

Низкомолекулярный протеом плазмы крови – источник биомаркеров для дифференциальной диагностики рака яичников

В.Е. Шевченко¹, Н.Е. Арноцкая¹, Н.Р. Погосян¹, О.Г. Иоселиани^{1,2}, А.Н. Грицай¹

¹ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва;

²ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва

Контакты: Валерий Евгеньевич Шевченко vshev@nm.ru

В настоящее время отсутствует скрининговый тест для ранней диагностики рака яичников (РЯ). В этом исследовании разработана, унифицирована и апробирована новая методология поиска биомаркеров РЯ, основанная на профилировании низкомолекулярного протеома (НМП) плазмы крови. Данный подход включает в себя 3 основных компонента: предварительную подготовку образцов, времяпролетную масс-спектрометрию с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией, обработку данных с помощью биоинформационного пакета программ. Продемонстрированы возможности и перспективность разработанного подхода для обнаружения потенциальных маркеров РЯ. Проведен скрининг образцов плазмы крови 56 больных РЯ, 36 больных доброкачественными опухолями яичников. В результате проведенного исследования обнаружены пептиды/полипептиды, которые могут в перспективе использоваться для дифференциальной диагностики РЯ.

Ключевые слова: биомаркеры, рак яичников, доброкачественные опухоли яичников, протеом, плазма крови, масс-спектрометрия

Low molecular weight blood plasma proteome – a source of differential diagnostic biomarkers of ovarian cancer

V. Ye. Shevchenko¹, N. Ye. Arnotskaya¹, N. R. Pogosyan¹, O. G. Ioseliani^{1,2}, A. N. Gritsay¹

¹N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow;

²N. I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia, Moscow

At present, there is no screening test for the early detecting of ovarian cancer, one of the most lethal form of gynaecological malignancy in the worldwide. In this study the new methodology for the search of tumor markers of ovarian cancer, involving profiling the low-molecular blood plasma proteomes, is developed, unified and approved. The given approach included three basic components: pre-preparation of samples, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and bioinformatics software for mass spectral data processing. Opportunities and prospects of the developed approach for the detection of potential ovarian cancer markers were shown. For search of potential tumor markers, screening of 56 blood plasma samples from ovarian cancer patients and 36 benign ovarian neoplasia samples were carried out. As a result of the present research, peptides/polypeptides which can be used in future for detecting this pathology were found out.

Key words: biomarkers, ovarian cancer, benign ovarian neoplasia, proteome, blood plasma, mass spectrometry

Введение

В настоящее время не существует единого метода оценки риска малигнизации у женщин с новообразованиями яичников. Для предварительной количественной оценки риска вероятности озлокачествления доброкачественных опухолей яичников (ДОЯ) I. Jacobs et al. [1] ввели индекс малигнизации (RMI – Risk of Malignancy Index). Надежность RMI исследовалась в ряде клинических работ, комбинация СА-125 и ультразвукового исследования (УЗИ) органов малого таза повысила специфичность метода и его прогностическую ценность. Тем не менее RMI скорее служил для констатации необходимости хирургического лечения, чем для проведения дифференциальной диагностики между ДОЯ и раком яичников (РЯ), и разделения пациенток на группы с низким и высоким риском малигнизации.

Недостатком алгоритма RMI является то, что уровень СА-125 повышается у 80 % пациенток с эпителиальным РЯ, но только у половины из них заболевание находится на ранних стадиях, т. е. его эффективность для ранней диагностики недостаточна, а в 20 % случаев новообразования вообще не экспрессируют этот антиген [2].

Тест на СА-125 характеризуется достаточно низкой специфичностью (особенно у женщин в пременопаузе), поскольку уровень антигена может повышаться при некоторых физиологических состояниях, соматических и гинекологических заболеваниях и новообразованиях других органов.

Один из подходов, позволяющих повысить чувствительность диагностических методов у пациенток с новообразованиями яичников, – это использование комбинации нескольких биомаркеров. При диффе-

ренициальном диагнозе ДОЯ и злокачественных опухолей яичников с использованием панелей из 4–5 протеинов удалось повысить чувствительность и специфичность с 78,1 и 76,8 % до 90,6 и 93,2 % соответственно [3]. R.G. Moore et al. продемонстрировали, что благодаря использованию комбинации CA-125 и HE4 можно дифференцировать доброкачественную опухоль от злокачественной с чувствительностью 76,4 % и специфичностью 95 % (по сравнению с 43,3 % для одного только CA-125) [4]. Была разработана логистическая регрессионная модель с использованием 2 биомаркеров – CA-125 и HE4, названная Risk of Ovarian Malignancy Algorithm (ROMA), позволяющая разделить риск малигнизации на низкий и высокий у пациенток с выявленными новообразованиями яичников. Таким образом, применение набора биомаркеров является перспективным подходом в ранней диагностике РЯ.

