

Протеомика в диагностике рака яичников

В.Е. Шевченко¹, Н.Е. Арноцкая¹, Д.Е. Макаров¹, Н.Р. Погосян², К.И. Жордания²¹Лаборатория онкопротеомики, ²гинекологическое отделение РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Контакты: Валерий Евгеньевич Шевченко vshev@nm.ru

В последнее время протеомика находит широкое применение для объяснения молекулярных механизмов возникновения рака и поиска биомаркеров, которые могут использоваться для диагностики и/или прогноза развития заболевания. В статье представлен краткий обзор протеомных исследований по обнаружению биомаркеров рака яичников с учетом различных типов биологических образцов.

Ключевые слова: рак яичников, протеомика, биомаркеры

Proteomics in the diagnosis of ovarian cancer

V.E. Shevchenko¹, N.E. Arnotskaya¹, D.E. Makarov¹, N.R. Pogosyan², K.I. Zhordania²¹Oncoproteomics Laboratory, ²Gynecology Department

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Proteomics has recently found wide application to account for the molecular mechanisms of cancer and to search for biomarkers that may be used to diagnose and/or predict the development of the disease. The paper briefly reviews proteomic studies to detect ovarian cancer biomarkers, by taking into account different types of biological samples.

Key words: ovarian cancer, proteomics, biomarkers

Биомаркеры рака яичников, используемые в клинической практике

В начальной стадии рак яичников (РЯ) — относительно бессимптомное заболевание, поэтому ранняя его диагностика представляет сложную задачу. Отсутствие достаточно высокоинформативных скрининговых тестов приводит к тому, что у большинства (75 %) пациенток РЯ диагностируют на поздней (III–IV) стадии болезни с 5-летней средней выживаемостью приблизительно 40 % для стадии III и < 20 % — для стадии IV [1–5]. Напротив, у больных с I стадией РЯ выживаемость составляет около 95 %, и большинство пациенток излечиваются полностью. Таким образом, ранняя диагностика с использованием биомаркеров может оказать существенное влияние на показатели летальности при РЯ.

Для достижения минимального положительного прогностического значения 10 % в общей популяции идеальный биомаркер для РЯ должен иметь чувствительность 100 % и специфичность — как минимум 99,6 % [6]. При использовании для диагностирования РЯ сывороточного биомаркера СА-125 с пороговым значением 35 Ед/мл чувствительность составляет 65 % и специфичность — 97 % с положительным прогностическим значением 10 % [7]. Повышение этого маркера отмечено в 80–90 % наблюдений при поздней стадии заболевания

и в 50–60 % — при ранней стадии. Возможны также ложноположительные результаты при доброкачественных формах опухоли, физиологических изменениях (менструация или беременность), туберкулезе и других злокачественных новообразованиях (рак матки, толстой кишки, желудка и др.). Таким образом, в целом данный маркер одобрен для контроля заболевания, а не для его обнаружения. Установлены и некоторые другие биохимические маркеры, например лизофосфотидиловая кислота, остеопонин, антиген, ассоциированный с карциномой яичников, и HE4 [8–11]. HE4 имеет более высокую чувствительность для ранней стадии заболевания, чем СА-125 [9, 12], и одобрен недавно, аналогично СА-125, как биомаркер для контроля появления рецидива.

Комбинация нескольких маркеров — новая парадигма для увеличения чувствительности и специфичности диагностических тестов. Для детектирования РЯ комбинировали СА-125 с известными биомаркерами различных видов рака [13–16]. Использование панелей из 4–5 протеинов улучшало специфичность и чувствительность теста по сравнению с применением только одного СА-125 (для ранней стадии рака чувствительность составила от 45 до 70 % при неизменной специфичности) [16]. При дифференцировании доброкачественных и злокачественных опухолей яичников удалось по-

высить чувствительность и специфичность с 78,1 и 76,8 до 90,6 и 93,2% соответственно [14]. R.G. Moore et al. [9] продемонстрировали, что благодаря использованию комбинации СА-125 и HE4 можно дифференцировать доброкачественную опухоль от злокачественной с чувствительностью 76,4% и специфичностью 95% (по сравнению с 43,3% для одного только СА-125). Таким образом, применение набора биомаркеров является перспективным подходом к диагностике РЯ.

Протеомика

Протеомика — изучение протеома, включающего все белки, вырабатываемые клеткой во время ее жизненного цикла. Это динамический процесс, который изменяется непрерывно в результате воздействия многих факторов. Белки фактически представляют функциональные молекулы в клетке. При анализе протеом в различных биообъектах можно обнаружить изменения в уровнях протеинов, например при развитии заболевания. Для улучшения результатов протеомных исследований при поиске биомаркеров были использованы различные биообразцы, которые имеют свои достоинства и недостатки. В основном анализ проводили с применением различных масс-спектрометрических методов, в том числе масс-спектрометрии (МС) с усиленной поверхностью лазерной десорбцией/ионизацией (УПЛДИ-МС) [17].

Биологические жидкости

В большинстве протеомных исследований использованы образцы крови для поиска биомаркеров, так как они могут содержать белки или пептиды, специфические для пораженного органа. Однако при изучении плазмы/сыворотки крови возникают проблемы, связанные с присутствием высокопредставленных белков (ВПБ), таких как альбумин, белки комплемента или каскада коагуляции и иммуноглобулины (Ig), маскирующих низкопредставленные белки (НПБ) и, вероятно, более интересные белки или пептиды.

Большая часть работ выполнена на образцах сыворотки, так как плазма содержит белки, связанные со свертыванием крови. Однако согласно проекту Plasma Proteome Project Международной организации протеом человека (Human Proteome Organization — HUPO) вместо сыворотки рекомендуется использовать плазму, поскольку спонтанное или ускоренное свертывание трудно стандартизировать [18], и до 40% пептидов в сыворотке специфичны только для нее [19].

