

A szérum zsírsavprofil diagnosztikus jelentőségének vizsgálata kísérletes modellben

Telekes András¹, Rásó Erzsébet², Vékey Károly³

¹Bajcsy-Zsilinszky Kórház, Onkológiai Osztály, ²Semmelweis Egyetem, II. sz. Patológiai Intézet, ³Magyar Tudományos Akadémia Kémiai Kutatóközpont, Tömegspektrometriai Osztály, Budapest

MKOT-Pfizer 2008 kutatási pályázat nyertese

Munkánk célja a szérum zsírsavprofiljának vizsgálata diagnosztikus alkalmasság szempontjából. Tizenkét C57Bl/6 hím egérbe, szemiortotopikus lokalizációban (sc.), B16 egér melanómasejteket implantáltunk (10^6 sejt/állat). A tumor beültetését követő 7., 14. és 21. napon időpontonként 4-4 állatot, altatást követően szívpunkcióval elvéreztettünk. A minták lipidprofiljának vizsgálatához extrakción és HPLC-MS-analitikán alapuló módszert dolgoztunk ki. Az MS-analízis segítségével meghatároztuk a vizsgált 14 zsírsavra jellemző jelintenzitásokat, a tumormentes állatokban, illetve a tumor beültetése után 3 időpontban. Az MS-görbék matematikai analízise azt mutatta, hogy a lipidprofil változása nem szignifikáns a kontroll (tumormentes) illetve a tumorbeültetést követő 1, 2, illetve 3 hét után vett minták között, illetve a tumorprogresszió folyamán (1-3. hét mintáiban). Három zsírsav esetén (mirisztinsav, palmitoleinsav, eikozadiénsav) a tumorprogresszió folyamán trendet észleltünk, ezek jelentőségének megítéléséhez azonban további vizsgálatokra van szükség. Experimentális egér melanóma esetén az általunk vizsgált zsírsavprofil nem tűnik alkalmasnak korai diagnózis céljából történő felhasználásra. Magyar Onkológia 55:199-204, 2011

Kulcsszavak: tömegspektrometria, melanóma, zsírsavprofil, diagnosztikus marker

The aim of this study was to investigate whether fatty acid profile is a suitable marker for diagnostic purposes in mouse melanoma. Twelve C57Bl/6 male mice were implanted with B16 mouse melanoma cells (10^6 cells/animal) orthotopically (subcutaneously). After the implantation 4-4 animals were bled by cardiac puncture following narcosis, at days 7, 14, and 21. In order to investigate fatty acid profiles a method based on extraction and HPLC-MS was developed. Signal intensities of 14 fatty acids were determined by mass spectrometry in tumor-free animals as well as tumor bearing animals at the three time points. Mathematical analysis showed non-significant profile changes when control (tumor-free) animals were compared to tumor-implanted ones as well as during tumor progression on week 1, 2 and 3. In case of three fatty acids (myristic acid, palmitoleic acid and eicosadienoic acid) a trend was observed during tumor progression but its statistical significance cannot be evaluated without further investigations. The fatty acid profile cannot be used for early diagnoses in mouse melanoma.

Telekes A, Rásó E, Vékey K. Investigation of fatty acid profile for diagnostic purposes in mouse melanoma. Hungarian Oncology 55:199-204, 2011

