

## HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE V NÁDOROVÉ DIAGNOSTICE

JAN NEDVĚD<sup>a</sup>, MARIÁN HAJDÚCH<sup>b</sup>, KAREL LEMR<sup>c</sup> a VLADIMÍR HAVLÍČEK<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, Praha 4 Krč, <sup>b</sup> Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého a Fakultní nemocnice v Olomouci, Puškinova 6, Olomouc, <sup>c</sup> Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Tř. 17. Listopadu 12, Olomouc

Došlo 23.8.10, přijato 25.11.10.

Klíčová slova: nádorový marker, hmotnostní spektrometrie, dynamický rozsah

### Obsah

1. Úvod
2. Nádorové markery
3. Současné trendy spojené s využitím hmotnostní spektrometrie
  - 3.1. Karcinom vaječnicků
  - 3.2. Karcinom prostaty
  - 3.3. Karcinom prsu
  - 3.4. Biologický materiál používaný k analýze
  - 3.5. Dynamický rozsah
4. Závěr

### 1. Úvod

Hmotnostní spektrometrie (MS) je elegantní instrumentální analytická technika, která nachází významné uplatnění v celé řadě odvětví. V řadě oblastí se přímo podílí na zlepšování kvality lidského života. Slouží například ke kontrole složek životního prostředí, kvality řady výrobků včetně potravin. Nemyslitelný je dnes vývoj a výroba léčiv bez jejího přispění. V poslední době se prosazuje i přímo do medicíny jako důležitý nástroj výzkumu řady onemocnění či jako nástroj přispívající k diagnostice chorob. V této souvislosti má značný význam i pro onkologický výzkum. Zhoubné nádory představují celosvětově rozšířené onemocnění, které každoročně postihne více než 10 milionů lidí. Prevence, včasná diagnostika a účinná terapie jsou proto cílem mnoha organizací a výzkumných skupin po celém světě. Tento přehled si klade za cíl shrnout nejnovější využití hmotnostní spektrometrie a hmotnostního 2D zobrazení v nádorové diagnostice. Pozornost je soustředěna zejména na identifikaci nových biomarkerů, zpřesnění informací poskytovaných biomarkery obecně

a na některé analytické problémy spojené s analýzou komplexních lidských biologických vzorků.

### 2. Nádorové markery

Důkaz přítomnosti a stanovení nádorových markerů ve vyšetřovaných vzorcích tvoří významnou oblast laboratorní diagnostiky a zahrnuje poměrně širokou paletu látek, které přímo nebo nepřímo vypovídají o probíhajícím nádorovém onemocnění. Obecně lze říci, že s výjimkou některých fúzních genů a proteinů neexistuje specifická molekula, která by jednoznačně poukazovala na přítomnost onemocnění. Obvykle se používá kombinace více markerů, přičemž mnohdy záleží na stanovené hladině, nikoliv jen na prosté přítomnosti. Rovněž dynamika koncentrací některých markerů nám může pomoci při klasifikaci stádia, prognózy a úspěšnosti terapie. Ve většině případů je nicméně nutné využít kombinace laboratorních, zobrazovacích a jiných vyšetřovacích metod ke zpřesnění či potvrzení diagnózy<sup>1</sup>.

Nejběžnější klinicky používané markery lze dle původu rozdělit do 3 skupin, hranice mezi nimi ale nejsou vždy ostré:

- a) onkofetální antigeny – AFP, cg, CEA, PLAP, PAPP, A-C, atd. (vysvětlení zkratk viz tab. I),
- b) tkáňové a orgánové specifické antigeny – PSA, PAP, NSE, TPA, TPS, CYFRA 21-1, CA antigeny, MAb, SCC, hormony, markery kostního metabolismu, atd.,
- c) nespecifické antigeny a markery – ferritin, LD, Tk,  $\beta_2$ -M, RAF, LASA, atd.

