

Profily nízkomolekulárního proteomového spektra získané pomocí hmotnostní spektrometrie SELDI-TOF v sérech pacientů s diseminovaným maligním melanomem: pilotní studie

Profiles of Low-Molecular Proteome Spectrum Obtained through SELDI-TOF Mass Spectrometry in the Sera of Patients with Metastatic Malignant Melanoma: Pilot Study

Lakomý R.¹, Greplová K.², Pilný R.², Budinská E.³, Valík D.², Poprach A.¹, Němeček R.¹, Vyzula R.¹

¹Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav, Brno

²Oddělení laboratorní medicíny, Masarykův onkologický ústav, Brno

³Institut biostatistiky a analýz, Masarykova univerzita, Brno

Souhrn

Úvod: Výzkum na genetické a molekulární úrovni dosahuje v posledních letech nebývalého rozvoje. Od poloviny 90. let se rozvíjí vědní obor – proteomika, která se zabývá studiem genových produktů – bílkovin. Hodnocení bílkovinných profilů v budoucnu pravděpodobně přispěje k přesnější stratifikaci pacientů z pohledu jak predikce léčebné odpovědi, tak i prognózy. S tímto cílem je v dnešní době proteomika využívána k identifikaci nových biomarkerů. Jinak tomu není ani u maligního melanomu, diagnózy bez jasného sérového markeru s vysokou senzitivitou a specifitou. **Metody:** Pomocí surface-enhanced laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS) jsme provedli pilotní analýzu proteinového spektra u 25 pacientů s diseminovaným maligním melanomem, léčených paliativní systémovou chemoterapií na našem pracovišti v letech 2004–2006. Soubor byl rozdělen na dvě skupiny: skupina s nádory rezistentními k chemoterapii – 14 pacientů – a skupina, která měla určitý klinický benefit z podané léčby (kompletní a parciální remise, stabilizace onemocnění) – 11 pacientů. Cílem experimentu bylo objevit proteinové profily charakteristické pro tyto skupiny a dále na základě všech proteinových profilů bez ohledu na léčebnou odpověď provést rozdělení celého souboru pacientů do nových podskupin. Závěrem nás zajímaly rozdíly v laboratorních a klinických parametrech, a to jak mezi skupinami chemorezistentních a chemosenzitivních pacientů, tak i mezi nově vytvořenými podskupinami s podobnými proteinovými profily. **Závěr:** U klinických skupin chemorezistentních a chemosenzitivních pacientů se nám nepodařilo najít signifikantní rozdíly v proteinových profilech ani laboratorních parametrech. U nově vytvořených podskupin z hlediska podobných proteinových profilů se nám podařilo vytipovat pacienty, kteří se od ostatních lišili v laboratorních i klinických parametrech. Výsledky jsou velmi zajímavé a je vhodné pokračovat v dalším výzkumu.

Klíčová slova

proteomika – biomarkery – SELDI-TOF-MS

Projekt byl finančně podpořen grantem IGA NR-8338-3/2005, MZ0MOU2005 a MSMT LC06035

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



MUDr. Radek Lakomý
Klinika komplexní onkologické péče
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: lakomy@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 10. 9. 2008

