

Prognostický význam osteoprotegerinu a osteopontinu u maligního melanomu

Třešková I.¹, Topolčan O.², Vrzalová J.², Pizinger K.³

¹ Oddělení plastické chirurgie, FN Plzeň
primář MUDr. Vlastimil Bursa

² Imunoanalytická laboratoř, FN Plzeň
vedoucí prof. MUDr. Ondřej Topolčan, CSc.

³ Dermatovenerologická klinika, FN Plzeň
přednosta prof. MUDr. Karel Pizinger, CSc.

SOUHRN

Cíl: Cílem naší studie je zhodnocení dynamiky biomarkerů, osteoprotegerinu a osteopontinu, v průběhu hodnocení jejich hladin v letech 2009–2012 a jejich vztahu k prognóze nemocných s maligním melanomem.

Metoda: Byla sledována skupina nemocných s maligním melanomem (n = 77) a kontrolní skupina bez nádorového onemocnění (n = 34). U těchto skupin jsme hodnotili sérové hladiny osteoprotegerinu a osteopontinu použitím xMAP technologie.

Výsledky: Byla zjištěna statisticky významná korelace mezi sérovou hladinou osteopontinu a postižením lymfatických uzlin (p < 0,01) a pozitivitou/negativitou sentinelové lymfatické uzliny (p < 0,03). Elevace sérové hladiny osteopontinu byla shledána u nemocných s pokročilým onemocněním ve srovnání s nemocnými s primárním melanomem (p < 0,02). Byla zjištěna elevace sérové hladiny osteoprotegerinu i u skupiny nemocných s progresí onemocnění ve srovnání se skupinou remisí (p < 0,01). Ve skupině nemocných s maligním melanomem jsme zjistili vyšší sérové hladiny osteoprotegerinu (p < 0,001) a osteopontinu (p < 0,0008) ve srovnání s kontrolní skupinou. Senzitivita vyšetření sérových hladin osteoprotegerinu byla 39,21% při 93% specifitě a osteopontinu 9,8% při 93% specifitě.

Závěr: Na základě naší studie se osteopontin a osteoprotegerin jeví jako potenciálně využitelné biomarkery při sledování biologické aktivity maligního melanomu. Výsledky naší studie a eventuální využití těchto biomarkerů v dispenzární péči o nemocné s maligním melanomem bude ale nutné ověřit na větší skupině nemocných.

Klíčová slova: maligní melanom – biomarkery – osteoprotegerin – osteopontin – multiplexová analýza

SUMMARY

Prognostic Significance of Osteoprotegerin and Osteopontin in Malignant Melanoma

Aim: The aim of our study was to evaluate the dynamics of biomarkers osteoprotegerin and osteopontin and their relationship to prognosis of patients with malignant melanoma during the period from 2009 to 2012.

Method: We evaluated a group of patients with malignant melanoma (n = 77) and control group without cancer (n = 34). In these groups we evaluated the serum levels of osteoprotegerin and osteopontin using xMAP technology.

Results: There was a statistically significant correlation between serum osteopontin and lymph node involvement (p < 0.01) and the positivity/negativity of the sentinel lymph nodes (p < 0.03). Elevated serum levels of osteopontin has been found in patients with advanced disease in comparison to patients with primary melanoma (p < 0.02). We found elevated serum levels of osteoprotegerin in the group of patients with disease progression compared to the group in remission (p < 0.01). In the group of patients with malignant melanoma we found higher serum levels of osteoprotegerin (p < 0.001) and osteopontin (p < 0.0008) in comparison with the control group. Sensitivity of osteoprotegerin was 39.21% at 93% specificity and osteopontin 9.8% at 93% specificity.

Conclusion: This study shows osteopontin and osteoprotegerin to be useful biomarkers in evaluating biological activity of malignant melanoma. Validation of our current results in a larger group of patients is needed.