První skupinu antigenů tvoří převážně proteiny, které se obvykle vyskytují ve fetálním stadiu vývoje a patologicky u nádorů z germinálních buněk. Druhá skupina zahrnuje látky, které se normálně vyskytují ve zdravé tkáni, ale mimo ni se vyskytují pouze za patologických stavů. A konečně třetí skupinu tvoří markery, které se vyznačují zejména svojí nenormální koncentrací a její dynamikou v případě maligních nádorových onemocnění. V tab. I jsou uvedeny nejvýznamnější markery, které jsou užívány v klinické praxi.

Přítomnost maligního nádoru v těle pacienta nezřídka natolik ovlivňuje jeho metabolismus a celkový stav organismu, že dochází ke komplexním změnám v běžných biochemických, hematologických a imunologických testech. Typickým případem je zvýšení zánětlivých ukazatelů počínaje sedimentací erytrocytů, zvýšení hladiny C-reaktivního proteinu až po vysoké hodnoty proteinů TNF alfa a beta kauzálně spojovaných s terminální kachexií onkologických pacientů. O něco více specifickou změnou je například zvýšená koncentrace fibrinogenu, která byla pozorována u pacientů s karcinomem slinivky břišní. Každopádně ale nelze tyto molekuly považovat za nádorové markery právě vzhledem k jejich nízké specifitě vůči

Tabulka I  
Přehled nejvýznamnějších nádorových markerů používaných v klinické praxi

Název	Zkratka	Typ	Orientační molekulová hmotnost	Klinické využití
$\alpha$ -Fetoprotein	AFP	glykoprotein, strukturou podobný albuminu	70 kD	primární hepatocelulární karcinom, germinální tumory; diagnostika a prognóza
CA 125		mucin	200 kD	karcinom ovárií, marker peritoneální karcinomatózy; prognóza, monitoring účinnosti chemoterapie
CA 15.3		mucin	250 kD	monitoring karcinomu prsu
CA 72.4		glykoprotein	48 kD	monitoring karcinomu žaludku
CA 19.9		glykolipid	1000 kD	monitoring karcinomu slinivky a kolorekta
Karcinoembryonální antigen	CEA	glykoprotein	180 kD	monitoring karcinomů gastrointestinálního traktu a dalších adenokarcinomů
Fragment cytokeratinu 21-1	CYFRA	fragment cytokeratinu 19	30 kD	monitoring karcinomu plic a močového měchýře
Receptor pro estrogen	ER	jaderný transkripční faktor	65 kD	prognostika účinnosti endokrinní terapie karcinomu prsu
Lidský choriový gonadotropin	hCG	glykoprotein	36 kD	diagnostika a monitoring některých forem tumorů germinálních buněk
Neuron-specifická enolasa	NSE	dimer enzymu enolasy	87 kD	monitoring malobuněčných karcinomů plic, neuroblastomu, APUDOMu
Placentární alkalická fosfatasa	PLAP	termostabilní isoenzym alkalické fosfatasy	86 kD	monitoring karcinomů z germinálních buněk
Receptor pro progesteron	PR	jaderný transkripční faktor	A forma: 94 kD B forma: 120 kD	prognostika účinnosti endokrinní terapie karcinomu prsu
Specifický prostatický antigen	PSA	glykoprotein, serinová proteasa	36 kD	diagnostika, screening, monitoring karcinomu prostaty
Antigen karcinomů ze skvamózních buněk	SCC	glykoprotein	48 kD	monitoring dlaždicobuněčných karcinomů
Tkáňový polypeptidový antigen	TPA	fragment cytokeratinu 8, 18 a 19	22 kD	monitoring karcinomu plic, močového měchýře
Specifický tkáňový polypeptidový antigen	TPS	fragment cytokeratinu 18	22 kD	monitoring metastazujícího karcinomu prsu

onkologickým onemocněním; často je nacházíme zvýšené i u jiných onemocnění, např. infekčních, autoimunitních a zánětlivých.