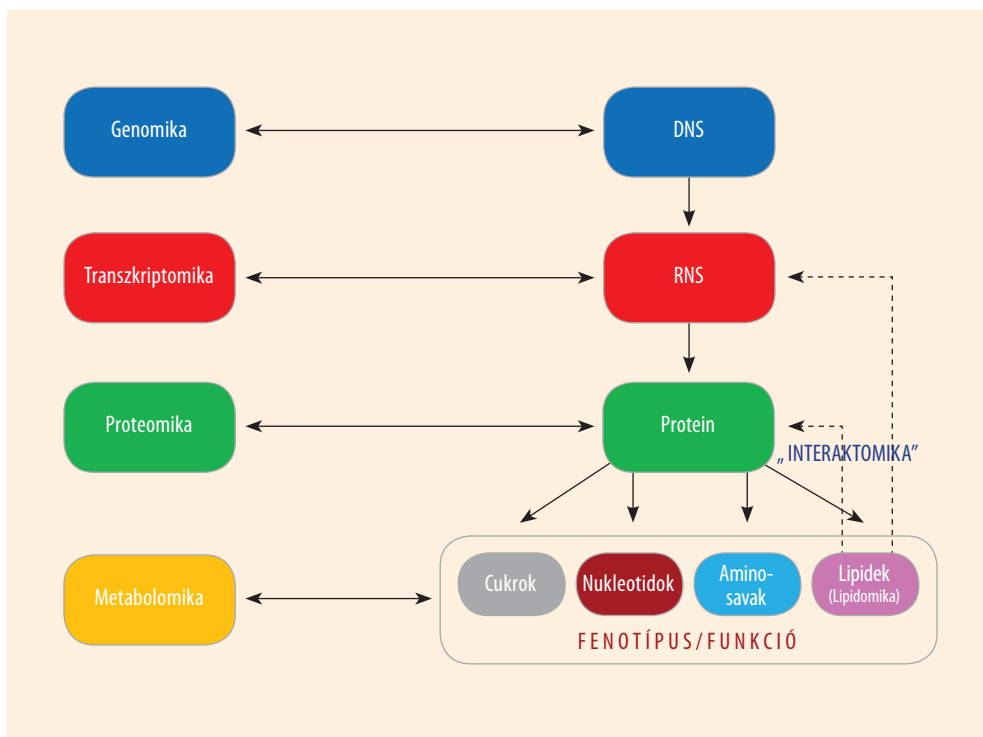
Keywords: mass spectrometry, melanoma, fatty acid profile, diagnostic marker

Levelezési cím: Dr. Telekes András, 1106 Budapest, Maglódi út 89-91.
Telefon: (36-20) 339-6523, Fax: (06-1) 432-7516, E-mail: andras.telekes@bajcsy.hu

