

# Emlődaganatos betegek vérplazmájának differenciál pásztázó kalorimetriás vizsgálata

Zapf István<sup>1</sup>, Fekecs Tamás<sup>2</sup>, Moezzi Medhi<sup>2</sup>, Tizedes György<sup>1</sup>, Pavlovics Gábor<sup>1</sup>, Kálmán Endre<sup>3</sup>, Horváth Őrs Péter<sup>1</sup>, Ferencz Andrea<sup>4</sup>

Pécsi Tudományegyetem, <sup>1</sup>Sebészeti Klinika, <sup>2</sup>Bőr-, Nemikórtani és Onkodermatológiai Klinika, <sup>3</sup>Patológiai Intézet, Pécs; <sup>4</sup>Semmelweis Egyetem, Kísérletes és Sebészeti Műtéttani Intézet, Budapest

Az emlődaganat a leggyakoribb daganatos betegség és a harmadik leggyakoribb halálok a nők körében. A differenciál pásztázó kalorimetria (DSC) egyre több onkológiai betegség diagnosztikájában és monitorozásában vizsgált, új analitikai módszer. Jelen kutatásunkban DSC módszerrel detektáltuk a vérplazma-komponenseket különböző stádiumú emlődaganatos betegekben. Vizsgálatunkba 19, emlődaganat miatt klinikánkon operált beteget vontunk be. Rutin hisztológiai módszerek mellett perifériás vérvétel történt az egészséges kontrolloknál, valamint a különböző tumorátmérőjű (0,5-75 mm) és regionális nyirokcsomó-érintettségű betegeknél. A vérplazma termoanalitikai mérését SETARAM micro DSC-II kaloriméterrel végeztük. Mérési eredményeink szerint a betegség progressziója és a termikus változások (átmeneti hőmérséklet, kalorimetriás entalpia) között azonos tendenciájú eredményeket mutattunk ki a különböző stádiumú emlődaganatos betegek esetében. Előzetes tanulmányunk a DSC technika klinikai használhatóságát is felveti, bár irodalmi adat még nincs arra nézve, hogy emlődaganatok esetén a humán vérplazma DSC vizsgálata alkalmas lenne-e diagnosztizálásra vagy a staginghez. Az összefüggések tisztázása érdekében további kutatásokat tervezünk. Magyar Onkológia 56:274-279, 2012

**Kulcsszavak:** emlődaganat, vérplazma, DSC technika

*Breast cancer is the commonest cause of cancer death in women worldwide. Its incidence has been increasing for many years in economically developed countries. Differential scanning calorimetry (DSC) is a thermoanalytical technique which monitors small heat changes between sample and reference materials. This examination is a validly efficient method for the demonstration of structural changes not only in the physical sciences, but in numerous human oncological diseases. The goal of this study was to measure DSC thermogram of blood plasma in breast cancer patients with different stages. Nineteen women with different tumor diameter (0.5-7.5 mm) and with or without regional lymph node metastases were involved in the study. Preoperatively peripheral blood samples were collected from the patients and from healthy controls, and plasma components were analysed by SETARAM micro DSC-II calorimeter. The diameter of the tumor tissue and the number of metastatic lymph nodes were evaluated on the basis of postoperative histological results. In the current study we found difference in changes of the thermal parameters (transition temperature, calorimetric enthalpy) of breast cancer patients' plasma components. Moreover, a tendency has been found for association of these results with tumor size and with the degree of regional lymph node involvement. Preliminary study of the clinical utility of DSC technology arises, even though there is no data in the literature. In cases of breast cancer the blood plasma may be suitable for DSC analysis for diagnosis or staging as well. In order to clarify the relationships we are planning further studies.*

Zapf I, Fekecs T, Moezzi M, Tizedes G, Pavlovics G, Kálmán E, Horváth ŐP, Ferencz A. DSC data of blood plasma in breast cancer patients. Hungarian Oncology 56:274-279, 2012

**Keywords:** breast cancer, blood plasma, DSC technique

Levelezési cím: Dr. Zapf István, Pécsi Tudományegyetem, Sebészeti Klinika, 7624 Pécs, Ifjúság út 13. Telefon: (06-72) 536-126/33242, E-mail: zapfistvan@googlemail.com

Közlésre érkezett: 2012. február 12. • Elfogadva: 2012. szeptember 10.