Key words: malignant melanoma – biomarkers – osteoprotegerin – osteopontin – multiplex analysis

Čes-slov Derm, 88, 2013, No. 6, p. 280–284

ÚVOD

Maligní melanom v současnosti představuje celosvětový problém, dostal se do popředí zájmu odborné ale i laické veřejnosti [5]. S jeho narůstající incidencí roste i snaha lépe porozumět chování tohoto heterogenního nádoru. Porozumění vztahu mezi prognostickými faktory a biologií melanomu je jedním z předmětů výzkumu v této oblasti [13]. Cílem práce bylo zhodnocení prognostické významnosti dvou nových biomarkerů – osteoprotegerinu (OPG) a osteopontinu (OPN), stejně tak využití nové metody stanovení biomarkerů – xMAP technologie při monitorování nádorového onemocnění.

Osteoprotegerin je protein (cytokinový receptor), který je kódován genem TNFRSF11B. Jedná se o důležitý regulátor kostního metabolismu, imunitního systému, důležitou funkci zaujímá při rozvoji cévních komplikací, jako je ateroskleróza či cévní ischemická mozková příhoda. Zajišťuje přežití endoteliálních buněk, jejich proliferaci, migraci a jejich formaci při angiogenezi [12, 18]. OPG také zajišťuje přežití buněk inhibicí apoptózy. Na základě tohoto zjištění byla vypracována řada studií podporující roli OPG v onkogenezi [11]. OPG má také významnou roli v angiogenezi – klíčového procesu při vzniku a metastazování nádoru. Produkce osteoprotegerinu je tedy součástí strategie přežití nádoru, byla zjištěna produkce OPG u celé řady nádorových buněk [14].

Osteopontin je glykoprotein extracelulární matrix produkovaný celou řadou buněk, jako jsou fibroblasty, osteoblasty, osteocyty, odontoblasty, chondrocyty, makrofágy či myoblasty. OPN je důležitým faktorem při remodelaci kosti a v imunitním systému [16]. Role osteopontinu byla popsána i při chemotaxi, buněčné migraci, adhezi, angiogenezi, apoptóze a zakládání metastáz. Zvýšená exprese OPN je spojena s agresivnějším chováním a tendencí k metastazování u celé řady nádorů [17]. Vyšší hladiny OPN v séru jsou pozorovány u pacientů s pokročilým onemocněním a jsou ukazatelem horší prognózy, kratším celkovým přežitím a kratším intervalem remise [6, 7].

PACIENTI A METODIKA

V letech 2009–2012 jsme provedli prospektivní nerandomizovanou kohortní studii s cílem posoudit prognostickou roli nových biomarkerů u maligního melanomu. Sledovali jsme pacienty s maligním melanomem podstupující radikální chirurgický výkon ($n = 77$) a kontrolní skupinu pacientů s benigním kožním onemocněním ($n = 34$). Sledování sérové hladiny biomarkerů bylo prováděno předoperačně a následně po operaci v pravidelných 3měsíčních intervalech po dobu 2 let, kontrolní skupina byla nabrána před operací a 1krát v pooperačním období. Průměrný věk v době stanovení diagnózy byl u skupiny nádorové 57,9 (11–87) let a u kontrolní skupiny 36,8 (17–84) let. U všech nemocných jsme provedli radikální chirurgický výkon s vyšetřením sentinelové uzliny v indikovaných případech podle mezinárodních doporu-

čení. Následně byli rizikováni nemocní léčeni imunoterapií (Interferon alfa) po dobu 12 měsíců a v pravidelných intervalech dispenzarizováni v névové poradně Dermatovenerologické kliniky FN Plzeň. Primární operace byla provedena u 51 nemocných, reexcize nádoru v 18 případech a operace pokročilého onemocnění v 8 případech. Melanom in situ byl popsán u 6 nemocných, stadium I (pT1) bylo popsáno u 21 nemocných, stadium II (pT2) u 19 nemocných, stadium III (pT3) u 17 nemocných a stadium IV (pT4) u 14 nemocných. Breslow skóre 0,1–1 mm byl přítomen ve 20 případech, 1,1–2 mm ve 23 případech, 2,1–4 mm v 15 případech a > 4,1 mm v 15 případech, ve 4 případech bylo Breslow skóre neznámé. Ulcerace nádoru jako negativní prognostický faktor byla přítomna u 30 nemocných. Maligní melanom v našem souboru byl nejvíce přítomen na dolních končetinách a trupu (tab. 1 a 2). U každého pacienta jsme odebrali 20 ml periferní krve standardní metodou flebotomie (systém VACUETTE®, Greiner Bio-One, Rakousko), s/bez EDTA. Plasma byla separována centrifugací a všechny vzorky byly okamžitě alikvotovány, zmrazeny a uchovány při -70 °C. Vzorky byly shromažďovány předoperačně (v den operace), 10 dní po operačním výkonu a dále každé 3 měsíce po celou dobu sledování na základě klinických kontrol. Sérové hladiny osteopontinu a osteoprotegerinu byly stanoveny pomocí xMAP technologie (multiplexová analýza) na přístroji Luminex 100: Luminex Corporation, USA. Stanovení bylo shodné ve skupině nemocných i v kontrolní skupině. Multiplexová analýza kombinuje principy průtokové cytometrie a imunoanalytického stanovení. Stanovení je založeno na molekulární reakci, která probíhá na barevně kódovaných sadách mikrokuliček. Je možné až 100 různých reakcí v jediném alikvotu vzorku. Další velkou výhodou je malý objem vzorku potřebný pro analýzu [3].