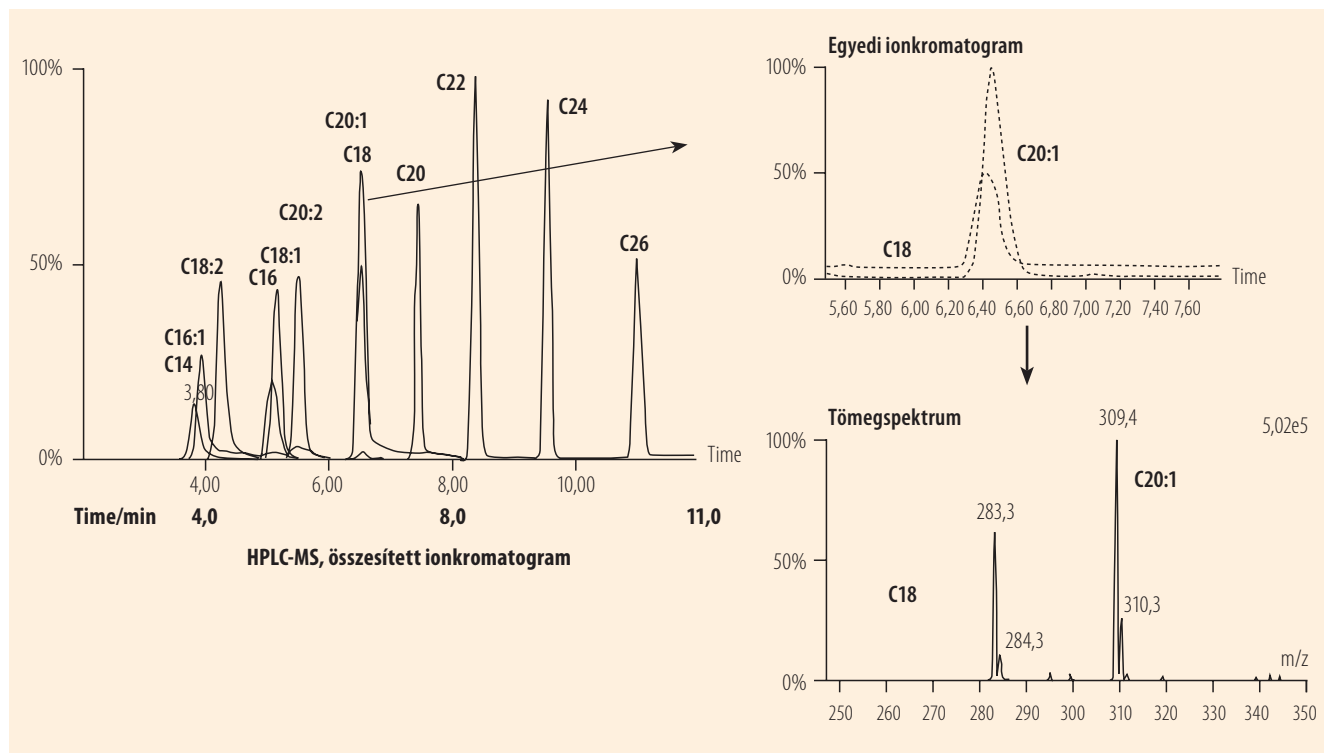
BEVEZETÉS

A tömegspektrometria (mass spectrometry – MS), mint az egyik legérzékenyebb analitikai módszer, egyre fontosabb szerepet tölt be az orvostudományi kutatásokban. Alkalmazási lehetőségei a gyógyszerszintek mérésétől a klinikumon át (beleértve a diagnosztikus, terápiás, prediktív biomarker-kutatásokat) a molekulák leképezéséig terjed (2, 17, 18). Mivel egy mérés során számos molekuláról lehet információt nyerni, a tömegspektrometria alapvető szerepet tölt be az úgynevezett „omik” kutatásokban. E kutatások irányvonalait, illetve a lipidomika helyét ezeken belül az 1. ábrában tüntetjük fel.

1. ábra. Az „OMIK” rendszer és a lipidomika



2. ábra. A zsírsav-standard mérése. A HPLC-n a C18 és C20 csúcsok egymást fedik, míg az MS-spektrumon ezek egyértelműen elkülönülnek, ami az MS jóval nagyobb szelektivitását mutatja.



A lipidomika a zsírszerű anyagokkal foglalkozik (pl. foszfolipidek, glikolipidek, szterol-lipidek, szfingolipidek, stb.). Fontos megérteni, hogy a zsírsavak csak a lipidomika egy „szeletét” jelentik. A zsírsavakat a szénatomok, illetve a molekulában található kettős kötések száma alapján osztályozzák.

A lipidek alapvető szerepet játszanak a sejtélettani folyamatokban, beleértve az intracelluláris jelátviteli folyamatokat, az elektrokémiai grádiens fenntartását, az energia tárolását, fehérjék szállítását és sejtmembránhoz való lehorgonyzását (20). A lipidmolekulák legismertebb szerepe a kétrétegű lipidrétegből álló membránok képzése, melyek lehetővé teszik a molekulák térbeli elválasztását celluláris és szubcelluláris szinten egyaránt. Mi több, a lipidmembránok fizikailag támogatják a membránhoz kötött fehérjéket és funkcionálisan is együttműködnek azokkal. Ma úgy tartják, hogy az összes fehérjék 20–30%-a sejtmembránhoz integrálódott fehérje (19).

A lipidomika és a daganatos elfajulás közti összefüggéseket csak az utóbbi időben kezdik felismerni. A linoleinsav magas koncentrációban (300 micromol/l felett) gátolta, míg alacsony (100–200 micromol/l) koncentrációban ser-

