

# Biomarkery raka trzustki

**EWA MAŁECKA-PANAS**

**KLINIKA CHORÓB PRZEWODU  
POKARMOWEGO UM W ŁODZI**

# Problem PDAC

- ▶ PDAC jest czwartą przyczyną zgonu z powodu nabłonkowych nowotworów złośliwych w świecie zachodnim
- ▶ Złe rokowanie wynika z braku skutecznej chemioterapii i późnego rozpoznania
- ▶ Rozpoznanie jest zwykle stawiane w chwili, gdy guz jest zaawansowany miejscowo i obecne są przerzuty jawne lub sukliniczne *Yachida 2010*
- ▶ Resekcja chirurgiczna jest obecnie jedyną szansą na przedłużenie czasu przeżycia, ale tylko u 15–20% chorych ze świeżym rozpoznaniem guz jest resekcyjny *Alexakis 2004*
- ▶ Nawet w tej grupie średni czas przeżycia wynosi 20–22 miesięcy *Hidalgo 2010*

# Typy biomarkerów

- ▶ Markery prognostyczne:
  - ▶ Biomarkery wskazujące na przebieg choroby niezależnie od leczenia, użyteczne dla diagnostyki, oceny przebiegu choroby
- ▶ Markery predykcyjne
  - ▶ Pomagające ustalić odpowiedź na leczenie, zwykle nie są prognostyczne
- ▶ Markery prognostyczne i predykcyjne
  - ▶ Użyteczne w ocenie przebiegu choroby i wyborze sposobu leczenia.
- ▶ Mogą być jednocześnie korzystne prognostycznie, ale przewidywać oporność na leczenie, np. MSI w RJG
- ▶ Częściej wskazują na złe rokowanie, ale wskazywać na skuteczność terapii ukierunkowanej, np. HER2 w raku sutka
- ▶ Użyteczne w wyborze metody leczenia

# Czy biomarkery mogą być użyteczne we wczesnej diagnostyce RT

- ▶ Uważa się, że RT postępuje i szybko i wczesnie dochodzi do przerzutów
- ▶ Badania obrazowe, jak KT, EUS są wykonywane po pojawieniu się objawów, nie wykrywają wczesnych resekcyjnych zmian i często nie różnicują RT od PZT
- ▶ Niiski koszt i mała inwazyjność wskazują, że biomarkery wykrywane w surowicy lub innych materiałach biologicznych pozostają idealną metodą wczesnego wykrywania RT
- ▶ **Nawet , gdy potencjalnie możliwe są przerzuty, czas przeżycia chorych po resekcji jest korzystniejszy niż u chorych, u których nie była ona możliwa**

# Źródła materiału biologicznego

- ▶ Ślina :K-ras, MBD3L2, ACV1 DPM1111 miRNA czułość 90%, swoistość 95% w różnicowaniu RT od zmian łagodnych i osób zdrowych *Zhang L 2010*
- ▶ Surowica
- ▶ Sok trzustkowy – procedura inwazyjna, zanieczyszczenia
  - ▶ Rak inwazyjny- złuszczenie komórek guza
  - ▶ Duża zawartość białek związanych z guzem
  - ▶ Mutacje DNA:K-ras, p53,
  - ▶ TP53 wczesny marker *Kanda M 2013*
  - ▶ CA19-9, CEA, DU-PAN2- w kombinacji: różnicowanie z PZT *Agrawal 2017*
- ▶ Materiał pooperacyjny
- ▶ Kał - złuszczenie, badania populacyjne?
  - ▶ K-ras, p53, w połączeniu z CA 19-9 w surowicy  
*Umashankar K et al. 2013*

# CA 19-9

- ▶ Najpowszechniej stosowany biomarker RT, zaakceptowany przez FDA do monitorowania RT
- ▶ Podwyższony poziom CA19-9 spotyka się u 75-85% chorych na PDAC
- ▶ Nie jest to marker narządowo swoisty, a jego poziom wzrasta również w raku dróg żółciowych, wątroby, jelita grubego oraz przełyku, w przewlekłym zapaleniu trzustki, marskości wątroby, cukrzycy i u chorych z żółtaczką o różnej etiologii
- ▶ Średnia czułość:80%, swoistość:86% (*Steinberg W et al1990*)
- ▶ Antygen CA 19-9 jest pochodną antygenu układu Lewis i osoby z rzadkim układem antygenu Lewis a-b-stanowiące 3-7 % populacji nie wytwarzają go i wyniki mogą być fałszywie ujemne.
- ▶ We wczesnej fazie PDAC marker jest nieużyteczny, zwykle prawidłowy, zaś wysokie wartości powyżej 500 silnie wskazują na PDAC, ale jest to zwykle zaawansowana postać choroby.
- ▶ Wysokie stężenie przed zabiegiem operacyjnym wiąże się z niekorzystnym rokowaniem.
- ▶ Zmniejszenie stężenia po leczeniu operacyjnym i normalizacja po leczeniu adjuwantowym są związane z korzystnym rokowaniem