### 3. Současné trendy spojené s využitím hmotnostní spektrometrie

Posledních několik let jsme svědky intenzivního zapojování hmotnostně-spektrometrických technik do onkologického výzkumu. Nejčastěji se výzkumné týmy snaží najít specifický analyt, jehož přítomnost případně nepřítomnost ve vzorku by jednoznačně potvrdovala onkologic-

ké onemocnění. Co se týče úspěšnosti, bezpochyby neúčinnější metodou je 2D hmotnostně-spektrometrické zobrazování, které se v anglosaské literatuře objevuje pod názvem „mass spectrometry imaging“ (MSI)<sup>2</sup>. Metoda je založena na porovnávání „zdravých“ a „nádorových“ tělních vzorků a lze sledovat celou škálu molekul co se týče molekulární hmotnosti nebo polarity. Tento přístup přináší velmi zajímavý náhled na prostorovou distribuci nových kandidátních molekul přímo v zasažené tkáni. Získané informace pak mohou být užitečné jak v diagnostice, tak v monitoringu úspěšnosti nádorové terapie.

Během posledních tří let bylo validováno několik proteinových biomarkerů (viz dále), určitý potenciál rov-

něž skýtá i zobrazení malých molekul, zvláště lipidů<sup>3</sup>. Pro jejich účinnou 2D analýzu často stačí prostý otisk tkáně na nanostrukturální povrch<sup>4</sup>. Tento přístup se označuje jako NALDI imaging (Nanostructure-Assisted Laser Desorption Ionization). Oproti doposud běžnějšímu MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization) zobrazení, které je již několik let ve standardní nabídce všech hlavních hmotnostně-spektrometrických firem, NALDI zobrazení pracuje bez matrice. Kombinací optimalizované úpravy obtisku (různé typy oplachů podle typu analýzy) a jednodušších fragmentačních spekter sledovaných analytů (identifikace látek) se dosahuje lepšího dynamického rozsahu, což má značný význam při analýze komplexních směsí, u kterých se koncentrace složek liší o mnoho řádů.

Zásadním požadavkem, který je kladen na jakýkoliv marker, je tedy jeho dostatečná (měřitelná) koncentrace v tělních tekutinách nebo v tkáních<sup>5</sup>. Potenciální biomarker pak musí být reprodukovatelně detegovatelný i v tak složitém systému, jako např. krevní plazma.

Lze konstatovat, že doposud žádná jiná analytická technika nenabízí stejné možnosti jako hmotnostní spektrometrie při analýze proteinů v jejich složitých směsích (například se odhaduje, že v krvi může být  $10^5$  až  $10^6$  proteinů či jejich modifikací o značně rozdílných koncentracích<sup>5</sup>). Současně je však zřejmé, že samotné hmotnostně-spektrometrické měření je jen jedním z kroků při analýze biomarkerů. Úspěch bývá také podmíněn vhodným odběrem a zpracováním vzorku i odpovídající interpretací výsledků s uplatněním bioinformatiky. Z hlediska volby vhodného vzorku je nutné se vyrovnat se dvěma často protichůdnými požadavky: vyšší obsah analytu v biologickém vzorku a invazivnost odběru. Specifické biomarkery související s nádorem se budou ve vyšším obsahu vyskytovat přímo v nádoru či v jeho blízkém okolí, což ovšem znamená odběr nemocné tkáně z pacientova těla biopsií. Ta je náročnější pro pacienta i z hlediska nákladů (materiálových, mzdových i časových). Některé nádorové buňky vykazují přítomnost specifických antigenních struktur na svém povrchu, nicméně tyto jsou zjištěné pouze právě z bioptického materiálu, což komplikuje nebo vylučuje jejich využití v běžné biochemické laboratorní diagnostice. Mnohem jednodušší a k pacientovi šetrnější je odběr tělních tekutin. V úvahu přicházejí zejména sérum resp. plazma, moč, sliny, případně bronchoalveolární laváž. Sérum, plazma či moč jsou běžně analyzovány pro diagnostické účely v souvislosti s nejrůznějšími onemocněními. Koncentrace biomarkeru v nich však bude nižší již z prostého důvodu jeho naředění (snad jen s výjimkou onemocnění přímo souvisejícím s těmito tělními tekutinami; např. močové ústrojí, krevtvorba). Další komplikací spojenou s analýzou tělních tekutin může být změna analytu v oběhovém systému v důsledku enzymatického štěpení<sup>5</sup>. Oproti využití bioptického materiálu je při hledání biomarkerů také obtížnější látky prokázat v tělních tekutinách přisoudit místu jejich vzniku.