Протеомная масс-спектрометрия широко используется для поиска и идентификации групп потенциальных биомаркеров опухолевого роста в биологических жидкостях и тканях организма [5–7]. Значительные успехи в этой области достигнуты в последние несколько лет после введения методов скрининга на основе времяпролетной (ВП) масс-спектрометрии, таких как усиленная поверхностью лазерная десорбция/ионизация (УПЛДИ) и матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (МАЛДИ) [8]. Клинические исследования с применением УПЛДИ ВП масс-спектрометрии дали возможность проводить широкомасштабный скрининг образцов сыворотки/плазмы крови и обнаруживать множество потенциальных маркеров, показывая высокую диагностическую чувствительность и специфичность этого метода для различных видов неоплазий [9–15]. Недавно была разработана технология профилирования низкомолекулярного протеома (НМП) биологических жидкостей, использующая магнитные частицы с модифицированной поверхностью для фракционирования сложных протеомов совместно с анализом МАЛДИ ВП масс-спектрометрии. Мы и ряд других авторов показали эффективность этой методологии для поиска потенциальных биомаркеров рака легкого, предстательной железы, молочной железы и др. [16–20].

В настоящей работе продемонстрирована возможность применения разработанного метода для обнаружения потенциальных маркеров для дифференциальной диагностики РЯ. В результате проведенного исследования обнаружен ряд пептидов/белков, которые могут в перспективе использоваться для выявления данной патологии.

Материалы и методы

Реактивы

Для всех процедур использовали дистиллированную воду, пропущенную через систему очистки

и обессоливания Millipore Simplicity (Millipore Corporation, USA). Набор магнитных частиц со слабой катионообменной поверхностью (MB-WCX), 2,5-дигидроксibenзойную кислоту, α -циано-гидроксикоричную кислоту, набор пептидных калибраторов II и набор протеиновых калибраторов I получали от Bruker Daltonics, ацетонитрил от Merck KGaA и этанол от Sigma-Aldrich, Inc.

Образцы крови

Образцы крови больных РЯ и ДОЯ получали из гинекологического отделения НИИ КО ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН. От всех больных РЯ и ДОЯ получено информированное согласие на проведение исследования.

Протокол получения и хранения плазмы крови

Забор крови у больных проводили натощак из вены (около 4 мл) в пробирки Vacuette (с антикоагулянтом EDTA – EthyleneDiamine Tetraacetic Acid) до хирургического вмешательства или до начала применения противоопухолевой терапии. Кровь центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин (1600g) при комнатной температуре, полученную плазму аликвотировали по 100 мкл и хранили при -80°C . Перед использованием образцы размораживали при комнатной температуре в течение 15 мин и немедленно обрабатывали.

Клиническая характеристика больных

Для исследования использовали плазму от 56 больных с гистологически подтвержденным диагнозом «серозный РЯ» (T1aN0M0, T1bN0M0, T1cN0M0 – 7 больных; T2bN0M0, T2cN0M0 – 7; T3bN0M0, T3cN0M0 – 44; T3cN1M0, T3cN0M1 – 5 (FIGO)) и 36 больных с ДОЯ (эндометриоидная киста – 10; муцинозная цистаденома – 6; серозная цистаденома – 9; фолликулярная киста – 2; дермоидная киста – 4; эндометриоз – 2; фибротеккома – 2; цистаденофиброма – 1). Возраст больных РЯ варьировал от 28 до 80 лет, ДОЯ – от 25 до 77 лет. Образцы больных РЯ и ДОЯ произвольно делили на подгруппы (по 28 и 18 соответственно) для построения классификационных моделей (процесс обучения) с помощью биоинформационного пакета ClinProTools™ 2,1 (CPT) (Bruker Daltonics) и внешней проверки их дискриминационной способности.