## BEVEZETÉS

Az emlődaganat a nők körében világszerte a leggyakoribb daganatos megbetegedés és Magyarországon a harmadik leggyakoribb daganatos halálok (15). Világirodalmi adatok szerint nyolc nőből egynél élete során biztosan kialakul az emlődaganat valamilyen formája (9). Az emlőrákban meghaltak száma a gazdaságilag fejlett országokban korábban nőtt, ma már csökkenő tendenciát mutat (5). Az utóbbi években úgy tűnik, hogy hazánkban is megállt a növekedés, sőt a daganatos halálozás csökkenése is megkezdődött. A terápia előrehaladott esetben az emlő és az axilláris nyirokcsomók teljes műtéti eltávolításából áll, kiegészítve olyan onkológiai kezelésekkel, mint a pre- vagy posztoperatív kemoterápia, az irradiáció, vagy a hormonkezelés (receptorstátusz függvénye), illetve HER2-pozitív esetekben a biológiai kezelés. Az emlődaganat korai felismerése növeli a túlélést, és az emlőmegtartó műtét (EMM) lehetőségét. Ilyen esetekben az EMM és az őrszemnyirokcsomó eltávolítása is elegendő lehet a kuratív kezeléshez és a beteg teljes gyógyulásához.

A diagnosztikában a fizikális vizsgálat mellett jelenleg a mammográfia és az emlő-UH az általánosan elfogadott szűrőműszer. Az emlő denzitásának emelkedésével szignifikánsan csökken a hagyományos mammográfia szenzitivitása, ezért az 50 év alatti betegek körében nem haladja meg a 60%-ot, denz emlő esetén pedig nem éri el az 50%-ot sem. Az emlő-UH 30 év alatti korban tapintott elváltozásoknál az elsődlegesen választandó vizsgálati módszer, de ennek szenzitivitása sem haladja meg a 75%-ot. Az újabb képalkotó eljárások, mint az MRI és PET-CT jó szenzitivitású, de rossz specificitású módszerek, így szűrésre nem alkalmazhatóak. A betegség prognózisára a daganatos szövetek hisztológiai feldolgozása során meghatározott hormonreceptorok (ösztrogén- és/vagy progesteronreceptor) és más biomarkerek (HER2, CK5) segítségével tudunk következtetni. Jelenleg a betegség lefolyásának utánkövetésére a radiológiai módszerek (mammográfia, CT, MRI, PET-CT) mellett vérből kimutatható tumormarkerek (CEA, CA 15-3) használatosak (19).

A differenciál pártázó kalorimetria (differential scanning calorimetry: DSC) olyan termoanalitikai módszer, melyet 1960-óta használnak a szerves anyagok fizikai tulajdonságainak kutatására. A XXI. század elejétől azonban egyre több, különböző biológiai struktúrákban végbemenő változások elemzésére is alkalmazni kezdték (2, 6–8, 20, 21). A módszer megértését szolgáló alapvető tényezők, szempontok a következők. Bármely anyag – beleértve a biológiai mintákat is – a hőmérséklettől függően különböző kémiai vegyületek formájában, vagy különböző kristályszerkezetben található. A hőmérséklet változtatásával elérhetjük azt a pontot, ahol az adott anyag kémiai formája, kristályszerkezete vagy halmazállapota megváltozik. Ezt az átalakulást