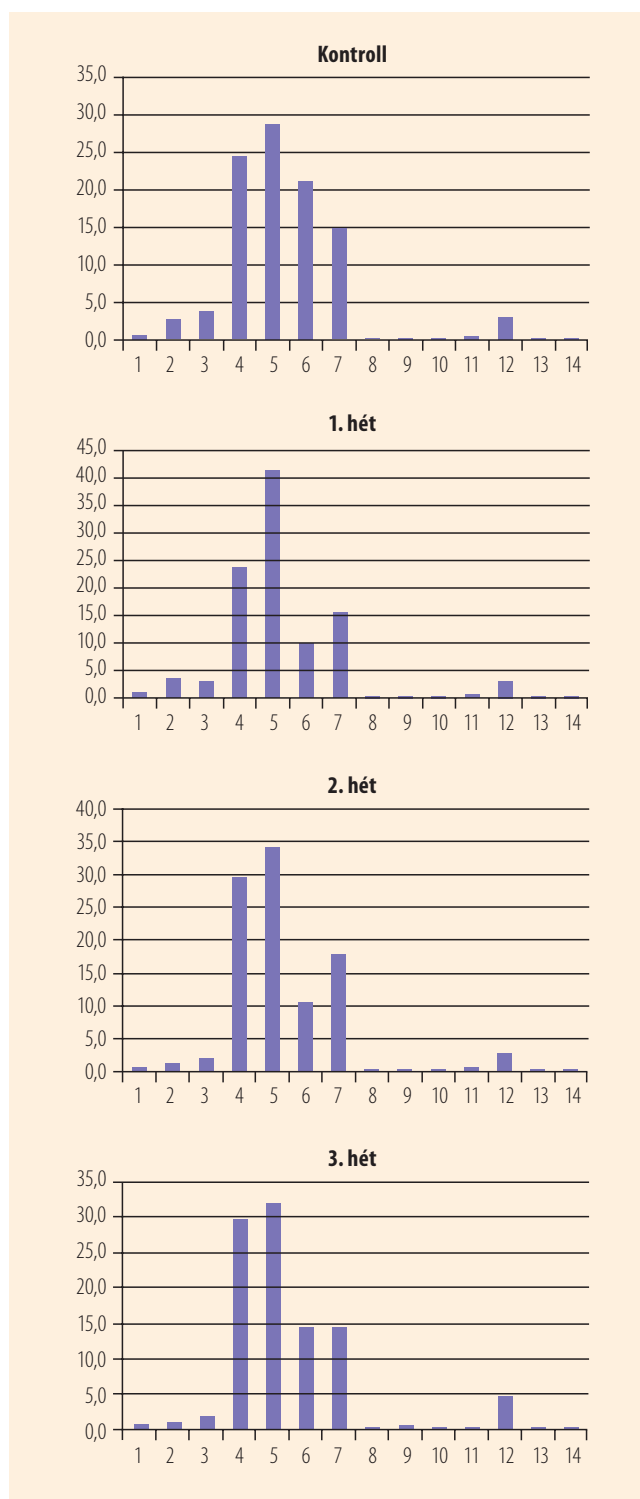
kentette colorectalis daganatsejtek proliferációját. A magas zsírsavkoncentráció okozta sejtosztódásgátlás hátterében a linoleinsav oxidatív stresszt keltő, illetve a mitochondrium működési zavarát okozó hatása áll (5). Más vizsgálat szerint a daganatos és nem daganatos sejtek osztódásához szükséges metabolikus „igény” nem különbözik. A daganatsejtek a fokozott proliferációt a zsírépítő/zsírbonító rendszer optimalizálásával érik el. Ebben alapvető szerepet játszik a HER2-túlprodukció (ami önmagában is rossz prognosztikai faktort jelent a klinikumban). Mi több, a daganatos fenotípusú sejt proliferációja és túlélése függ az „onkogén” lipidmetabolizmustól (9). A de novo lipidszintézis aktiválódása a daganatsejtekben az agresszív növekedés egyik jellemzője. Ennek egyik potenciális magyarázata, hogy a membrán lipidszaturációja megvédi a daganatsejteket a szabad gyököktől és a kemoterápiás szerektől egyaránt (13). A doxorubicin-rezisztenciát például összefüggésbe tudták hozni a sejtmembrán lipid összetevőinek és biofizikai tulajdonságainak változásával emlőráksejtekben (12). A membránban található fokozott szfingolipid-

1. táblázat. Egér plazma zsírsavösszetételének vizsgálata

Zsírsvav	M-1	Jel	Kontroll		1. hét		2. hét		3. hét	
			AVE	Sum%	AVE	Sum%	AVE	Sum%	AVE	Sum%
C12:0	199	1	13	0,46	15	0,80	16	0,63	16	0,49
C14:0	227	2	77	2,60	24	1,26	28	1,14	29	0,93
C16:1	253	3	109	3,70	59	3,03	52	2,09	58	1,83
C16:0	255	4	718	24,34	456	23,54	733	29,63	933	29,61
C18:2	279	5	844	28,60	797	41,18	841	34,00	1007	31,93
C18:1	281	6	625	21,19	195	10,05	262	10,57	456	14,48
C18:0	283	7	435	14,74	300	15,48	438	17,71	457	14,49
C20:5	301	8	6	0,20	3	0,17	4	0,15	8	0,26
C20:2	307	9	7	0,24	6	0,29	8	0,34	17	0,53
C20:1	309	10	8	0,26	6	0,29	9	0,36	9	0,30
C20:0	311	11	11	0,38	10	0,49	11	0,43	8	0,24
C22:6	327	12	87	2,96	58	3,01	65	2,61	147	4,68
C22:0	339	13	5	0,18	5	0,24	4	0,18	4	0,12
C24:0	367	14	4	0,14	3	0,17	4	0,16	3	0,11
Összeg:			2950	100,00	1935	100,00	2474	100,00	3152	100,00

