

Malign Perikard Efüzyonunda Proteomiks Analizi ve Malignite İlişkili Protein Profiline Belirlenmesi

Proteomics Analysis of Malignant Pericardial Effusion And Determine The Profile Of Malignancy-Associated Protein

Sabiye Yılmaz¹, Murat Kasap², Dilek Ural³, Hüseyin Gündüz¹

¹ Sakarya Üniversitesi Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Tıp Fakültesi, Kardiyoloji Ana Bilim Dalı, Sakarya

² Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Ana Bilim Dalı, Kocaeli

³ Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kardiyoloji Ana Bilim Dalı, Kocaeli

Özet

Başvuru Tarihi: 07.02.2014 Kabul Tarihi: 04.08.2014

Amaç: Akciğer kanserine bağlı perikard efüzyonunda protein içeriğinin proteomiks analizi, ilişkili olabilecek yeni biyobelirteçlerin araştırılması ve proteomiks çalışmalarına genel bakış.

Yöntemler: 5 hasta (4 adenokarsinom, 1 büyük hücreli), 5 kontrol (CABC uygulanan) perikard efüzyonu çalışmaya dahil edildi. Hasta grubu yaş ortalaması 47,4±7,92 olan 5 erkekte; kontrol grubu yaş ortalaması 63,4±7.7 olan 4 erkek, 1 bayandan oluşmaktaydı. Örnekler -80°C'de saklandı. 2-D jel elektroforezinde proteinler izoelektrik noktalarına ve moleküler ağırlıklarına göre ayrıldı. Elde edilen jeller Coomasia boyası ile boyanarak protein spotları açığa çıkarıldı. Görüntü analizi Melanie 7 Viewer programı ile yapıldı. Protein spotları öncelikle görsel olarak değerlendirildi, upregülasyona veya downregülasyona uğrayan proteinler saptandı. Proteinlerin tanımlanabilmesi için data analiz metodu halihazırda bulunmadığından proteinler tanımlanamadı. Ancak Melanie 7 programı ile her bir jeldeki protein spotları işaretlendi, birbirleriyle ve normal insan plazmasının 2-D jelindeki protein spotları ile moleküler ağırlıklarına göre karşılaştırıldı.

Bulgular: Malign efüzyonlarda daha fazla proteinin salındığı, plazma ve serumda bulunan proteinlerle benzer olduğu görüldü. Saptanan proteinlerin yeni bir biyobelirteç olma olasılığının düşük olmasına rağmen KAH grubunda olmaması malin efüzyonlarda hedef molekül olarak olası ilaç tedavisi için yol gösterici olabilir. Çalışmada proteinlerin isimlendirilmesi yapılamamış, fonksiyon ve varlığı ile ilgili net bir karar birliğine varılmamış olsa da bu veriler malign perikardiyal efüzyonlarda proteomiks analizinin genişletilerek devam edilmesini destekler.

Sonuç: Tümör hücrelerinin salgıladığı proteinler tümör yükünü, tedaviye verdiği cevabı gösterebilir ve gelecekte güçlü, ümit verici tümör belirteçi olabilir. Tanı, tedavinin belirlenmesi ve prognoz tayininde kullanılabilir. Proteomiks alanında her geçen gün gelişmeler artmaktadır, daha güçlü data analiz programları geliştirilmektedir. Gelecekte sensitivitesi ve spesifitesi artmış protein biyobelirteçleri bulunabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Proteomiks, perikard efüzyonu; malignite; biyobelirteç; kardiyovasküler hastalıklar ve proteomiks

Abstract

Application: 07.02.2014 Accepted: 04.08.2014

Objective: We want to analyse protein content by proteomics of pericardial effusion due to lung cancer, finding new biomarker and overview of proteomics studies.

Methods: 5 patients (4 adenocarcinoma, one large cell), 5 control (CABC applied) pericardial effusion were included in the study. The mean age of patients group 47.4 ± 7.92 with 5 men; the mean age of the control group 63.4 ± 7.7 with 4 men, consisted of one lady. Specimens were kept at -80°C. 2-D gel electrophoresis of proteins based on isoelectric points and molecular weights. Obtained gels were stained with Coomasia stain and protein spots displayed. Image analyses were made by Melanie Viewer program. Protein spots were evaluated visually. Upregulation and downregulation proteins were evaluated. We don't have data analyse method for protein description, proteins weren't identification. Protein spots were marked with Melanie 7 program, they were compared with each other and normal human plasma protein spots according to the molecular weights.

Results: We found much more protein in malign pericardial effusion. These proteins were similar to serum plasma proteins. Identified proteins mayn't be new biomarker, also these proteins weren't founded in CAD. Because of this it can be guide for medication therapy. We didn't entitle proteins but these datas strengthen protein proteomics analyses in malign pericardial effusions.

Conclusion: Proteins secreted by tumor cells display tumor load, response to treatment and can be used for diagnosis, treatment modalities, prognosis analysis. Developments increase in proteomics field and much more strong data analyse programs were improved. With these improvements more sensitive and specific protein biomarkers can be discovered.

Keywords: Proteomics, pericardial effusion; malignancy; biomarkers; cardiovascular diseases and proteomics

Giriş

Çeşitli lokal ve sistemik hastalıklar perikardiyal efüzyona neden olabilmektedir. Fazla miktarda sıvı oluşumu maligniteler, tüberküloz perikardit, üremi, miksödem, vaskülitler, konnektif doku hastalıkları ve parazitozda görülür.^{1,2}

Malign perikardiyal efüzyonlara genel otopsilerde %1-4, kanserli hasta otopsilerinde %15-30 oranında rastlanmaktadır.^{3,4} En sık olarak akciğer kanseri (%30), meme kanseri (%23), lenfomalar ve lösemilere rastlanmaktadır.⁵

Perikardiyal sıvı analizleri etiyojinin belirlenmesinde önemlidir. Yüksek protein içeren eksüdatif efüzyonlar transüda efüzyonlarından daha ciddi bir hastalığa işaret etmektedir. Albümin ve antitripsin gibi plazmada bol bulunan proteinler kapillerden ultrafiltrasyon ile transüda sıvıda bulunabilirken, alfa 2 mikroglobülin, haptoglobülin, immünglobülin, fibrinojen, komplemanlar, lipoprotein ve kollajen gibi yüksek moleküler ağırlıklı proteinler eksüdatif perikardiyal efüzyonlarda saptanır.^{6,7}