leggyakrabban hőjelenség kíséri. Detektálva az átalakulás hőmérsékletét, illetve az eközben elnyelt/felszabaduló termikus energiát, azonosíthatjuk az anyag kémiai szerkezetét, ha az észlelt hőeffektusokat ismert, tiszta kémiai anyagoknál mért hőjelenségekkel összevetjük. A DSC készülék két mintatartót tartalmaz, melyek közül az egyik a vizsgálandó mintát, míg a másik a referenciaanyagot tartalmazza. A referenciaanyagnak „inertnek” kell lennie, vagyis a mérés során nem szenvedhet szerkezeti változást. A módszer azt az elektromos teljesítményt méri, ami ahhoz szükséges, hogy a mintát és a referenciaanyagot felfűtés vagy lehűtés során azonos hőmérsékleten tarthassuk. A mérések 0–100°C közötti hőmérsékleti tartományban történnek pl. 0,3 K/perc hőmérsékletemeléssel. A DSC-termogram értékelésekor arra kapunk választ, hogy a görbén a hőmérséklet növelésével hogyan változott a hőáram, vagyis időegység alatt az anyagon átáramló hőmennyiség. Ha biológiai mintával hőt közlünk, akkor az azt egyenletesen felveszi, és az anyag felmelegítésére (belső energia növelésére) fordítódik (első plató fázis, nincs hőmérsékletkülönbség a minta és referencia között). Egy bizonyos hőmérsékletnél a hőáram csökkenni kezd, hiszen a hőmennyiség egy része nem a belső energia (hőmérséklet) növelésére, hanem a kémiai, biológiai kötések átrendeződésére/felszakítására fordítódik, mintegy abban „nyelődik el”. Ekkor kezd a görbe leszálló szára, a denaturációs fázis kialakulni – endoterm folyamat, a minta hőmérséklete kisebb a referenciánál, többlet energiát (ami a szerkezet megbontásához szükséges) kell betáplálnunk, hogy a hőmérsékletkülönbség a két cella között zérus maradjon (kristályosodásnál a minta termel hőt, így a referenciacellába kell energiát táplálni a  $\Delta T=0$  állapot fenntartásához). Egyre több fehérje kezd denaturálódni, ami egyre több hőelnyeléssel jár, így tovább nő a mintába betáplált hőáram. Egy adott hőmérsékletnél (maximális átalakulási/kitekeredési/denaturációs hőmérséklet:  $T_m$ ; a görbe csúcsa) a teljes makromolekula-mennyiség 50%-a denaturálódott. Ezt követően egyre több denaturálódott fehérje lesz és egyre kevesebb alakul át időegység alatt, ezért egyre kevesebb többlet energiát kell a mintatartóba táplálni, hogy kövesse a felfűtési programot. Amikor minden fehérje denaturálódott, nem kell többlet energia szerkezeti átalakulásra, csak a belső energiát kell növelni, így a minta és referencia közt nem lesz hőmérsékletkülönbség, ismét egyenletessé válik a hőfelvétel mértéke a minta- és referenciacellában (második plató fázis) (17).

A vizsgálatok rámutattak arra, hogy a biológiai struktúrákban végbemenő termodinamikai módosulások összefüggésbe hozhatók a különböző betegségek kialakulásával. Illetve az is kimutatásra került, hogy ezek a termoanalitikai változások [átmeneti hőmérséklet:  $T_m$  (°C); kalorimetriás entalpia:  $\Delta H$  (J/g)] specifikusan jelennek meg a különböző be-

tegségekben és azon belül is az egyes stádiumok vonatkozásában mutatnak eltérést (10). Garbett és munkatársai 2009-ben írt összefoglaló közleményükben a vérplazma DSC technikával mért termikus változásait írták le (13). Az összes általuk vizsgált daganatos állapot (melanoma malignum, endometriumcarcinoma, tüdőcarcinoma, ovariumcarcinoma, cervixcarcinoma), illetve más betegség (Lyme-kór, szisztémás lupus erythematosus, rheumatoid arthritis) specifikus DSC-mintát mutatott a vérplazmában. Azt a következtetést vonták le, hogy a vizsgált tumoroknak, ill. betegségeknek egyedi, ujjlenyomatszerű termikus görbéje lehet. Továbbá ezek a termikus változások korreláltak a cervixcarcinoma különböző stádiumaival (11, 12). A legújabb kutatások tehát felvetik annak lehetőségét, hogy a DSC onkológiai betegségek esetén is hasznos információval szolgálhat a hagyományos diagnosztikus eljárások mellett, de emlődaganatos betegek körében végzett DSC-vizsgálatról irodalmi adatok nincsenek.

Kutatásunk során arra kerestük a választ, hogy van-e különbség az egészséges és az emlődaganatos betegek vérmin táinak DSC-görbéi között, illetve a termoanalízis mutat-e korrelációt a betegség stádiumával és progressziójával.

