

## TĚLNÍ TEKUTINY JAKO ZDROJ PROTEOMICKÝCH BIOMARKERŮ RŮZNÝCH ONEMOCNĚNÍ

JANA VÁCLAVKOVÁ\*, TOMÁŠ OŽDIAN\*,  
MARIÁN HAJDÚCH a PETR DŽUBÁK

Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Hněvotínská 5, 779 00 Olomouc  
petr.dzubak@upol.cz

Došlo 12.2.20, přijato 18.2.20.

Klíčová slova: proteomika, biomarker, tělní tekutiny, diagnostika, hmotnostní spektrometrie

### Obsah

1. Úvod
2. Zdroje biomarkerů
3. Příklady tělních tekutin pro detekci biomarkerů
  - 3.1. Moč
  - 3.2. Sliny
  - 3.3. Slzy
  - 3.4. Sputum
  - 3.5. Kondenzát vydechaného vzduchu
  - 3.6. Sperma
  - 3.7. Cervikální hlen
  - 3.8. Mozkomíšní mok
  - 3.9. Pankreatická šťáva
  - 3.10. Žluč
  - 3.11. Plodová voda
4. Klady a zápory proteomiky v detekci biomarkerů
5. Závěr

### 1. Úvod

Hledání nových biomarkerů u závažných diagnóz je velkou výzvou pro současnou medicínu. Jen málo biomarkerů používaných v klinické praxi totiž splňuje všechny požadavky kladené na ideální biomarker. Typickým příkladem je prostatický specifický antigen (PSA) použitelný nejen ke sledování účinnosti terapie, předpovědi rekurence nádoru, ale také k diagnostice nádorů prostaty<sup>1</sup>. Bohužel většinu v současnosti využívaných biomarkerů lze jen málokdy použít k přímé diagnostice onemocnění a musí být podpořeny dalším, nejlépe zobrazovacím

vyšetřením. Nejčastějším problémem biomarkerů je jejich nízká specifita, neboť zvolený protein může být uvolňován z více zdrojů, případně může indikovat přítomnost různých onemocnění. Jako příklad může posloužit právě výše zmíněný PSA, který je používán k diagnostice nádorů, ale může být zvýšený také u zánětlivých onemocnění prostaty<sup>2</sup>.

K hledání nových biomarkerů lze s výhodou využít tzv. omické přístupy, jako je genomika, metabolomika a proteomika, kdy využíváme paralelní charakterizaci souborů genů, proteinů nebo metabolitů a identifikujeme ty, které odliší nemocné jedince od zdravých<sup>3,4</sup>. Významný pokrok v této oblasti byl zaznamenán v souvislosti s rozvojem hmotnostní spektrometrie, která umožnila přesnou identifikaci proteinů v biologické matici a je díky tomu klíčovou metodou většiny citovaných prací.

Tento referát je zaměřen na proteomické biomarkery získávané z tělních tekutin s výjimkou krve.

### 2. Zdroje biomarkerů

Jednou z nejlépe zvládnutých diagnóz při hledání biomarkerů je nádorové onemocnění, kdy cílovou tkání je nádor a jím postižený orgán<sup>5</sup>. V této souvislosti by byla nejbohatším zdrojem studovaného biomarkeru samotná nádorová tkáň. Biopsie suspektního nádoru je sice proveditelná, ale je to invazivní výkon, mnohdy vyžadující hospitalizaci a přinášející riziko možných komplikací např. infekce, krvácení, v některých lokalizacích je obtížně proveditelný a v důsledku nemožný pro rutinní screening rizikové populace.

Nejčastěji vyšetřovaným materiálem v klinické praxi je z řady důvodů krev. Její odběr a zpracování jsou rutinně zavedeny a spojeny s minimem rizik. Dostatečně senzitivní a specifický biomarker identifikovaný v tomto materiálu je proto cílem řady klinických studií. Nevýhodou krve je ale její nejvyšší proteomická komplexita ze všech studovaných biologických matric<sup>6</sup>, zejména díky tomu, že se mísí v celém organismu, protéká všemi orgány a plní řadu systémových funkcí.

Na druhou stranu téměř každý orgán sekretuje specifickou tělní tekutinu. V těchto „proximálních“ tekutinách mohou být biomarkery ještě ve vyšších koncentracích než v systémové krvi. Jejich příklady a biomarkery v nich studované jsou uvedeny v dalších kapitolách.

\*Autoři se na práci podíleli stejným dílem.

### 3. Příklady tělních tekutin pro detekci biomarkerů

Tělní tekutiny, jako zdroj biomarkerů, můžeme rozlišit na další dvě skupiny dle invazivity odběru. Bez nutnosti porušit integritu lidského těla je možné získat například moč, sliny, slzy, sputum, kondenzát vydechaného vzduchu, ale také sperma nebo cervikální hlen. V diagnostice se ovšem někdy bez biologického materiálu odebraného invazivním způsobem není možné obejít. Typickým příkladem je relativně běžně odebíraný mozkomíšní mok, pankreatická šťáva, žluč, plodová voda, případně bronchoalveolární tekutina.