AVE: abszolút intenzitások átlaga az 5 kontroll, illetve 4–4 tumoros egérminta esetén;
M-1: molekulatömeg-1

3. ábra. 14 zsírsav mintázata egér melanómában. A függőleges tengelyen a zsírsavak százalékos megoszlása látható (felhívjuk a figyelmet az eltérő skálabeosztásra), a vízszintes tengelyen az egyes oszlopok az egyes zsírsavakat reprezentálják, az 1. táblázatban megadott sorrendben.



metabolizmus (pontosabban a szfingozin-1-foszfát szintje) a tumorprogresszióval és a daganatsejtek gyógyszer-rezisztenciájával volt kapcsolatba hozható. Ezért a szfingolipid-metabolizmus potenciális daganatterápiás célpontnak tekinthető (11). A zsírsavszintetáz (fatty acid synthase – FAS) egy komplex, multifunkcionális enzim, központi szerepet játszik zsírsavak szintézisében. Az utóbbi időben ennek fokozott szintjét észlelték különféle daganatok esetén, így onkoterápiás célponttá vált (4, 6, 7).

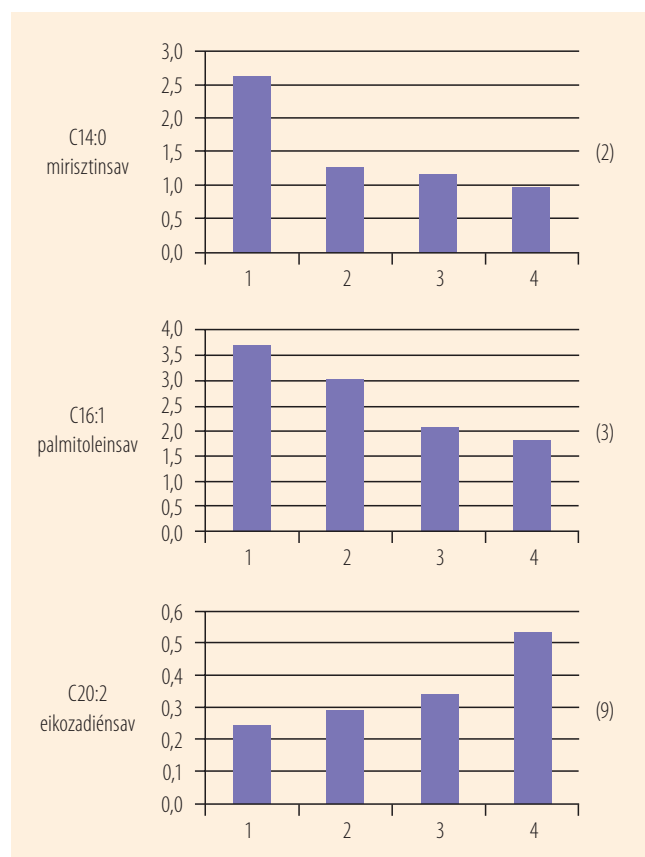
A zsírsavak és a melanóma kapcsolatáról is vannak sporadikus adatok. Az egyik legkorábbi adat 1984-ből származik. A B16 egér melanóma fokozottan áttétképző változatát (B16-F10) hasonlították össze az alacsony metasztatizáló képességű variánsal (B16-F1) a sejtmembrán, microsome és mitochondrium lipidösszetevőinek, illetve a membránhoz kötött enzimaktivitások szempontjából. A kísérletek során egyértelmű eltéréseket találtak, nevezetesen, a B16-F10 sejtmembránjában alacsonyabb koleszterin/foszfolipid arányt, alacsonyabb arachidonsav- és nemszaturált zsírsav-szintet, illetve emelkedett foszfatidilkolin/foszfatidiletanolamin arányt és szukcinát citokróm c-reduktáz aktivitást mutattak ki a B16-F1-hez viszonyítva (15). Továbbá, az atorvastatin hypercholesterinaemia kezelésére használt koncentrációban, in vivo vizsgálatban csökkentette a RhoC fehérjét túlermelő humán melanómasejtek áttétképző képességét (1). Végül, egy vizsgálat megerősítette, hogy a B16 melanómasejtek az áttétképzés során a vérplazmában detektálható gangliozidokat szekretálnak (14). Vizsgálatunk célja egerbe ültetett B16 melanómasejtek esetén a plazma-lipidprofil vizsgálata volt a tumor progressziója során, valamint annak tisztázása, hogy a lipidprofil esetleges megváltozása felhasználható-e korai diagnózis céljából.