Proteomiks, özellikle postgenomik dönemde bir hücre, doku veya biyolojik sıvıların protein profillerinin tanımlanmasında, hastalığın mekanizmasının proteine dayalı araştırılmasında, tanı için yeni biyobelirteç keşfinde ve ilaç tedavisi için yeni hedeflerin belirlenmesinde güçlü bir araçtır.⁸ Ayrıca genetik yatkınlık gösteren hastalıkların tanımlanması doğru bir genetik teste gereksinim duyduğu kadar fenotipin de doğru saptanmasını gerektirir. Çünkü bir organizmadaki proteom genomdan farklı olarak daha dinamiktir ve organizmanın bulunduğu koşula (örneğin patolojik durum) ve zamana bağlı olarak değişebilir.⁹

Klinik proteomiksin diğer hedefleri arasında hastalık yinelenmesinin erken dönemde saptanmasını sağlayacak biyolojik belirteçlerin belirlenmesi ve bunların diyagnostik görüntüleme ile nasıl birlikte kullanılacağına anlaşılması, hastanın tedaviye beklenen yanıtı açısından bireysel tedavi yöntemlerinin uyarlanmasına yardımcı olmaktadır.¹⁰⁻¹¹

Klinik biyobelirteçler malign efüzyonların saptanmasında olduğu kadar diğer sistemik, inflamatuvar hastalıkların tanı, tedavi ve takibinde de önemlidir.

Gereçler ve Yöntem

Örneklerin Toplanması ve Hazırlık

2005-2009 yılları arasında kardiayak tamponat kliniği ile KÜTF Kardiyoloji Kliniğine başvuran, ekokardiyografi eşliğinde perikardiyosentez işlemi uygulanan hastalar alındı. Perikard efüzyonunun etiyojsi klinik değerlendirme, biyokimyasal, mikrobiyolojik, patolojik analiz ve görüntüleme yöntemleri ile belirlendi. Akciğer kanseri saptanan hastalar çalışma grubuna dahil edildi.

Kontrol grubu herhangi bir ek hastalığı olmayan, KÜTF Kalp Damar Cerrahisi kliniğine koroner arter bypass cerrahisi (CABG) amacı ile başvuran kişilerden seçildi. Kapak hastalığı, semptomatik kalp yetersizliği olan hastalar dışlandı. Perikard sıvısı örnekleri operasyon öncesinde perikard açıldığı sırada alındı. Hasta ve kontrol grubundaki katılımcıların özellikleri Tablo 1' de belirtilmiştir.

Protein çözeltilerinin hazırlanması

Perikard sıvıları antikoagulyasyon uygulanmamış steril tüplerde -80 C'de saklandı. Örnekler buz üzerinde çözüldükten sonra santrifüj edilerek çöken hücreler ve üst faz sıvı ayrıldı. İki aşamalı olarak hem çöken hücrelerden hem de üst faz sıvıdan proteomiks çalışmasına karar verildi. Ancak ilk aşamada çökelti kısmın 2D jel elektroforezinden belirgin protein spotları elde edilemedi. Çökelti kısmında hücrelerin çeşitliliği ve sekrete edilen proteinlerden çok hücre içi ve hücre yapısındaki proteinlerin ağırlıklı olarak saptanabileceği düşünülerek üst faz kısmından çalışmasına karar verildi.

Sıvı fazın analizinden önce çalışılan örneklerin içerisinde ağırlıklı olarak albümin bulunması ve bulunan bu albüminin düşük seviyede bulunan proteinleri bloke etme ihtimaline karşılık örneklerden albümin uzaklaştırması yapıldı. Bu amaçla aurum serum mini kit (BioRad, USA) kullanıldı. Elde edilen indirgenmiş sıvıdan tuzları ve diğer uygun olmayan maddeleri uzaklaştırmak için 2D clean up kiti (BioRad, USA) kullanıldı.

Albüminden indirgenmiş, temizleme işlemi yapılmış üst faz örnekleri de, TCA aseton çöktürme işlemi yapıldıktan sonra 250 µL İEF rehidrasyon tamponu içerisinde çözüldü. Daha sonra 17 cm lik IPG (Ph 3-10) striplerine 300 µL örnek volüm eklendi ve emdirildi.

Tablo 1: Hasta ve kontrol grubunun klinik karakteristik özellikleri ve laboratuvar bulguları (E: erkek, K: kadın, H: hemorajik, e:eksüda, S: seröz, t: transüda, EF: ejeksiyon fraksiyonu, Kre: Kreatinin, Trop: troponin, CRP: C reaktif protein (referans aralığı: 0-0,8), Ca 125: Karbonhidrat antijen 125 (referans aralığı: 1,9-35u/ml), Ca 15-3: Karbonhidrat antijen 15-3 (referans aralığı: 0-25u/ml), Ca 19-9: Karbonhidrat antijen 125 (referans aralığı: 0-34u/ml), CEA: Karsinoembriyonik antijen (referans aralığı: 0-6,2 ng/ml), AFP: Alfa fetoprotein (referans aralığı: 0,5-5 lu/ml).

Hasta	Yaş	Cins	Tanı	Efüzyon	CRP	Trop	Ca125	Ca15-3	Ca19-9	CEA	AFP	Kre	EF
Hasta Grubu													
1	34	E	Adeno Ca	H, e	5,12	-	71,8	42	80,7	18,5	1,35	0,9	65
2	48	E	Adeno Ca	H,e	3,64	-	200,4	47	3,08	229	3,04	0,9	62
3	50	E	Adeno Ca	H,e	7,30	-	301,7	31,98	2101	3,62	1,90	0,8	64
4	50	E	BüyükHüc.Ca	H, e	29,9	-	1434	183,3	4637	6,88	1,47	0,6	60
5	55	E	Adeno Ca	H, e	9,92	-	304	19,47	1,05	2,34	0,930	0,8	60
Kontrol Grubu													
1	55	E	KAHKarsız	S, e	1,2	-	-	-	-	-	-	1,1	60
2	58	E	KAHNSTEMI	S, t	1,23	4,6	-	-	-	-	-	0,9	30
3	64	E	KAHNSTEMI	S, t	-	-	-	-	-	-	-	1	35-40
4	65	E	KAH	S, t	3,35	-	-	-	-	-	-	1,2	40-45
5	75	K	KAH	S, t	-	2,1	-	-	-	-	-	0,9	50

İki Boyutlu Jel Elektrofrez (2D Gel Elektrofrez)

2D jel elektrofrezinde 1. boyuttaki amaç kompleks proteinlerin izoelektrik noktalarına göre, 2. boyutta moleküler ağırlıklarına göre odaklamaktır.¹²⁻¹⁴