Pro statistické zpracování získaných hodnot jsme použili deskriptivní statistiku, Kruskalův-Wallisův test, Wilcoxonův test, Spearmanův korelační test. Pro zhodnocení vztahu senzitivita-specifita byly užity ROC (receiver operating characteristics) křivky. Optimální cut-off hodnota byla nalezena jako statisticky nejvýznamnější výsledek při nejnižší hodnotě p . Pro jednotlivý biomarker byla vypočtena AUC (area under the curve). Hodnota $p < 0,05$ byla považována za statisticky signifikantní.

Tabulka 1. Charakteristika skupiny nemocných a kontrolní skupiny

| | Melanomová skupina | Kontrolní skupina |
|---------------|--------------------|-------------------|
| Pacienti | n | n |
| Celkový počet | 77 | 34 |
| Ženy | 38 | 23 |
| Muži | 39 | 11 |
| Věk (roky) | n | n |
| Minimum | 11 | 17 |
| Maximum | 87 | 84 |
| Průměr | 57,9 | 36,8 |

Tabulka 2. Charakteristika melanomové skupiny

| | |
|-----------------|----|
| TNM | n |
| T1a | 18 |
| T1b | 3 |
| T2a | 11 |
| T2b | 8 |
| T3a | 6 |
| T3b | 11 |
| T4a | 4 |
| T4b | 10 |
| IS,LM | 6 |
| Neznámo | 1 |
| N0 | 33 |
| N1 | 5 |
| N2 | 4 |
| N3 | 2 |
| Neznámo | 33 |
| M0 | 0 |
| M1 | 2 |
| Neznámo | 75 |
| Breslow skóre | n |
| 0,1-1 | 20 |
| 1,1-2 | 23 |
| 2,1-4 | 45 |
| >4,1 | 15 |
| Neznámo | 4 |
| Ulcerace | n |
| Ano | 30 |
| Ne | 45 |
| Neznámo | 2 |
| Lokalizace | n |
| Dolní končetina | 24 |
| Horní končetina | 12 |
| Krk | 2 |
| Obličej | 5 |
| Trup | 34 |

VÝSLEDKY

Deskriptivní statistika sérových hladin osteoprotegerinu a osteopontinu ve skupině nemocných s maligním melanomem a kontrolní skupině je uvedena v tabulce 3. Byla zjištěna statisticky významná korelace mezi sérovou hladinou osteopontinu a postižením lymfatických uzlin ($p < 0,01$) a s pozitivitou/negativitou sentinelové lymfatické uzliny, $p < 0,03$. Jiné statisticky významné korelace hladin vyšetřovaných biomarkerů a TNM klasifikace nebyly zjištěny. Stejně tak nebyly zjištěny významné korela-