#### 3.1. Moč

Moč je společně s krví nejčastěji odebíraným materiálem. Odběr je neinvazivní a pacient je schopný vzorek odebrat sám a to i v domácím prostředí. Moč však za normálních podmínek obsahuje jen velmi malou koncentraci proteinů – maximálně 0,2 mg ml<sup>-1</sup>. Vyšší koncentrace proteinů je označována jako proteinurie a je známkou zhoršené filtrační funkce ledvin. Na druhou stranu je moč k dispozici ve větších objemech než jiné tekutiny, snad pouze s výjimkou oligurických pacientů se selháním ledvin. Nicméně v tomto případě je možné hledat proteinové biomarkery v dialyzátu, což je odpadní tekutina při hemodialýze a nebo peritoneální dialýze. V minulosti byly takto popsány např. karbonylované deriváty albuminu<sup>7</sup>, fibrinogenu<sup>8</sup>, ceruloplasminu<sup>9</sup> a haptoglobinu<sup>10</sup>, přičemž tato jejich modifikace vždy indikovala alteraci jejich funkce s významnými prognostickými důsledky. Proteomická analýza moči je tedy možná, musí ale zahrnovat koncentrační kroky jako ultracentrifugaci, ultrafiltraci, nebo lyofilizaci. Proteinový obsah moči je velmi variabilní, jsou zde ale přítomny různé markery jako např. endogenní „housekeeping“ peptidy, které jsou vysoce stabilní a v moči se vyskytují nezávisle na věku, pohlaví a nemění se často ani po farmakoterapii<sup>11</sup>.

Proteomická analýza moči byla využita při hledání biomarkerů selhání ledvin, nádorů prostaty, polycystické choroby ledvin, chronické transplantační nefropatie, lupusové nefritidy, ledvinových kamenů, malignit ledvin a močového měchýře<sup>11</sup>. V současnosti se již využívá několik proteinových biomarkerů obsažených v moči v klinické praxi. Jako příklad mohou posloužit biomarkery spojené s akutním selháváním ledvin: neutrofilní s gelatinasou asociovaný lipokalin (NGAL), cystatin C a další<sup>12</sup>. Dalším příkladem významných proteinových markerů dostupných z moči jsou protein nukleární matrix 22 (NMP22) a antigen karcinomu močového měchýře (UBC), které byly schváleny americkým úřadem FDA (Food and Drug Administration) k diagnostice nádorů močového měchýře<sup>13</sup>.

#### 3.2. Sliny

Sliny jsou kapalné výměšky vylučované ze tří velkých slinných žláz (příušní, podjazykové a čelistní) a drobných slinných žláz (retní, tvářové, stoličkové, patrové

a jazykové). Sliny mohou obsahovat části buněk, zubního plaku, bakterií, sekrety z nosu, sekrety z dýchacích cest a krev. Chemicky se jedná o slabě kyselý roztok o pH 6–7 složený z 99 % vody, 0,3 % bílkovin a 0,2 % elektrolytů. Funkčně se sliny podílí na zpracování potravy, zprostředkovávají vnímání chuti a pomáhají remineralizovat sklovinu. Ve slinách bylo dosud identifikováno více než 3000 proteinů, nejvíce abundantní jsou však alfa-amylasa, anixin A1, kalgranulin-B, desmoplakin a albumin. Tyto proteiny zastupují 16 % celkového slinného proteomu. Ve slinách byly, díky jejich snadné dostupnosti, studovány biomarkery celé řady nemocí, např. autismu, nádorů plic, ústních malignit, Sjögrenova syndromu a reakce štěpu proti hostiteli<sup>11,14,15</sup>.

Pro diagnostiku ústních nádorů ze slin je komerčně dostupný kit „Oral fluid nanosensor test“ (OFNASET), který analyzuje dva proteinové markery (thioredoxin a interleukin 8) a čtyři mRNA markery ze slin<sup>16</sup>. Ve fázi vývoje je kit pro diagnostiku zánětů dásní, který měří hladinu matrix-metaloproteinasy 8 (cit.<sup>17</sup>).

#### 3.3. Slzy

Slzy se využívají jako potenciální zdroj biomarkerů onemocnění oka, ale také některých systémových onemocnění<sup>11</sup>. Slzy rozdělujeme do tří kategorií – slzy bazální, reflexní a emoční. Bazální slzy jsou ty slzy, které v klidovém stavu oplachují oko. Reflexní slzy jsou vylučovány při podráždění oka. Od bazálních slz se odlišují zejména vyšším objemem, ale také mírně odlišným obsahem proteinů<sup>18</sup>. Slzy emoční jsou specifické pro člověka a na rozdíl od reflexních slz jsou řízeny a spouštěny aktivací limbického systému<sup>19</sup>. Pro studium proteomických biomarkerů se používají slzy bazální. Jednak mají nejvyšší koncentraci proteinů a nejlépe odpovídají přirozenému biologickému stavu. Odběr slz je pouze minimálně invazivní, slzy se odebírají pomocí papírku pro Schirmerův test suchého oka, případně pomocí skleněné kapiláry<sup>20</sup>.

Proteomické biomarkery byly v slzách studovány za účelem diagnostiky a pochopení mechanismu očních onemocnění, a to u syndromu suchého oka, blefaritidy, diabetické retinopatie, nebo keratokonu. Biomarkery ze slz byly sledovány také u systémových onemocnění, jako jsou nádorová onemocnění, roztroušená skleróza, nebo Alzheimerova nemoc. Ze slz již bylo identifikováno nejméně 47 potenciálních a 10 validovaných biomarkerů pro všechna výše zmíněná onemocnění<sup>11,21</sup>. Testy založené na identifikaci matrixové metaloproteinasy, imunoglobulinu E a laktoferinu v slzách<sup>11,21</sup> sloužící k diagnostice zánětlivých onemocnění oka a syndromu suchého oka jsou již komerčně dostupné (InflammaDry<sup>22</sup> a TearScan Micro-Assay System<sup>23</sup>).