ANYAG ÉS MÓDSZER

12 C57Bl/6 hím egerbe szemiorototopikus lokalizációban (sc.) B16 egér melanómasejteket (10^6 sejt/állat) implantáltunk. A tumor beültetését követő 7., 14. és 21. napon időpontonként 4–4 állatot, altatást követően szívpunkcióval elvégezettünk. A heparinnal véralvadást gátló mintákat 4°C -on 10000 g fordulatszámon 10 percig centrifugáltuk. A vérplazmát elkülönítettük a sejtes elemektől és a mérésig -80°C -on tároltuk. Kontrollként 5 egészséges, a tumorimplantált állatoknak megfelelő korú és nemű állatból nyert, a fentieknek megfelelő eljárás szerint preparált plazmát használtunk.

A minták lipidprofil-vizsgálatához extrakción és HPLC-MS-analitikán alapuló módszert dolgoztunk ki. A módszer kalibrálásához több zsírsav ekvimoláris elegyét tartalmazó metanolos standard oldatot készítettünk. Ez C10:0, C12:0, C14:0, C16:1, C16:0, C18:2, C18:1, C18:0, C20:5, C20:2, C20:1,

4. ábra. A zsírsavanalízis során észlelt trendek. A függőleges tengelyen az adott zsírsavak mennyiségét mutatjuk be relatív egységekben, az 1., 2., 3., illetve 4. oszlop a kontroll, illetve a tumorbeültetést követő 1, 2, 3 hét után vett mintát jelenti. A zárójelbe tett számok az 1. táblázatban megadott sorrendet jelentik.



C20:0, C22:6, C22:0, C24:0, C26:0 zsírsavakat tartalmazott (Sigma-Aldrich), 50–50 μM koncentrációban. A mintát előkészítés során hidrolizáltuk (a kötött formában jelenlevő zsírsavak felszabadítása céljából) [100ml plazma + 80 ml 5 M sósav + 200 ml ACN (80 °C, 1 óra)]. A keveréket 2x0,5 ml hexánnal extraháltuk. A hexános oldatot N_2 -áramban bepároltuk, majd a visszamaradó szilárd anyagot 100 ml metanolban oldottuk, melyből 10 μl aliquotot vizsgáltunk. Az alkalmazott berendezések: Waters Quattro MICRO TANDEM MS (ESI negatív ionizációs módban). Az MS-analízis segítségével meghatároztuk az egyes zsírsavakra jellemző jelintenzitásokat, melyek a megfelelő plazmakoncentrációkkal arányosak. A vizsgálatok elsődleges célja az egyes egyedekben észlelt plazmakoncentrációk összehasonlítása, nem pedig a plazmakoncentrációk pontos meghatározása, így precíz kvantitatív vizsgálatokat nem végeztünk. A relatív koncentrációk (jelintenzitások) meghatározásának

reprodukálhatósága, azaz a standard deviáció (az analitikai mérés hibája) átlagosan 8%. Az egyes egyedek közötti biológiai eltérés szórása átlagosan 30%.