ce mezi sérovou hladinou těchto markerů a hodnotou podle Breslowa, ulcerací či lokalitou onemocnění. Vyšší sérové hladiny těchto markerů vykazovali nemocní s pokročilým onemocněním ve srovnání se skupinou nemocných s primárním melanomem. Statisticky významné korelace byly zjištěny u osteopontinu ($p < 0,02$). Během sledování byly naměřeny vyšší sérové hladiny i u skupiny nemocných s progresí onemocnění ve srovnání se skupinou remisí. Statisticky významné korelace jsme zjistili u osteoprotegerinu ($p < 0,01$). Ve skupině nemocných s maligním melanomem jsme zjistili vyšší sérové hladiny vyšetřovaných biomarkerů, osteoprotegerinu a osteopontinu, ve srovnání s kontrolní skupinou ($p < 0,001$ a $p < 0,0008$) – tabulka 4. Senzitivita vyšetření sérových hladin osteoprotegerinu byla 39,21% při 93% specifitě a osteopontinu 9,8% při 93% specifitě (tab. 5).

Tabulka 3. Průměrné hodnoty osteoprotegerinu a osteopontinu v nádorové a kontrolní skupině, využití korelační analýzy

| Biomarker | OPG | OPN |
|------------------------------|----------|------------|
| Kontrolní skupina | | |
| n | 29 | 29 |
| Medián | 252,65 | 8 659,68 |
| Minimum | 120,83 | 3 025,61 |
| Maximum | 513,27 | 35 141,76 |
| Skupina nádorová | | |
| Předoperační náběr | | |
| n | 51 | 51 |
| Medián | 355,18 | 15 985,01 |
| Minimum | 141,92 | 1 318,34 |
| Maximum | 832,72 | 66 420,87 |
| Follow-up – remise | | |
| n | 87 | 87 |
| Medián | 324,81 | 13 552,73 |
| Minimum | 162,52 | 578,71 |
| Maximum | 1015,91 | 94 563,27 |
| Follow-up – progrese | | |
| n | 16 | 16 |
| Medián | 503,38 | 15 652,48 |
| Minimum | 267,86 | 7 546,62 |
| Maximum | 1 183,45 | 147 866,34 |
| Pokročilý melanom | | |
| n | 9 | 9 |
| Medián | 463,86 | 26568,66 |
| Minimum | 190,77 | 138,1 |
| Maximum | 582,64 | 35627,27 |
| Follow-up – stacionární stav | | |
| n | 16 | 16 |
| Medián | 528,785 | 21128,03 |
| Minimum | 229,27 | 10504,42 |
| Maximum | 761,84 | 45817,68 |

Tabulka 4. Významné korelace mezi hladinami OPG, OPN a klinickými ukazateli

| Biomarker | | OPG | OPN |
|--------------------------------|-------------------|---------|---------|
| Klinické charakteristiky | | p-value | p-value |
| T | | NS | NS |
| N | | NS | < 0,01 |
| Breslow skóre | primární melanom | NS | NS |
| | pokročilý melanom | | |
| SLN | primární melanom | NS | < 0,03 |
| | pokročilý melanom | NS | NS |
| Ulcerace | | NS | NS |
| Lokalita tumoru | | NS | NS |
| Primární x pokročilý melanom | | NS | < 0,02 |
| Remise x progrese | | < 0,01 | NS |
| Melanomová x kontrolní skupina | | < 0,001 | <0,0008 |

Vysvětlivky: T – velikost nádoru, N – postižení regionálních lymfatických uzlin, SLN – sentinelová lymfatická uzlina (pozitivita/negativita), NS – nespecifická hodnota

DISKUSE

Maligní melanom je jedním z nejagresivnějších nádorů, pokud není včas diagnostikován a odstraněn. S celosvětově rostoucí incidencí rostou i snahy o lepší porozumění tomuto heterogennímu nádoru. Základním krokem je nalezení vztahů mezi prognostickými faktory a biologickou povahou nádoru [13]. Tloušťka nádoru podle Breslowa a stav sentinelové lymfatické uzliny zůstávají nadále nejdůležitějšími prognostickými faktory z hlediska recidivy choroby a přežití. Tyto faktory ovšem nepřinášejí přesné a včasné informace k určení biologického chování nádoru u každého jednotlivého pacienta, agresivity choroby nebo cesty diseminace. Zatím neexistuje žádný klinický, histologický, imunohistochemický či molekulární marker, který by nám umožnil upřesnit charakteristiky nádoru ve smyslu jeho dalšího chování a prognózy nemocného.