#### 3.4. Sputum

Sputum je viskózní, hlenovitý biologický materiál vylučovaný dýchacím ústrojím a uvolňovaný při kašli. Proteomická analýza sputa je zatím v počátcích, v tuto chvíli je studována zejména v souvislosti s astmatem,

chronickou obstrukční plicní nemocí<sup>24</sup>, tuberkulózou<sup>25</sup> a plicními nádory<sup>26</sup>. Odběr sputa je neinvazivní, někdy je ale výhodná jeho indukce inhalací hypertonickeho solného roztoku. Takto indukované sputum má vyšší kvalitu a životnost obsažených buněk<sup>27</sup>.

Přestože jsou ve sputu studovány biomarkery výše zmíněných chorob, nedávná proteomická charakterizace 40 indukovaných sput od nekuřáků ukázala vysokou heterogenitu mezi jedinci ve stejné studované skupině, kdy z celkem 4182 proteinů identifikovaných alespoň u 1 jednotlivce bylo pouze 73 proteinů přítomných ve více než 90 % vzorků<sup>28</sup>. Na druhou stranu může být diagnostický proteinový podpis založený na mnohem menším počtu až jednotkách identifikovaných proteinů. Například v nedávné studii byly ve sputu identifikovány tři kandidátní proteinové biomarkery (UGGT1, COL6A1 a MAP4) jako odpovědi na léčbu cisplatinou u nemalobuněčného karcinomu plic<sup>29</sup>.

### 3.5. Kondenzát vydechaného vzduchu

Vyšetření kondenzátu vydechaného vzduchu je klinicky zajímavé zejména pro nízkou invazivitu jeho odběru. Kondenzát se získává pomocí zařízení, které chladí jímající nádobu, přes kterou proudí vydechaný vzduch. Ochlazením dochází ke kondenzaci vlhkosti, která se v nádobě sbírá. Od zdravého člověka je možné za 10 min získat až 3 ml kapalného kondenzátu. Toto množství se může lišit u pacientů s karcinomy plic a chronickou obstrukční plicní chorobou<sup>30</sup>. V kondenzátu vydechaného vzduchu se nejčastěji stanovují metabolity<sup>31</sup> a pH (cit.<sup>31</sup>). Proteomické studie kondenzátu vydechaného vzduchu jsou spíše v počátcích a soustřeďují se kromě nádorů plic<sup>30</sup>, astmatu a chronické obstrukční plicní choroby (COPD)<sup>32</sup> také na důkladnou charakterizaci dechového kondenzátu<sup>33</sup>. Úskalím proteomické analýzy vydechaného vzduchu je velmi nízká koncentrace proteinů v získaném vzorku. Od toho se odvíjí další obtíže při zpracování a zejména závislost na citlivých analytických metodách založených na hmotnostní spektrometrii. Některé studie řešily problém nízkého počtu proteinů spojením několika vzorků od zdravých jedinců, nebo pacientů. Tímto přístupem sice byla ztracena informace o heterogenitě vzorku, ale nízký počet proteinů ve vzorku již nebyl překážkou v úspěšném provedení proteomické analýzy<sup>33,34</sup>. Další strategií, jak zvýšit množství analytu ve vzorku, byly různé metody zakoncentrování, přičemž nejvýhodnějšími se ukázaly metody zachycení proteinů na porézních kuličkách POROS-20-R2-RP<sup>35</sup>, vysušování mrazem<sup>36</sup> a chromatografie na reverzní fázi<sup>37</sup>. S využitím hmotnostně spektrometrických přístupů s vysokým rozlišením<sup>38–41</sup>, byla úspěšně provedena proteomická analýza i na úrovni jednotlivých vzorků a například v souboru 192 jedinců bylo identifikováno 348 různých proteinů, mezi nimiž byly identifikovány potenciální biomarkery plicních nádorů<sup>40</sup>.

Přestože z kondenzátu vydechaného vzduchu byla identifikována řada potenciálních nádorových proteinových biomarkerů (např. cytokeratiny 1, 6, 9, 10, beta-

hemoglobin, hornerin<sup>40</sup>, dermcidin<sup>39</sup> a další), o jejich klinickém využití nejsou zatím dostupné žádné informace.

### 3.6. Sperma

Biomarkery ve spermatu jsou sledovány prakticky z jediného důvodu. Tím je stanovení mužské plodnosti, případně monitorování její léčby. Byly publikovány proteomické studie nejen na lidech, ale také na prasatech<sup>42</sup>, skotu<sup>43</sup> nebo rybách<sup>44</sup>. Další výzkumné metody se soustřeďují na kvalitu DNA<sup>45</sup>, vliv exogenních polutantů<sup>46,47</sup>, epigenetiku<sup>48</sup> nebo bakteriální infekce<sup>49</sup>.