Фракционирование образцов плазмы крови

Для предварительного фракционирования плазмы крови использовали набор для профилирования НМП сыворотки/плазмы крови Profiling Kit 100 MB-WCX (Bruker Daltonics), содержащий магнитные микрочастицы со слабой катионообменной поверхностью, и соответствующий протокол, рекомендованный производителем. Часть полученной фракции пептидов/полипептидов (2 мкл) наносили на стальную полированную 384-луночную МАЛДИ-мишень (Bruker MTP 384 target plate polished steel TF) в 2 повторях, после высушивания на воздухе образец покрывали

Таблица 1. Часть результатов статистического анализа усредненных масс-спектров НМП плазмы крови индивидов 2 групп (РЯ/ДОЯ) после обработки программой СРТ 2,1

Mass	DAve	PTTA	Ave1	Ave2	StdDev1	StdDev2	AUC
1007,25	1,57	2,57E-11	3,37	1,81	1,74	0,87	0,78
3734,52	2,87	4,39E-10	6,62	3,75	3,18	2,03	0,80
4141,49	1,75	3,62E-09	3,77	2,02	2,3	1,03	0,77
3061,8	91,41	1,31E-08	69,44	160,85	43,27	100,98	0,77
4266,96	3,19	2,26E-08	5,29	2,1	4,55	1,87	0,83
1525,59	2,89	2,26E-08	4,73	1,84	4,29	1,34	0,84
4153,82	5,98	3,38E-08	9,66	3,69	8,7	3,52	0,81
2802,52	109,24	4,81E-08	110,26	219,5	77,18	125,46	0,75
3919,39	13,31	4,81E-08	24,14	10,83	21,08	4,54	0,82
1178,66	1,39	4,81E-08	4,1	2,71	1,42	1,43	0,79
12953,11	0,19	4,81E-08	0,48	0,28	0,28	0,12	0,69
2423,86	152,28	5,67E-08	126,45	278,73	107,55	177,5	0,76
1628,74	6,33	5,67E-08	12,69	6,37	8,76	4,96	0,83
1530,55	1,04	6,43E-08	3,07	2,03	1,18	1,04	0,79
1458,4	3	6,82E-08	7,35	4,35	4,74	1,5	0,78
5517,9	0,59	8,59E-08	2,08	1,48	0,84	0,47	0,77
2295,95	12,79	9,07E-08	40,73	27,94	15,75	12,42	0,76
9947,84	0,49	1,29E-07	1,27	0,78	0,71	0,39	0,72
3040,89	11,76	2,12E-07	11,47	23,23	6,25	15,05	0,76
2683,27	42,33	2,54E-07	28,13	70,46	14,09	55,68	0,73
16657,52	0,25	3,25E-07	0,41	0,16	0,44	0,09	0,71
2190,14	27,44	4,46E-07	59,64	87,08	20,59	35,22	0,73
11096,88	0,36	4,53E-07	0,82	0,46	0,61	0,23	0,69
7467,79	2,19	7,08E-07	5,98	3,79	3,6	1,59	0,68
2236,95	83,1	7,30E-07	30,01	113,11	31,98	114,86	0,77

Примечание. Mass — масс-спектр иона, Да; DAve — разница средних значений площадей пиков для двух классов; PTTA — р-величина для t-теста; AveN — среднее значение для площади пика класса N; StdDevN — стандартное отклонение значения площади пика для класса N; AUC — площадь под ROC-кривой.

раствором матрицы (2 мкл). В качестве матрицы применяли смесь 2,5-дигидроксibenзойной (3 мг/мл) и α -циано-гидроксикоричной (2,4 мг/мл) кислот в смеси метанол/ацетонитрил/вода в соотношении 5:4:1 [21].

Времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией

Протеомный анализ проводили на ВП масс-спектрометре Ultraflex II (Bruker Daltonics) по методике, разработанной нами ранее [22]. В результате был получен сигнал суммарной интенсивности не менее чем 10^6 .

Анализ масс-спектрометрических данных

Для процессирования и генерации масс-фингерпринта с помощью биоинформационного пакета СРТ обрабатывали все спектры с отношением сигнал/шум > 3 и разрешением 800 в диапазоне масс 1–17 кДа. При построении классификационных моделей (процесс обучения) с помощью СРТ и внешней проверки их дискриминационной способности образцы больных РЯ и ДОЯ делили пополам, при этом одну часть использовали при построении моделей (обучение), а вторую — при их внешней валидации. В результате

получали серию нормализованных площадей пиков в каждом спектре, которые использовались СРТ при формировании средних масс-спектров каждого класса и построении моделей, отличающих образцы больных РЯ и ДОЯ.