E.F. Petricoin et al. [17] впервые применили протеомику для обнаружения биомаркеров РЯ в образцах сыворотки 50 больных и сравнили их

с 50 образцами, полученными от здоровых пациентов. Благодаря использованию УПЛДИ-МС они выявили специфический для РЯ набор белков и применили его к новой серии валидации (50 больных РЯ и 66 здоровых женщин). Эти результаты продемонстрировали 100% чувствительность и 95% специфичность. При анализе полученных данных ряд авторов указали, в частности, на необходимость: 1) идентификации дифференциально экспрессированных протеинов (ДЭП); 2) определения целевой популяции; 3) использования стандартизированных протоколов и правильного применения методик для получения воспроизводимых результатов [20–24]. Позже с помощью масс-спектрометра высокого разрешения те же авторы определили профиль белков в сыворотке больных РЯ, который давал 100% чувствительность и специфичность [25]. K.A. Baggerly et al. [26] указывали на погрешности измерений в подобных экспериментах, связанные, в частности, с отсутствием рандомизации образцов контрольной группы и больных РЯ. Впоследствии несколько лабораторий использовали подобные методики для поиска биомаркеров РЯ. A.J. Rai et al. [7] предложили дискриминационную модель с 7 маркерами для дифференцирования больных РЯ и здоровых пациенток. Авторами были выделены 3 белка (трансферрин — Tf, гаптоглобин — HAP и тяжелая цепь Ig), относящиеся к БОФ. В. Ye et al. [27] идентифицировали α -субъединицу HAP, повышение уровня которой было зарегистрировано в сыворотке крови больных РЯ. N. Ahmed et al. [28] обнаружили изоформы предшественника HAP1 и сопоставили эти данные с результатами иммуногистохимического анализа образцов ткани. HAP1 присутствовал в злокачественном эпителии яичников и строме, кровеносных сосудах и областях с миксоматозной стромой, а также в сосудистых пространствах. В нормальном поверхностном эпителии яичников HAP1 не выявлен.

K.R. Kozak et al. [29] представили 3 панели дифференциально экспрессированных белков, встречающихся у больных РЯ. Первая панель позволяла дифференцировать больных с доброкачественными и злокачественными опухолями яичников, а две другие — пациенток с ранней стадией заболевания и здоровых женщин. Образцы подразделяли на обучающую серию и серию валидации. При тестировании 3 панелей биомаркеров был правильно классифицирован 41 из 44 образцов. Позже та же группа исследователей сообщила об идентификации ряда ДЭП [30]. Один из них, апополипротеин A1 (AA1), относят к ВПБ плазмы крови. Другими идентифицированными белками были гемоглобин (Hb) и белки острой фазы (БОФ), транстиретин (TTR)

и ТФ, уровни которых постепенно уменьшались при переходе от больных РЯ к пациенткам с пограничными опухолями яичников (ПОЯ) и здоровым женщинам, что позволяло обнаруживать РЯ на ранней стадии. Другая группа исследователей также идентифицировала α - и β -субъединицы Hb, повышение уровней которых было отмечено в сыворотках больных РЯ [31]. Z. Zhang et al. [32] установили, что те же самые белки (AAI и TTR) дифференциально экспрессированы у больных РЯ, и использовали их для проведения независимой валидации. При комбинировании модели, включающей 3 маркера, с СА-125 получали чувствительность или специфичность выше, чем у одного СА-125. N. Ahmed et al. [33] идентифицировали изоформы предшественников НАР и ТФ, уровни которых увеличивались у больных РЯ и уменьшались у практически здоровых доноров. Опубликованы другие мультимаркерные модели для ранней диагностики, для которых не были проведены валидация и идентификация [34, 35].

В исследовании J. Helleman et al. [36] сравнивали не только белковые профили больных РЯ и здоровых женщин (биомаркеры первичной опухоли), но и профили при прогрессии РЯ с таковыми у здоровых пациенток (биомаркеры опухолевой прогрессии) и с профилями, зафиксированными в конце адьювантной химиотерапии (биомаркеры мониторинга прогрессии). Все эти пациентки были чувствительными к платине (развитие рецидива спустя 6 мес после окончания основного курса терапии). Авторы обнаружили ряд ДЭП, из них 8 диагностических, 7 биомаркеров прогрессии и 8 белков мониторинга прогрессии, один из которых был идентифицирован как сывороточный амилоид А1 (SAA1) — БОФ, увеличенная экспрессия которого обусловлена наличием других опухолей. M.F. Lopez et al. [37] опубликовали описание подхода, основанного на белке-носителе и примененного ими для идентификации в сыворотке белковых фрагментов НПБ или не выявленных ранее белков. Авторы создали панели из множества маркеров для классификации образцов как случай или контроль и обнаружили фрагменты пептидов, связанные с каскадом коагуляции и характеризующиеся высокой дискриминационной способностью. D. Jackson et al. [38] установили, что уровни 2 изоформ афамина, витамин Е-связывающего протеина, у пациенток с РЯ были снижены и этот маркер был комплементарен с СА-125. S.A. Moshkovskii et al. [39] использовали термостабильные фракции плазмы для уменьшения уровней ВПБ и выявили 2 пика с показателями m/z (отношение массы молекулы к заряду ее иона) 11 500 и 11 700 Да, дифференциально

экспрессированных в образцах у больных РЯ и у практически здоровых женщин. Дальнейшая идентификация показала, что они относились к SAA и его аргинин-N-терминальной сокращенной форме, т. е. к реагентам острой фазы, уровни которых возрастают в зависимости от состояния заболевания. Y.W. Lin et al. [40] также выполнили профилирование протеома плазмы, включив опухоль Крукенберга в фазу открытия биомаркеров. С применением метода тандемной МС с технологией изобарных меток для относительного и абсолютного количественного определения (isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation — iTRAQ) проводили количественное картирование сыворотки крови 10 больных серозным РЯ и 6 пациенток контрольной группы [41]. Авторам удалось идентифицировать 220 уникальных протеинов, 14 из которых приводили к увеличению уровней экспрессии у больных РЯ по сравнению с таковыми в группе контроля, в том числе extracellular matrix protein-1, leucine-rich α -2-glycoprotein-1, lipopolysaccharide binding protein-1 и proteoglycan-4.