Přijato/Accepted: 26. 11. 2008

Summary

Backgrounds: Recently, research at genetic and molecular levels has extensively accelerated due to advances in new technologies. Since the mid-90s, a relatively new discipline – clinical proteomics, has evolved, which focuses on studying gene products – proteins. The evaluation of protein profiles may contribute to the more accurate stratification of patients in the future, in terms of both prediction of treatment results and prognosis. In pursuing this objective, proteomic approaches are currently used for the identification of new biomarkers. This is also the case with malignant melanoma, a disease without typical serum marker possessing high sensitivity and high specificity. **Methods:** We analyzed human blood serum samples from 25 patients with metastatic malignant melanoma treated with palliative chemotherapy at the Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, in 2004–2006. The analysis was performed by Surface Enhanced Laser Desorption/Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry (SELDI-TOF-MS). Our patients were divided into two subgroups: a group relatively resistant to chemotherapy – 14 patients – and a group with certain clinical benefit from the treatment (complete and partial remission, stabilized disease) – 11 patients. We were searching for a new biomarker or typical protein profile in the selected two subgroups. Then, we recategorized our patients into three groups according to the similarity of their protein profiles regardless of sensitivity to chemotherapy. Finally, we evaluated differences in laboratory and clinical parameters, between both the groups of chemo-resistant and chemo-sensitive patients, and newly defined subgroups with similar protein profiles. **Conclusion:** We did not identify any significant differences in protein profiles or laboratory parameters in the predefined chemo-sensitive or chemo-resistant groups of patients. However, with regard to the new groups with similar protein profiles, we identified a subgroup of patients with different laboratory and clinical parameters. The results are very interesting and merit further research.

Key words

proteomic – biomarkers – SELDI-TOF-MS

Úvod

Lidský genom je tvořen jen cca 40 000 geny, kdežto proteom – funkční produkt genetické informace (soubor proteinů) – je podstatně složitější a dle odborných odhadů je cca 10–20krát početnější. Jeho podoba je dosti variabilní a je podmíněna mnoha faktory, jako je věk, pohlaví, vnější prostředí, přidružená onemocnění, farmakologická léčba. Jeho dynamičnost je nezbytná pro přežití a je základem adaptačních mechanismů organismu.

V oblasti výzkumu nádorových chorob je stále více úsilí věnováno identifikaci nových biomarkerů, podle kterých by bylo možné relativně rychle, levně a spolehlivě diagnostikovat počáteční stadia nádorových onemocnění, event. jejich recidivu, dále hodnotit léčebnou odpověď, predikovat efekt protinádorové léčby a podat bližší informace stran celkové prognózy pacientů.

Na základě zkušeností z klinické praxe je zřejmé, že prognóza pacientů s disseminovaným maligním melanomem je

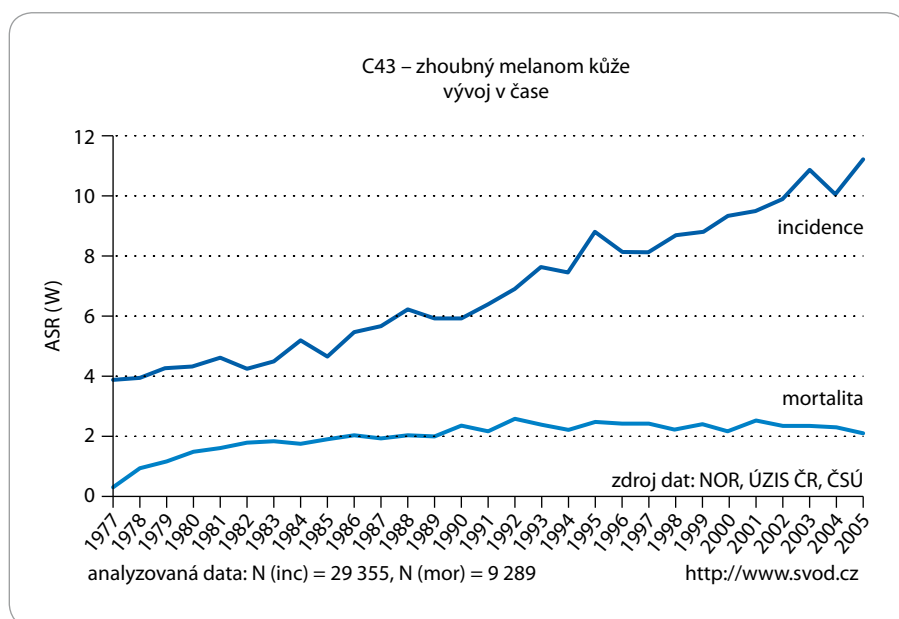
velmi vážná. Onemocnění je obecně považováno za chemo- a radiorezistentní a i multimodální přístup zahrnující kombinovanou chemo-(imuno-)terapii, radioterapii a paliativní chirurgické výkony špatnou prognózu pacientů většinou významně neovlivní.