Uplatnění hmotnostní spektrometrie v diagnostice karcinomu je dnes významně vázáno na jiné metody používané v této oblasti. Nově vyvinuté přístupy totiž musí

být pečlivě validovány již zavedenými metodami, např. imunohistochemickým vyšetřením tkáně.

### 3.1. Karcinom vaječníků

V rozsáhlé studii v několika zdravotnických zařízeních byl srovnáván proteinový profil pacientek trpících ovariálním karcinomem. Byly vytipovány tři diferenční píky  $m/z=280343$ ,  $m/z=12828$  a  $m/z=3272$ , které byly identifikovány jako apolipoprotein A1, zkrácený transthyretin a zkrácený inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor. Dalším publikovaným přístupem je např. analýza sérových peptidů, které bývají navázány na albumin, pomocí afinitní obohacovací chromatografie. Některé tyto postupy byly i navrhovány pro klinické použití, ale prosadit do praxe se je zatím nepodařilo<sup>5</sup>. Experimentálně nejzajímavější molekulární značkou tedy zůstává aktivační komplex PA28 pro 11S proteasom<sup>6</sup>. Tento tkáňový proteinový fragment byl vytipován metodou MALDI zobrazení a validován řadou imunochemických metod.

### 3.2. Karcinom prostaty

Současný onkologický výzkum se nesoustředí pouze na hledání nových markerů, ale také na zpřesnění informací, které nám poskytují markery dosud užívané. Významným markerem pro diagnostiku karcinomu prostaty je specifický prostatický antigen (prostate specific antigen, PSA; viz tab. I), který je běžně stanovován imunoanalytickými metodami v séru<sup>7</sup>. Ukázalo se, že tento marker vlastně zahrnuje 3 isoformy inaktivního PSA. První forma je proenzym a je přímo asociovaná s karcinomem a představuje přibližně třetinu celkového množství PSA v séru. Druhá forma, tzv. benigní PSA (BPSA) mnohem specifičtěji ukazuje na benigní hyperplazii prostaty<sup>8</sup>. Z toho vyplývá, že zpřesnění analýzy s ohledem na poměr daných komponent může značně vylepšit přesnost diagnózy a omezit falešnou pozitivitu.

Nicméně i tak specifický indikátor, jakým je PSA, často selhává při odlišení maligního nádoru od benigní prostatické hyperplazie, což je motivací pro hledání vhodnějších biomarkerů. Jako jeden z potenciálních kandidátů byl proteomickými metodami vytipován apolipoprotein A2, ostatní kandidátní molekuly se nepodařilo ověřit opakovanými testy<sup>9</sup>. Zajímavou biomolekulou z hlediska možného využití v diagnostice je tkáňový fragment MKK2 (mitogen-activated protein kinase kinase 2), který byl prokázán na základě fragmentačního spektra iontu  $m/z$  4335. Zvýšená exprese příslušné kinyasy byla monitorována metodou MSI<sup>10</sup>.

V řadě prací je však konstatováno, že hledání nádorových biomarkerů karcinomu prostaty naráží na problémy nejen při praktickém zpracování vzorků, ale i při statistickém zpracování dat: nezdá se stává, že to co platí pro konkrétní populaci, nemusí být přenositelné do jiného regionu. Toto varování se samozřejmě neomezuje jen na zmíněné onemocnění a musí být vzato do úvahy při hledání a identifikaci biomarkerů<sup>11,12</sup>.

### 3.3. Karcinom prsu

Obdobným problémům při hledání specifického biomarkeru čelíme i v případě karcinomu prsu. Proteomická studie, která srovnávala sérové profily zdravých jedinců s pacienty s prokázaným karcinomem prsu, vytypovala 3 diferenční molekuly –  $m/z$  8100, 8900 a 3400. Nezávislá studie, která využila stejných podmínek, však odhalila pouze dva z těchto signálů, a to  $m/z$  8100 a 8900. Třetí nezávislá studie pak neprokázala molekulu se signálem při  $m/z$  8100 a signály 4300 a 8900 se objevily pouze u 33 % resp. 45 % vzorků. Autoři tohoto výzkumu usuzují, že zde významnou roli hrála různost obyvatel geografických oblastí, odkud byly vzorky získány<sup>13,14</sup>.