Моча также представляет привлекательный объект для протеомных исследований, поскольку образцы ее легко получить, они идеальны для скрининга и более стойкие к преаналитическим процедурам обработки, чем образцы сыворотки и плазмы [42]. При использовании образцов мочи наблюдаются большие внутри- и межличностные вариации в уровнях белков и низкая их концентрация. Кроме того, из-за присутствия гломерулярной мембраны белки высокой молекулярной массы не попадают в мочу.

B. Ye et al. [43] выявили повышенное содержание гликозилированных форм нейротоксина из эозинофилов и СООН — терминального фрагмента остеопоэтина — в моче больных РЯ, что могло быть связано с воспалением. В исследовании A.L. Petri et al. [44] идентифицированные белки представлены как протеолитические фрагменты ВПБ фибриногена и коллагена и не являются опухолеспецифичными. Показано, что уровень SMRP мочи (mesothelin) у больных РЯ повышен и обладает большей чувствительностью при раннем обнаружении заболевания, чем серологические маркеры. S.D. Drenberg et al. [45] продемонстрировали, что для дифференцирования эпителиального РЯ можно использовать ангиостатин (AS). Уровни AS в моче (uAS) у здоровых женщин и у пациенток с доброкачественными гинекологическими заболеваниями в среднем составили $21,4 \pm 3,7$ и $41,5 \pm 8,8$ нг/мл соответственно, а у больных с I ($n=6$) и более поздними ($n=31$) стадиями — $115 \pm 39,2$ и $276 \pm 45,8$ нг/мл. Кроме того, uAS у больных РЯ были повышены в зависимости от

стадии, размера опухоли, а также были комплементарны с уровнями СА-125.

На поздней стадии заболевания у многих пациентов с РЯ отмечают быстрый рост интраперитонеальных опухолей наряду со вздутием живота, происходящим в результате накопления асцитной жидкости (АЖ) в брюшной полости. Формирование асцита связано с тем, что злокачественные клетки секретируют белки, факторы роста и цитокины, которые вызывают неоваскуляризацию, ангиогенез, повышенную инфильтрацию жидкости и/или обструкцию лимфатических сосудов [46–48], что приводит к накоплению подобной сыворотке жидкости в пределах брюшной полости. Эта локальная микросреда, состоящая из секретлируемых и слущенных белков опухолевых клеток яичников, представляет превосходный объект для идентификации потенциальных биомаркеров РЯ [49]. По причине того, что АЖ содержит много клеток опухолевого происхождения, в дополнение к другим растворимым факторам роста, связанным с инвазией и метастазированием [50, 51], она является секретом клеток РЯ и связана с другими факторами микроокружения злокачественного новообразования. Таким образом, при использовании современных протеомных технологий для анализа асцита можно обнаружить новые биомаркеры, являющиеся более чувствительными и специфическими, чем те, которые доступны в настоящее время.

Изучение протеома асцита было проведено в недавнем исследовании L. Gortzak-Uzan et al. [52], идентифицировавших более 2200 белков, из которых только 229 были выявлены в растворимой фракции асцита. Однако поскольку протеом сыворотки содержит тысячи белков, список из 229 белков вряд ли представляет полный протеом растворимой части асцита. В ходе применения различных методов разделения в комбинации с МС С. Kuk et al. [53] идентифицировали 445 белков в растворимой фракции асцита. С учетом того что уровни сывороточных белков отличаются на 9 порядков, был изучен протеом низкомолекулярной фракции (НМФ) АЖ (до 30 кДа). Авторы сравнили идентифицированный подпротеом АЖ РЯ с базой данных протеома плазмы крови человека и установили, что только 34% найденных белков присутствовало в обеих биожидкостях. Даже с учетом того, что протеом плазмы крови был охарактеризован не полностью и исследователи изучали НМФ протеома, можно заключить, что протеом АЖ достоверно отличается по составу от плазмы крови и ее белки отражают вклад микросреды опухоли. Классификация идентифицированных белков по базам данных показала, что 52% белков в АЖ являются внеклеточными или мембранными для внеклеточной биологической жидкости. Белки, идентифицирован-

ные в АЖ, отражают патологическое состояние яичников. В связи с тем что накопление асцита часто связывают с прогрессированием РЯ, многие из идентифицированных белков, по мнению авторов, могут служить новыми потенциальными биомаркерами. С другой стороны, не все белки в асците представляют опухолеассоциированные антигены. В результате использования различных критериев отбора С. Kuk et al. [53] минимизировали список белков для дальнейшей валидации (см. таблицу).

В. Davidson et al. [54] сравнили злокачественные и доброкачественные выпоты (плевры и асцит) и исследовали экспрессию белков известных сигнальных путей с помощью белковых микроэкреев и иммуногистохимического окрашивания. Они смогли дифференцировать злокачественную форму доброкачественных выпотов на основании различий в сигналах и идентифицировали 3 преобладающих сигнальных пути, которые активируются при злокачественных выпотах.

L.M. Amon et al. [55] использовали метод количественной тандемной МС для сравнительного профилирования протеома сыворотки и перитонеальной жидкости (ПЖ), взятых у больных серозным РЯ и у пациенток с доброкачественными опухолями яичников. После идентификации авторы отобрали 54 ДЭП сыворотки крови и 358 белков ПЖ. В обоих типах биоматериала были количественно определены 17 белков, уровни которых возрастали от контроля к случаю, из них 14 были внеклеточными. Все 19 валидированных маркеров обнаружены в ПЖ больных РЯ, а субпопуляция 7 маркеров была количественно определена в сыворотке методом ELISA.