Přesto se mezi nemocnými s disseminovaným maligním melanomem objeví jedinci s relativně lepší prognózou, bez tendence k časně multiorgánové diseminaci, onemocnění relativně chemosenzitivní, u kterých systémová léčba může prodloužit období bez příznaků nemoci i celkové přežití. Na druhé straně jsou naopak jedinci s evidentně chemorezistentním onemocněním, progredující i přes intenzivní kombinovanou systémovou léčbu a umírající na rychlou progresi během několika málo měsíců.

Dle klinických průběhů onemocnění je jasné, že rozdílné odpovědi k systémové léčbě (chemoterapie, imunoterapie) nespoívají jen s léčbou samotnou, ale jsou též ovlivněny rozdílným biologickým chováním vlastního nádorového onemocnění a složitými vztahy mezi hostitelem a nádorem (graf. 1).

Materiál a metoda

Předmětem zájmu byli pacienti s disseminovaným maligním melanomem (chemoterapií dosud nepředléčení), kteří podstoupili paliativní chemoterapii (± imunoterapii) 1. linie (tab. 1).



Graf 1. Incidence a mortalita na zhoubný melanom kůže.

Tab. 1. Popisná charakteristika analyzovaného souboru pacientů.

Proměnná	Charakteristika
počet pacientů	25
věk – medián v letech (rozmezí)	47,5 (31–70)
pohlaví – muži/ženy	18/7
pozitivní spádové uzliny v době dg. – ano/ne	11/14
adjuvantní INF alfa-2a – ano/ne	12/13
délka podávání adjuvantní INF alfa-2a – medián v měsících (rozmezí)	11,5 (2–12)
disease free survival – medián v měsících (rozmezí)	30 (2–95)
místo relapsu – počet	
kůže a podkoží	11
uzliny	18
plíce	14
játra	5
kosti	6

Tab. 2. Výsledek léčby v závislosti od použitého režimu.

	CR + PR	SD	PD
CVD s/bez cytokinů	3	5	6
BOLD	1	2	3
dakarbazin v monoterapii	0	0	5
celkem	4	7	14

CVD – cisplatina-vinblastin-dakarbazin, BOLD – bleomycin-vinkristin-lomustin-dakarbazin, CR – celková remise, PR – parciální remise, SD – stabilizace onemocnění, PD – progresse onemocnění

Volba režimu byla určována celkovým stavem pacienta, věkem, interkurencemi a rozsahem onemocnění. U pacientů v mladším věku, v dobrém celkové stavu, bez závažných kardiovaskulárních onemocnění, s normálními renálními funkcemi byl preferován režim CVD (cisplatina-vinblastin-dakarbazin) ± imunoterapie (interferon alfa-2a, interleukin-2) – režim dle Leghy. Pro pacienty s vysokým rizikem kardiovaskulárních komplikací, renální insuficiencí nebo postižením CNS v dobrém stavu byl indikován režim s nitrosureou – BOLD (bleomycin-vinkristin-lomustin-dakarbazin) a u pacientů starších, polymorbidních byl doporučen pouze dakarbazin v monoterapii.

Do souboru bylo zařazeno celkem 25 pacientů, 18 mužů a 7 žen, kteří započali paliativní systémovou chemo-(imuno) terapii v MOÚ od srpna 2005 do února 2007. Všichni pacienti měli před zahájením paliativní chemoterapie proveden odběr krve, který jsme uskutečnili do uzavřeného odběrového systému Monovette firmy Sarstedt (Německo) do

zkumavky Neutral. Krev jsme nechali sražit po dobu alespoň 45 min, centrifugovali 20 min při 1 000 g a vzniklé sérum jsme zamrazili při -70°C , z alikvoty dále byly provedeny standardní laboratorní vyšetření včetně CRP, laktátdehydrogenáza – LDH, protein S100b, flowcytometrie a další.