Proteomické studie spermatu se dají rozdělit na studie spermií a seminální plasm<sup>50</sup>. Rozdělení spermatu na tyto dvě frakce probíhá prostou centrifugací. Spermie jsou z této dvojice paradoxně méně komplexní matricí, protože v procesu zrání je DNA zahuštěna a zůstávají pouze proteiny specifické pro hlavičku, bičík a proteiny odpovědné za získávání energie. Ty jsou distribuovány rovnoměrně v celé spermii. Porovnání proteomu zdravé spermie a spermie neplodných mužů ukázaly největší rozdíly právě v proteinech, které se podílí na energetickém metabolismu, jako jsou například glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasa, fruktosa-1,6-bisfosfátaldolasa a další<sup>50</sup>. Studium seminální plasmy čelí podobným problémům jako studium plasmy krevní. Je zde přítomno několik velmi abundantních proteinů, které maskují velký počet minoritních proteinů a výrazně ztěžují jejich detekci. Z tohoto důvodu se v seminální plasmě, i když je to komplexnější matrice, podařilo identifikovat mnohem méně proteinů než ve spermii (2545 vs. 6238)<sup>50,51</sup>. Porovnání seminální plasmy zdravých a neplodných mužů vedlo k objevení celé řady rozdílně regulovaných proteinů. Tyto proteiny mají v seminální plasmě mnoho různých funkcí<sup>51</sup> a jejich validace je v různém stádiu výzkumu. Akrozomální vezikulární protein 1 (acrosomal vesicle protein 1) je již součástí domácího diagnostického kitu SpermCheck Fertility<sup>®</sup> od firmy Bio-Rad Laboratories<sup>51</sup>.

### 3.7. Cervikální hlen

Cervikální hlen je viskózní substance uzavírající děložní čípek. Odběr tohoto hlenu je neinvazivní a je možné jej provést při běžné preventivní gynekologické prohlídce. Vzhledem k tomu, že děložní čípek je jedinou snadno dostupnou částí dělohy, je cervikální hlen vhodným zdrojem biomarkerů pro studium nemocí dělohy. Za největší nevýhodu cervikálního hlenu lze považovat to, že se jeho složení a to i proteinové, v průběhu menstruačního cyklu výrazně mění<sup>52</sup>. Cervikální hlen je nejrůdnější v období ovulace a jediné tehdy je propustný pro spermie. Tehdy je také nejsnadnější jeho odběr. Před a po ovulaci rapidně klesá jeho objem a stoupá viskozita a odběr je tedy možný pouze rozpouštěním hlenu oplachem.

V současnosti se začínají objevovat nové práce studující proteomický profil cervikálního hlenu v průběhu menstruačního cyklu<sup>52</sup>, endometriózy<sup>53</sup>, rakoviny děložního čípku<sup>54</sup>, nebo HIV infekce<sup>55</sup>. Některé markery pro tyto

diagnózy jsou již validovány, jako například alfa aktinin 4 pro nádory děložního čípku nebo myeloblastin a serpin A5 pro HIV infekce<sup>11</sup>. V cervikovaginálním oplachu byly studovány markery těhotenských komplikací, jako je intramniotická infekce, preeklampsie, nebo předčasný porod<sup>11</sup>.

### 3.8. Mozkomíšni mok

Mozkomíšni mok je tělní tekutina oplachující mozek a míchu. Její hlavní funkcí je chránit mozek a míchu před otřesy a nárazy, odvádět z nervové soustavy odpadní látky, udržovat homeostázu a chránit mozek a míchu před ischemií udržováním nitrolebního tlaku. Mozkomíšni mok je v současnosti rutinně odebírán a analyzován metodou lumbální punkce. Biochemická analýza mozkomíšního moku se soustředí zejména na fyzikální vlastnosti, mikrobiologickou kontaminaci, obsah celkového proteinu, případně obsah albuminu nebo imunoglobulinů<sup>56</sup>.

Přímý kontakt s mozkem a míchou a zavedená metoda odběru jsou faktory, které činí studium mozkomíšního moku velmi atraktivním. Lze v něm studovat biomarkery Alzheimerovy<sup>57</sup> a Parkinsonovy choroby<sup>58</sup>, roztroušené sklerózy<sup>59</sup>, mozkových nádorů<sup>60</sup>, idiopatického normotlakého hydrocefalu<sup>61</sup>, poranění míchy<sup>62</sup> a dalších poruch nervového systému. V současnosti se již v klinické praxi využívají četné proteomické biomarkery, jako je protein 14-3-3 a agregované prionové proteiny, jejichž přítomnost je finálním průkazem Creutzfeldtovy-Jakobovy choroby, oligoklonální IgG je markerem roztroušené sklerózy a protein S100 $\beta$  markerem gliózy<sup>63</sup>. Poměrně často je využívána detekce protilátek vůči různým patogenům, ale i autoproti látek vůči vlastním proteinům jako například aquaporinu 4, která je součástí diagnostických kritérií pro neuromyelitis opticus<sup>64</sup>. Do klinické praxe vstupují také proteomické biomarkery palčivé Alzheimerovy nemoci, jako je zejména beta-amyloidní protein 42 (A $\beta$ 42), celkový tau protein (tTau), fosforylovaný tau protein (pTau) a neurogranin<sup>65</sup>. Významným přínosem těchto biomarkerů je skutečnost, že je možné jejich změny detegovat již 25 let před rozvojem klinických známek onemocnění a je zde prostor pro včasné terapeutické intervence<sup>66,67</sup>.

Vzhledem k velmi intenzivní potřebě dalších biomarkerů neurologických onemocnění ze strany klinických pracovišť byla za tímto účelem v roce 2015 založena mezinárodní Společnost pro analýzu mozkomíšního moku a klinickou neurochemii (CSF society).

### 3.9. Pankreatická šťáva

Pankreatická šťáva je vyměšována slinivkou břišní do dvanácterníku a obsahuje především trávicí enzymy a jejich prekurzory trypsinogen, chymotrypsinogen, elastasu, karboxypeptidasu, lipasy, nukleasy a amylasy. Jako zdroj biomarkerů se studuje zejména v souvislosti nádory slinivky, v mnohem menší míře také při studiu pankreatitidy<sup>68</sup>.