V řadě studií se diskutuje o celé řadě biomarkerů, které by pomohly lépe porozumět biologické aktivitě melanomu [8, 9, 15]. Biomarkery slouží ke zpřesnění prognostické informace, k odhadu agresivity choroby, k individualizaci léčby. Výzkum v oblasti biomarkerů představuje cestu k lepšímu porozumění biologické podstaty maligního melanomu. Zatím však neexistuje spolehlivý biomarker maligního melanomu, který by byl využitelný v praxi. Hledání vhodného biomarkeru na poli maligního melano-

mu pokračuje, sledují se nové faktory, které by mohly přispět ke zlepšení péče o nemocné s melanomem. K takovým faktorům by mohly patřit i osteopontin a osteoprotegerin.

Osteopontin je adhezivní glykoprotein mající roli v nádorové angiogenezi a metastazování. Na základě zjištění, že se jedná o potentní biomarker u celé řady nádorů, jsme provedli studii s cílem objasnit roli osteopontinu u maligního melanomu. Nalezli jsme statisticky významné korelace sérových hladin osteopontinu a postižení lymfatických uzlin. Sérové hladiny byly významně vyšší u pacientů s maligním melanomem ve srovnání s kontrolní skupinou. Byly také zjištěny vyšší hladiny u pacientů s pokročilým onemocněním ve srovnání s předoperačními nábery u primárního melanomu. Barak et al. A Kadkol et al. [1, 4] publikovali studii zabývající se významem osteopontinu u metastatického uveálního melanomu, kde sérové hladiny OPN byly signifikantně vyšší u metastatické skupiny ve srovnání s remisní skupinou a skupinou kontrolní. Toto zjištění je v souladu s našimi výsledky. Rangel et al. ve své studii [10] prokázal asociaci mezi vyšší expresí osteopontinu a vyšším Breslow skóre. Hodnoty OPN byly prediktivní vůči postižení spádových lymfatických uzlin podle Rangelovy studie, v souladu s naším tvrzením.

Osteoprotegerin je potentním proangiogenním faktorem s významnou rolí v onkogenezi a šíření nádoru. V naší studii byly nalezeny vyšší sérové hladiny u skupiny nádorové v porovnání s kontrolní skupinou. Jiné statisticky významné asociace nalezeny nebyly. Podle našich znalostí není prozatím publikována studie, která by potvrzovala použití osteoprotegerinu jako biomarkeru u maligního melanomu. Existují studie u jiných nádorů, ovšem s kontroverzními výsledky.

Senzitivita obou testovaných biomarkerů byla nízká. Pro srovnání je možno uvést senzitivitu nejvíce diskutovaných biomarkerů u maligního melanomu, tj. proteinu S100B a laktádehydrogenázy, jejichž senzitivita je 30–70% podle různých studií. Například Banfalvi et al. udává senzitivitu S100B 70% při 100% specificitě a LDH 48% při 83% specificitě [2].

Na základě naší studie se osteopontin a osteoprotegerin jeví jako potenciálně využitelné biomarkery při sledování biologické aktivity maligního melanomu.

ZÁVĚR

Tato studie měla za cíl ověřit využitelnost osteoprotegerinu a osteopontinu při hodnocení biologické aktivity maligního melanomu a vhodnost dalšího výzkumu v oblasti výše uvedených biomarkerů. Jsme si vědomi roz-

Tabulka 5. Senzitivita a specificita vybraných biomarkerů

| Biomarker | Cut-off | Specificita % | Senzitivita % | PV+ | PV- | R | AUC |
|-----------|----------|---------------|---------------|-------|-------|------|------|
| S-OPG | 400,58 | 93 | 39,21 | 90,9 | 46,55 | 1,7 | 0,77 |
| S-OPN | 30915,59 | 93 | 9,8 | 71,42 | 36,98 | 1,13 | 0,72 |

Vysvětlivky: PV – prediktivní hodnota, R – koeficient korelace, AUC – plocha pod křivkou

dílných věkových hladin u nádorové a kontrolní skupiny, tato souvislost není u kontrolní skupiny statisticky signifikantní, určitou roli může hrát u skupiny nádorové. Toto bude v pokračování studie zohledněno a výsledky studie a eventuelní využití těchto biomarkerů v dispenzární péči o nemocné s maligním melanomem bude ověřeno na větší skupině nemocných.