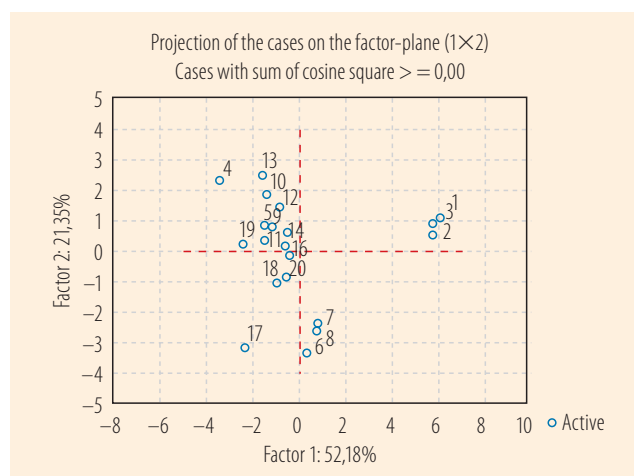
EREDMÉNYEK

A HPLC-MS-vizsgálatok eredményét a standard mérések esetén a 2. ábrán illusztráljuk. A lipidprofil-vizsgálat során 14 zsírsav szintjét mértük a tumormentes állatokban, illetve 7, 14 és 21 nappal a tumorbeültetést követően. A mérések részletes eredményeit az 1. táblázatban tüntettük fel. Mivel a számokat nehéz átlátni, a zsírsavak százalékos arányát mutató mérési adatokat grafikusán is bemutatjuk a 3. ábrán.

Három zsírsav esetén (mirisztinsav C14:0, palmitoleinsav C16:1, eikozadiénsav C20:2) jól látható tendenciát észleltünk e zsírsavak mennyisége és a tumoros megbetegedés előrehaladása között. Ezt mutatja a 4. ábra. A mirisztinsav és palmitoleinsav mennyisége a tumorprogresszióval csökkenő, míg az eikozadiénsavé emelkedő értékeket mutatott. A vizsgálatokban azonban csak kis esetszámot vizsgáltunk, így a fenti tendenciákból statisztikailag szignifikáns következtetést nem lehet levonni.

Az tömegspektrometriás eredményeket főkomponens-analízis (PCA) segítségével is értékeltük. A PCA grafikus eredményét az 5. ábrán mutatjuk be. A PCA egy multivariáns adatokat elemző statisztikai módszer; egy adatvezérelt technika, mely egy adathalmazon belül a variancia-kovariancia struktúrát elemzi. Nem a valószínűség-modellen,

5. ábra. A PCA analízis eredménye. A két tengelyen a zsírsavak koncentrációinak lineáris kombinációjából származó főkomponensek értékei szerepelnek. Az ábrán az egyes mintacsoportok nem különülnek el szignifikáns mértékben. A minták jelzése: 1-3. vak minta; 4-8. kontroll; 9-12. 1. hét; 13-16. 2. hét; 17-20. 3. hét



hanem azon alapul, hogy multivariáns adatokat tartalmazó nagy adathalmaz esetén csökkenti az adatok dimenzióit. Az eredmények azt mutatják, hogy (részben a kis esetszám következtében) a lipidprofil-vizsgálatban észlelt különbségek nem szignifikánsak a kontroll (tumormentes) illetve a tumorbeültetést követő 1, 2, illetve 3 hét után vett minták között, illetve a tumorprogresszió folyamán (1–3. hét mintáiban).

MEGBESZÉLÉS

Experimentális egér melanóma esetén az általunk vizsgált zsírsavprofil nem tűnik alkalmasnak korai diagnózis céljából történő felhasználásra. Egyes zsírsavak esetén (lásd 4. ábra) trendet észleltünk, ezek jelentőségének megítéléséhez azonban további vizsgálatokra van szükség.

A mirisztinsav a fehérjét a transzláció során módosítani képes (21). Ennek során a mirisztinsav az N-terminális glicinhez kötődik kovalens módon (N-mirisztóiláció). Ez általában irreverzibilis fehérjemódosuláshoz vezet. A folyamatot az NMT (N-terminális mirisztóil-transzferáz) enzim végzi (3). Ezeknek a lipoproteineknek pontos szerepe nem ismert. Egyes daganatokban az NMT fokozott aktivitását észlelték, így az terápiás célponttá vált (16). A daganatok fokozott NMT-aktivitása magyarázhatja a szérum-mirisztinsav csökkenését a tumorprogresszió során.

A palmitoleinsav a lipogenezis egyik végterméke. Magas szintje csökkenti a FAS-aktivitást. A tumorprogresszió során csökkenő palmitoleinsav-szint magyarázhatja, hogy a daganatokban miért magas a FAS-aktivitás.