Odběr pankreatické šťávy probíhá endoskopicky po předchozí intravenózní stimulaci sekretinem. Tato stimula-

ce vede k výraznějším změnám v obsahu biomarkerů a zvyšuje diagnostickou hodnotu vyšetření<sup>69</sup>.

V takto odebrané pankreatické šťávě se nestanovují jen proteiny, ale může sloužit k identifikaci nádorových buněk a zjišťování jejich mutačního statusu, přičemž bylo popsáno stanovení mutací proteinů p53 nebo k-ras (cit.<sup>70</sup>). Dále se pankreatická šťáva využívá ke stanovení obsahu miRNA (cit.<sup>71</sup>), cytokinů<sup>72</sup> nebo epigenetických změn DNA (cit.<sup>73</sup>). Samotné proteomické studie by se daly rozdělit do dvou hlavních kategorií. První kategorií tvoří studie, které hledají nové markery. Druhou kategorií studie, které využívají stávající markery, jako je např. karcinoembryonální antigen (CEA), a zpřesňují jejich analytické parametry, případně prokazují jejich použitelnost<sup>73</sup>.

### 3.10. Žluč

Proteomické biomarkery se ve žluči studují minimálně. Jsou k tomu dva důvody. První je, že žluč je komplexní směs složená zejména z metabolitů, lipidů a solí. Tyto složky je potřeba před proteomickou analýzou odstranit. Druhým důvodem je vyšší invazivita odběru vzorků<sup>74</sup>. Proteomické studie zaměřené na hledání biomarkerů se zaměřují zejména na rakovinu žlučového<sup>74</sup>, v mnohem menší míře pak na nádory slinivky břišní<sup>75</sup> a záněty žlučníku<sup>76</sup>. Například v rámci studie zaměřené na nádory žlučových cest byl ve žluči identifikován známý somatomedin, inzulinový růstový faktor typu 1 (IGF1), který byl schopen odlišit nádory žlučových cest od benigních onemocnění a nádorů pankreatu<sup>74</sup>.

### 3.11. Plodová voda

Plodová voda je tělní tekutina, která vytváří plodu během těhotenství jeho životní prostor, chrání jej před mechanickou traumatizací a umožňuje mu pohyb. To, že je plodová voda v těsném kontaktu s plodem, plod tuto vodu polyká a také do ní vylučuje, dělá plodovou vodu nejméně invazivním zdrojem biomarkerů plodu. V současné době se odběr plodové vody, amniocentéza, provádí jako druhý stupeň novorozeneckého screeningu, a to ve chvíli, kdy první stupeň zachytil zvýšené riziko defektu plodu. Amniocentéza se zpravidla provádí až po 15. týdnu těhotenství, jelikož odběr v časných fázích těhotenství je více rizikový<sup>77</sup>.

V plodové vodě je možné identifikovat jak transkriptomické, tak i metabolické a proteomické biomarkery<sup>78</sup>. Proteomické studie se věnují zejména riziku předčasného porodu, ať už z důvodu infekčních nebo genetických. V této oblasti bylo dosaženo významného pokroku, neboť již byly charakterizovány změny proteomu plodové vody v průběhu těhotenství, ale také proteiny charakteristické pro zvýšené riziko předčasného porodu<sup>78</sup>. Mezi nejvýznamnější proteiny patřily apolipoproteiny A-I a A-IV, vazebný protein pro IGF1 (IGFBP1), bikunin, faktor produkovaný epiteliálními buňkami (PEDF) a alfa-1-anti-trypsin<sup>79</sup>.

#### 4. Klady a zápory proteomiky v detekci biomarkerů

Nejběžnější design proteomické studie zaměřené na identifikaci biomarkerů libovolného onemocnění je cílená na identifikaci proteinů, které jsou významně rozdílné mezi zdravou a patientskou skupinou. Při dostatečném počtu vzorků v dané studii se podaří identifikovat proteiny, které odráží nespecifické rozdíly mezi jednotlivci a které jsou charakteristickým podpisem onemocnění. Přes tyto zjevné výhody a zřejmé výzkumné úsilí v této oblasti, jen velmi málo v současnosti používaných biomarkerů bylo objeveno výše uvedeným postupem. Pro tento stav existuje více příčin, které brzdí zavedení kandidátního biomarkeru do praxe a jeho schválení regulačními autoritami<sup>80</sup>.

Typická proteomická studie se skládá ze tří hlavních fází (Schéma 1). První je fáze výzkumná (discovery), kdy se porovnávají kontrolní a patientské vzorky a hledají se kvalitativní (přítomnost nebo nepřítomnost proteinu) a kvantitativní (rozdíl v koncentraci proteinu) změny. Proteomické studie v této fázi studují celý soubor pacientů tak, aby byla identifikovaná nespecificita biomarkerů a byly nalezeny proteiny, které jsou charakteristické pro onemocnění v celé populaci<sup>81</sup>. Druhou fází proteomické studie nového biomarkeru je fáze verifikační. Tato fáze se zaměřuje na v první fázi identifikované signifikantně změněné proteiny. Toto zjištění je nezbytné ověřit jinou metodou (cílená proteomika pomocí LC-MS, ELISA nebo western blot), než byla použita v první fázi, a na jiné skupině pacientů. Cílem této fáze je ověřit a vytrždit skutečně jen ty proteiny, které mají nejlepší diagnostické vlastnosti. Jestliže se během běžného biomarkerového proteomického experimentu identifikují až tisíce proteinů, může se snadno stát, že signifikantně změněných proteinů budou desítky až stovky. Cílem poslední validační fáze je zaměřit se pouze na ty proteiny, které budou mít diagnostickou hodnotu vyšší, než má současné vyšetření, a zároveň stanovit hladiny senzitivity a specificity pro každý kandidátní biomarker<sup>81</sup>.