## BETEGANYAG ÉS MÓDSZEREK

Prospektív kutatásunkba 19, operábilis emlődaganatos nőbeteget vontunk be, akik 2011. február és április között kerültek műtetre a Pécsi Tudományegyetem Sebészeti Klinikáján. Minden esetben standard preoperatív kivizsgálásra (mammográfia, emlő-UH, FTAB, core biopszia) került sor. A betegek átlagéletkora 55,4 év volt, a legfiatalabb 32, míg a legidősebb 79 éves volt. Előzetes irodalmi adatok hiányában a betegcsoportokat az ismert TNM stádiumokkal összhangban igyekeztünk összeállítani úgy, hogy minél több T és N stádium legyen képviseltetve. A betegeket a tumor átmérője és az axilláris nyirokcsomó-érintettség mértéke szerint csoportosítottuk. A tumor legnagyobb átmérője alapján történő csoportosítás: 1. csoport:  $\leq 10$  mm, 2. csoport: 11–20 mm, 3. csoport: 21–30 mm, 4. csoport: 31–40 mm, 5. csoport: 41–50 mm, 6. csoport:  $\geq 51$  mm. A betegek egy részénél ( $n=9$ ) nem találtunk axilláris nyirokcsomó-metasztázist, míg a betegek fennmaradó részében előfordult, hogy egyszerre akár 10 áttétes nyirokcsomót is kimutatott a szövettani vizsgálat. Az áttétes axilláris nyirokcsomók száma alapján a következő csoportokba soroltuk a betegeket: A. csoport: 0 áttétes nyirokcsomó, B. csoport: 1–3 áttétes nyirokcsomó, C. csoport: 4–10 áttétes nyirokcsomó. A kutatást a PTE KK Regionális Etikai Bizottságának engedélye alapján végeztük el (3601.316-12736/2009).

Egészséges felnőttektől (kontroll csoport,  $n=10$ ), valamint közvetlenül a műtét előtt a betegektől ( $n=19$ ) EDTA-t (1,5 mg/ml minta) tartalmazó Vacutainer-es kémcsöbe peri-

fériás vértmintákat vettünk. Ezt követően a plazmafrakciót  $4^\circ\text{C}$ -on 1600/perc fordulattal 15 percig történő centrifugálással különítettük el a vér sejtsejtségeitől. Az így kapott plazmát a DSC mérésig  $-80^\circ\text{C}$ -on tároltuk.

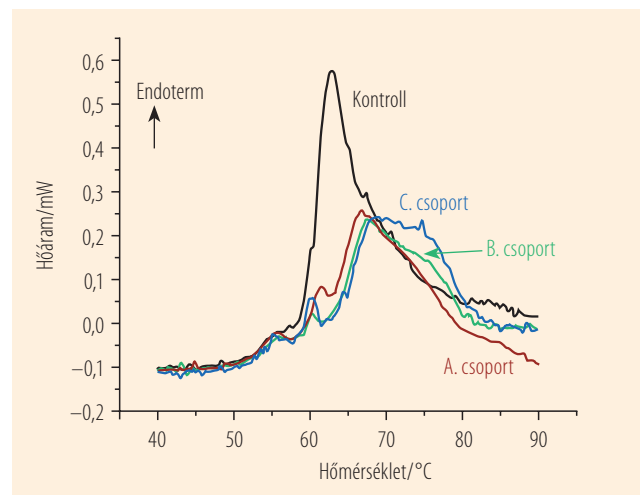
A plazma termikus denaturációját SETARAM micro DSC-II kaloriméterrel határoztuk meg, mely 24 órás mérést jelent mintánként. Minden mérést  $0$ – $100^\circ\text{C}$  közötti hőmérsékleti tartományban végeztünk el  $0,3$  K/perc felfűtési sebességet alkalmazva. Referenciaoldatként fiziológiás sóoldatot ( $0,9\%$  NaCl) használtunk. A minta- és referenciacellák tömegét  $\pm 0,1$  mg pontossággal táraztuk ki, így a minta- és a referenciaedények közötti esetleges hőkapacitás-különbség korrigálására nem volt szükség. A kalorimetrikus entalpiát a hőabszorpció görbe alatti területből 2 végpontos SETARAM csúcspontos integrációjával számítottuk ki. Az adatok grafikus feldolgozása ASCII konverzió után Origin (ver. 6.0) program (Microcal Software Inc, Northampton, USA) segítségével történt.

Statisztikai analízisként Student t-tesztet használtunk. Az eredményeket középértékben adtuk meg. Szignifikáns eltérésnek a  $p < 0,05$  értéket vettük.

## EREDMÉNYEK

Az egészséges kontroll személyek és az emlődaganatos betegek DSC-görbéit összehasonlítva, a mérések eltérő termikus doméneket ( $T_m$  és a görbék lefutása alapján) mutattak nyirokcsomó-érintettség esetén (a 19 betegből csak 16 esetben volt nyirokcsomószám-meghatározás) a denaturáció alatt (1. ábra, 1. táblázat). A kontroll minták

**1. ábra.** Egészséges kontrollok és különböző nyirokcsomóstatusú emlődaganatos betegek vérplazmáinak DSC-analízise (A. csoport: 0 áttétes nyirokcsomó, B. csoport: 1–3 áttétes nyirokcsomó, C. csoport: 4–10 áttétes nyirokcsomó)