Клеточные культуры

Модели клеточных культур не могут полностью отражать состояние опухоли в естественных условиях, а манипуляции с клетками во время их обработки иногда вызывают изменения уровней экспрессии протеинов. Н. Wang et al. [56] картировали протеом лизатов линии светлоклеточного РЯ (клеточная линия ES2), используя комбинацию двухмерной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с масс-спектрометром. Авторы обнаружили 900 белков, 290 из которых были идентифицированы МС-методами. Эту процедуру позже проводили для сравнения белковых профилей культивируемых поверхностных эпителиальных клеток РЯ с 2 линиями клеток аденокарциномы [57]. Исследователи идентифицировали 310 уникальных белков, о части которых сообщалось ранее при изучении РЯ и других неоплазий человека. J.P. Gagne et al. [58] сравнивали уровни экспрессии протеинов в лизатах агрессивной клеточ-

Характеристика 52 потенциальных маркеров РЯ, идентифицированных в АЖ [53]

Название протеина	Молекулярная масса, Да
Agrin precursor	214 820
Lutheran blood group glycoprotein precursor	61 042
Latent transforming growth factor β -binding protein 2 precursor	195 039
Isoform 1 of endosialin precursor	80 840
Glycoprotein precursor	14 159
Clusterin precursor	52 477
COMP 80-kDa protein	79 676
Carboxypeptidase A4 precursor	47 334
Cystatin-C precursor	15 781
Cystatin-M precursor	16 493
Isoform 1 of connective tissue growth factor precursor	38 073
Dystroglycan precursor	97 563
Dickkopf-related protein 3 precursor	38 272
Isoform 2A of desmocollin-2 precursor	99 945
Desmoglein 2 preproprotein	122 276
Extracellular matrix protein 1 precursor	60 655
Isoform 1 of EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 precursor	54 621
Protein FAM3C precursor	24 663
Isoform C of fibulin 1 precursor	74 442
Folate receptor α precursor	29 801
Follistatin-related protein 1 precursor	34 967
Uncharacterized protein C17orf 25	54 995
Ganglioside GM2 activator precursor	20 805
Glutathione peroxidase 3 precursor	25 488
Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein precursor	468 788
Serine protease HTRA1 precursor	51 269
Insulin-like growth factor-binding protein 2 precursor	35 119
Insulin-like growth factor-binding protein 3 precursor	31 656
Insulin-like growth factor-binding protein 4 precursor	27 916
Insulin-like growth factor-binding protein 5 precursor	30 552
Insulin-like growth factor-binding protein 6 precursor	25 304
Insulin-like growth factor-binding protein 7 precursor	29 112
Leucine-rich α_2 -glycoprotein precursor	38 162
Hepatocyte growth factor-like protein precursor	80 360
Matrix-remodeling-associated protein 5 precursor (adlican)	312 263
Nidogen-2 precursor	151 377
Epididymal secretory protein E1 precursor	16 552
Nucleobindin-1 precursor	53 862
Procollagen C-endopeptidase enhancer 1 precursor	47 955
Isoform 1 of plectin-1	531 708
Isoform 1 of phospholipid transfer protein precursor	54 723
Endothelial protein C receptor precursor	30 697
Vitamin K-dependent protein S precursor	75 105
Isoform Sap-mu-0 of proactivator polypeptide precursor	58 094
Isoform 1 of sulfhydryl oxidase 1 precursor	82 561
Secreted and transmembrane protein 1 precursor	27 021
Corticosteroid-binding globulin precursor	45 124
16-kDa protein (superoxide dismutase 1)	16 104
Polydom (Sel-Ob)	390 478
Transgelin-2	22 374
Transforming growth factor- β -induced protein ig-h3 precursor	74 665
Vasorin precursor	71 696

ной линии РЯ и менее агрессивной формы. Авторы обнаружили и идентифицировали 37 ДЭП, которые в основном были представлены белками, участвующими в организации цитоскелета, подвижности клеток и адгезии.

Q.Y. He et al. [59] культивировали поверхностный эпителий яичников больных наследственным

РЯ (НРЯ) и пациенток с доброкачественной гинекологической патологией и сравнивали их белковые профили. При этом подходе был использован двухмерный гель-электрофорез в комбинации с МС. Авторы обнаружили 1500 белков, 8 из которых были дифференциально экспрессированы при НРЯ и включали белки, участвующие в защите кле-

ток от апоптоза. Несколько найденных белков, уровни которых возрастали, ранее связывались с другими типами злокачественных новообразований и могли отражать предраковые изменения. Для исследования сигнальных путей, ответственных за чувствительность и резистентность к препаратам платины, выполнено несколько работ на моделях клеточных культур [60–64]. Найденные ДЭП были ответственны за ускоренную детоксикацию субстратов лекарственного средства, торможение апоптоза клеток и связаны с модуляцией актинового цитоскелета и частично — с ингибированием ряда сигнальных путей, позволяющим клеткам перенести продолжительное медикаментозное лечение. Tian Y. et al. [65] на модели линии клеток SKOV-3 серозного РЯ исследовали молекулярные механизмы резистентности к паклитакселу. С помощью метода ВЭЖХ-МС с iTRAQ-технологией был идентифицирован 1371 протеин. Авторы установили, что тубулин и митохондриальные белки ответственны за химиорезистентность к паклитакселу.

Опухолевая ткань

Большинство белков, выявленных в протеомных исследованиях, которые проводили с использованием образцов крови или мочи, являлись белками острой фазы (БОФ), возможно, связанными с воспалением, и не были опухолеспецифическими. В связи с этим опухолевая ткань кажется более привлекательной альтернативой для поиска опухолеспецифических биомаркеров, чем биологические жидкости. Опухолевая ткань яичников состоит из различных клеток (клетки стромы, ооциты, содержащие фолликулы, кровеносные сосуды, инфильтрирующие лимфоциты), которые могут маскировать результаты протеомного анализа. В исследованиях с цельной тканью были обнаружены белки, которые могли коррелировать с развитием опухолевого процесса. Эту проблему можно решить с помощью лазерной микродиссекции (ЛМД) посредством выделения определенного типа клеток для получения гомогенной популяции. Данная методика сначала была описана M.R. Emmert-Buck et al. [66] и использовалась при изучении нескольких неоплазий [67–71]. Исследования, сравнивающие белковые профили между цельной тканью и клетками, полученными благодаря применению ЛМД, отчетливо показывают, что в случае микродиссектируемых клеток набор белков значительно обогащается [72]. Недостатки этой методики связаны с малым количеством используемой ткани для последующих методов и длительностью процедуры. Продемонстрировано, что с помощью УПЛДИ-МС и оптимизированных протоколов можно получить белковые профили клеток, выделенных с помощью ЛМД [73]. W. Wang

et al. [74] успешно комбинировали обращеннофазовую капиллярную хроматографию с изоэлектрофокусированием и тандемной МС для получения белковых профилей этих клеток.