# Panele cytokin, jako biomarkery RT

## Yako 2016

- ▶ Najszerzej zbadane: IL-1 beta, IL-6, IL-8, IL-10, VEGF, TGF
- ▶ Panel: CA19-9, IL-1 beta, IL-6 i IL-8 poprawiały skuteczność różnicowania RT z osobami zdrowymi w porównaniu z samym CA19-9
- ▶ Wartości IL-2, IL-6, IL-10 VEGF i TGF obniżały się po leczeniu operacyjnym lub po chemioterapii RT
- ▶ Brak wartości predykcyjnej
- ▶ Poprawa swoistości ( 91,7% vs 66,7%) w różnicowaniu RT z łagodnymi chorobami trzustki panelu IL-8, IL-6, IP-10, PGDF i CA19-9 w porównaniu z samym Ca19-9 kosztem czułości (81,4% vs 88,4%)

# Potencjalne biomarkery 1

- ▶ **DJ-1;nowy onkogen**, związany z aktywacją AKT (rola w oporności na chemioterapię i rozwoju guza); korelacja z inwazyjnością guza i przerzutowaniem
  - ▶ Wzrost ekspresji w 68,5% RT, korelacja ze stopniem zaawansowania (*HE X et al. 2012*)
  - ▶ Wysokie poziomy DJ-1 w soku trzustkowym chorych na RT (*Tian M et al. 2008*)
  - ▶ **W surowicy testem ELISA poziom DJ-1 podwyższony w RT w porównaniu do PZT i osób zdrowych** (*Chen Y et al. 2012;He XY et al. 2011*)
- ▶ **Plektyna-1 różnicowanie RT od łagodnych chorób trzustki**, wzrost ekspresji w PanIN III, w porównaniu do PanIN I/II (*Bausch D et al. 2010*)
- ▶ **Ligand stymulujący proliferację (Proliferation-inducing ligand;APRIL)**; należy do rodziny TNF, istotna rola w obronie gospodarza, zapaleniu i równowadze immunologicznej (*Wang F et al. 2011*)
  - ▶ Poziom APRIL w surowicy podwyższony w RT, dodatnia korelacja z CEA i Ca 19-9
  - ▶ Czułość APRIL : 70,1%, swoistość:5,5%; w kombinacji z CEA i CA 19-9:88,9% and 80%
- ▶ **Przeciwciało monoklonalne anty-MUC, PAM4** nie zabarwia prawidłowego nabłonka przewodowego trzustki, słabo zabarwia zmiany PanIn 1a i 1B, silnie- komórki RT inwazyjnego, sugerowana rola we wczesnej diagnostyce RT (*Gold DV 2007*)
  - ▶ Czułość PAM4 dla RT w surowicy:82%, swoistość:95%



# Potencjalne biomarkery 2

- ▶ **ULBP2** – po badaniach mRNA, wykrywany za pomocą immunohistochemii i w surowicy-podwyższone wartości w RT w porównaniu z PZT i osobami zdrowymi, czułość 83,8%, swoistość 73,9%, w kombinacji z CA19-9 AUC=0,910 *Chen 2016*
- ▶ **CEACAM**, glikoproteina żółciowa1, uczestniczy w mechanizmach wzrostu guza, angiogenezie, immunomodulacji; wykrywana w surowicy testem ELISA w 91% RT, u 24% osób zdrowych, u 66% chorych na PZT, korzystna kombinacja z CA19-9 *Ballehaninna UK 2011*
- ▶ **REG-4** wykrywany immunohistochemicznie, następnie testem ELISA, czułość dla RT 94,9%, swoistość 64%, także podwyższone wartości w PZT *Takayama 2010*
- ▶ **Osteopontyna (OPN)** stymuluje proliferację i progresję raka, podwyższona ekspresja w RT, czułość testu ELISA 80%, swoistość 97%; miarodajność wyższa niż CA19-9 *Poruk KE 2013*
- ▶ **Rozpuszczalny iC3b** wytwarzany w interakcjach komórek guza, przeciwciał dla guza i układu dopełniacza, jego wzrost poprzedza nawrót radiologiczny po resekcji guza *Marten 2010*

# Urokinazowy aktywator plazminogenu

- ▶ Enzym proteolityczny uwalniany z komórek raka
- ▶ Uczestniczy w degradacji białek błony podstawnej i macierzy, ułatwiając inwazję komórek raka do tkanek otaczających
- ▶ Aktywuje metaloproteinazy i czynniki wzrostowe; FGF, VEGF, IGF, TNF-alfa
- ▶ Stymuluje migrację komórek i angiogenezę, promując inwazję i tworzenie przerzutów odległych
- ▶ Opisano wzrost ekspresji tego białka w rakach sutka, jajnika, przetyku, żołądka, a ostatnio-w raku trzustki

*Duffy 2004, Halamkova 2011, He2007*

## Serum level of Urokinase Plasminogen Activator (uPA) Correlates with the Survival of Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC)

Winter K<sup>1\*</sup>, Szcześniak P<sup>2</sup>, Bulska M<sup>2</sup>, Kumor-Kisielewska A<sup>3</sup>, Durko Ł<sup>1</sup>, Gąsiorowska A<sup>1</sup>, Orszulak-Michalak D<sup>2</sup> and Małecka Panas E<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Digestive Tract Diseases, Medical University of Lodz, Poland

<sup>2</sup>Biopharmacy Institution, Medical University of Lodz, Poland

<sup>3</sup>Department of Pneumology and Allergy, Medical University of Lodz, Poland