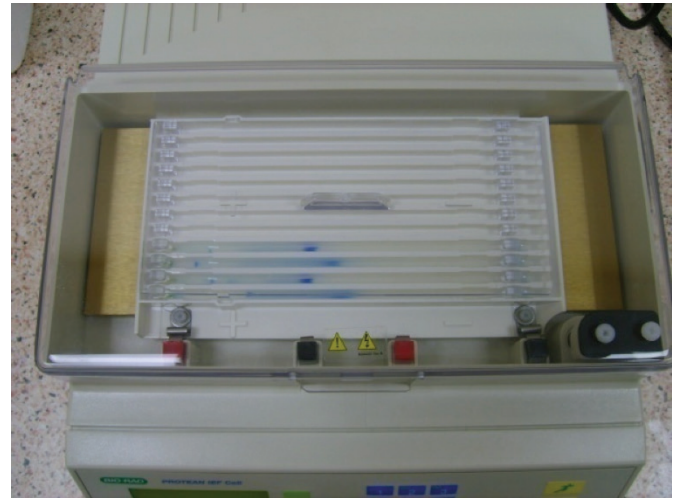
Birinci Boyut: İzoelektrik odaklama (IEF):

Üst faz sıvı örnekleri 17 cm' lik IPG striplere (Ph 3-10 ReadyStrip) emdirildi. 17 cm lik IPG stripleri -80 C'de saklandığı için rehidrasyon işlemine geçilmeden önce her bir stripe denkleştirme işlemi uygulandı. Stripler önce 15 dk equilibration tampon 1, daha sonra 15 dk equilibration tampon 2 ile muamele edildi. Denkleştirme işleminden sonra rehidrasyon tampon ile muamele edilen her bir örnekten 300 µl' lik protein çözeltileri PROTEAN IEF tabaksına koyuldu. IPG stripleri '+' kutup sol tarafa gelecek şekilde tabaka içindeki örneklerin üzerine yerleştirildi ve aktif rehidrasyon işlemi yapıldı. Rehidrasyon sırasında 1. saat sonunda örneğin buharlaşmasını önlemek için üzerlerine 2-3 ml mineral yağı ilave edildi ve yaklaşık 16 saat rehidrasyon işlemine devam edildi.

Rehidrasyon işleminden sonra izoelektrik odaklamaya geçildi. IPG strip artan voltaj programı ile 20 C'de adım adım yürütüldü (250 volt: 20 dakika, 10000 volt: 2,5 saat lineer, 10000 volt: hızlı ve toplamda 40000 kilowatt/saat gücünde ortalama 7 saat). (şekil 1 A)

İkinci Boyut: Protein Jel Elektrofrez (SDS-PAGE):

Mobilite, moleküllerin hem yüklerine hem de boyutlarına bağlıdır. Protein moleküllerinin yükleri eşit ise mobilite sadece büyüklüğe bağlı olacaktır.



Şekil 1: 2D Gel Elektrofrez sistemi. A: İzoelektrik odaklamada (IEF) kullanılan rehidrasyon tabakası, B: SDS-PAGE yürütme tankı

2D jel elektrofrezin 2. boyutunda IPG stripleri poliakrilamid jel üzerinde yürütülerek moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırıldılar. 17 cm'lik iki ucu açık dikdörtgen cam plakalar arasında yüklemeli jeli üstten 1 cm boşluk kalacak şekilde döküldü. Üst yüzeyi

2 mm yüksekliğe kadar su ile doyurulmuş izopropanol pipet ile eklendi. Jel polimerize olduktan sonra n-bütanol saf su ile uzaklaştırıldı. Kurutma kâğıdı ile cam plakalar arası temizlendi. Polimerize olan jel rezervuar tanka yerleştirildi. IPG stripler yürütücü solüsyonda 1-2 dakika bekletildikten sonra jel üzerine yerleştirildi ve arada boşluk kalmaması için agaroz solüsyonu eklendi. Tank yürütücü solüsyon ile doldurularak 17 cm' lik IPG striplerdeki proteinler 48 voltta 7 saat yürütüldü (Şekil B). Yürütme sonunda jel cam plakalardan çıkarıldı, 2 saat sabitleştirici solüsyonda yıkandıktan sonra Coomassie mavisi içeren boyama solüsyonunda 2 saat bekletildi ve daha sonra distile su ile yıkandı

Görüntüleme ve Analiz

Boyanan jeller image scanner ve labscan 3.00 yazılımı ile tarandı. Görüntü analizi Melanie 7 Viewer programı ile yapıldı. 2-D jel haritasındaki protein spotları öncelikle görsel olarak değerlendirildi ve upregülasyona veya downregülasyona uğrayan proteinler saptandı. Proteinlerin tanımlanabilmesi için data analiz metodu halihazırda bulunmadığından proteinler tanımlanamadı. Ancak Melanie 7 programı ile her bir jeldeki protein spotları işaretlendi ve birbirleri ile karşılaştırıldı. Perikardiyal efüzyonun plazmanın ultrafiltrasyonu sonucu oluştuğu düşünülerek, yine görsel olarak, perikardiyal efüzyondaki protein spotları normal insan plazmasının 2-D jelindeki protein spotları ile moleküler ağırlıklarına göre karşılaştırıldı. (İnsan plazma protein profili, Swiss-Prot/TrEMBL website: http://www.expasy.ch/swiss-2dpage/viewer&map=PLASMA_HUMAN&ac=all adresinden elde edilmiştir.) kontrol grubunda bir hastanın jel görüntüsü Coomassie ile iyi boyanamadığından değerlendirilmeye alınmadı.

Bulgular

Hasta Özellikleri ve Laboratuvar Verileri

Çalışmaya 5 malign perikardiyal efüzyonlu (Akc Ca: 4 adenokarsinom, 1 büyük hücreli) ve 5 kontrol toplam 10 hasta dahil edildi. Malign efüzyonlu hastaların hepsi erkekti ve ortalama yaş 47,4±7,92 yıl bulundu. Kontrol grubu hastaları 4 erkek, 1 bayandan oluşmaktaydı ve yaş ortalaması 63,4±7.7 yıl bulundu. Malign perikardiyal sıvılar hemorajik ve eksüda karakterinde iken, kontrol grubu sıvıları seröz vasıftaydı.

Malign perikardiyal efüzyonlu hastaların ejeksiyon fraksiyo-

nu korunmuş ve koroner arter hastalığı risk faktörleri olarak yalnızca sigara mevcuttu. Kontrol grubunda 4 hastanın sol ventrikül sistolik fonksiyonları hafif derecede azalmışken bir hastanın sistolik fonksiyonları korunmuştu, ancak hiçbir hastada kalp yetersizliği semptomları bulunmamaktaydı. Kontrol grubu hastalarından ikisinin öyküsünde ST elevasyonsuz MI, birinde kararsız angina pectoris ve ikisinde kararlı angina pectoris tanıları vardı. DM, HT, sigara gibi koroner arter hastalığı risk faktörleri bulunan bu grupta başka bir sistemik hastalık yoktu. Her iki grubun da renal fonksiyonları korunmuştu.