Po absolvování 2–3 cyklů chemoterapie následovalo přešetření zobrazovacími metodami ke zhodnocení léčebné odpovědi.

Na podzim 2007 jsme séra pacientů podrobili proteomické analýze pomocí SELDI-TOF-MS. Měření jsme prováděli na čtyřech typech aktivních chromatografických čipů – a) afinitní chromatografie na imobilizovaných iontech kovů (Cu^{2+}), tzv. IMAC, b) chromatografie vázající hydrofobní proteiny vazbou na nepolární povrch C12, tzv. H50, a c,d) chromatografickým hydrofilním povrchem, tzv. normální fázi, která byla promývána kyselou nebo zásaditou organickou směsí [1]. Přípravu vzorku jsme provedli denurací séra v roztoku vzniklém smí-

cháním 9 mol/l^{-1} močoviny (Fluka, USA), v níž jsme rozpustili iontový detergent 3-(3-cholamidopropyl)dimethylammonio)-propansulfonát (CHAPS, Fluka, USA) v koncentraci 20 g/l^{-1} a následně přidali dithiothreitol (DTT, Sigma Aldrich, USA) na výslednou koncentraci 10 mmol/l^{-1} . Sérum jsme smíchali s touto denaturační směsí v poměru 1 + 1. Takto připravený vzorek jsme 30 min inkubovali při laboratorní teplotě, poté 10 min promíchali na třepače a 10 min centrifugovali při $14\ 000\text{ g}$ a 4°C . Všechny vzorky jsme měřili v triplikátu, tj. celkem jsme naměřili 75 spekter na čtyřech površích, naměřené proteomické profily jsme statisticky vyhodnotili programem Biomarker Wizard dodávaným firmou Ciphergen (USA, dnes Bio-Rad USA). Výsledky našeho měření jsme pak spolu s dalšími laboratorními parametry postoupili statistické analýze.

Cílem pilotního projektu pomocí SELDI-TOF-MS bylo nejprve objevit proteomické profily charakteristické pro skupiny pacientů absolutně chemorezistentních a pacientů s určitou léčebnou odpovědí (stabilizace, parciální a kompletní remise), poté celý soubor dle podobnosti proteinových profilů přerozdělit do nových podskupin, bez ohledu na léčebnou odpověď a na závěr zjistit rozdíly mezi laboratorními a klinickými parametry u skupin chemorezistentních a chemosenzitivních pacientů a též mezi nově vytvořenými podskupinami s podobnými proteinovými profily.

Pro tyto účely byly použity následující metody: Significance analysis of microarrays (SAM), shluková analýza s maticí vzdáleností odvozenou od Spearmanovy korelace a algoritmy shlukování – average linkage, complete linkage, Ward a DIANA a Mann-Whitney test pro porovnání parametrů mezi skupinami chemorezistentních a chemosenzitivních pacientů a Kruskal-Wallis test pro porovnání parametrů mezi nalezenými novými skupinami.

Výsledky

Převážně byl použit režim CVD – 14 pacientů, režim BOLD – 6 pacientů a dakarbazin v monoterapii – 5 pacientů. U 4 pacientů léčených režimem CVD byly do kombinace přidány cytokiny, ve dvou

případech interleukin-2 a v dalších dvou kromě interleukinu-2 i interferon alfa-2a (režim dle Leghy).

V daném souboru pacientů byla u 14 konstatována progresse onemocnění (PD), u 7 stabilizace onemocnění (SD), u 3 parciální remise (PR) a pouze u 1 pacienta byla zaznamenána kompletní remise (CR) (tab. 2).