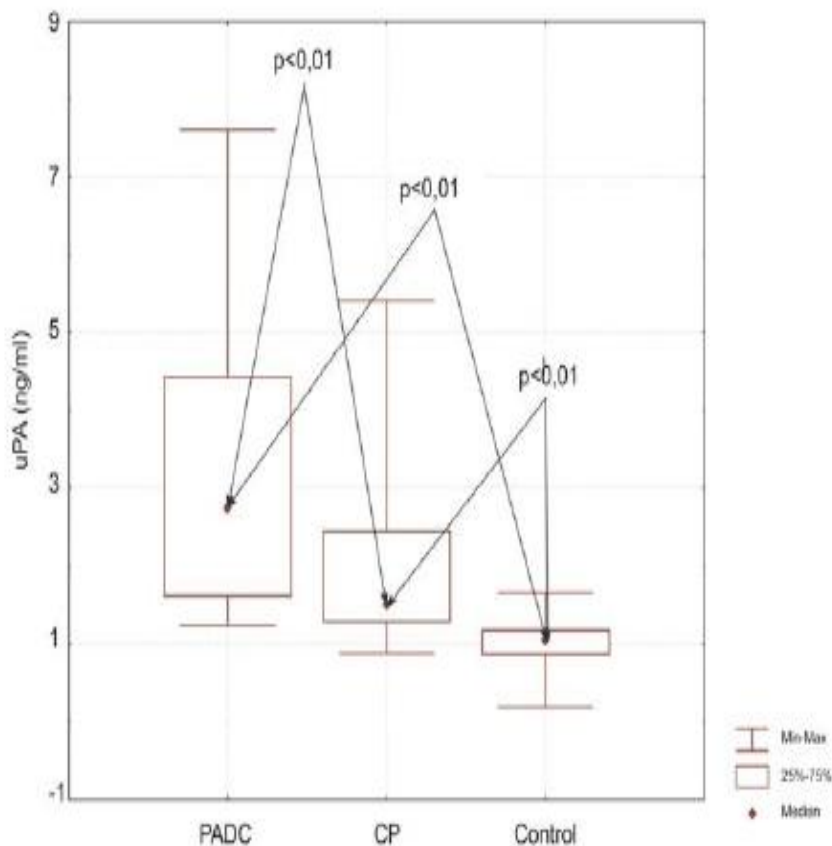


Figure 1: Median uPA serum concentration (ng/ml) in patients with PDAC, CP and in control group.

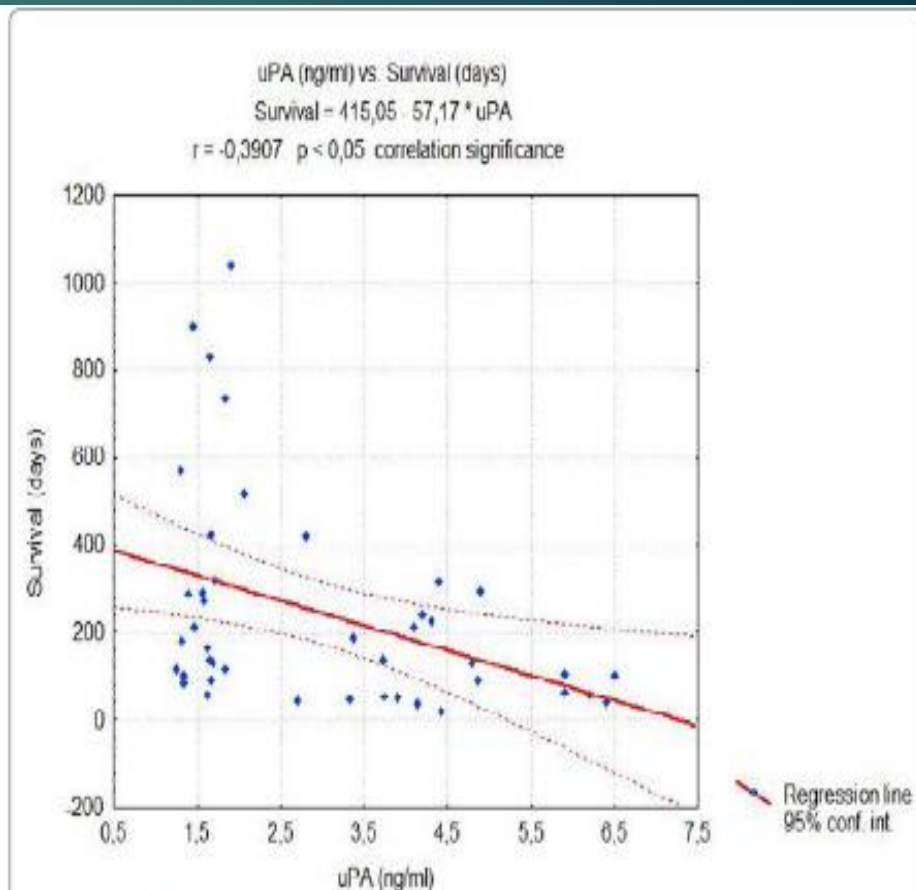


Figure 4: Correlation between uPA serum concentration (ng/ml) and survival (days) in PDAC patients.