Z tkáňových markerů vykázal vysokou přesnost klinického stanovení (89 %) signál středního proteinu 1 ( $m/z$  8404), který se váže na HER2 receptor. Status HER2 receptoru (pozitivní/negativní tkáň) byl klasifikován právě metodou MSI<sup>15</sup>.

### 3.4. Biologický materiál používaný k analýze

V současné době je nejpoužívanějším materiálem ke studiu nových biomarkerů plasma nebo sérum. Nicméně použití některých dalších tělních tekutin se zvažuje vzhledem k praktičnosti jejich zpracování. Z těchto je jednoznačně nejdostupnější moč. Její velká výhoda spočívá v tom, že množství proteinů v ní obsažených je značně nižší než v plasmě resp. séru a jejich velikost je menší. Nevýhodou je možné velké naředění vzorku. Logicky také moč nejlépe odráží onemocnění ledvin a močového ústrojí, proto její význam pro ostatní typy onemocnění klesá<sup>16</sup>.

Bioptické vzorky tkáně mají stále klíčové místo v proteomické diagnostice nádorových onemocnění, neboť, jak již bylo zmíněno, koncentrace potenciálních markerů je v tkáni mnohem vyšší než v tělních tekutinách<sup>17</sup>.

### 3.5. Dynamický rozsah

Ve chvíli, kdy se podaří vytipovat kandidátní molekuly, ať už technikou MSI nebo metodou SELDI (Surface-Enhanced Laser Desorption Ionization)<sup>18</sup>, je nasnadě sledování jejich rozdílné exprese v biologickém materiálu<sup>19</sup>. U kvantitativního MS stanovení lze volit mezi dvěma základními přístupy, které mají podobnou citlivost. Jedná se o h-SIM (Selected Ion Monitoring; rekonstrukce kvantitativních i kvalitativních dat z vysoce rozlišených hmotnostních spekter) a SRM (Selected Reaction Monitoring; sledují se fragmentační procesy).

Atraktivita nově nastupujícího h-SIM spočívá v možnosti vrátit se k již v minulosti nasbíraným datům a znovu je vyhodnotit (například při sledování nečekaného metabolitu, degradačního produktu, posttranslačně modifikovaného peptidu). Metoda se realizuje výhradně na hmotnostních analyzátořech typu orbitrap, iontový cyklotron (oba pracují v FT režimu) a vysoce rozlišujících analyzátořech doby letu (TOF – Time of Flight).

Starší a rutinní metodou, kterou uznává i poměrně konzervativní U.S. Food and Drug Administration, je technika SRM, která je nejčastěji provozována na trojitých kvadrupolech. Při vhodně nastavených metodách se laboratoře dostávají k biomarkerům o koncentracích v řádu 1 až 10 ng ml<sup>-1</sup>, což jsou výsledky, které by již mohly úspěšně soutěžit s imunoanalytickými metodami. U nich se jedná zvláště o variantu založenou na použití protilátek (SISCAPA, Stable Isotope Standards for the use with Capture by Anti-Peptide Antibodies). Dobře odladěné stanovení ELISA se zatím stále jeví jako nejcitlivější metoda (tab. II), což je avšak kompenzováno vyšší finanční náročností a delší dobou potřebnou na vývoj nového kitu<sup>20</sup>.

Tabulka II

Srovnání limitů detekce metodou ELISA a různých modifikací metod SRM<sup>21–24</sup>

Technika	Detekční limit
SRM v plasmě	1 μm ml <sup>-1</sup>
SRM v depletované plasmě	25 ng ml <sup>-1</sup>
SRM s izolací glykosylovaných proteinů	5 ng ml <sup>-1</sup>
SRM v depletované a frakcionované plasmě	2,5 ng ml <sup>-1</sup>
SRM kombinované se SISCAPA obohacením	1–10 ng ml <sup>-1</sup>
ELISA	v řádu pg ml <sup>-1</sup>

