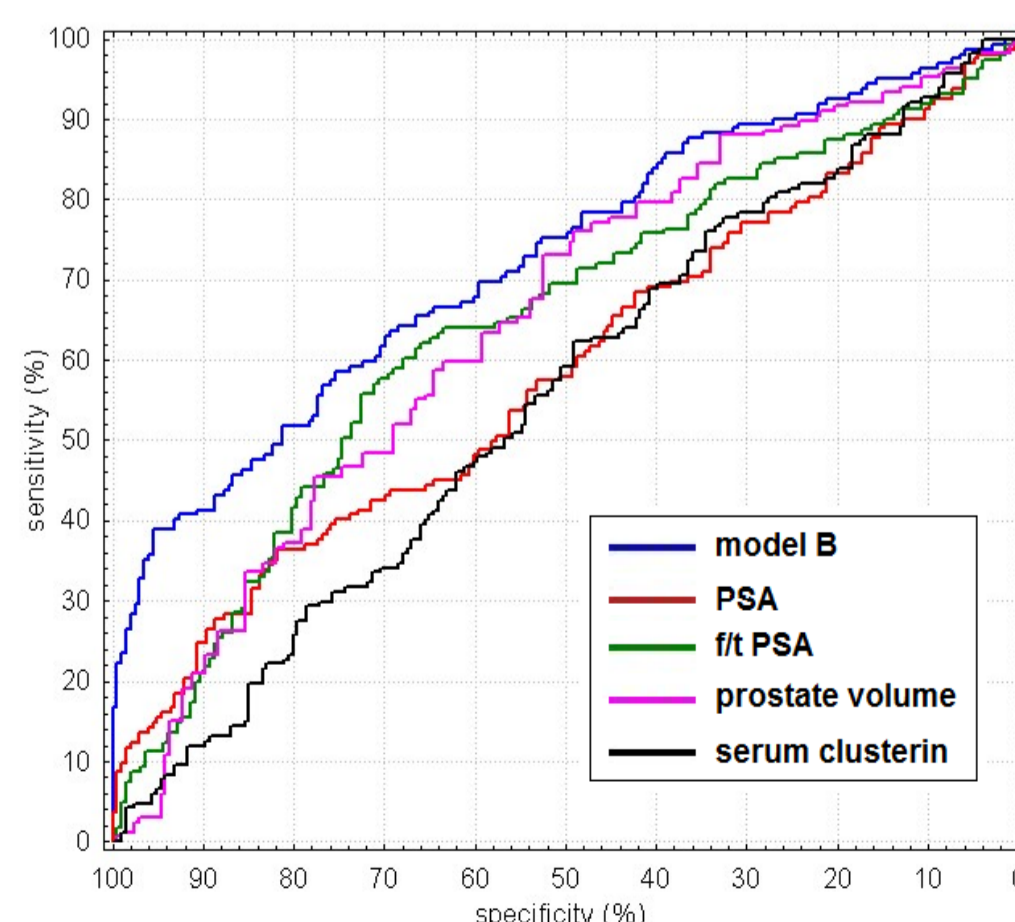
Kód pacienta	IGF-1 (ng/ml)	IGFBP-2 (ng/ml)	IGFBP-3 (ng/ml)	Sarkosin (pmol/l)	sPLA2-IIa (pg/ml)	ZAG2 (ug/ml)	clusterin (ug/ml)	PSP94 (ng/ml)
AB440221	262,4	177,2	2 975,7	10,21	2 567	108,64	78,87	23,04
JB311030	248,7	437,1	2 817,7	11,24	10 739	83,16	77,25	50,73
RH430914	189,5	1 035,1	3 341,5	12,08	19 202	135,08	101,19	69,90
DO590423	173,1	307,4	2 500,6	9,37	8 670	67,60	90,63	29,25
MH450929	149,5	549,7	3 260,9	7,85	6 366	72,95	64,54	81,73
BV401205	196,1	431,5	2 963,7	7,37	4 772	63,42	70,29	22,18
FM661029	242,2	461,6	3 160,9	6,25	4 002	71,69	102,77	18,37
KS470630	252,4	753,2	3 367,2	7,26	2 963	63,52	67,74	28,86
PS441111	194,7	204,5	3 573,0	8,42	5 870	75,98	71,92	16,40
TB660324	247,3	121,2	3 416,8	9,39	1 049	67,51	74,90	12,74
HJ400423	239,2	217,5	2 209,3	11,85	3 425	27,21	175,89	23,83
PP411130	238,9	633,1	3 013,0	16,63	5 051	92,30	54,01	27,80
TL290209	185,1	479,3	3 423,9	15,15	8 772	65,82	90,36	17,77
PJ510915	110,6	170,1	2 035,6	10,14	2 268	19,66	78,33	21,27
VS470105	177,2	323,5	2 225,0	9,19	4 376	53,26	76,35	21,96
JJ320102	238,5	490,4	2 120,2	6,05	2 501	48,39	80,77	3,89
JK480826	110,2	191,5	1 760,8	10,35	3 410	62,97	72,37	4,75
MP430715	71,8	583,4	2 206,2	12,65	4 748	58,18	78,42	33,13
ZR420615	158,6	379,6	3 093,2	35,23	4 870	58,01	65,46	41,52
MK511212	181,6	180,8	3 558,4	27,66	1 975	57,65	74,81	19,78
MT471215	240,6	105,7	2 611,5	17,38	2 268	43,62	77,07	23,94
SS520213	139,1	211,6	2 835,3	17,58	2 611	51,97	55,34	27,49
JB490831	127,5	676,2	2 030,1	11,46	2 596	75,29	64,36	45,30
KM551203	159,9	1 064,0	2 551,5	8,80	5 067	75,88	85,37	6,82
KV520220	207,5	367,1	2 885,2	8,23	2 182	35,58	58,25	27,31
MK550120	267,2	164,2	2 817,7	7,01	6 271	45,45	91,27	21,43

Obr. 3. Princip detekce značených imunokomplexů pomocí multiplexové technologie



Platforma multiplexor technologie Luminex/xMAP využívá kombinace průtokové cytometrie, latexových mikročásteček, laserové detekce, digitálního zpracování signálu a imobilizace specifických protilátek na povrch mikročásteček. Vlastní reakce je založena na tvorbě imunokomplexu sendvičového typu (podobně jako v ELISA), kdy jedna z protilátek je vázána na povrch mikročástečky a druhá je značena např. fluorescenční značkou. Výsledný imunokomplex má vlastnosti mikročástečky i příslušné značky. Množství imunokomplexu a tím i koncentrace analytu jsou zjišťovány průtokovou cytometrií v kombinaci s laserovou detekcí. Smícháním jednotlivých komponent lze dosáhnout až 100 různých kombinací velikosti částic a intenzity zbarvení imunokomplexu, což umožňuje stanovení stejného počtu analytů v jedné reakční směsi.

Obr. 4. První výsledky : prediktivní parametry pozitivní biopsie prostaty (model B zahrnuje prostatický specifický antigen, nález ve rektumu, velikost prostaty a hladinu clusterinu v séru; při senzitivitě 80% dosahuje specifity 42%)



Závěr : Dosavadní zkušenosti řešitelského týmu na projektu identifikace a validace nových biomarkerů pro určité onkologické diagnózy potvrzují účelnost a výhodnost podílu soukromého sektoru na výzkumné činnosti lékařských fakult a fakultních nemocnic.

Práce byla podpořena grantem MPO TIP FR-TI3/666.