# Cukrzyca związana z RT

- ▶ Świeżo wykryta cukrzyca występuje u połowy chorych na RT, nawet we wczesnej fazie bezobjawowej
- ▶ Cukrzyca t 2 występuje często, a RT-rzadko- badania przesiewowe u wszystkich chorych z nowowykrytą cukrzycą nieefektywne
- ▶ Skuteczny marker różnicujący cukrzycę związaną z RT od cukrzycy typu 2 jest niezbędny, ale wykrywałby tylko połowę przypadków RT
- ▶ Mechanizm karcinogenezy trzustki związanej z cukrzycą
  - ▶ Cukrzyca zwiększa proliferację komórek nabłonka przewodowego trzustki *Butler 2010*
  - ▶ Insulinooporność i hiperinsulinemia (w porównaniu do obniżonych poziomów insuliny w PZT); hiperinsulinemia jest przyczyną obniżenia poziomu IGFB-1 i IGFB-2 → ↑ wolnego IGF-1 → IGF-1R (wysoka ekspresja w komórkach RT) → ↑ proliferacji komorek

# Czułość ( $\alpha$ ) i swoistość ( $\beta$ ) IGF1, IGFBP2 i IGF1/IGFBP2 jako parametr diagnostyczny

RT

*Włodarczyk B Pancreatology 2017*

Parametr	$\alpha$	$\beta$	Wartość krytyczna
IGF-1 (ng/ml)	0,01	0,9966	134,9
	0,05	0,8138	83,67
	0,1	0,4948	67,73
IGFBP-2 (ng/ml)	0,01	0,1519	73,23
	0,05	0,0558	106,24
	0,1	0,0344	126,1
IGF-1/IGFBP-2	0,01	0,0967	0,849
	0,05	0,0302	0,5063
	0,1	0,0150	0,3959

# Biomarker różnicujący guz trzustki w przebiegu AZT od procesu złośliwego

- ▶ Jednoczesny wzrost  $\text{IgG4} > 280 \text{ mg/dl}$ , przy  $\text{CA19-9} < 85 \text{ U/ml}$  wskazuje na guz w przebiegu AZT Chang 2014

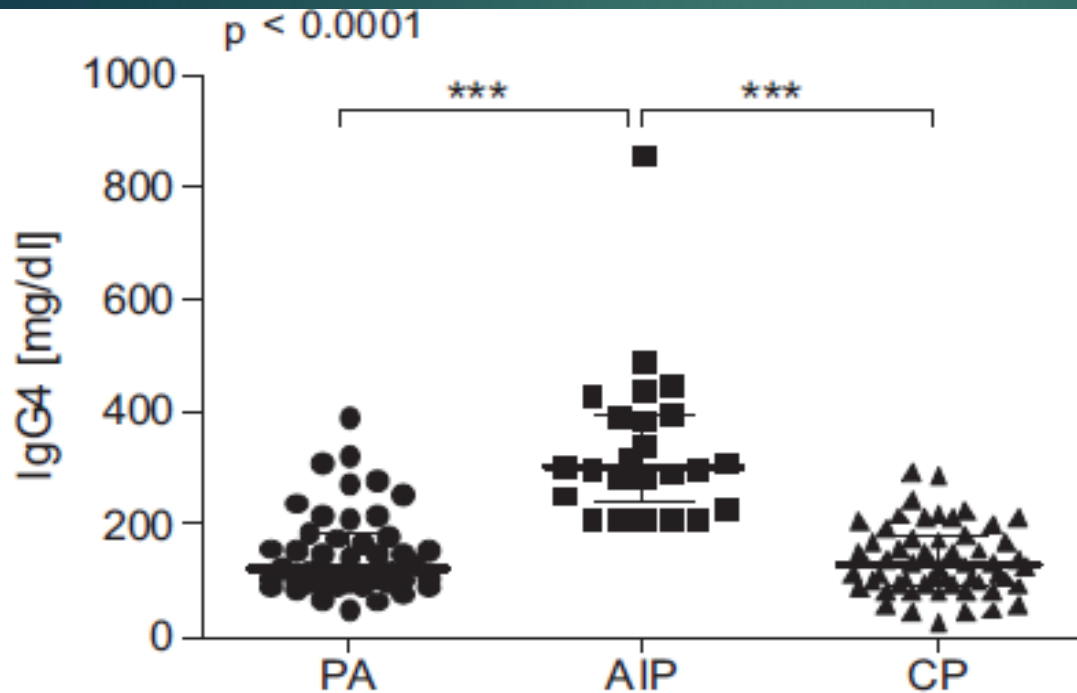


Fig. 2. Comparison of serum IgG4 levels in patients with autoimmune pancreatitis (AIP), pancreatic adenocarcinoma (PA) and chronic pancreatitis (CP).

- Średni poziom  $\text{IgG4}$  u chorych na AZT =  $301,9 \text{ mg/dl}$ ; RT =  $123, \text{mg/dl}$
- Punkt odcięcia  $\text{IgG4} = 210 \text{ mg/dl}$ : najwyższa czułość:  $83,8\%$  i swoistość:  $89,5\%$  dla AZT
- $35\%$  chorych na RT i  $25,4\%$  na PZT miało  $\text{IgG4} > 280 \text{ mg/dl}$ !