Dle očekávání měli pacienti s postižením kůže, podkoží a uzlin delší přežití a vyšší četnost léčebných odpovědí. Výjimkou byli dva pacienti, kteří měli masivní kožní postižení končetiny, bez tendence k orgánové diseminaci, relativně dlouhou dobou přežití (téměř dva roky), a přesto zcela rezistentní k podávané systémové léčbě. V případě postižení vnitřních orgánů na tom byli lépe pacienti s plicními metastázami. Nejhorší výsledky z hlediska léčby i přežití měli pacienti s postižením jater, kostí, střev a mozku.

Statistické zhodnocení

a) Hodnocení proteinových profilů u skupin pacientů absolutně chemorezistentních a pacientů s určitou léčebnou odpovědí (stabilizace, parciální a kompletní remise)

Metodou SAM se nám nepodařilo nalézt specifické proteiny nebo proteinové spektrum v daných skupinách pacientů. Celkem bylo hodnoceno 142 píků.

b) Shluková analýza všech proteinových profilů a rozdělení do nových podskupin bez ohledu na léčebnou odpověď.

Metodou shlukové analýzy jsme shlukovali proteinové profily každého povrchu zvlášť a na základě podobnosti daných profilů jsme soubor přerozdělili na 3 podskupiny (tab. 3–4; obr. 2).

c) Porovnání laboratorních a klinických parametrů u pacientů chemorezistentních vs chemosenzitivních a též mezi podskupinami s podobnými proteinovými profily.

- Mezi skupinami chemorezistentních a chemosenzitivních pacientů jsme neshledali signifikantní rozdíly v laboratorních parametrech, z klinických parametrů měli chemosenzitivní pacienti častěji postižení kůže a podkoží.
- Mezi skupinami 1–3 (rozdělení dle podobných proteinových profilů) jsme našli významné trendy jak v laborator-

Tab. 3. Rozdělení souboru na tři podskupiny dle podobnosti proteinových profilů a ztah k léčebné odpovědi.

Shluk	N (počet)	Zastoupení klinické skupiny			
		rezistentní (R)		senzitivní (S)	
1	4	3	75,0%	1	25,0%
2	13	6	46,2%	7	53,8%
3	8	5	62,5%	3	37,5%
celkem	25	14	56,0%	11	44,0%

Tab. 4. Expres píků definujících shluky vytvořené shlukováním všech povrchů algoritmem DIANA. + znamená zvýšenou, – sníženou hladinou výskytu v oblasti píků oproti ostatním shlukům.

Píky definující skupiny (M/Z v Da)	Skupina pacientů		
	1	2	3
3 209, 3 308	–	+	+
3 927	–	+	+
4 082, 4 338	–	+	+
4 588	+	+	–
4 693	+	+	–
6 424, 6 622, 6 828	–	+	+
6 875	–	+	+
8 553, 8 681	–	+	+
9 180	+	+	–
9 286	+	+	–
9 340	+	+	–
11 510–11 674	+	–	–
13 747	–	+	+
18 327, 18 356, 18 546	+	+	–

1. skupina 4 pacientů 1, 3, 7, 22 byla definována hlavně zvýšenou hladinou výskytu na pozicích píků 11 510–11 674 kDa a sníženou hladinou výskytu v oblastech 3 209, 3 309, 4 082, 4 340, 6 872, 8 553, 8 681 a 13 747 kDa.

3. skupina 8 pacientů 4, 20, 16, 8, 14, 21, 5, 13 byla definována hlavně sníženou hladinou výskytu v oblasti 4 588 a 4 693 kDa a v oblasti 9 180–9 340 kDa.