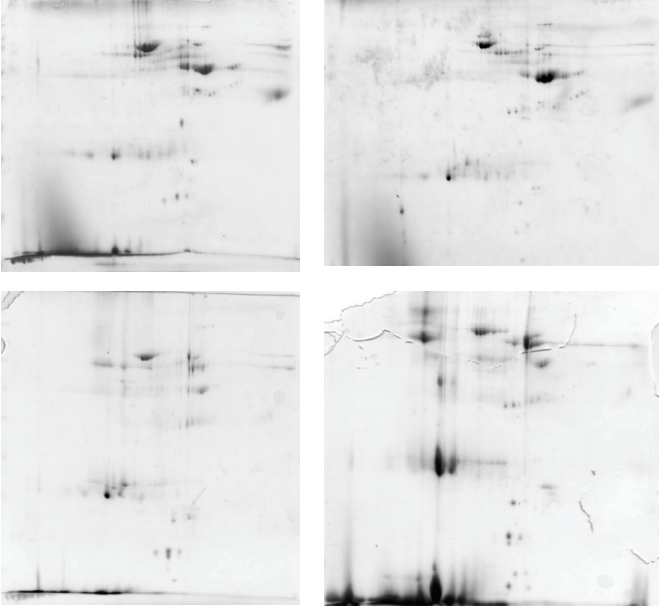
Hasta ve kontrol grubunun klinik karakteristik özellikleri ve laboratuvar bulguları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Malign perikardiyal efüzyonların laboratuvar verileri retrospektif tarandı. CA 125' in (462±551 u/mL) tüm hastalarda belirgin olarak artmış olduğu görüldü. CA 15-3 (64±67 u/mL) beş hastanın dördünde ılımlı bir artış gösterirken, CA 19-9 (1364±2037 u/mL) ve CEA (52±99 u/mL) beş hastanın üçünde artmış saptandı. Bu tümör belirteçlerindeki artışlar büyük hücreli akciğer kanserli hastada adenokarsinomlu hastalardan daha belirgindi. AFP tüm hastalarda normal bulundu. CRP değerleri tüm malign efüzyonlarda artmış olarak bulundu (11,1±10,7 mg/dl). Kontrol grubu hastalarının 3 tanesinde CRP seviyesi bakılmıştı ve CRP seviyesindeki artış daha ılımlıydı (1,9±1,2 mg/dl). Bu veriler ışığı altında özellikle CA 125 olmak üzere CA 19-9 ve CEA' nin akciğer kanseri nedenli malign perikardiyal efüzyonlarda tanı ve prognozda kullanılabilecek tümör belirteçi olarak düşünülebilse de hasta sayısının çok az olması ve bu gibi tümör belirteçlerinin spesifik olmayıp başka inflamatuvar olaylarda da artış gösterebileceği unutulmamalıdır.

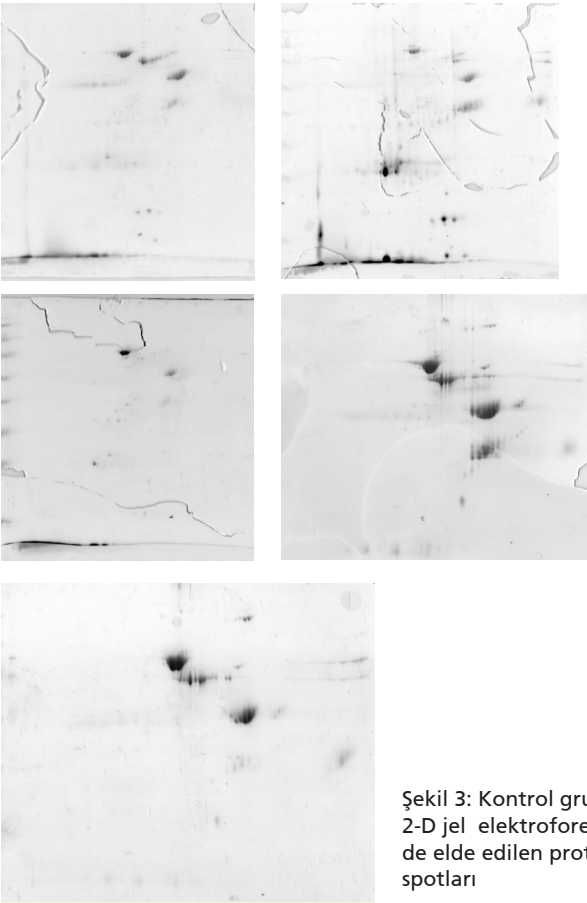
Hasta ve kontrol grubunun 2-D jel görüntüleri ve elde edilen protein spotları

Elde edilen 2-D jeller görsel olarak değerlendirildiğinde malign efüzyonlarda daha çok sayıda protein spotu görüldü. Protein spotları birbirlerine benzerdi ve belli bölgelerde yoğunluk artmıştı (Şekil 2-3).

Protein spotları yine görsel olarak moleküler ağırlıklarına göre sınıflandırıldığında protein sayılarının aynı moleküler ağırlıkta yaklaşık benzer olduğu görüldü. (Tablo 2-3).



Şekil 2: Hastalarda 2-D jel elektroforezinde elde edilen protein spotları



Şekil 3: Kontrol grubunda 2-D jel elektroforezinde elde edilen protein spotları

Tablo 2: Malign perikard sıvılarında protein spotlarının moleküler ağırlıklarına göre gruplandırılması

Moleküler ağırlık (Kd)	Hasta 1 spot sayısı	Hasta 2 spot sayısı	Hasta 3 spot sayısı	Hasta 4 spot sayısı	Hasta 5 spot sayısı
10-15 bin	8	4	9	4	4
15-25 bin	14	9	19	10	16
25-35 bin	11	11	16	12	13
35-40 bin	9	5	12	4	7
40-55 bin	12	19	15	15	14
55-70 bin	17	29	12	15	28
70-100 bin	12	19	15	28	14
100-130 bin	4	11	2	14	2
Toplam	87	101	100	92	98

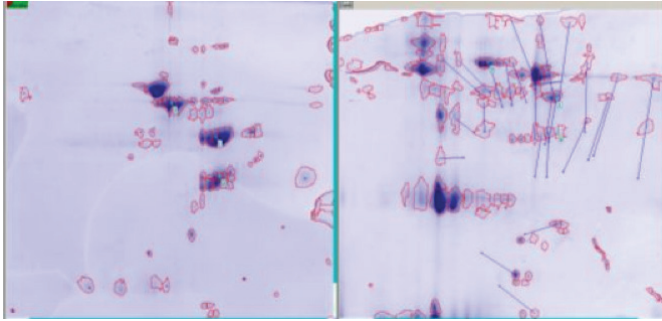
Tablo 3: Kontrol perikard sıvılarında protein spotlarının moleküler ağırlıklarına göre gruplandırılması.