# Ścieżka sygnałowa Hedgehog

- ▶ Rola w rozwoju i różnicowaniu tkanki embrionalnej, neuronów, mięśni gładkich, kości, komórek nabłonka i komórek hematopoetycznych oraz w tworzeniu organów, w tym przewodu pokarmowego z wykluczeniem obszaru tworzenia trzustki

Białka Hh wiążą receptory błonowe:

- ▶ patched (Ptc)
- ▶ smoothed (Smo)
- ▶ Wiązanie ligandów Hh do Ptc powodują aktywację Smo i całej ścieżki sygnałowej, w tym czynnika transkrypcyjnego GLI

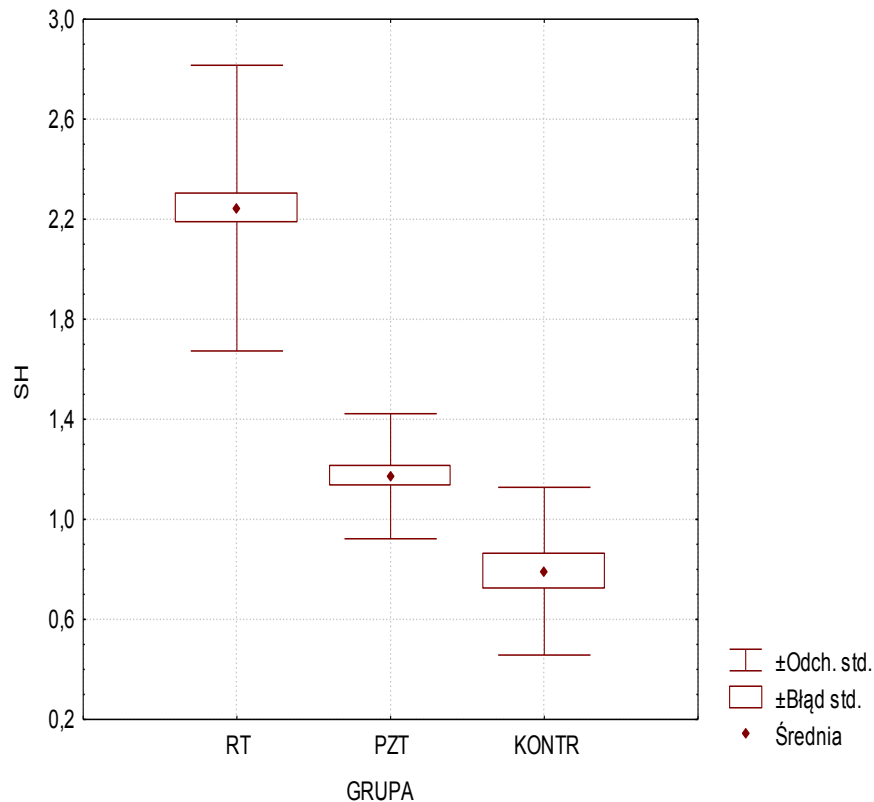
*Kayed 2006*

- ▶ W raku trzustki ulega aktywacji w
  - komórkach raka
  - tkance mezenchymalnej zrębu

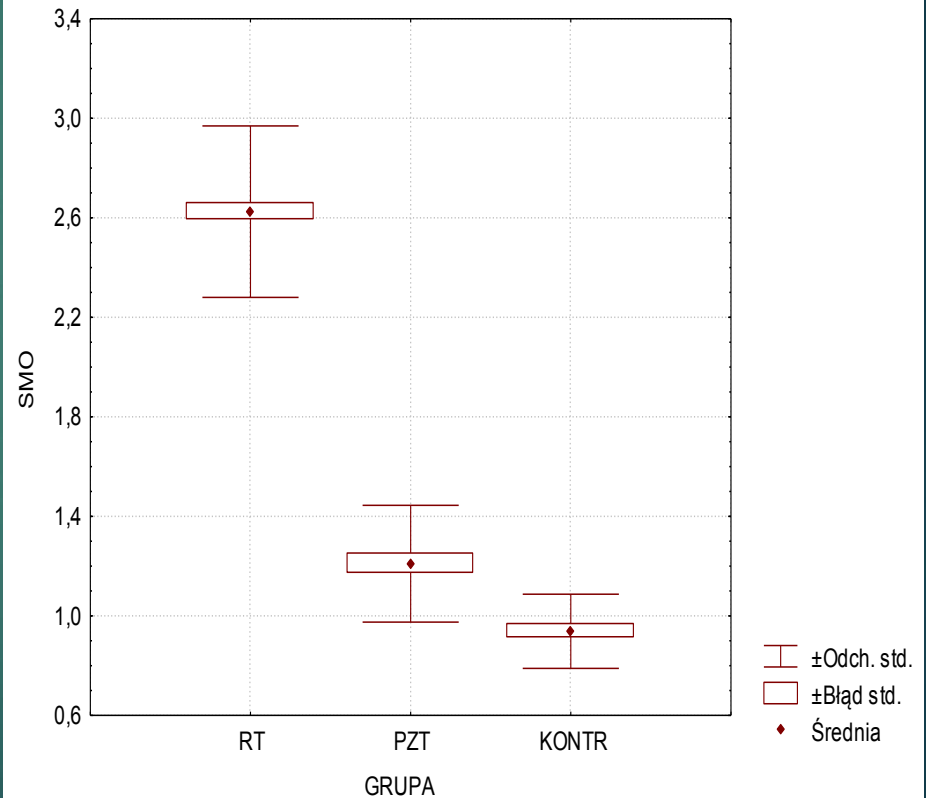
# Porównanie ekspresji białka Shh i SMO w raku trzustki (RT), przewlekłym zapaleniu trzustki (PZT) i u osób zdrowych