**1. táblázat.** Humán vérplazma DSC-adatok egészséges kontrolloknál és a nyirokcsomó-érintettség alapján különböző stádiumú emlődaganatos betegeknél (átmeneti hőmérséklet:  $T_m$  (°C); kalorimetriás entalpia:  $\Delta H$  (J/g), átlag $\pm$ SE csak  $n \geq 5$  esetén)

Humán vérplazma	$T_{m1}$ (°C)	$T_{m2}$ (°C)	$T_{m3}$ (°C)	$T_{m4}$ (°C)	$T_{m5}$ (°C)	$\Delta H$ (J/g)
Kontroll (n=10)	56,2 $\pm$ 0,1 (n=10)	60,2 (n=3)	63,0 $\pm$ 0,1 (n=10)	-	-	1,20 $\pm$ 0,06
Nyirokcsomó-érintettség						
A. csoport (n=9)	55,6 $\pm$ 0,1 (n=9)	60,8 $\pm$ 0,1 (n=8)	66,0 $\pm$ 0,1 (n=8)	75,4 (n=2)	-	1,16 $\pm$ 0,05
B. csoport (n=2)	55,9 (n=2)	60,4 (n=2)	66,6 (n=2)	-	-	0,94
C. csoport (n=5)	55,7 $\pm$ 0,1 (n=5)	60,9 (n=3)	66,2 $\pm$ 0,1 (n=5)	70,4 (n=2)	77,7 (n=2)	1,19 $\pm$ 0,06

A. csoport: 0 áttétes nyirokcsomó, B. csoport: 1–3 áttétes nyirokcsomó, C. csoport: 4–10 áttétes nyirokcsomó

esetében három fő átalakulási hőmérséklet különíthető el ( $T_{m1}$ ,  $T_{m2}$ ,  $T_{m3}$ ), a második csak három, míg az első 10, a harmadik is 10 esetben jelent meg. A  $T_{m1}$  minden beteg mintájában is megjelent. A  $T_{m2}$  az A. csoportban 88,9, a B. csoportban 100, a C. csoportban pedig 60%-os gyakorisággal fordult elő szemben a kontroll mintabeli 30%-os megjelenésével. A  $T_{m3}$  esetében a kontroll 100%-os gyakoriságával szemben 88,9–100–100%-os megjelenést tapasztaltunk. A DSC-adatok alapján tehát a második és harmadik olvadási hőmérsékletre tartozó szerkezeti egység módosulása a daganatos mintáknál az áttétes nyirokcsomók számának növekedése szempontjából a betegség súlyosságát jól monitorozó tényezőnek tekinthető. A betegség nyirokcsomó-érintettségével kapcsolatos progressziójával kapcsolatban a  $T_{m4}$  és a  $T_{m5}$  paraméterek jelenthetnek további megerősítő monitorozási lehetőséget. A kalorimetriás entalpia szintén összefüggést mutat a betegség súlyosságával, de az alacsony esetszám miatt ez az eredmény csak a B. csoportnál tekinthető szignifikánsnak.

A tumor nagyságával összefüggésben – a nyirokcsomó-státuszhoz hasonlóan – a betegség progressziójával azonos tendenciájú eredményeket találtunk (2. ábra, 2. táblázat). A  $T_{m1}$  és  $T_{m2}$  ebben az esetben is jó indikátora a betegség progressziójának. A vizsgálatokat magasabb esetszámra lenne célszerű kiterjeszteni, de az egyes csoportok közötti eltérés jellege (trend) így is jól látható. Ahhoz, hogy meghatározzuk, mely szérumproteinek megváltozása okozza a termikus eltéréseket, a későbbiekben kvantitatív analízist tervezünk elektroforetikus vizsgálatok elvégzésével.