Moleküler ağırlık (Kd)	Kontrol 1 spot sayısı	Kontrol 3 spot sayısı	Kontrol 4 spot sayısı	Kontrol 5 spot sayısı
10-15 bin	1			
15-25 bin	7	4	7	6
25-35 bin	3	3	5	6
35-40 bin	3	9	2	2
40-55 bin	9	4	17	16
55-70 bin	9	4	15	18
70-100 bin	5	3	19	8
100-130 bin	2	3	14	6
Toplam	39	30	75	62

Protein spotlarının karşılaştırılması

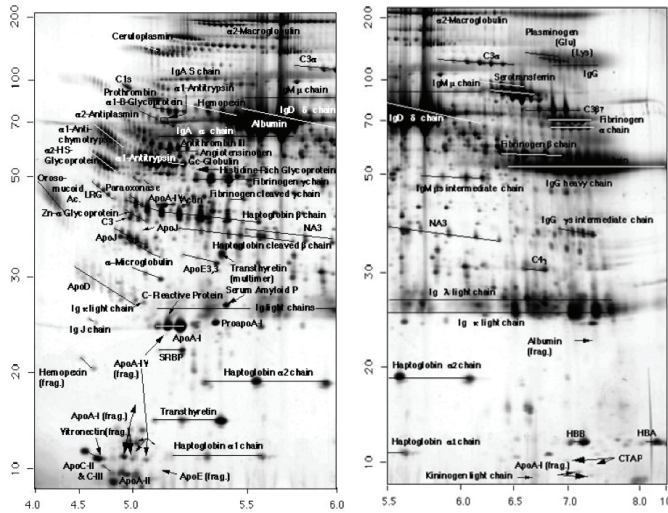
Görsel olarak aynı bölgelerde sinyal artışı olmasına rağmen o bölgelerdeki protein yapıları daha farklıydı. Tüm hasta grubunda yalnızca 3 protein spotu bire bir benzerdi ancak biz bu proteinleri analiz programı olmadığından tanımlayamadık. Kontrol grubunda da görsel olarak protein spotlarının benzer olmasına rağmen tanımlanan proteinlerde farklılıklar vardı, yalnızca 3 protein spotu bire bir benzerdi. Kontrol grubu arasında ST elevasyonsuz MI tanısı ile CABG uygulanan iki hastanın protein sayı ve yapısı birbirlerine daha fazla benzerlik gösteriyordu. KAH grubunda kalp yetersizliği semptomları olmamasına rağmen 4 hastanın EF düşükken (%43) bir hastanın EF'si korunmuştu. Ancak EF'si düşük ve korunmuş hasta arasında görsel olarak protein spotları arasında fark yoktu.

Tüm hastaların karşılaştırılmasında ortak bir protein spotu saptanamadığından hasta ve kontrol grubunun birer üyesi karşılaştırıldı (Hasta 1 ve Kontrol 4) (Şekil 4). Her iki hastada 23 tane protein spotu ortak bulundu



Şekil 4: Hasta ve kontrol grubundan iki hastanın birbiri ile karşılaştırılması

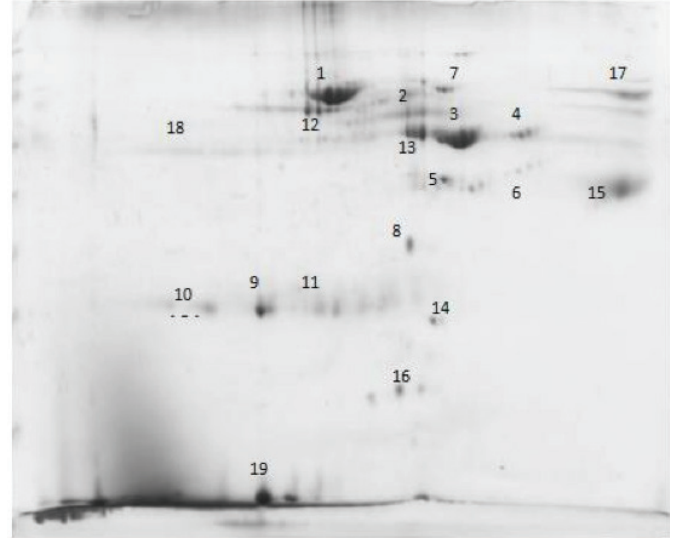
Tanımlanmış olan insan plazma protein haritası data verileri ile elde edilen protein spotlarının karşılaştırılması Tanımlanmış olan insan plazma protein haritası data verilerinde 626 spot ve 69 protein girdisi belirtilmiştir (Swiss-Prot/TrEMBL website: <http://www.expasy.ch/ch2dothergifs/publi/plasma-acidic.gif> ve [plasma-basic.gif](http://www.expasy.ch/ch2dothergifs/publi/plasma-basic.gif)) (Şekil 5 A-B).



Şekil 5 A-B Tanımlanmış insan plazma protein spotları, A: asidik, B: bazik (Swiss Prot/TrEMBL website)

Perikard sıvısında plazma ultrafiltrasyonundan oluştuğu düşünülerek perikard sıvılarından elde edilen protein spotları ile insan plazma protein haritası görsel olarak karşılaştırıldı. Tüm hastalarda ağırlıklı olarak saptanan protein spotlarının kabaca

albumin 1, fibrinojen gama zincir ve fragmanları, Ig ağır zincir, Ig orta zincir, Ig G, plazminojen, kompleman 3 alfa, C3, kompleman prekürsörleri, apolipoproteinler, anjiyotensinojen, CRP, transtretin, haptoglobülin, antitrombin 3, globülin bölgelelerine denk geldiği görüldü. (Şekil 6)