Winter 2017

Wykres ramkowy: SH



Wykres ramkowy: SMO

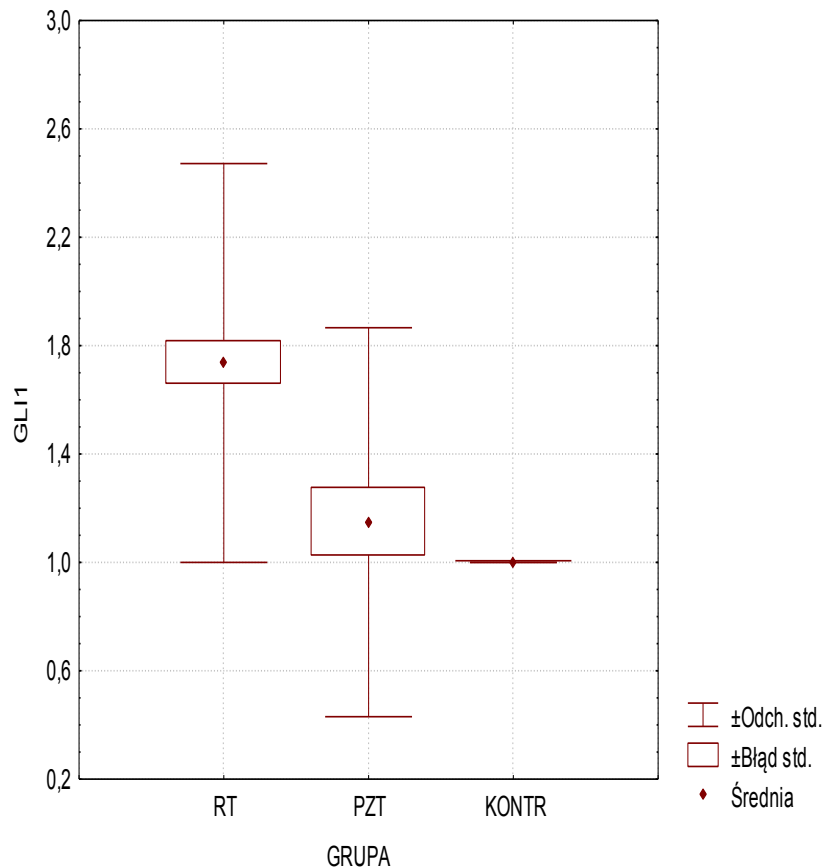




# Białka Hedgehog w RT cd

Winter K 2017

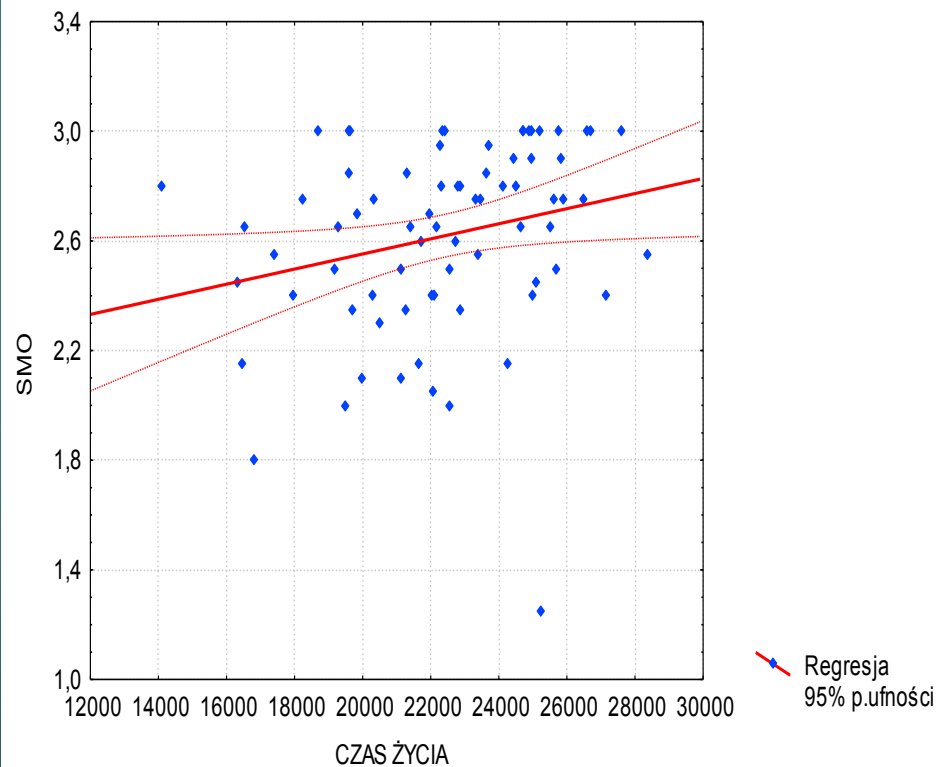
Wykres ramkowy: GLI1



CZAS ŻYCIA vs. SMO

$$SMO = 2,0013 + 0,00003 * CZAS ŻYCIA$$

Wsp. korelacji = 0,24316  $p < 0,05$



# Badania metabolomu

- ▶ Metabolomika polega na badaniu unikalnych markerów chemicznych poszczególnych procesów metabolicznych w komórce
- ▶ Metabolom reprezentuje odczyt fizjologiczny stanu biochemicznego w różnych obszarach ustroju, dostarcza sygnałów fizjologicznych dotyczących genomu i proteomu odzwierciedlających aktualny stan fenotypowy *Oliver SG 2002*
- ▶ Dane metabolomu mają istotny potencjał w wykrywaniu ryzyka raka i dostarczaniu informacji nt przebiegających procesów karcinogenezy
- ▶ Metaboliczne zmiany w litych nowotworach złośliwych, w tym w RT są od dawna znane, jako efekt Warburga *Warburg 1956*
- ▶ Zmiany metabolizmu ( glikoliza beztlenowa) w komórkach raka pozwala na ich przeżycie w warunkach niedostatecznej podaży tlenu → proliferacja komórek
- ▶ Zastosowanie technik czułej spektrofotometrii masowej w badaniu metabolomu komórek RT doprowadziło do wykrycia wielu drobnych molekuł i metabolitów użytecznych w różnicowaniu RT i łagodnych chorób tego narządu, zwłaszcza lipidów i kwasów tłuszczowych *Zhang 2013*



PEN ACCESS

ORIGINAL ARTICLE

# Metabolic biomarker signature to differentiate pancreatic ductal adenocarcinoma from chronic pancreatitis

Julia Mayerle,<sup>1,2</sup> Holger Kalthoff,<sup>3</sup> Regina Reszka,<sup>4</sup> Beate Kamlage,<sup>4</sup> Erik Peter,<sup>4</sup> Bodo Schniewind,<sup>3</sup> Sandra González Maldonado,<sup>5</sup> Christian Pilarsky,<sup>6</sup> Claus-Dieter Heidecke,<sup>7</sup> Philipp Schatz,<sup>4</sup> Marius Distler,<sup>8</sup> Jonas A Scheiber,<sup>1</sup> Ujjwal M Mahajan,<sup>1,2</sup> F Ulrich Weiss,<sup>1</sup> Robert Grützmann,<sup>6</sup> Markus M Lerch<sup>1</sup>

**Table 1** List of metabolites selected based on the multivariate elastic net analysis comprising the biomarker signature and their analysis of variance results