M.V. Jones et al. [75] использовали клетки, полученные посредством ЛМД, для сравнения белковых профилей пациенток с инвазивным РЯ и ПОЯ. Несмотря на небольшое исследование, они смогли выявить 23 ДЭП. Из них 3 белка были идентифицированы как Rho G — белковый ингибитор диссоциации (RhoGDI) и FK506, являющиеся косвенными медиаторами инвазии, и глиоксалаза I, которая защищает клетки от токсичности и играет определенную роль в развитии химиорезистентности. Уровни этих белков при РЯ возрастали. H.J. An et al. [76] применяли ЛМД для отделения нормальной ткани от пограничной и инвазивной опухолевой ткани яичников. Они установили, что опухоли яичников различного гистологического типа имели характерные белковые профили. Наибольшие различия наблюдались между протеомами нормальной ткани и серозной инвазивной опухоли, а наименьшие — в случае муцинозного рака. Кроме того, муцинозные ПОЯ с агрессивным гистологическим типом (такие как стромальные) экспрессировали профиль протеинов для начальной стадии инфильтрирующего роста опухоли, который был ближе к их инвазивному типу, чем к муцинозной ПОЯ. Все это подтверждалось гистологическими анализами, продемонстрировавшими, что серозные опухоли имеют худший прогноз. Авторы также сравнили злокачественную и нормальную ткань яичников, инвазивные и пограничные опухоли и нашли белки, играющие важную роль при супрессии метастазов, росте клеток и апоптозе. J. Luo et al. [77] использовали комбинацию ЛМД с УПЛДИ-МС для сравнения белковых профилей между инвазивным РЯ ($n=13$), ПОЯ ($n=7$) и здоровой тканью. Они обнаружили 7 ДЭП между опухолевыми клетками и нормальной тканью, уровни 4 пиков между ПОЯ и нормальной тканью отличались, а 2 пика имели различные уровни экспрессии в случае ПОЯ и РЯ. В последних 2 исследованиях опухолевые клетки и нормальные эпителиоциты яичника были получены от тех же самых пациенток, что представляет довольно трудную задачу, особенно при поздних стадиях заболевания, когда яичники полностью поражены опухолью и трудно восстановить любую нормальную ткань. В исследовании H.J. An et al. [76] 10 из 11 больных имели I и II стадии, в то время как в исследовании J. Luo et al. [77] информация о стадии заболевания отсутствовала. S. Bengtsson et al. [78] применяли цельную ткань для сравнения белковых профилей РЯ с пограничной и нормальной тканями и тканью

здоровых пациенток с известной мутацией *BRCA-1*. Авторы выполнили перекрестный анализ ДЭП между 4 группами. В результате были идентифицированы белки, связанные с клеточными ответами на стресс и сворачиваемостью белков, включенные в сигнальные пути апоптоза, играющие ключевую роль в распространении метастазов, участвующие в ответах на повреждение ДНК и принадлежащие цитоскелету. X.O. Li et al. [79] также использовали цельную ткань и идентифицировали 6 ДЭП, участвующих в пролиферации клеток, апоптозе и связанных с онкогенезом и прогрессией опухолевого роста. Различия в уровнях их экспрессии также наблюдались в случаях рака толстой кишки человека и гепатоцеллюлярного рака [80, 81]. Кроме того, описана измененная экспрессия митохондриальной еноил-КоА-гидратазы с короткой цепью для образцов поверхностного эпителия яичника, полученных при осуществлении профилактической овариэктомии. Более высокие уровни экспрессии белка отмечали у больных семейным РЯ по сравнению с таковыми у пациенток с несемейным РЯ [59]. При поиске мишеней для таргетной терапии РЯ D. Faratian et al. [82] изучили экспрессию 10 фосфопротеинов в 8 сигнальных путях (PI3K, MAPK, β -catenin, STAT, NF κ B, ER, клеточный цикл и отклик на повреждение ДНК), пролиферации (фосфо-гистон H3 и Ki67) и апоптозе (активированная каспаза-3) в 2 независимых сериях образцов ткани РЯ с использованием иммунофлуоресцентного анализа. В качестве мишеней для таргетной терапии авторы предложили ингибировать сигнальный путь MAPK для серозной и светлоклеточной карциномы яичников или комплексное ингибирование сигнальных путей STAT, NF κ B и WNT. При анализе опухолевой ткани яичника методом МС-изображений был получен список специфических биомаркеров [83], ассоциированных с пролиферацией клеток, модуляцией иммунного отклика и прогрессией рака. В дальнейшем эти специфические биомаркеры валидировали с помощью методов иммуноцитохимии, клеточной биологии, вестерн-блоттинга и полимеразной цепной реакции.

Общие проблемы протеомных исследований

Проведение ранних протеомных исследований сопровождалось рядом проблем, часть из которых со временем может быть разрешена.

Слабая идентификация. По мере развития МС-методик возможна идентификация большего числа пиков, хотя область низких молекулярных масс остается проблематичной.

Недостатки перекрестной валидации и воспроизводимости. Несколько научных групп опубликовали список потенциальных маркеров, не валидируя их на новой серии образцов. В связи с этим важно проводить хорошо контролируемые исследования со строгим протоколом получения образцов, сериями валидации и с участием различных лабораторий. Необходимо включение пациенток, в отношении которых имеется четкая клиническая информация.

Недостаточное объединение существующих биомаркеров. Следует комбинировать или сравнивать с СА-125 потенциальные биомаркеры, используемые для диагностики РЯ, для определения чувствительности и специфичности.