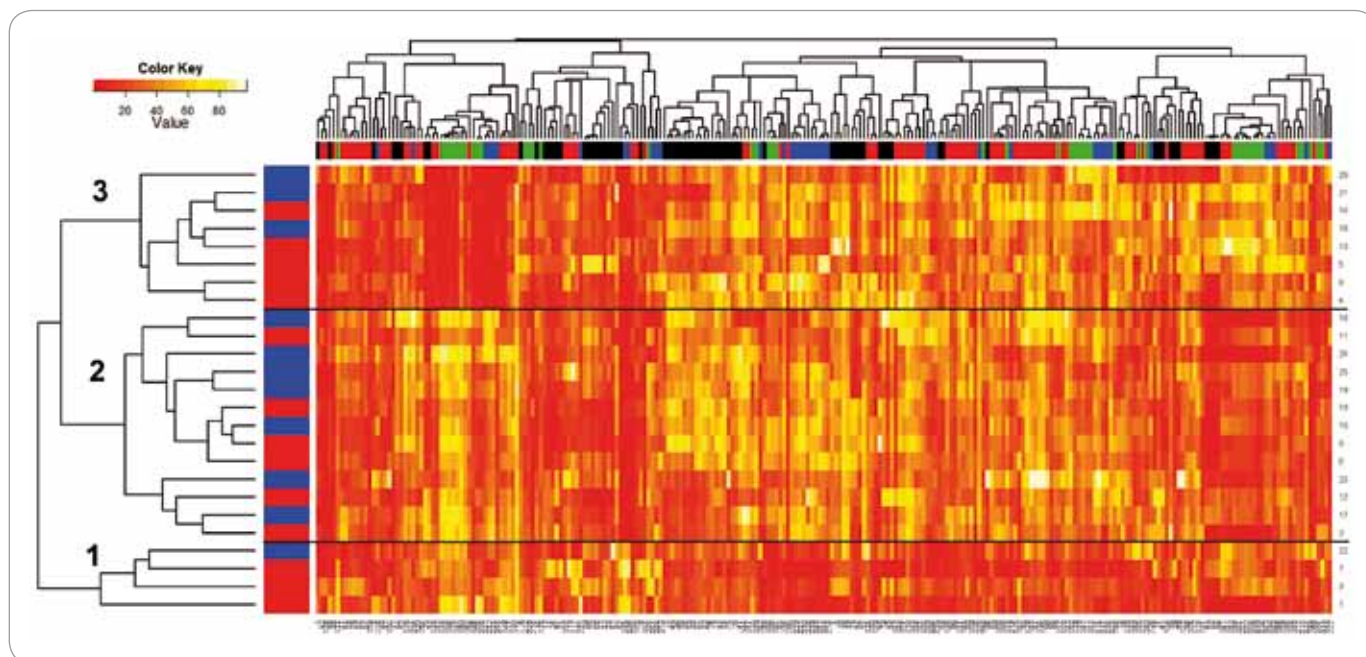
ních, tak i v klinických parametrech, a to především ve skupině 1. Tato skupina čtyř pacientů měla signifikantně vyšší hladinu proteinu S100B ($p = 0,008$), CRP ($p = 0,021$) a signifikantně nižší hladinu albuminu ($p = 0,007$) a hemoglobinu ($p = 0,013$). Z klinických parametrů u 1. skupiny dominovalo postižení jater ($p < 0,001$), plic ($p = 0,021$) a uzlin ($p = 0,001$). Vzhledem k nízkému počtu pacientů ve skupině 1 jsou uvedené p -hodnoty spíše orientační a nelze z nich vyvozovat obecně platné závěry.

Závěr

Ve skupinách chemorezistentních a chemosenzitivních pacientů s disemino-

vaným maligním melanonem se nám metodou SELDI-TOF-MS zatím nepodařilo identifikovat evidentní odlišný protein nebo specifické proteinové spektrum. Pomocí shlukovací analýzy se nám ale podařilo rozdělit soubor na podskupiny s podobnými proteinovými profily, které měly také korelaci v určitých laboratorních a klinických parametrech, což hodnotíme jako zajímavý a nečekaný výsledek. Výsledky našeho pilotního hodnocení mohou být jistě ovlivněny malým souborem pacientů, jeho nehomogenitou jak z pohledu použité léčby, tak z pohledu rozdílného rozsahu onemocnění.