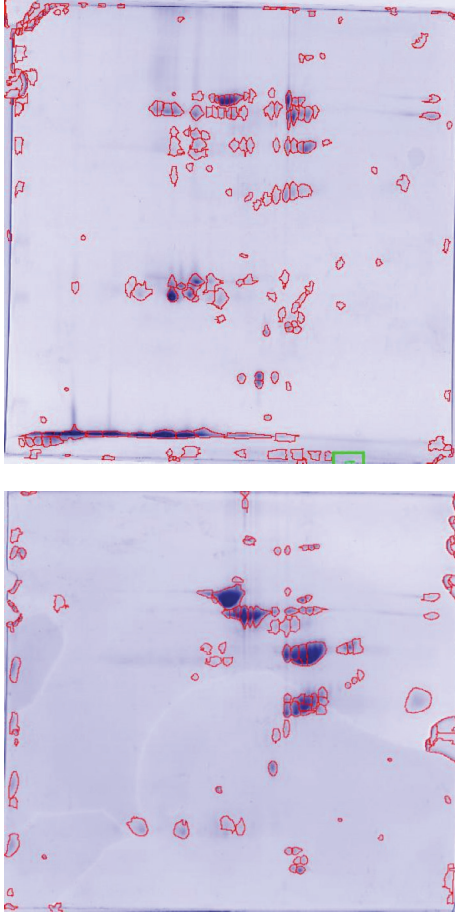


Şekil 6: Görsel olarak malign perikard sıvısının insan plazma proteini ile karşılaştırıldığında saptanan proteinler (1-albumin, 2- Ig D gama zincir, 3- fibrinojen B zincir, 4- fibrinojen alfa zincir, 5- IgM hafif zincir, 6- IgG ağır zincir, 7- serotransferrin, 8- NA3, 9- CRP, 10- Ig J zincir, 11- Apo A1, 12- antitrombin 3, 13- glikoprotein, 14- haptoglobülin, 15- Ig ağır zincir, 16- transtretin, 17- Ig ağır zincir gama, 18- C3, 19- Apo A2, 20- plazminojen, 21- fibrinojen gama zincir).

Malign efüzyonlardaki protein spotları kendi aralarında ve hasta grubu ile görsel olarak karşılaştırıldığında tüm malign perikard sıvılarında yaklaşık 25 bin Kd moleküler ağırlığındaki protein spotunda anlamlı sinyal artışı mevcuttu (Şekil 2,3,7). Bu protein spotu insan plazma protein haritası data verileri ile görsel olarak karşılaştırıldığında CRP bölgesine denk gelmekteydi (Şekil 5)

Tartışma

Elde ettiğimiz 2-D jel görüntülerinden malign perikardiyal efüzyonlarda daha fazla sayıda protein salındığı ve bu proteinlerin plazma ve serumda tanımlanan proteinlere benzer olduğu görüldü. Bu spotlar insan plazma protein data verileri ile yine görsel olarak karşılaştırıldığında ekspresyonu artmış proteinlerin ağırlıklı olarak akut faz reaktanı proteinleri olduğu saptandı.



Şekil 7: Hasta 5 ve kontrol 4 nolu kişilerin 2-D jel protein haritası ve ekspresyonu artmış olan protein spotu görülmektedir.

Özellikle yaklaşık 25 bin Kd moleküler ağırlığındaki protein spotunun yoğunluğunun daha fazla artış olduğu ve bu bölgede görsel olarak karşılaştırıldığında CRP bölgesine karşılık geldiği düşünüldü.

Kontrol grubu olarak aldığımız koroner arter hastalarından ST elevasyonsuz MI geçiren iki kişinin 2-D jel elektroforez görüntülerinden elde edilen protein spot sayısı diğer kontrol grubu hastalarına göre daha fazlaydı. Spot görüntüleri görsel olarak malign perikardiyal efüzyonlardan elde edilen protein spotlarına daha çok benzemektedir. Bu hastalarda da iskemi ve reperfüzyonun yarattığı oksidatif stres ile inflamatuvar belirteçler ve akut faz reaktanları artmış olabilir.

Proteomiks analizinin plevral, peritoneal, perikardiyal sıvılar

gibi biyolojik sıvılarda çeşitli hastalıklar ile çalışılmış birkaç çalışma vardır. Örneğin; plevral efüzyonun protein analizinde matriks metalloprotein-9 pronenzimin (proMMP-9) intraplevral enflamasyon ve hasarlanmada yeni, sensitif ve erken belirlenen bir belirteç olarak faydalı olabileceği bildirilmiştir.¹⁵ Komplemen seviyelerinin (C3, C4) romatoid arttritte düşüken tüberküloz ve malign efüzyonlarda yüksektir.¹⁶

Akciğer kanserlerinde perikardiyal efüzyon ile çalışılmış proteomiks çalışması yoktur ancak plevral efüzyonlarla çalışılmış ve birkaç biyobelirteç gösterilmiştir. CYFRA 21-1 küçük hücre dışı akciğer kanserinde özellikle skuamoz hücreli karsinomda tanı ve takipte önemli bir serum belirteci olarak bulunmuştur. CYFRA 21-1'in spesifitesi CEA'den daha fazladır.¹⁷ CYFRA 21-1 tanıda güvenilir bir belirteç olmasına rağmen onkogen tarafından sentezlenen HER-2/neu protein adenokarsinomlarla ilişkili plevral efüzyonlarda daha yüksek sensitiviteye sahiptir. Hsieh ve arkadaşları hücre proliferasyonu, büyüme ve farklılaşmada rol oynayan pigment epitelyal-derived faktör (PEDF) ve fibrinojen prekürsörlerinin akciğer adenokarsinomlarda transuda sıvılardan daha fazla salındığını göstermişlerdir.¹⁸ Bard ve arkadaşları birkaç yeni protein tanımlamışlardır; sorting-nexin, trombospondin 2, B-cell translocation gene 1, PEDF. 19Çözünür FasL (sFasL) apoptoziste önemli rol oynar ve Tbc perikarditte artmıştır. Son çalışmalar sFasL nin akciğer adenokarsinomunda da arttığını göstermiştir.²⁰ Akciğer sürfaktan protein-A(SP-A), CEA malign plevral efüzyonlarda sıklıkla kullanılan tümör belirteçleridir.²¹ Solubl Reseptör-binding kanser antijen (RCAS1) konsantrasyonu adenokarsinoma ait plevral efüzyonlarda malign olmayan plevral efüzyonlardan belirgin olarak yüksektir.

Literatürde şu ana kadar perikardiyal efüzyonun proteomiks profili ile ilgili yapılmış bir çalışma mevcuttu. Bu çalışmada 3 tüberküloz hastası 3 KAH'sı ile karşılaştırılmıştı. Tbc perikardiyal efüzyonda 11 adet farklı protein ekspresyonu saptanmıştı ve bunların 7 tanesi upregülasyona uğrarken, 4 tanesi downregülasyona uğramış. Bu proteinler içinde fibrin beta, fibrinojen prekürsör, fibrinojen gama zinciri, PEDF, beta aktin varyant, haptoglobülin prekürsör, complement C3, alfa-1-mikroglobülin, GSHPx3 prekürsör olarak tanımlanan proteinlerdi. PEDF en etkili doğal antianjiyogenik faktördür. Tbc perikardiyal efüzyonlarda azalmış olarak saptanmış.²²⁻²³

Klinik biyobelirteçler malign efüzyonların saptanmasında olduğu kadar diğer sistemik, inflamatuvar hastalıkların tanı, tedavi ve takibinde de önemlidir.