Необходимость выделения группы риска для проведения скрининга. Более чем 90% РЯ являются спорадическими и встречаются в общей популяции, в то время как НРЯ составляет 5–10%. Следовательно, эта категория больных будет нуждаться в другой скрининговой стратегии.

Заключение

При проведении протеомных исследований РЯ в основном были использованы различные МС-методы, применяемые для анализа образцов сыворотки и плазмы крови, однако до сих пор удовлетворительные маркеры не найдены. Большинство обнаруженных в сыворотке или плазме крови биомаркеров относят к БОФ, которые не специфичны для отдельных видов рака или его прогрессии. Кроме того, наличие меж- и внутрииндивидуальных изменений предполагает изучение значительных популяций больных и практически здоровых доноров, а присутствие ВПБ делает неизбежным предварительную обработку образцов сыворотки или плазмы крови. Исследования по применению ткани опухоли РЯ выполнены на небольшом числе образцов и пока недостаточно убедительны, однако перспективны в отношении выявления белков, раскрывающих биологическое поведение данного вида неоплазии. Недавние исследования главным образом были посвящены поискам диагностических биомаркеров, хотя прогностические маркеры были бы очень полезны при формировании групп пациенток, нуждающихся в проведении эффективной химиотерапии. При изучении клеточных культур ряд авторов идентифицировали белки, связанные с резистентностью к препаратам, содержащим платину, однако требуется дальнейшая их валидация на образцах опухолевой ткани.

ЛИТЕРАТУРА

1. Heintz A.P., Odicino F., Maisonneuve P. et al. Carcinoma of the ovary. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. *Int J Gynaecol Obstet* 2006;95(Suppl 1):161–92.
2. Young R.C., Walton L.A., Ellenberg S.S. et al. Adjuvant therapy in stage I and stage II epithelial ovarian cancer. Results of two prospective randomized trials. *N Engl J Med* 1990;322(15):1021–7.
3. Armstrong D.K., Bundy B., Wenzel L. et al. Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. *N Engl J Med* 2006;354(1):34–43.
4. Markman M., Walker J.L. Intraperitoneal chemotherapy of ovarian cancer: a review, with a focus on practical aspects of treatment. *J Clin Oncol* 2006;24(6):988–94.
5. Adam B.L., Qu Y., Davis J.W. et al. Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men. *Cancer Res* 2002;62(13):3609–14.
6. Jacobs I.J., Menon U. Progress and challenges in screening for early detection of ovarian cancer. *Mol Cell Proteom* 2004;3(4):355–66.
7. Rai A.J., Zhang Z., Rosenzweig J. et al. Proteomic approaches to tumor marker discovery. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126(12):1518–26.
8. Sedlakova I., Vavrova J., Tosner J., Hanousek L. Lysophosphatidic acid: an ovarian cancer marker. *Eur J Gynaecol Oncol* 2008;29(5):511–4.
9. Moore R.G., McMeekin D.S., Brown A.K. et al. A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol* 2009;112(1):40–6.
10. Visintin I., Feng Z., Longton G. et al. Diagnostic markers for early detection of ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14(4):1065–72.
11. Ward B.G., McGuckin M.A., Ramm L.E. et al. The management of ovarian carcinoma is improved by the use of cancer-associated serum antigen and CA 125 assays. *Cancer* 1993;71(2):430–8.
12. Moore R.G., Brown A.K., Miller M.C. et al. The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol* 2008;108(2):402–8.
13. Jacobs I., Davies A.P., Bridges J. et al. Prevalence screening for ovarian cancer in postmenopausal women by CA 125 measurement and ultrasonography. *BMJ* 1993;306(6884):1030–4.
14. Woolas R.P., Conaway M.R., Xu F. et al. Combinations of multiple serum markers are superior to individual assays for discriminating malignant from benign pelvic masses. *Gynecol Oncol* 1995;59(1):111–6.
15. Zhang Z., Barnhill S.D., Zhang H. et al. Combination of multiple serum markers using an artificial neural network to improve specificity in discriminating malignant from benign pelvic masses. *Gynecol Oncol* 1999;73(1):56–61.
16. Skates S.J., Horick N., Yu Y. et al. Preoperative sensitivity and specificity for early-stage ovarian cancer when combining cancer antigen CA-125II, CA 15-3, CA 72-4, and macrophage colony-stimulating factor using mixtures of multivariate normal distributions. *J Clin Oncol* 2004;22(20):4059–66.
17. Petricoin E.F., Ardekani A.M., Hitt B.A. et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002;359(9306):572–7.