V okamžiku, kdy je nastaven takto robustní systém umožňující vybrat kandidáty s dostatečnou výpovědní

	Fáze	Technologie	Analyty	Vzorky
Nečíslená	<b>Výzkumná</b> Identifikace kandidátních biomarkerů	LC-MS/MS	1000	50
Cílená	<b>Verifikační</b> Ověření principu	Immuno: ELISA Proteomika: MRM	5-100	100
	<b>Validační</b> Rozšířené klinické testování	ELISA	1-10	1000

Schéma 1. Schéma designu studie zaměřené na vývoj proteomických biomarkerů

hodnotou, je až zarážející, že se již mnoho ze studovaných biomarkerů nepoužívá v klinické praxi. Důvodem je zejména skutečnost, že další validační kroky jsou finančně a personálně náročné, s potřebou multicentrické klinické studie, která se musí zaměřit i na další příbuzná onemocnění k ověření specificity testu, což mnohdy přesahuje možnosti výzkumných skupin, které provedly výzkumnou a validační fázi. V této fázi je nezbytné najít investora, případně licencovat duševní vlastnictví soukromému subjektu, který vyvine diagnostický kit a provede jeho otestování a certifikaci před a následně i po schválení regulační autoritou<sup>82</sup>. Posledním faktorem je implementace vyšetření do systému zdravotního pojištění a využívání nového biomarkeru zdravotníky<sup>30,83</sup>.

#### 5. Závěr

Je zřejmé, že zejména u tekutin, jejichž odběr je neinvazivní, je velký vývojový potenciál a dojde k objevům nových biomarkerů, zejména pro onemocnění k nim přilehlých tkání a orgánů. Detailní popis validační fáze vývoje biomarkerů je nad rámec tohoto přehledu<sup>81-85</sup>. Přes výše zmíněné obtíže a nezbytné translační úsilí, které je nutné vynaložit, je biomarkerům ze zmiňovaných tekutin věnována stále vyšší pozornost. Je tedy pravděpodobné, že se s nimi budeme v budoucnu setkávat stále častěji.

*Práce byla podpořena z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č.: AZV 16-32302A, AZV 16-32318A, NV18-08-00291 a z Evropského fondu pro regionální rozvoj – projekt ENOCH (reg.č.: CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000868).*

#### LITERATURA

1. Freedland S. J., Sutter M. E., Dorey F., Aronson W. J.: *Urology* 61, 365 (2003).
2. Azab S., Osama A., Rafaat M.: *Transl. Androl. Urol.* 1, 148 (2012).
3. Zuo X., Zhang L., Luo H., Li Y., Zhu H.: *Clin. Genet.* 92, 365 (2017).
4. Ortega M. A., Poirion O., Zhu X., Huang S., Wolfgruber T. K., Sebra R., Garmire L. X.: *Clin. Transl. Med.* 6, 46 (2017).
5. Jimenez-Luna C., Torres C., Ortiz R., Dieguez C., Martinez-Galan J., Melguizo C., Prados J. C., Caba O.: *Oncotarget* 9, 16573 (2018).
6. Tessitore A., Gaggiano A., Ciciarelli G., Verzella D., Capece D., Fischietti M., Zazzeroni F., Alesse E.: *Int. J. Proteomics* 2013, 125858.
7. Pavone B. a dalších 10 spoluautorů: *J. Nephrol.* 24, 453 (2011).
8. Michelis R., Gery R., Sela S., Shurtz-Swirski R., Grinberg N., Snitkovski T., Shasha S. M., Kristal B.: *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 18, 924 (2003).