Yeni çalışmalar ile çeşitli kalp hastalıklarında bazı maddelerin perikardiyal sıvıdaki konsantrasyonları pek çok patofizyolojik mekanizmaların anlaşılmasına katkı sağlamaktadır. Kalp yetersizliğinde atriyal natriüretik peptit (ANP) ve brain natriüretik peptit (BNP) perikardiyal sıvıda yaklaşık 12 kat fazla bulunması bu faktörlerin kalp yetersizliğinde otokrin ya da parakrin bir faktör olarak patofizyolojik bir rol oynadığını düşündürmektedir.²⁴⁻²⁵ BNP diyastol sonu basınç ve hacim artışına bağlı olarak ventrikülden salınır. KKY tanısı; ciddiyeti, tedavinin etkinliği, prognoz öngördürücüdür ve NYHA ile paraleldir. N terminal pro B-tip Natriüretik peptitin (NT pro BNP), MI sonrası ve DKY nedeni ile hastaneye yatan hastalarda prognostik değeri gösterilmiştir.²⁶ Kararsız anginada ICAM-I, VCAM-I, e-selektin gibi adezyon moleküllerinin ve interlökin 6 ve 8 gibi proinflamatuvar sitokinlerin perikard sıvısındaki yüksek düzeyleri koroner arter hastalıkları ile inflamasyon ilişkisini desteklemektedir. Noradrenalin yüksekliği iskemik kalp kasında hasarlanma ve aritmilerin gelişiminden norepinefrinin sorumlu olduğu savını desteklemektedir. Sol ventrikül hipertrofisi ve remodeling oluşumundan sorumlu olduğu düşünülen angiotensin-II düzeylerinin bu hastaların perikard sıvısında düşük düzeyde bulunması kardiyomiyosit hipertrofisinden angiotensin-II'nin direkt sorumlu olmadığını düşündürmektedir. İskemik kalp hastalıklarında asit ve basic fibroblast growth faktörler, vasküler endotelial growth faktör, hepatositik growth faktör gibi çeşitli anjiojenik faktörlerin perikardiyal konsantrasyonları anlamlı düzeyde artmıştır. Bu faktörlerin kollateral damar gelişimini uyardıkları bilinmektedir. Perkütan veya cerrahi revaskülarizasyonun yapılamadığı hasta gruplarında tıkalı damarlarda kollateral gelişimini uyararak için intraperikardiyal "basic fibroblast growth" faktör uygulamaları perikardiyal yeni terapötik girişimlerin adresi haline getirmektedir.²⁴⁻²⁶

Ege ve arkadaşları, miyokardiyal infarkt sonrası perikard efüzyonunda CRP ve LDH seviyelerinin arttığını göstermişlerdir. Sağlıklı kişilerde ve kararlı angina pektoris sahibi kişilerde bazal CRP seviyeleri kardiyovasküler olaylar için bağımsız risk faktörü olarak gösterilmiştir. Akut MI sonrası CRP seviyeleri artmaktadır ve olumsuz sonuçlarla ilişkilidir.²⁷

Heart-tip sitoplazmik fatty asit binding protein (H-FABP), AMI'nın erken teşhisinde sensitif ve spesifik bir belirteç olarak rapor edilmiştir H-FABP yalnızca MI'da değil miyokardiyal zararlanma ile ilişkili ciddi miyokard iskemilerinde de artmış saptanmıştır. Ancak hala H-FABP'nin miyokardiyal iskeminin erken tanısında kullanımı ile ilgili klinik çalışmaya ihtiyaç vardır.²⁸

Ca125 yüksek sensitivitesine karşın, düşük spesifitesi nedeniyle tümör belirteci olarak kullanımını sınırlar. Altta yatan etiolojiden bağımsız malign-benign etiyojili serozal sıvı artışı ile serum Ca125 düzeyleri arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. Ca125'in jinekolojik malignensiler, kolorektal Ca, meme Ca, Akc Ca, hepatoselüler karsinom, pankreas Ca, intrakraniyal cerrahilerde artmış olduğu gösterilmiştir. Ayrıca Ca125 nefrotik sendrom, KBY, KKY'nde de artar. Nagele ve arkadaşları kalp transplantasyonu için değerlendirdikleri hastalarda Ca 125 düzeyinin artmış olduğunu ve Ca125 düzeyinin NYHA fonksiyonel sınıf ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Transplantasyon sonrası Ca125 normale dönmüştür. Ayrıca medikal tedavi ile de klinik tabloları stabilize olan hastalarda Ca125 düzeyleri azalmış, klinik durumu kötüleşen hastalarda Ca125 artmıştır.²⁹

Biyolojik sıvılardan elde edilen proteinlerin artmış sekresyonu kadar salınımı azalmış protein spotunda tanımlamak önemli olabilir. Veri tabanları üzerinden kimliği belirlenmiş olan proteinler değerlendirilerek farklı tedavi dozlarına yanıt, tedavi edilen ve edilmeyen bireylerdeki protein haritaları veya farklı hastalıkları taşıyan vakalar ile kontrol grupları arasında fark doğrudan ve en güvenilir şekilde ortaya koyulmaktadır. 12-14 Bizim çalışmamızda da saptanan proteinlerin yeni bir biyobelirteç olma olasılığının düşük olmasına rağmen bu proteinlerin KAH grubunda olmaması belki de olası ilaç tedavisi için yol gösterici olabilir.

Çalışma kısıtlamaları:

Çalışmada bu proteinlerin isimlendirilmesi yapılamamış, fonksiyon ve varlığı ile ilgili net bir karara varılamamış olsa da bu veriler malign perikardiyal efüzyonlarda proteomiks analizinin genişletilerek devam edilmesini destekler.

Sonuç:

Bu çalışma malign perikardiyal efüzyonlarda proteomiks anali-

zinden yararlanarak protein profilinin çalışılabileceğini kanıtlamıştır. Bu proteinler, proteomiks veri tabanındaki proteinlerden farklı salınan proteinlerin belirlenebilmesi için değerlidir ve gelecekte malign efüzyonlardan yeni bir biyobelirteç taramasında kullanılabilirler.