LITERATURA

1. BARAK, V., FRENKEL, S., KALICKMAN, I. et al. Serum markers to detect metastatic uveal melanoma. *Anticancer Res.*, 2007, Jul-Aug, 27 (4A), p. 1897–1900.
2. BANFALVI, T., BOLDISZAR, M., GERGYE, M. et al. Comparison of prognostic significance of serum 5-S-Cysteinyldopa, LDH and S-100B protein in Stage III-IV malignant melanoma. *Pathol. Oncol. Res.*, 2002, 8 (3), p. 183–187.
3. HOUSER, B. Bio-Rad's Bio-Plex® suspension array system, xMAP technology overview. *Arch. Physiol. Biochem.*, 2012, Oct, 118 (4), p. 192–196.
4. KADKOL, S. S., LIN, A. Y., BARAK, V. et al. Osteopontin expression and serum levels in metastatic uveal melanoma – a pilot study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 2006, Mar, 47 (3), p. 802–806.
5. KRAJSOVÁ, I. Kožní melanom: diagnostika, léčba a pooperační sledování. *Čes-slov Derm.*, 87, 2012, No. 5, p. 163–174.
6. LÁZÁR-MOLNÁR, E., HEGYESI, H., TÓTH, S. et al. Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine*, 2000, Jun, 12 (6), p. 547–554.
7. LISKA, V., HOLUBEC, L. J. R., TRESKA, V. et al. Evaluation of tumour markers as differential diagnostic tool in patients with suspicion of liver metastases from breast cancer. *Anticancer Res.*, 2011, Apr, 31 (4), p. 1447–1451.
8. MALATI, T. Tumor markers: an overview. *Indian. J. Clin. Biochem.*, 2007, Sep, 22 (2), p. 17–31.
9. PALMER, S. V., ERICKSON, L. A., ICHETOVKIN, I. et al. Circulating serologic and molecular biomarkers in malignant melanoma. *Mayo Clin Proc.*, 2011, Oct, 86 (10), p. 981–990.
10. RANGEL, J., NOSRATI, M., TORABIAN, S. et al. Osteopontin as a molecular prognostic marker for melanoma. *Cancer*, 2008, Jan 1;112 (1), p. 144–150.
11. REID, P., HOLEN, I. Pathophysiological roles of osteoprotegerin. *Eur. J. Cell. Biol.*, 2009 Jan, 88 (1), p. 1–17.
12. SIMONET, W. S., LACEY, D. L., DUNSTAN, C. R. et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 1997, Apr 18, 89 (2), p. 309–319.
13. SPATZ, A., STOCK, N., BATIST, G. et al. The biology of melanoma prognostic factors. *Discov. Med.*, 2010, Jul, 10 (50), p. 87–93.
14. TSUKAMOTO, S., ISHIKAWA, T., IIDA, S. et al. Clinical significance of osteoprotegerin expression in human colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2011, Apr 15, 17 (8), p. 2444–2450.
15. VEREECKEN, P., CORNELIS, F., VAN BAREN, N. et al. A synopsis of serum biomarkers in cutaneous melanoma patients. *Dermatol. Res. Pract.*, 2012, p. 260–264.
16. WANG, K. X., DENHARDT, D. T. Osteopontin: role in immune regulation and stress responses. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2008, Oct-Dec, 19 (5–6), p. 333–345.
17. WEBER, G. F., LETT, G. S., HAUBEIN, N. C. Osteopontin is a marker for cancer aggressiveness and patient survival. *Br. J. Cancer*, 2010, Sep 7, 103 (6), p. 861–869.
18. YEUNG, R. S. Osteoprotegerin/osteoprotegerin ligand family: Role in inflammation and bone loss. *J. Rheumatol.*, 2004, May, 31 (5), p. 844–846.

Studie podpořena grantovým projektem IGA MZ ČR NT 11017-5/2010.

Do redakce došlo dne 25. 9. 2013.

*Adresa pro korespondenci:
MUDr. Inka Třešková,
K Plzeňci 23
326 00 Plzeň
e-mail: t.inka@seznam.cz*