18. Omenn G.S., States D.J., Adamski M. et al. Overview of the HUPO Plasma Proteome Project: results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database. *Proteomics* 2005;5(13):3226–45.
19. Tammen H., Schulte I., Hess R. et al. Peptidomic analysis of human blood specimens: comparison between plasma specimens and serum by differential peptide display. *Proteomics* 2005;5(13):3414–22.
20. Baggerly K.A., Morris J.S., Coombes K.R. Reproducibility of SELDI-TOF protein patterns in serum: comparing datasets from different experiments. *Bioinformatics* 2004;20(5):777–85.
21. Elwood M. Proteomic patterns in serum and identification of ovarian cancer. *Lancet* 2002;360(9327):170–1.
22. Diamandis E.P. Proteomic patterns in serum and identification of ovarian cancer. *Lancet* 2002;360(9327):170–1.
23. Diamandis E.P. Mass spectrometry as a diagnostic and a cancer biomarker discovery tool: opportunities and potential limitations. *Mol Cell Proteom* 2004;3(4):367–78.
24. Daly M.B., Ozols R.F. The search for predictive patterns in ovarian cancer: proteomics meets bioinformatics. *Cancer Cell* 2002;1(2):111–2.
25. Conrads T.P., Fusaro V.A., Ross S. et al. High-resolution serum proteomic features for ovarian cancer detection. *Endocr Relat Cancer* 2004;11(2):163–78.
26. Baggerly K.A., Edmonson S.R., Morris J.S., Coombes K.R. High-resolution serum proteomic patterns for ovarian cancer detection. *Endocr Relat Cancer* 2004;11(4):583–7.
27. Ye B., Cramer D.W., Skates S.J. et al. Haptoglobin-alpha subunit as potential serum biomarker in ovarian cancer: identification and characterization using proteomic profiling and mass spectrometry. *Clin Cancer Res* 2003;9(8):2904–11.
28. Ahmed N., Barker G., Oliva K.T. et al. Proteomic-based identification of haptoglobin-I precursor as a novel circulating biomarker of ovarian cancer. *Br J Cancer* 2004;91(1):129–40.
29. Kozak K.R., Amneus M.W., Pusey S.M. et al. Identification of biomarkers for ovarian cancer using strong anion-exchange ProteinChips: potential use in diagnosis and prognosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(21):12343–8.
30. Kozak K.R., Su F., Whitelegge J.P. et al. Characterization of serum biomarkers for detection of early stage ovarian cancer. *Proteomics* 2005;5(17):4589–96.
31. Woong-Shick A., Sung-Pil P., Su-Mi B. et al. Identification of hemoglobin-alpha and -beta subunits as potential serum biomarkers for the diagnosis and prognosis of ovarian cancer. *Cancer Sci* 2005;96(3):197–201.
32. Zhang Z., Bast R.C. Jr., Yu Y. et al. Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. *Cancer Res* 2004;64(16):5882–90.
33. Ahmed N., Oliva K.T., Barker G. et al. Proteomic tracking of serum protein isoforms as screening biomarkers of ovarian cancer. *Proteomics* 2005;5(17):4625–36.
34. Yu J.K., Zheng S., Tang Y., Li L. An integrated approach utilizing proteomics and bioinformatics to detect ovarian cancer. *J Zhejiang Univ Sci B* 2005;6(4):227–31.
35. Zhang H., Kong B., Qu X. et al. Biomarker discovery for ovarian cancer using SELDI-TOF-MS. *Gynecol Oncol* 2006;102(1):61–6.
36. Helleman J., van der Vlies D., Jansen M.P. et al. Serum proteomic patterns for ovarian cancer monitoring. *Int J Gynecol Cancer* 2008;18(5):985–95.
37. Lopez M.F., Mikulskis A., Kuzdzal S. et al. A novel, high-throughput workflow for discovery and identification of serum carrier protein-bound peptide biomarker candidates in ovarian cancer samples. *Clin Chem* 2007;53(6):1067–74.
38. Jackson D., Craven R.A., Hutson R.C. et al. Proteomic profiling identifies afamin as a potential biomarker for ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13(24):7370–9.
39. Moshkovskii S.A., Serebryakova M.V., Kuteykin-Teplyakov K.B. et al. Ovarian cancer marker of 11.7 kDa detected by proteomics is a serum amyloid A1. *Proteomics* 2005;5(14):3790–7.
40. Lin Y.W., Lin C.Y., Lai H.C. et al. Plasma proteomic pattern as biomarkers for ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2006;16(Suppl 1):139–46.
41. Boylan K.L., Andersen J.D., Anderson L.B. et al. Quantitative proteomic analysis by iTRAQ(R) for the identification of candidate biomarkers in ovarian cancer serum. *Proteome Sci* 2010;8:31.
42. Kumar S., Tsai C.J., Nussinov R. Temperature range of thermodynamic stability for the native state of reversible