Zavedení analýz proteomových profilů do onkologické praxe k přesnější stratifi-



Obr. 2. Heatmapa zobrazující výsledek shlukování DIANA na všech površích. Řádky představují jednotlivé pacienty, sloupce jednotlivé m/z. Barevně jsou dále odlišeni pacienti (modrá – chemosenzitivní pacient, červená – chemorezistentní pacient) i povrchy (H50 – černá, IMAC – modrá, NP20 kys – zelená, NP20zas – červená). Jednotlivé buňky zobrazují intenzitu výskytu jednotlivých fragmentů na příslušných m/z, a to na barevné škále v rozmezí od nejnižší hodnoty (0 – červená), po nejvyšší (100 – bílá; viz Color Key). Černé horizontální přímky vymezují tři skupiny pacientů.

kaci pacientů a jejich nádorových onemocnění má pravděpodobně obrovský potenciál. Dle typických proteinových profilů bude šance s určitou pravděpodobností odhalit časná stadia onemocnění, optimalizovat léčbu, predikovat a hodnotit její efektivitu, blíže podat informace o předpokládané prognóze. Svě místo může mít potenciálně i k zachycení časného, terapií ovlivnitelného relapsu onemocnění.

Literatura

- Pilný R, Michalová E, Brožková K et al. Příprava biologického materiálu pro metodu SELDI TOF MS. Brno: Edukační sborník XXXI. Brněnské onkologické dny 2007: 360.
- Wilson LL, Tran L, Morton DL. Detection of differentially expressed proteins in early-stage melanoma patients using SELDI-TOF mass spectrometry. *Ann NY Acad Sci* 2004; 158: 40–50.
- Helanová S, Vyzula R, Žaloudík J et al. Technologie ciphergen – nová perspektiva v proteomice. *Klinická onkologie* 2004; 17 (5): 157–161.
- Liotta LA, Petricoin EF. General keynote: proteomic patterns in sera serve as biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2003; 88(1Pt 2): S25–S28. Discussion S37–S42.
- Mian S, Ugurel S, Parkinson E. Serum Proteomic Fingerprinting Discriminates Between Clinical Stages and Predicts Disease Progression in Melanoma Patients. *J Clin Oncol* 2005; 23: 5088–5093.
- Litvak A, Gupta R, Yee R. Endogenous Immune Response to Early and Intermediate-Stage Melanoma Is Correlated with Outcomes and Is Independent of Locoregional Relapse and Standard Prognostic Factors. *J Am Coll Surg* 2004; 198: 27–35.
- Ding Y, Prieto V, Zhang P. Nuclear Expression of the Antiapoptotic Protein Survivin in Malignant Melanoma. *Cancer* 2006; 106: 1123–1129.
- Geilen Ch, Georgieva J, Milling A. Malignant Melanoma – Markers for Progression and Prognosis in Malignant Melanoma. *Front Radiat Ther Oncol*. Basel: Karger 2006; 39: 120–126.
- Češková P, Brožková K, Hernychová L et al. Hmotnostní spektrometrie v kvantitativní a diagnostické proteomice: možnosti a limitace. *Chem listy* 2006; 100 (11): 974–979.
- Brožková K, Knofličková D, Hernychová L et al. Identifikace potenciálních biomarkerů karcinomu prsu metodou SELDI-TOF-MS. *Klin onkol* 2007; 20(6): 377–383.
- Pilný R, Bouchal P, Borilova S et al. Surface-Enhanced Laser Desorption Ionization/Time-of-Flight Mass Spectrometry Reveals Significant Artifacts in Serum Obtained from Clot Activator-Containing Collection Devices. *Clin Chem* 2006; 52(11): 2115–2116.
- Dušek L, Mužík J, Kubásek M et al. Český národní webový portál epidemiologie nádorů [online]. Masarykova univerzita. Přístup z 2. 2. 2008. <http://www.svod.cz.Verze 7.0>.
- Tusher VG, Tibshirani R et al. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(9): 5116–5121.