## 4. Závěr

Hmotnostní spektrometrie postupně nachází svoje místo v nádorové diagnostice. Těžiště jejího využití leží dnes zejména v experimentální oblasti v identifikaci nových nádorových markerů. Nabízí vysokou citlivost, selektivitu, přímou identifikaci látek a v kombinaci se separačními technikami umožňuje studium i minoritních složek ve složitém biologickém materiálu, a to bez potřeby velkého množství vzorku. 2D zobrazování hmotnostní spektrometrie dovoluje sledovat distribuci látek v řezech tkání. S pomocí hmotnostní spektrometrie se daří rozšiřovat poznatky o již známých molekulách a ty pak aplikovat do klinické praxe.

Je patrné, že v oblasti klinické diagnostiky nebude zatím hmotnostní spektrometrie rutinní metodou a ještě chvíli zůstane doménou pro vybraná experimentální lékařská pracoviště, alespoň v České republice. Nároky kladené na obsluhu i výše provozních nákladů u nejvýkonnějších hmotnostních spektrometrů (FT-ICR) stále upřednostňují jednodušší, ale méně univerzální imunoanalytické techniky. V případě ostatních hmotnostních spektrometrů mohou být náklady srovnatelné nebo i nižší. Imunoanalytické metody jsou však v klinických laboratořích velmi dobře zavedené a personál je pro jejich využití proškolený. Důležitým faktem je i implementace standardních protokolů na

již existující poloautomatické a automatické analytické systémy, které jsou dnes běžné na klinických pracovištích. V současnosti může být řešením identifikace biomarkeru hmotnostní spektrometrií a následné zavedení imunoanalytické metody pro jeho sledování v běžných klinických vzorcích. V budoucnu lze očekávat významnější uplatnění hmotnostní spektrometrie v rutinních klinických laboratořích, což je však podmíněno jejím dalším instrumentálním i metodologickým rozvojem.

*Práce na tomto projektu byla podpořena granty Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (LC07017, MSM6198959216). Infrastrukturální část projektu (Ústav molekulární a translační medicíny LF UP) je financována z projektů Operačního programu věda a výzkum pro inovace (projekt BIOMEDREG, CZ.1.05/2.1.00/01.0030).*