Literatürde perikardiyal efüzyonun proteomiks analizini içeren birkaç çalışma vardır. Proteomiks alanındaki son ilerlemeler bariz olsa da, şu anki çalışmalarla hastalıkların tanısında yeni, spesifik bir belirteç ve tedavinin bireyselleştirilmesinde yeni moleküler bir hedef bulma amacına henüz ulaşamamıştır. Proteomiks çalışmalarında saptanan hedef molekülün

linik kullanımda yeterli salınabilmesi lazımdır. Ayrıca sıvılarda protein konsantrasyonlarındaki dinamik değişkenlik, sıvıların analizinde devam eden bir problemdir.

Ayrıca proteomix çalışmalarını sadece malinitelerde değil diğer kardiyak ve sistemik hastalıkların erken tanı, tedavi, prognoz tayininde kullanılabilir.

Teşekkür: Kontrol grubunun perikard sıvılarının toplanmasında bana yardımcı olan Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı hocalarına ve asistan arkadaşlarıma saygılarımı sunarım.

1. Little WC, Freeman GL. Pericardial disease. *Circulation* 2006; 113:1622-32.
2. Maisch B, Seferović PM, Ristic AD, et al. Guidelines on the diagnosis and management of pericardial diseases executive summary; the Task Force on the Diagnosis and Management of Pericardial Diseases of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2004; 25:587-610.
3. Wilkes JD, Fidias P, Vaickus L, Perez RP. Malignancy-related pericardial effusion. 127 cases from the Roswell Park Cancer Institute. *Cancer* 1995; 76:1377-87
4. Girardi LN, Ginsberg RJ, Burt ME. Pericardiocentesis and intrapericardial sclerosis: effective therapy for malignant pericardial effusions. *Ann Thorac Surg* 1997; 64:1422-7.
5. Martinoni A, Cipolla CM, Civelli M, Cardinale D, Lamantia G, Colleoni M, DeBraud F, Susini G, Martinelli G, Goldhirsh A, Fiorentini C. Intrapericardial treatment of neoplastic pericardial effusions. *Herz* 2000; 25:787-93.
6. Spodick D H. *The Pericardium: A Comprehensive Textbook*. Marcel Dekker, New York, NY 1997.
7. Davidson B, Nielsen S, Christensen J, Asschenfeldt P, Berner A, Risberg B, Johansen P. The role of desmin and N-cadherin in effusion cytology: a comparative study using established markers of mesothelial and epithelial cells. *Am J Surg Pathol* 2001; 25:1405-12.
8. Chapman K. The ProteinChip Biomarker System from CIPHERgen Biosystems: a novel proteomics platform for rapid biomarker discovery and validation. *Biochem Soc Trans* 2002; 30:827.
9. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of Cell*. 4th ed. New York: Garland Science, 2002.
10. Washburn MP, Wolters D, Yates JR 3rd. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol* 2001; 19:242-7.
11. Weber K, Pringle JR, Osborn M. Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamide gel. *Methods Enzymol* 1972; 26:3-27.
12. Marko-Varga G. Proteomics principles and Challenges. *Pure Appl Chem* 2004; 76:829-837.
13. Biberöglü G. Kütle Spektrometresi ve Tıp Alanında Kullanımı. *T Klin J Med Sci* 2003; 23:491-498.
14. Moore CA, Khoury MJ, Bradley LA. From genetics to genomics using gene-based medicine to prevent disease and promote health in children. *Semin Perinatol* 2005; 29:135-43.
15. Kotyza J, Pesek M, Puzman P, Havel D. Progelatinase B/ matrix metalloproteinase-9 proenzyme as a marker of pleural inflammation. *Exp Lung Res* 2004; 30:297-309.
16. Salomaa ER, Viander M, Saaresranta T, Terho EO. Complement components and their activation products in pleural fluid. *Chest* 1998; 114:723-30.
17. Hung TL, Chen FF, Liu JM, Lai WW, Hsiao AL, Huang WT, Chen HH, Su WC. Clinical evaluation of HER-2/neu protein in malignant pleural effusion-associated lung adenocarcinoma and as a tumor marker in pleural effusion diagnosis. *Clin Cancer Res* 2003; 9:2605-12.
18. Hsieh WY, Chen MW, Ho HT, You TM, Lu YT. Identification of differentially expressed proteins in human malignant pleural effusions. *Eur Respir J* 2000; 28:1178-85.
19. Bard MP, Hegmans JP, Hemmes A, Luider TM, Willemsen R, Severijnen LA, van Meerbeeck JP, Burgers SA, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. Proteomic analysis of exosomes isolated from human malignant pleural effusions. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 31:114-21.
20. Shijubo N, Honda Y, Fujishima T, Takahashi H, Kodama T, Kuroki Y, Akino T, Abe S. Lung surfactant protein-A and carcinoembryonic antigen in pleural effusions due to lung adenocarcinoma and malignant mesothelioma. *Eur Respir J* 1995; 8:403-6.
21. Garcia-Pachon E, Soler MJ, Padilla-Navas I, Romero V, Shum C. C-reactive protein in lymphocytic pleural effusions: a diagnostic aid in tuberculous pleuritis. *Respiration* 2005; 72:486-9.
22. Tyers M, Mann M. From genomics to proteomics. *Nature* 2003; 422:193-7.
23. Fujii K, Nakano T, Kawamura T, Usui F, Bando Y, Wang R, Nishimura T. Multidimensional protein profiling technology and its application to human plasma proteome. *J Proteome Res* 2004; 3:712-8.
24. Troughton RW, Asher CR, Klein AL. Pericarditis. *Lancet* 2004; 363:717-27.
25. Fujita M, Komeda M, Hasegawa K, Kihara Y, Nohara R, Sasayama S. Pericardial fluid as a new material for clinical heart research. *Int J Cardiol* 2001; 77:113-8.
26. Bettencourt P, Azevedo A, Pimenta J, Friões F, Ferreira S, Ferreira A. N-terminal-pro-brain natriuretic peptide predicts outcome after hospital discharge in heart failure patients. *Circulation* 2004; 110:2168-74.
27. Oyama J, Shimokawa H, Morita S, Yasui H, Takeshita A. Elevated interleukin-1beta in pericardial fluid of patients with ischemic heart disease. *Coron Artery Dis* 2001; 12:567-71.
28. Tambara K, Fujita M, Miyamoto S, Doi K, Nishimura K, Komeda M. Pericardial fluid level of heart-type cytoplasmic fatty acid-binding protein (H-FABP) is an indicator of severe myocardial ischemia. *Int J Cardiol* 2004; 93:281-4.
29. Nägele H, Bahlo M, Klapdor R, Schaeperkoetter D, Rödiger W. CA 125 and its relation to cardiac function. *Am Heart J* 1999; 137:1044-9.