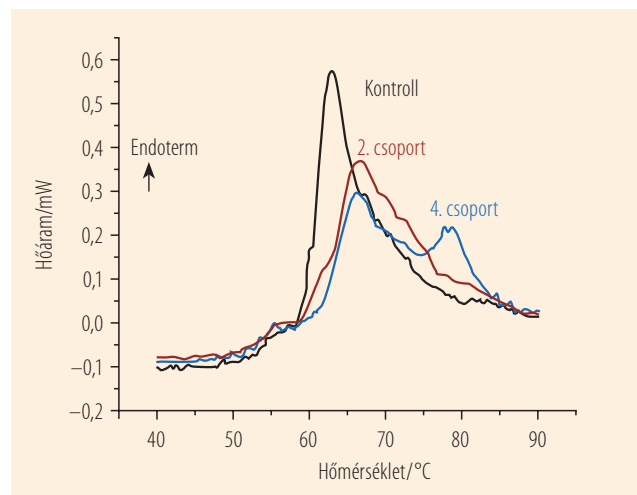
## MEGBESZÉLÉS

Az emlőrák világszerte a leggyakoribb daganatos betegség a nők körében (9, 15). Jelenleg a mammográfia és az emlő-UH tekinthető standard szűrőmódszernek. A mammográfia szenzitivitását nagyban befolyásolja a beteg kora, 50 évnél idősebbekben 80%, de ennél fiatalabbnál csak 65% a szenzitivitás értéke. A specificitás 88% körüli (14, 18). Az, hogy az új, érzékenyebb képalkotó eljárások (MRI, PET-

CT) a közeljövőben kiváltják a mammográfiát, ezen eljárások rossz specificitása miatt nem valószínű (4). A szérumtumormarkerek (CA 15,3; CEA) nem alkalmasak a korai emlőrák diagnosztizálására alacsony specificitásuk és szenzitivitásuk miatt (19). A jelenlegi szűrő- és monitorozó metodikák mellett felmerül az igény olyan új módszerek bevezetésére is, mellyel a betegség hatására a vérben bekövetkező változásokból következtetni tudunk a daganatra vagy annak progressziójára. Ez főként a korai emlőrák diagnosztikában és a fiatal betegek körében lenne előnyös (4, 22).

Az emlőtumor előrehaladtával a daganatsejtek először az axilláris nyirokcsomók felé terjednek. A betegség stádiumát a daganat mérete és az áttétes nyirokcsomók száma, vagy a távoli áttétek jelenléte határozza meg. A betegségmentes túlélés és az átlagos túlélés szempontjából az egyik legfontosabb prognosztikus faktor az axilláris nyirokcsomó-státusz (16). Tanulmányunk az emlődaganatos betegek vérplazmájában létrejött termikus változásokat vizsgálta DSC módszerrel a daganat méretének és az áttétes

**2. ábra.** Egészséges kontrollok és különböző tumorméretű emlődaganatos betegek vérplazmáinak DSC-analízise (2. csoport: 11-20 mm, 4. csoport: 31-40 mm)



**2. táblázat.** Humán vérplazma DSC-adatok egészséges kontrolloknál és különböző tumorméretű emlődaganatos betegeknél (átmeneti hőmérséklet:  $T_m$  (°C); kalorimetriás entalpia:  $\Delta H$  (J/g), átlag $\pm$ SE csak  $n \geq 5$  esetén)

Humán vérplazma	$T_{m1}$ (°C)	$T_{m2}$ (°C)	$T_{m3}$ (°C)	$T_{m4}$ (°C)	$\Delta H$ (J/g)
Kontroll (n=10)	56,2 $\pm$ 0,1 (n=10)	60,2 (n=3)	63,0 $\pm$ 0,1 (n=10)	-	1,20 $\pm$ 0,06
Tumorátmérő szerinti csoportosítás					
1. csoport (n=3)	55,7 (n=3)	61,0 (n=2)	65,2 (n=3)	-	1,17
2. csoport (n=7)	55,9 $\pm$ 0,1 (n=7)	61,0 $\pm$ 0,1 (n=6)	66,2 $\pm$ 0,1 (n=7)	76,0 (n=3)	1,19 $\pm$ 0,06
3. csoport (n=4)	55,7 (n=4)	60,3 (n=3)	66,4 (n=3)	70,5 (n=2)	1,07
4. csoport (n=3)	55,6 (n=3)	60,1 (n=1)	66,1 (n=3)	78,2 (n=1)	1,10
5. csoport (n=1)	55,0 (n=1)	-	65,9 (n=1)	77,8 (n=1)	1,35
6. csoport (n=1)	56,6 (n=1)	61,4 (n=1)	66,6 (n=1)	-	1,11

1. csoport:  $\leq 10$  mm, 2. csoport: 11–20 mm, 3. csoport: 21–30 mm, 4. csoport: 31–40 mm, 5. csoport: 41–50 mm, 6. csoport:  $\geq 51$  mm

regionális nyirokcsomók számának függvényében. Az emberi vérplazma vizsgálata alkalmas a betegségek diagnosztizálására és a terápia monitorozására, a vérminták pedig könnyen hozzáférhetőek a betegektől minimálisan invazív és biztonságos módon. A kalorimetriás vizsgálatok során elért legújabb eredmények egy új perspektívát jelenthetnek a humán vérplazma vizsgálata tekintetében (1, 3, 12).