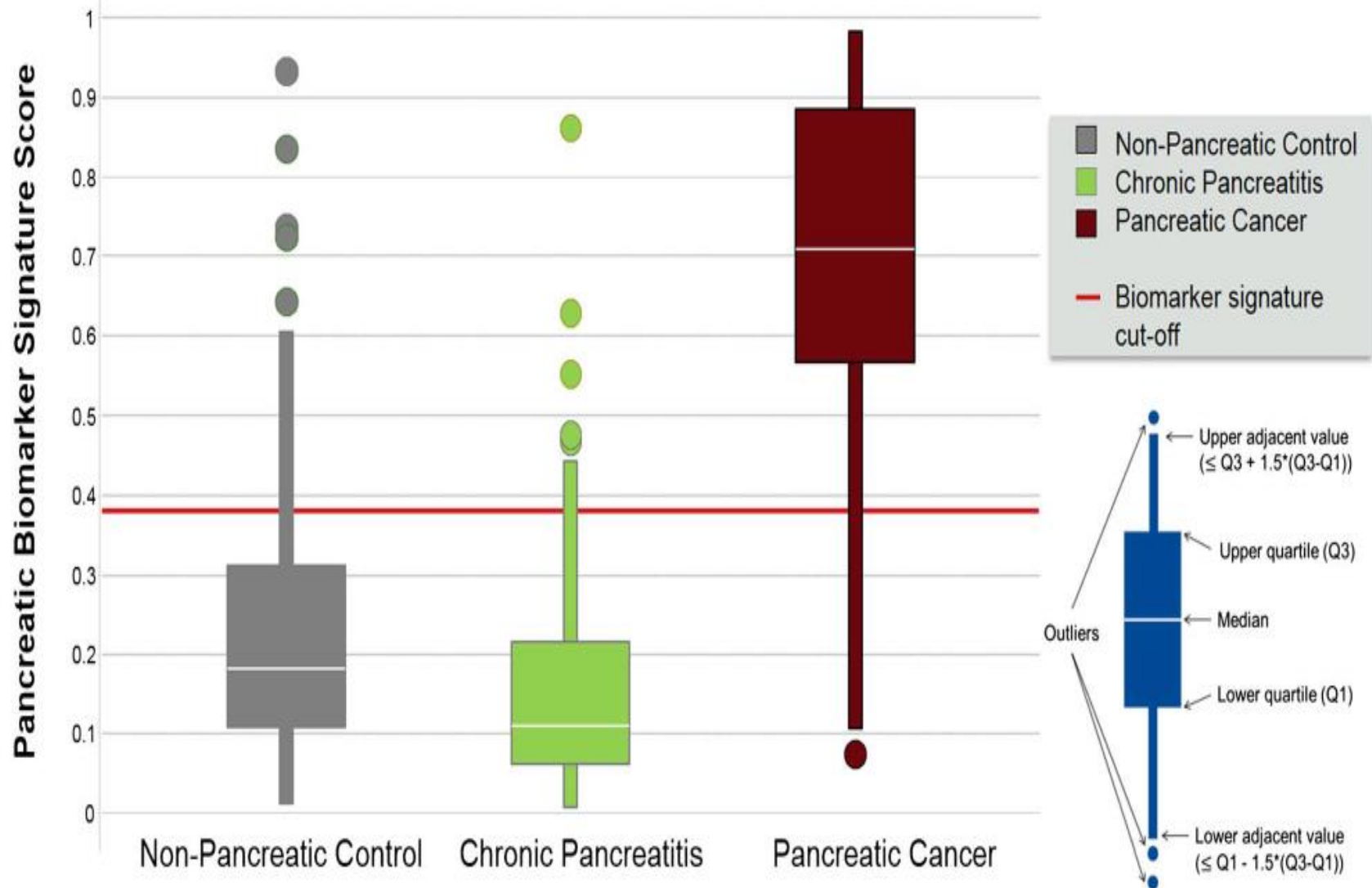
Metabolite name	Trainings set			Test set		
	Fold change	p Value	FDR	Fold change	p Value	FDR
CA19-9	18.36	6.89E-09	7.65E-06	14.27	3.17E-09	1.07E-06
Proline	0.69	2.24E-05	0.0027	0.75	0.0001	0.0082
Sphingomyelin (d18:2,C17:0)	1.15	0.005612	0.0400	1.15	0.0119	0.0696
Phosphatidylcholine (C18:0,C22:6)	1.26	8.59E-05	0.0034	1.06	0.2091	0.4619
Isocitrate	1.26	0.008074	0.0518	0.99	0.9159	0.9377
Sphinganine-1-phosphate (d18:0)	0.79	0.025867	0.1175	0.85	0.0705	0.2430
Histidine	0.77	0.000324	0.0073	0.79	0.0004	0.0109
Pyruvate	0.93	0.367408	0.6114	0.97	0.6479	0.7976
Ceramide (d18:1,C24:0)	0.79	0.001509	0.0167	0.80	0.0087	0.0583
Sphingomyelin (d17:1,C18:0)	1.36	4.86E-05	0.0029	1.37	4.61E-05	0.0078



ORIGINAL ARTICLE

# Metabolic biomarker signature to differentiate pancreatic ductal adenocarcinoma from chronic pancreatitis

Julia Mayerle,<sup>1,2</sup> Holger Kalthoff,<sup>3</sup> Regina Reszka,<sup>4</sup> Beate Kamlage,<sup>4</sup> Erik Peter,<sup>4</sup> Bodo Schniewind,<sup>3</sup> Sandra González Maldonado,<sup>5</sup> Christian Pilarsky,<sup>6</sup> Claus-Dieter Heidecke,<sup>7</sup> Philipp Schatz,<sup>4</sup> Marius Distler,<sup>8</sup> Jonas A Scheiber,<sup>1</sup> Ujjwal M Mahajan,<sup>1,2</sup> F Ulrich Weiss,<sup>1</sup> Robert Grützmann,<sup>6</sup> Markus M Lerch<sup>1</sup>