Методы классической статистики применялись СРТ в комбинации с различными алгоритмами построения классификационных моделей, такими как генетический алгоритм (ГА), метод опорных векторов (МОВ), управляемая нейронная сеть (УНС), алгоритм быстрой классификации (АБК). Разделительную способность модели оценивали перекрестной и внешней валидацией.

Результаты и обсуждение

В данном исследовании мы проверили и подтвердили гипотезу о том, что НМП плазмы крови больных РЯ отличается от протеома больных ДОЯ, и это различие можно использовать для поиска потенциальных маркеров опухолевого роста. Сравнение масс-спектральных профилей РЯ и ДОЯ, полученных СРТ из серии данных в обучающей фазе эксперимента, показало их подобие, однако ряд ионов, отвечающих молекулам пептидов/полипептидов, имели различные интенсивности для 2 популяций (табл. 1).

Анализ показал, что пики масс-спектра представляли в основном однозарядные ионы протонированных пептидов/полипептидов. В обучающем тесте воспроизводимо детектировали 208 различных пиков на спектр при отношении сигнал/шум > 3 в диапазоне масс 1–17 кДа (191 для 110 кДа, 17 для 1017 кДа), что давало матрицу из 208×92 интенсивностей (площадей) пиков для 2 классов. Данные статистической обработки, часть из которых представлена в табл. 1, выявили 115 пиков с достоверно различающимися уровнями сигналов ($p < 0,01$) в масс-спектрах образцов плазмы больных РЯ и ДОЯ. Анализ усредненных масс-спектров показал, что интенсивности 88 пиков увеличивались у больных РЯ, а 27 пиков – уменьшались ($p < 0,01$). Все эти ионы относились к дифференциально экспрессированным (ДЭ) пептидам/полипептидам, которые можно рассматривать в качестве потенциальных маркеров РЯ.

Наибольший интерес вызывали пептиды/полипептиды, представленные в масс-спектре протонированными ионами, интенсивности которых с наибольшей статистической достоверностью отличались между 2 классами (РЯ/ДОЯ): масс-спектр 1007 (3,37 против 1,81), 3735 (6,62 против 3,75), 4141 (3,77 против 2,07), 3062 (69,44 против 160,85), 4267 (5,29 против 2,10) и некоторые другие. Как видно из табл. 1, эти пики имели высокие значения площади (AUC $\geq 0,77$) под ROC-кривой (receiver operating characteristic – операционная характеристика приемника), характеризующей их дискриминационную способность. Распре-

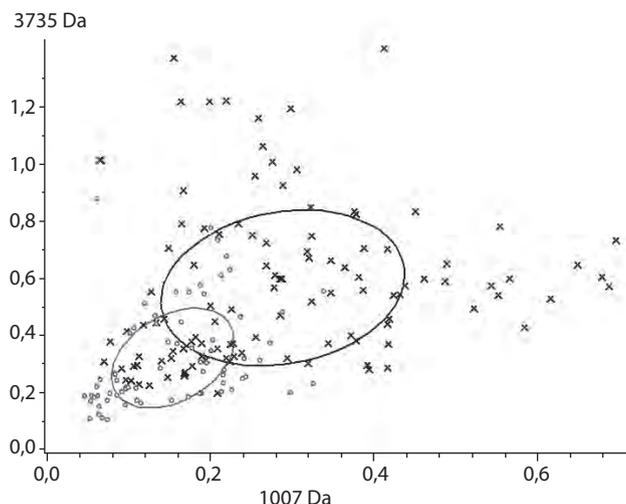


Рис. 1. Статистическое распределение образцов плазмы крови (РЯ/ДОЯ), основанное на значениях площадей пиков с масс-спектром 1007 и 3735 Да (в произвольных единицах) в процессе обучения биоинформационного пакета СРТ 2.1. × – распределение площадей пиков, принадлежащих образцам плазмы крови больных РЯ; о – распределение площадей пиков, принадлежащих образцам плазмы крови больных ДОЯ

деление числа пиков масс-спектра в зависимости от диапазона AUC иллюстрирует табл. 2. Анализ полученных данных показал, что из 115 ДЭ пиков масс-спектра 19 проявляли достаточно высокую дискриминационную способность (AUC $\geq 0,77$). Наивысшее значение AUC $\geq 0,82$ относилось к пептидам/полипептидам, которым отвечали ионы с масс-спектрами 1526, 1629, 4267, 3919.