Kutatásunk során azt vizsgáltuk, hogy miképpen változnak a humán vérplazma termikus komponensei emlődaganatos betegeknél a különböző méretű daganatok és nyirokcsomó-metasztázisok hiánya vagy jelenléte esetén. A 19 beteg termogramjait áttekintve egyedi karakterisztikát figyeltünk meg az egészséges személyek görbéihez képest. Nemzetközi vagy hazai adatok hiányában erre vonatkozó irodalmi összevetést nem tudunk tenni. De hasonló megfigyeléseket tett Garbett munkacsoportja bőr- és nőgyógyászati tumoros, valamint autoimmun betegségekben szenvedők vérplazmáinak DSC-vizsgálata során. Ennek alapján valószínűsítették, hogy minden tumornak, illetve betegségnek egyedi, ujjlenyomatszerű termikus görbéje lehet. Továbbá cervixcarcinoma esetén a betegség stádiumával is sikerült korrelációt kimutatniuk (12, 13).

A különböző stádiumú emlőrákos betegek vérplazmájának DSC-vizsgálata során sikerült kimutatnunk a tumor méretével, valamint az axilláris nyirokcsomók érintettségének mértékével kapcsolatos összefüggést. Összehasonlítva az egészséges kontroll személyek DSC-görbéit az emlődaganatos betegekével, a mérések a  $T_{m2}$  termikus domének eltérő, a betegség súlyosságától függő gyakoriságát és újabb denaturációs átmeneteket mutattak. Míg a kontroll mintákban nagyobb gyakorisággal csak két fő átalakulási hőmérséklet különíthető el ( $T_{m1}$ ,  $T_{m3}$ ) nagy valószínűséggel, addig a  $T_{m2}$  főleg a betegek mintáiban jelent meg. A második olvadási hőmérséklet az emlődaganat jelenlétekor figyelhető meg gyakrabban, amit az áttétes nyirokcsomók számának

növekedése jelentős mértékben befolyásol. A  $T_{m3}$  és  $T_{m4}$  a betegség további progresszióját jelzi. A kalorimetriás entalpia ugyancsak összefüggést mutat a betegség súlyosságával, de az alacsony esetszám miatt az eredmény nem tekinthető szignifikánsnak.

A tumor méretével összefüggésben – a nyirokcsomóstátushoz hasonlóan – a betegség progressziójával kapcsolatba hozható eredményeket találtunk. A  $T_{m3}$  és  $T_{m4}$ , mint a szerkezet vonatkozásában további változást mutató termikus jellemzők, szintén jól mutatják a betegség stádiumát, amelyet a kalorimetriás entalpia változása is támogat. A kezdeti vizsgálataink jelezte tendenciák azt mutatják, hogy a méréseket célszerű lesz nagyobb esetszámmra is kiterjeszteni. Továbbá tervezzük a plazmaproteinek érintettségének meghatározása érdekében a későbbiekben azok kvantitatív analízisének elvégzését.

Eredményeink több okból is fontosak, egyrészt a DSC vizsgálat nemcsak az emlőrák jelenlétét tisztázhatja, hanem alkalmas lehet a különböző stádiumok elkülönítésére, illetve a betegség lefolyásának monitorizálására is. Ehhez hasonló eredményeket írtak le más vizsgálatok során is, ahol a DSC módszert a betegségek diagnosztizálására használták. Nőgyógyászati onkológiai minták elemzése során e módszerrel vizsgált minták termogramjai korreláltak a betegség progressziójával a pre-invazív cervicalis lézióktól az invazív rák minden stádiumáig. A különbség a normális szövetek és a high grade squamous intraepithelialis léziók között szignifikáns volt, és a cervixcarcinoma gyors diagnosztizálását a DSC-analízis lehetővé tette (11). Az eredmények hátterének pontos magyarázata ugyan még nem ismert, a vérplazma DSC-analízise mégis szignifikáns változást mutat a betegeknél, amelyet nem az adott anyag plazmában bekövetkező koncentrációváltozása okoz. Irodalmi adat még nincs arra nézve, hogy emlődaganatok esetén a humán vérplazma DSC-vizsgálata alkalmas lenne-e diagnosztizálásra vagy a staginghez.