Az eikozadiénsav egy omega-6 zsírsav, mely kompetitív módon gátolja az inozin-5'-monofoszfát-dehidrogenázt (IMPDH) (10). Az IMPDH a guanin-nukleotidok ráta-limitáló enzime, ami a nukleinsavakhoz mind in vivo, mind in vitro kötődik (8). A tumorprogresszió során emelkedő eikozadiénsav-koncentráció részben magyarázhatja, hogy miért lassul le a tumornövekedés (Gompertz növekedési görbe).

IRODALOM

1. Collisson EA, Kleer C, Wu M, et al. Atorvastatin prevents RhoC isoprenylation, invasion, and metastasis in human melanoma cells. *Mol Cancer Ther* 2:941–948, 2003

2. Dill AL, Eberlin LS, Ifa DR, Cooks RG. Perspectives in imaging using mass spectrometry. *Chem Commun (Camb)* 47:2741–2746, 2011
3. Farazi TA, Waksman G, Gordon JL. The biology and enzymology of protein N-myristoylation. *J Biol Chem* 276:9501–9504, 2001
4. Flavin R, Peluso S, Nguyen PL, Loda M. Fatty acid synthase as a potential therapeutic target in cancer. *Future Oncol* 6:551–562, 2010
5. Lu X, Yu H, Ma Q, et al. Linoleic acid suppresses colorectal cancer cell growth by inducing oxidant stress and mitochondrial dysfunction. *Lipids Health Dis* 9:106, 2010
6. Lupu R, Menendez JA. Pharmacological inhibitors of fatty acid synthase (FASN) – catalyzed endogenous fatty acid biogenesis: a new family of anticancer agents? *Curr Pharm Biotechnol* 7:483–493, 2006
7. Mashima T, Seimiya H, Tsuruo T. De novo fatty-acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy. *Br J Cancer* 100:1369–1372, 2009
8. McLean JE, Hamaguchi N, Belenky P, et al. Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase binds nucleic acids in vitro and in vivo. *Biochem J* 379:243–251, 2004
9. Menendez JA. Fine-tuning the lipogenic/lipolytic balance to optimize the metabolic requirements of cancer cell growth: molecular mechanisms and therapeutic perspectives. *Biochim Biophys Acta* 1801:381–391, 2010
10. Mizushima Y, Dairaku I, Yanaka N, et al. Inhibitory action of polyunsaturated fatty acids on IMP dehydrogenase. *Biochimie* 89:581–590, 2007
11. Oskouian B, Saba JD. Cancer treatment strategies targeting sphingolipid metabolism. *Adv Exp Med Biol* 688:185–205, 2010
12. Peetia C, Bhavre R, Vijayaraghavalu S, et al. Drug resistance in breast cancer cells: biophysical characterization of and doxorubicin interactions with membrane lipids. *Mol Pharm* 7:2334–2348, 2010
13. Rysman E, Brusselmans K, Scheyts K, et al. De novo lipogenesis protects cancer cells from free radicals and chemotherapeutics by promoting membrane lipid saturation. *Cancer Res* 70:8117–8126, 2010
14. Saha S, Mohanty KC. Secretion of metastases related gangliosides by mouse B16-melanoma in circulation in vivo and in culture media in vitro. *Indian J Exp Biol* 42:976–980, 2004
15. Schroeder F, Gardiner JM. Membrane lipids and enzymes of cultured high- and low-metastatic B16 melanoma variants. *Cancer Res* 44:3262–3269, 1984
16. Selvakumar P, Pasha MK, Ashakumary L, et al. Myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase: a novel molecular approach for cancer therapy. *Int J Mol Med* 10:493–500, 2002
17. Telekes A, Hegedűs M, Kiss I. Mass spectrometry in clinical treatment. In: *Medical Application of Mass Spectrometry*. Eds. Vékey K, Telekes A, Vertes A. Elsevier, 2008, pp. 263–289
18. Telekes A, Hegedűs M, Kiss I. Therapeutic drug monitoring and measurement of drug concentrations using mass spectrometry. In: *Medical Application of Mass Spectrometry*. Eds. Vékey K, Telekes A, Vertes A. Elsevier, 2008, pp. 487–501
19. Vance DE, Vance JE. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Elsevier, New York 2002
20. Watson AD. Thematic review series: systems biology approaches to metabolic and cardiovascular disorders. Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems. *J Lipid Res* 47:2101–2111, 2006
21. Wilcox C, Hu JS, Olson EN. Acylation of proteins with myristic acid occurs cotranslationally. *Science* 238:1275–1278, 1987