#### LITERATURA

- Rifai N., Gillette M. A., Carr S. A.: *Nat. Biotechnol.* **24**, 971 (2006).
- Vidova V., Volny M., Lemr K., Havlicek V.: *Coll. Czech. Chem. Commun.* **74**, 1101 (2009).
- Pol J., Vidova V., Kruppa G., Koblíha V., Novak P., Lemr K., Kotiaho T., Kostianin R., Havlicek V., Volny M.: *Anal. Chem.* **81**, 8479 (2009).
- Vidova V., Novak P., Strohalm M., Pol J., Havlicek V., Volny M.: *Anal. Chem.* **82**, 4994 (2010).
- Conrads T. P., Hood B. L., Veenstra T. D.: *Biotechniques* **40**, 799 (2006).
- Lemaire R., Menguellet S. A., Stauber J., Marchaudon V., Lucot J. P., Collinet P., Farine M. O., Vinatier D., Day R., Ducoroy P., Salzet M., Fournier I.: *J. Proteome Res.* **6**, 4127 (2007).
- Liang S. L., Chan D. W.: *Clin. Chim. Acta* **381**, 93 (2007).
- Mikolajczyk S. D., Millar L. S., Wang T. J., Rittenhouse H. G., Marks L. S., Song W. T., Wheeler T. M., Slawin K. M.: *Cancer Res.* **60**, 756 (2000).
- Malik G., Ward M. D., Gupta S. K., Trosset M. W., Grizzle W. E., Adam B. L., Diaz J. I., Semmes O. J.: *Clin. Cancer Res.* **11**, 1073 (2005).
- Cazares L. H., Troyer D., Mendrinós S., Lance R. A., Nyalwidhe J. O., Beydoun H. A., Clements M. A., Drake R. R., Semmes O. J.: *Clin. Cancer Res.* **15**, 5541 (2009).
- McLerran D., Grizzle W. E., Feng Z., Bigbee W. L., Banez L. L., Cazares L. H., Chan D. W., Diaz J., Izbicka E., Kagan J., Malehorn D. E., Malik G., Oelschlager D., Partin A., Randolph T., Rosenzweig N., Srivastava S., Thompson I. M., Thornquist M., Troyer D., Yasui Y., Zhang Z., Zhu L., Semmes O. J.: *Clin. Chem.* **54**, 44 (2008).
- McLerran D., Grizzle W. E., Feng Z. D., Thompson I. M., Bigbee W. L., Cazares L. H., Chan D. W., Dahlgren J., Diaz J., Kagan J., Lin D. W., Malik G., Oelschlager D., Partin A., Randolph T. W., Sokoll L., Srivastava S., Thornquist M., Troyer D., Wright G. L., Zhang Z., Zhu L., Semmes O. J.: *Clin. Chem.* **54**, 53 (2008).
- Li J. N., Orlandi R., White C. N., Rosenzweig J., Zhao J., Seregini E., Morelli D., Yu Y. H., Meng X. Y., Zhang Z., Davidson N. E., Fung E. T., Chan D. W.: *Clin. Chem.* **51**, 2229 (2005).
- Mathelin C., Cromer A., Wendling C., Tomasetto C., Rio M. C.: *Br. Cancer Res. Treat.* **96**, 83 (2006).
- Rausser S., Marquardt C., Balluff B., Deininger S. O., Albers C., Belau E., Hartmer R., Suckau D., Specht K., Ebert M. P., Schmitt M., Aubele M., Hofler H., Walch A.: *J. Proteome Res.* **9**, 1854 (2010).
- Schiffer E., Mischak H., Novak J.: *Proteomics* **6**, 5615 (2006).
- Melle C., Ernst G., Schimmel B., Bleul A., Thieme H., Kaufmann R., Mothes H., Settmacher U., Clausen U., Halbhuber K. J., von Eggeling F.: *Gastroenterology* **129**, 66 (2005).
- Bonam-Rani A., Ternier J., Ratel D., Benabid A. L., Issartel J. P., Brambilla E., Berger F.: *Clin. Chem.* **52**, 2103 (2006).
- Strohalm M., Novak P., Pompach P., Man P., Kavan D., Witt M., Dzubak P., Hajduch M., Havlicek V.: *J. Mass Spectrom.* **44**, 1565 (2009).
- Picotti P., Bodenmiller B., Mueller L. N., Domon B., Aebersold R.: *Cell* **138**, 795 (2009).
- Huttenhain R., Malmstrom J., Picotti P., Aebersold R.: *Curr. Opin. Chem. Biol.* **13**, 518 (2009).
- Kuzyk M. A., Smith D., Yang J. C., Cross T. J., Jackson A. M., Hardie D. B., Anderson N. L., Borchers C. H.: *Mol. Cell. Proteomics* **8**, 1860 (2009).
- Whiteaker J. R., Zhao L., Anderson L., Paulovich A. G.: *Mol. Cell. Proteomics* **9**, 184 (2010).
- Schoenherr R. M., Zhao L., Whiteaker J. R., Feng L. C., Li L., Liu L. N., Liu X. W., Paulovich A. G.: *J. Immunol. Meth.* **353**, 49 (2010).

**J. Nedvěd<sup>a</sup>, M. Hajdúch<sup>b</sup>, K. Lemr<sup>c</sup>, and V. Havlíček<sup>a</sup>** (<sup>a</sup> *Microbiological Institute, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*, <sup>b</sup> *Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine, Palacký University and Faculty Hospital, Olomouc*, <sup>c</sup> *Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc*): **Mass Spectrometry in Cancer Diagnosis**

Tumor markers play an important role in cancer diagnostics. However, with the exception of selected fusion genes and proteins, there are no specific compounds for unambiguous cancer diagnosis. Oncologists must combine many markers to assess diagnosis, staging, prognosis and prediction of therapeutic response. Mass spectrometry (MS) is a powerful technique which can help to identify new biomarkers and/or to refine information about marker candidates. Recent years have witnessed new approaches in MS analysis for discovery of cancer biomarkers. This review highlights some recent findings and trends in cancer diagnosis.