- two-state proteins. *Biochemistry* 2003;42(17):4864–73.
43. Ye B., Skates S., Mok S.C. et al. Proteomic-based discovery and characterization of glycosylated eosinophil-derived neurotoxin and COOH-terminal osteopontin fragments for ovarian cancer in urine. *Clin Cancer Res* 2006;12(2):432–41.
44. Petri A.L., Simonsen A.H., Yip T.T. et al. Three new potential ovarian cancer biomarkers detected in human urine with equalizer bead technology. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2009;88(1):18–26.
45. Drenberg C.D., Saunders B.O., Wilbanks G.D. et al. Urinary angiostatin levels are elevated in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2010;117(1):117–24.
46. Adam R.A., Adam Y.G. Malignant ascites: past, present, and future. *J Am Coll Surg* 2004;198(6):999–1011.
47. Kassis J., Klominek J., Kohn E.C. Tumor microenvironment: what can effusions teach us? *Diagn Cytopathol* 2005;33(5):316–9.
48. Tamsma J.T., Keizer H.J., Meinders A.E. Pathogenesis of malignant ascites: Starling's law of capillary hemodynamics revisited. *Ann Oncol* 2001;12(10):1353–7.
49. Hu L., Hofmann J., Zaloudek C. et al. Vascular endothelial growth factor immunoneutralization plus Paclitaxel markedly reduces tumor burden and ascites in athymic mouse model of ovarian cancer. *Am J Pathol* 2002;161(5):1917–24.
50. Berchuck A., Carney M. Human ovarian cancer of the surface epithelium. *Biochem Pharmacol* 1997;54(5):541–4.
51. Verheul H.M., Hoekman K., Jorna A.S. et al. Targeting vascular endothelial growth factor blockade: ascites and pleural effusion formation. *Oncologist* 2000;5(Suppl 1):45–50.
52. Gortzak-Uzan L., Ignatchenko A., Evangelou A.I. et al. A proteome resource of ovarian cancer ascites: integrated proteomic and bioinformatic analyses to identify putative biomarkers. *J Proteome Res* 2008;7(1):339–51.
53. Kuk C., Kulasingam V., Gunawardana C.G. et al. Mining the ovarian cancer ascites proteome for potential ovarian cancer biomarkers. *Mol Cell Proteomics* 2009;8(4):661–9.
54. Davidson B., Espina V., Steinberg S.M. et al. Proteomic analysis of malignant ovarian cancer effusions as a tool for biologic and prognostic profiling. *Clin Cancer Res* 2006;12(3 Pt 1):791–9.
55. Amon L.M., Law W., Fitzgibbon M.P. et al. Integrative proteomic analysis of serum and peritoneal fluids helps identify proteins that are up-regulated in serum of women with ovarian cancer. *PLoS One* 2010;5(6):11137.
56. Wang H., Kachman M.T., Schwartz D.R. et al. A protein molecular weight map of ES2 clear cell ovarian carcinoma cells using a two-dimensional liquid separations/mass mapping technique. *Electrophoresis* 2002;23(18):3168–81.
57. Wang H., Kachman M.T., Schwartz D.R. et al. Comprehensive proteome analysis of ovarian cancers using liquid phase separation, mass mapping and tandem mass spectrometry: a strategy for identification of candidate cancer biomarkers. *Proteomics* 2004;4(8):2476–95.
58. Gagne J.P., Ethier C., Gagne P. et al. Comparative proteome analysis of human epithelial ovarian cancer. *Proteome Sci* 2007;5:16.
59. He Q.Y., Zhou Y., Wong E. et al. Proteomic analysis of a preneoplastic phenotype in ovarian surface epithelial cells derived from prophylactic oophorectomies. *Gynecol Oncol* 2005;98(1):68–76.
60. Yan X.D., Pan L.Y., Yuan Y. et al. Identification of platinum-resistance associated proteins through proteomic analysis of human ovarian cancer cells and their platinum-resistant sublines. *J Proteome Res* 2007;6(2):772–80.
61. Stewart J.J., White J.T., Yan X. et al. Proteins associated with Cisplatin resistance in ovarian cancer cells identified by quantitative proteomic technology and integrated with mRNA expression levels. *Mol Cell Proteom* 2006;5(3):433–43.
62. Chien J., Aletti G., Baldi A. et al. Serine protease HtrA1 modulates chemotherapy-induced cytotoxicity. *J Clin Invest* 2006;116(7):1994–2004.
63. Le Moguen K., Lincet H., Deslandes E. et al. Comparative proteomic analysis of cisplatin sensitive IGROV1 ovarian carcinoma cell line and its resistant counterpart IGROV1-R10. *Proteomics* 2006;6(19):5183–92.
64. Song J., Shih Ie M., Salani R. et al. Annexin XI is associated with cisplatin resistance and related to tumor recurrence in ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 2007;13(22 Pt 1):6842–9.
65. Tian Y., Tan A.C., Sun X. et al. Quantitative proteomic analysis of ovarian cancer cells identified mitochondrial proteins associated with paclitaxel resistance. *Proteom Clin Appl* 2009;3(11):1288–95.
66. Emmert-Buck M.R., Bonner R.F., Smith P.D. et al. Laser capture microdissection. *Science* 1996;274(5289):998–1001.
67. Banks R.E., Dunn M.J., Forbes M.A. et al. The potential use of laser capture microdissection to selectively obtain distinct populations of cells for proteomic analysis — preliminary findings. *Electrophoresis* 1999;20(4–5):689–700.
68. Ornstein D.K., Gillespie J.W., Pawelz C.P. et al. Proteomic analysis of laser capture microdissected human prostate cancer and in vitro prostate cell lines. *Electrophoresis* 2000;21(11):2235–42.
69. Cazares L.H., Adam B.L., Ward M.D. et al. Normal, benign, preneoplastic, and malignant prostate cells have distinct protein expression profiles resolved by surface enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry. *Clin Cancer Res* 2002;8(8):2541–52.
70. Shekouh A.R., Thompson C.C., Prime W. et al. Application of laser capture microdissection combined with two-dimensional electrophoresis for the discovery of differentially regulated proteins in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Proteomics* 2003;3(10):1988–2001.
71. Melle C., Ernst G., Schimmel B. et al. A technical triade for proteomic identification and characterization of cancer biomarkers. *Cancer Res* 2004;64(12):4099–104.
72. Lawrie L.C., Curran S., McLeod H.L. et al. Application of laser capture microdissection and proteomics in colon cancer. *Mol Pathol* 2001;54(4):253–8.
73. Cadron I., Van Gorp T., Amant F. et al. The use of laser microdissection and SELDI-TOF MS in ovarian cancer tissue to identify protein profiles. *Anticancer Res* 2009;29(4):1039–45.
74. Wang W., Guo T., Rudnick P.A. et al. Membrane proteome analysis of microdissected ovarian tumor tissues using capillary isoelectric focusing/reversed-phase liquid chromatography-tandem MS. *Anal Chem* 2007;79(3):1002–9.
75. Jones M.B., Krutzsch H., Shu H. et al. Proteomic analysis and identification of new biomarkers and therapeutic targets for invasive ovarian cancer. *Proteomics* 2002;2(1):76–84.
76. An H.J., Kim D.S., Park Y.K. et al. Comparative proteomics of ovarian epithelial tumors. *J Proteom Res* 2006;5(5):1082–90.
77. Luo J., Qian J.H., Yu J.K. et al. Discovery of altered protein profiles in epithelial ovarian carcinogenesis by SELDI mass spectrometry. *Eur J Gynaecol Oncol* 2008;29(3):233–8.
78. Bengtsson S., Krogh M., Szigyarto C.A. et al. Large-scale proteomics analysis of human ovarian cancer for biomarkers. *J Proteome Res* 2007;6(4):1440–50.
79. Li X.Q., Zhang S.L., Cai Z. et al. Proteomic identification of tumor-associated protein in ovarian serous cystadenocarcinoma. *Cancer Lett* 2009;275(1):109–16.
80. Cable S., Keller J.M., Colin S. et al. Peroxisomes in human colon carcinomas. A cytochemical and biochemical study. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1992;62(4):221–6.
81. Suto K., Kajihara-Kano H., Yokoyama Y. et al. Decreased expression of the peroxisomal bifunctional enzyme and carbonyl reductase in human hepatocellular carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999;125(2):83–8.
82. Faratian D., Um I., Wilson D.S. et al. Phosphoprotein pathway profiling of ovarian carcinoma for the identification of potential new targets for therapy. *Eur J Cancer* 2011.
83. El Ayed M., Bonnel D., Longuespee R. et al. MALDI imaging mass spectrometry in ovarian cancer for tracking, identifying, and validating biomarkers. *Med Sci Monit* 2010;16(8):233–45.