## ÖSSZEFOGLALÓ

Kutatásunk során elsőként vizsgáltuk DSC-analízissel a különböző stádiumú emlődaganatos betegek vérplazmáját. A perifériás vérvétel rutin módszerként egyszerű és biztonságos módja a mintavételnek, és a szérum DSC-termogramja értékelhető eltéréseket mutatott az egészséges és a különböző stádiumú betegek mintáinak mérésekor. Az összefüggések tisztázása érdekében további kutatásokat tervezünk, de előzetes tanulmányunk a DSC technika klinikai használhatóságát is felveti.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönjük a betegek részvételét a vizsgálatokban, valamint az OTKA C272 és PD77474 pályázatok támogatását.

## IRODALOM

- Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* 1:845–867, 2002
- Bruylants G, Wouters J, Michaux C. Differential scanning calorimetry in life science: thermodynamics, stability, molecular recognition and application in drug design. *Curr Med Chem* 12:2011–2020, 2005
- Ebert MP, Korc M, Malferteiner P, et al. Advances, challenges, and limitations in serum-proteome-based cancer diagnosis. *J Proteome Res* 5:19–25, 2006
- Elmore JG, Armstrong K, Lehman CD, et al. Screening for breast cancer. *JAMA* 293:1245–1256, 2005
- Héry C, Ferlay J, Boniol M, et al. Changes in breast cancer incidence and mortality in middle-aged and elderly women in 28 countries with Caucasian majority populations. *Ann Oncol* 19:1009–1018, 2008
- Ferencz A, Nedvig K, Lőrinczy D. DSC examination of intestinal tissue following cold preservation. *Thermochim Acta* 497:41–45, 2010
- Ferencz A, Nedvig K, Laszlo E, et al. DSC examination of kidney tissue following warm ischemia and reperfusion injury. *Thermochim Acta* 525:161–166, 2011
- Ferencz A, Fekecs T, Lőrinczy D. Differential Scanning Calorimetry, as a new method to monitor human plasma in melanoma patients with regional lymph node or distal metastases. In: *Skin Cancer Overview*, Ed. Yaguang Xi, Intech, Rijeka 2011, pp. 141–152
- Feuer EJ, Wun LM, Boring CC, et al. The lifetime risk of developing breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 85:892–897, 1993
- Fish DJ, Brewood GP, Kim JS, et al. Statistical analysis of plasma thermograms measured by differential scanning calorimetry. *Biophys Chem* 152:184–190, 2010
- Garbett NC, Miller JJ, Jenson AB, et al. Calorimetric analysis of the plasma proteome. *Semin Nephrol* 27:621–626, 2007
- Garbett NC, Miller JJ, Jenson AB, et al. Calorimetry outside the box: a new window into the plasma proteome. *Biophys J* 94:1377–1383, 2008
- Garbett NC, Mekmaysy CS, Helm CW, et al. Differential scanning calorimetry of blood plasma for clinical diagnosis and monitoring. *Exp Mol Pathol* 86:186–191, 2009
- Kerlikowske K, Carney PA, Geller B, et al. Performance of screening mammography among women with and without a first-degree relative with breast cancer. *Ann Intern Med* 133:855–863, 2000
- Key TJ, Verkasalo PK, Banks E. Epidemiology of breast cancer. *Lancet Oncol* 2:133–140, 2001
- Kim KJ, Huh SJ, Yang JH, et al. Treatment results and prognostic factors of early breast cancer treated with a breast conserving operation and radiotherapy. *Jpn J Clin Oncol* 35:126–133, 2005
- Lőrinczy D. Thermal Analysis in Medical Application. *Wide Diversity in Thermal Analysis and Calorimetry*. Akadémiai Kiadó, Budapest 2011, pp. 8–290
- Moadel RM. Breast cancer imaging devices. *Semin Nucl Med* 41:229–241, 2011
- Molina R, Barak V, Dalen A, et al. Tumor markers in breast cancer – European Group on Tumor Markers recommendations. *Tumour Biol* 26:281–293, 2005
- Nedvig K, Ferencz A, Róth E, et al. DSC examination of intestinal tissue following warm ischemia and reperfusion injury. *J Thermal Anal Calorim* 95:775–779, 2009
- Wiegand N, Várhidy L, Lőrinczy D. Differential scanning calorimetric examination of ruptured lower limb tendons in human. *J Thermal Anal Calorim* 101:487–492, 2010
- Zapf I, Fekecs T, Ferencz A, et al. DSC analysis of human plasma in breast cancer patients. *Thermochim Acta* 524:88–91, 2011