9. Kang J. H., Kim K. S., Choi S. Y., Kwon H. Y., Won M. H.: *Biochim. Biophys. Acta* 1568, 30 (2001).
10. Miller Y. I., Altamentova S. M., Shaklai N.: *Biochemistry* 36, 12189 (1997).
11. Csósz É., Kalló G., Márkus B., Deák E., Csutak A., Tózsér J.: *J. Proteomics* 153, 30 (2017).
12. Verbrugge F. H.: *Curr. Heart Fail. Rep.* 16, 240 (2019).
13. Chakraborty A., Dasari S., Long W., Mohan C.: *Am. J. Cancer Res.* 9, 1104 (2019).
14. Fialová L.: *Chem. Listy* 113, 581 (2019).
15. Kaczor-Urbanowicz K. E., Martin Carreras-Presas C., Aro K., Tu M., Garcia-Godoy F., Wong D. T.: *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ 242, 459 (2017).
16. Gau V., Wong D.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1098, 401 (2007).
17. Taylor J. J. a dalších 13 spoluautorů: *Sci. Rep.* 9, 11034 (2019).
18. Perumal N., Funke S., Wolters D., Pfeiffer N., Grus F. H.: *Proteomics* 15, 3370 (2015).
19. Bylsma L. M., Gračanin A., Vingerhoets A. J. J. M.: *Clin. Auton. Res. Off. J. Clin. Auton. Res. Soc.* 29, 63 (2019).
20. Green-Church K. B., Nichols K. K., Kleinholz N. M., Zhang L., Nichols J. J.: *Mol. Vis.* 14, 456 (2008).
21. Azkargorta M., Soria J., Acera A., Iloro I., Elortza F.: *J. Proteomics* 150, 359 (2017).
22. “InflammaDry | Quidel.”: <<https://www.quidel.com/immunoassays/inflammdry>>, staženo 12. 2. 2020.
23. “Innovative Medical Supplies | Regional Distributor for Advanced Tear Diagnostics’ Products.”: <<https://ims300.com/>>, staženo 12. 2. 2020.
24. Paone G., Leone V., Conti V., De Marchis L., Ialleni E., Graziani C., Salducci M., Ramaccia M., Munafò G.: *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 20, 698 (2016).
25. Fu Y. R., Yi Z. J., Guan S. Z., Zhang S. Y., Li M.: *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18, 1241 (2012).
26. Yu L., Shen J., Mannoor K., Guarnera M., Jiang F.: *Clin. Lung Cancer* 15, 372 (2014).
27. Paggiarol L. of the W. G. P. L., Group M. of the W., Chanez P., Holz O., Ind P. W., Djukanović R., Maestrelli P., Sterk P. J.: *Eur. Respir. J.* 20, 3 (2002).
28. Schofield J. P. R. a dalších 35 spoluautorů: *J. Proteome Res.* 17, 2072 (2018).
29. Böttger F., Schaaij-Visser T. B., de Reus I., Piersma S. R., Pham T. V., Nagel R., Brakenhoff R. H., Thunnissen E., Smit E. F., Jimenez C. R.: *J. Proteomics* 196, 106 (2019).
30. Hayes S. A., Haefliger S., Harris B., Pavlakis N., Clarke S. J., Molloy M. P., Howell V. M.: *J. Breath Res.* 10, 034001 (2016).
31. Aldakheel F. M., Thomas P. S., Bourke J. E., Matheson M. C., Dharmage S. C., Lowe A. J.: *Allergy* 71, 741 (2016).
32. Terracciano R., Pelaia G., Preianò M., Savino R.: *Proteomics Clin. Appl.* 9, 203 (2015).
33. Lacombe M., Marie-Desvergne C., Combes F., Kraut A., Bruley C., Vandembrouck Y., Chamel Mossuz V., Couté Y., Brun V.: *J. Breath Res.* 12, 021001 (2018).
34. Muccilli V., Saletti R., Cunsolo V., Ho J., Gili E., Conte E., Sichili S., Vancheri C., Foti S.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 105, 134 (2015).
35. Bloemen K., Hooyberghs J., Desager K., Witters E., Schoeters G.: *Proteomics Clin. Appl.* 3, 498 (2009).
36. Kurova V. S., Anaev E. C., Kononikhin A. S., Fedorchenko K. Y., Popov I. A., Kalupov T. L., Bratanov D. O., Nikolaev E. N., Varfolomeev S. D.: *Clin. Chem. Lab. Med.* 47, 706 (2009).
37. Núñez-Naveira L., Mariñas-Pardo L. A., Montero-Martínez C.: *Lung* 197, 523 (2019).
38. Kononikhin A. S. a dalších 13 spoluautorů: *J. Chromatogr. B* 1047, 97 (2017).
39. Fedorchenko K. U. a dalších 11 spoluautorů: *Mosc. Univ. Chem. Bull.* 71, 134 (2016).
40. López-Sánchez L. M., Jurado-Gámez B., Feu-Collado N., Valverde A., Cañas A., Fernández-Rueda J. L., Aranda E., Rodríguez-Ariza A.: *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 313, L664 (2017).
41. Sun C., Zhou T., Xie G., Fu S., Gao L., Liao J., Wu Y., Wang G.: *J. Proteomics* 206, 103392 (2019).
42. Sutovsky P.: *Reprod. Domest. Anim. Zuchtthg.* 50 Suppl 2, 11 (2015).
43. Harayama H., Minami K., Kishida K., Noda T.: *Reprod. Med. Biol.* 16, 89 (2017).
44. Lacerda S. M. dos S. N., Costa G. M. J., de França L. R.: *Gen. Comp. Endocrinol.* 207, 56 (2014).
45. Zini A., Albert O., Robaire B.: *Andrology* 2, 322 (2014).
46. Den Hond E., Tournaye H., De Sutter P., Ombelet W., Baeyens W., Covaci A., Cox B., Nawrot T. S., Van Larebeke N., D’Hooghe T.: *Environ. Int.* 84, 154 (2015).
47. Lafuente R., García-Blázquez N., Jacquemin B., Checa M. A.: *Fertil. Steril.* 106, 880 (2016).
48. Jenkins T. G., Aston K. I., James E. R., Carrell D. T.: *Syst. Biol. Reprod. Med.* 63, 69 (2017).
49. Fraczek M., Kurpisz M.: *Folia Histochem. Cytobiol.* 53, 201 (2015).
50. Jodar M., Soler-Ventura A., Oliva R.: *J. Proteomics* 162, 125 (2017).
51. Samanta L., Parida R., Dias T. R., Agarwal A.: *Reprod. Biol. Endocrinol. Reprod. Biol. Endocrinol.* 16, 41 (2018). <https://spermcheck.com>, staženo 12. 2. 2020.
52. Grande G., Milardi D., Vincenzoni F., Pompa G., Biscone A., Astori A.L., Fruscella E., Messina I., Castagnola M., Marana R.: *Mol. Biosyst.* 11, 1717 (2015).
53. Grande G., Vincenzoni F., Milardi D., Pompa G., Ricciardi D., Fruscella E., Mancini F., Pontecorvi A., Castagnola M., Marana R.: *Clin. Proteomics* 14, 7 (2017).
54. Panicker G., Lee D. R., Unger E. R.: *J. Proteomics* 71, 637 (2009).
55. Burgener A.: *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 818, 143 (2012).
56. “ČSKB: Vyšetřování mozkomíšního moku.”: <<http://>