# Podsumowanie

- ▶ Większość stowarzyszeń i grup ekspertów nadal rekomenduje CA 19-9, jako najlepiej zwalidowany marker RT, niemniej nie znajdujący zastosowania we wczesnej diagnostyce i w badaniach przesiewowych
- ▶ Wykrycie pojedynczego białka które pozwalałoby na wykrycie RT reprezentującego liczne, zróżnicowane zmiany genetyczne jest mało prawdopodobne.
- ▶ Nadzieje należy wiązać z kombinacjami różnych markerów
- ▶ Badania genomu różnych materiałów biologicznych mogą zidentyfikować substancje , które wymagają dalszych badań
- ▶ mRNA w surowicy, profile metaboliczne, krążące DNA etc mogą być użyteczne jako biomarkery w przyszłości
- ▶ Zintegrowane wielośrodkowe badania, rejestry RT, wielonarodowe biobanki i ścisła współpraca są niezbędne dla przyszłego postępu w tej dziedzinie

# Acknowledgements

- ▶ Prof.dr.hab.n.med.Paweł Lampe
- ▶ Prof. dr hab.n.med.Janina Grzegorzczuk
- ▶ Prof. dr hab. n med. Marian Danilewicz
- ▶ Prof. dr hab. n med.Małgorzata Wągrowska-Danilewicz
- ▶ Dr med. Olga Stasikowska
- ▶ Dr hab. Renata Talar-Wojnarowska
- ▶ Dr hab.Anita Gąsiorowska
- ▶ Dr hab. Marek Olakowski
- ▶ Dr Pharm Piotr Szcześniak
- ▶ Dr med.Łukasz Durko
- ▶ Dr Katarzyna Winter