- www.cskb.cz/cskb.php?pg=doporuceni--vysetrovani-mozkomisniho-moku>, staženo 12. 6. 2018.
57. Huynh R. A., Mohan C.: *Front. Neurol.* 8, 102 (2017).
  58. Xing L., Wang D., Wang L., Lan W., Pan S.: *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 15462 (2015).
  59. Kroksveen A. C., Opsahl J. A., Gulbrandsen A., Myhr K.-M., Oveland E., Torkildsen Ø., Berven F. S.: *Biochim. Biophys. Acta* 1854, 746 (2015).
  60. Shen F., Zhang Y., Yao Y., Hua W., Zhang H.-S., Wu J.-S., Zhong P., Zhou L.-F.: *Neurosurg. Rev.* 37, 367 (2014).
  61. Schirinzi T., Sancesario G. M., Di Lazzaro G., D'Elia A., Imbriani P., Scalise S., Pisani A.: *J. Neural Transm.* 125, 673 (2018).
  62. Rodrigues L. F., Moura-Neto V., E Spohr T. C. L. de S.: *Mol. Neurobiol.* 55, 6436 (2018).
  63. Wright B. L. C., Lai J. T. F., Sinclair A. J.: *J. Neurol.* 259, 1530 (2012).
  64. Wingerchuk D. M. a dalších 18 spoluautorů, International Panel for NMO Diagnosis: *Neurology* 85, 177 (2015).
  65. Willemse E. A. J. a dalších 14 spoluautorů: *Clin. Chem.* 64, 927 (2017).
  66. Bateman R. J. a dalších 27 spoluautorů, Dominantly Inherited Alzheimer Network: *N. Engl. J. Med.* 367, 795 (2012).
  67. Jack C. R., Knopman D. S., Jagust W. J., Shaw L. M., Aisen P. S., Weiner M. W., Petersen R. C., Trojanowski J. Q.: *Lancet Neurol.* 9, 119 (2010).
  68. Williams J. A.: *Pancreas* 42, 905 (2013).
  69. Doyle C. J., Yancey K., Pitt H. A., Wang M., Bemis K., Yip-Schneider M. T., Sherman S. T., Lillemo K. D., Goggins M. D., Schmidt C. M.: *Pancreas* 41, 186 (2012).
  70. Lu X., Xu T., Qian J., Wen X., Wu D.: *Chin. Med. J. (Engl.)* 115, 1632 (2002).
  71. Sadakari Y., Ohtsuka T., Ohuchida K., Tsutsumi K., Takahata S., Nakamura M., Mizumoto K., Tanaka M.: *JOP J. Pancreas* 11, 587 (2010).
  72. Noh K. W., Pungpapong S., Wallace M. B., Woodward T. A., Raimondo M.: *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 4, 782 (2006).
  73. Ballehaninna U. K., Chamberlain R. S.: *Tumour Biol.* 34, 3279 (2013).
  74. Alvaro D.: *Curr. Opin. Gastroenterol.* 25, 279 (2009).
  75. Agrawal S.: *World J. Clin. Oncol.* 8, 255 (2017).
  76. Kouroumalis E., Samonakis D., Voumvouraki A.: *Hepatic Med. Evid. Res.* 10, 43 (2018).
  77. Copel J. A., Pettker C. M.: *Gynekologie po promoci 2006*, 32.
  78. Kamath-Rayne B. D., Smith H. C., Muglia L. J., Morrow A. L.: *Reprod. Sci.* 21, 6 (2014).
  79. Buhimschi I. A., Zhao G., Rosenberg V. A., Abdel-Razeq S., Thung S., Buhimschi C. S.: *PloS One* 3, e2049 (2008).
  80. Wan-Ibrahim W. I., Singh V. A., Hashim O. H., Abdul-Rahman P. S.: *Mol. Med.* 21, 861 (2015).
  81. Geyer P. E., Holdt L. M., Teupser D., Mann M.: *Mol. Syst. Biol.* 13, 942 (2017).
  82. Hanash S. M.: *Genome Med.* 3, 66 (2011).
  83. Pavlou M. P., Diamandis E. P., v knize: *Genomic and Personalized Medicine*, 2. vyd. (Ginsburg Geoffrey S., Willard Huntington F., ed.), str. 263–271. Academic Press, London 2013.
  84. Kulasingam V., Prassas I., Diamandis E. P.: *NPJ Precis. Oncol.* 1, 17 (2017).
  85. Diamandis E. P.: *J. Natl. Cancer Inst.* 102, 1462 (2010).
- J. Václavková, T. Ozdian, M. Hajdúch, and P. Džubák** (*Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, Olomouc*): **Body Fluids as a Source of Proteomic Biomarkers of Various Diseases**
- Proteomics is one of the crucial methods used in biomarker discovery in various human diseases. The advantage of proteomics relies in its ability to identify disease-specific proteins. One very promising strategy is to analyze body fluids that are proximal to the organ of interest and are usually less complex than tissues or blood. Such an approach increases the chance for marker definition. This article reviews current knowledge on body fluid proteomics and proteomic biomarkers of human diseases and highlights mass spectrometry as one of the crucial methods in biomarker discovery.
- Keywords: proteomics, biomarker, body fluids, diagnostics, mass spectrometry
- Acknowledgements*  
Supported by Ministry of Health of the Czech Republic, grants nr. 15-AZV 16-32302A, AZV 16-32318A, NV18-08-00291 and by the European Regional Development Fund - Project ENOCH (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000868).