Для иллюстрации дискриминационной способности комбинации из 2 таких пиков масс-спектра на рис. 1 представлено двумерное распределение их площадей (в произвольных единицах) для каждого образца (РЯ/ДОЯ), используемого в процессе обучения СРТ. Величины масс-спектров пиков в спектре указаны над осями x и y. По оси x отложены значения площадей для пика с масс-спектром 1007, по оси y – для пика с масс-спектром 3735. Эллипсами выделены среднеквадратические отклонения этих значений для каждого класса. Как можно видеть из приведенного графика, большая часть значений площадей этих

Таблица 2. Распределение числа пиков масс-спектра в зависимости от диапазона изменения площади под ROC-кривой

Диапазон изменения площади под ROC-кривой (AUC)	Число пиков масс-спектра
AUC $\geq 0,80$	6
$0,79 \geq \text{AUC} \geq 0,75$	26
$0,74 \geq \text{AUC} \geq 0,70$	28
$0,69 \geq \text{AUC} \geq 0,60$	52

Таблица 3. Проверка качества дискриминационных моделей методом перекрестной валидации (данные обучающей серии образцов)

Классификационные алгоритмы	Перекрестная валидация (%)			
	средняя по классам	РЯ	контрольная группа	распознавательная способность
ГА	85,8	93,8	77,9	98,6
МОВ	80,9	95,3	66,4	99,3
УНС	68,9	46,7	91,1	85,6
АБК	68,3	60,2	76,5	76,7

пиков увеличена в образцах РЯ (обозначены крестиками) по сравнению с образцами ДОЯ (обозначены кружками).

Генерацию моделей проводили в диапазоне масс-спектров от 1 до 17 кДа. Для предварительной оценки их дискриминационной способности использовали протокол перекрестной проверки, в котором программа СРТ случайно выбирала 2/3 данных в качестве набора обучения и 1/3 как испытательный набор, чтобы определить, насколько правильно данная модель могла предсказать РЯ. В табл. 3 представлены результаты перекрестной проверки на изучаемой серии образцов, которые демонстрируют высокую распознавательную способность по классам моделей, построенных методом ГА, МОВ (> 98 %).

Полученные при анализе обучающей серии образцов наборы пиков, отличающие образцы плазмы крови больных РЯ от ДОЯ, использовали для внешней проверки в независимой серии из 46 образцов. Основываясь на результатах испытательной серии, вычисляли чувствительность и специфичность построенных дискриминационных моделей. Как видно из табл. 4, все модели могли классифицировать образцы РЯ и ДОЯ со средней чувствительностью и достаточно высокой специфичностью. Наивысшие значения этих параметров имели наборы пиков, сформированные методом УНС. Анализ качественного состава модели УНС, представленного в табл. 5, показал, что она состояла из 23 пиков (в диапазоне масс от 1007 до 12 954 Да), из которых 12 имели до-

Таблица 4. Чувствительность и специфичность дискриминационных моделей (данные тестовой серии образцов)

Классификационные алгоритмы	Чувствительность, %	Специфичность, %
ГА	71,95	74,3
МОВ	64,9	91,4
УНС	71,9	80,0
АБК	52,6	82,9

стоверно различающиеся уровни сигнала ($p < 0,01$) для 2 классов, а 5 пиков имели значения $AUC \geq 0,78$, подтверждающие их высокую дискриминационную способность. Из 12 пиков 7 отвечали протонированным пептидам/полипептидам, экспрессия которых увеличивалась при РЯ в сравнении с ДОЯ (см. табл. 5). Данная модель разделяла образцы плазмы крови больных РЯ и ДОЯ с чувствительностью 72 % и специфичностью 80 % (см. табл. 4). Для сравнения в табл. 6 приведены подобные параметры для модели, построенной с помощью алгоритма МОВ, состоящей из 13 пиков (в диапазоне масс от 1007 до 7003 Да), из которых 8 с достоверно различающимися уровнями сигнала ($p < 0,01$) для 2 классов, 5 из них имели значения $AUC \geq 0,78$. Эта дискриминационная модель разделяла образцы плазмы крови больных РЯ и ДОЯ с чувствительностью 65 % и специфичностью 91 % (см. табл. 4). Снижение чувствительности по сравнению с предыдущей моделью объясняется, по-видимому, присутствием меньшего числа дискриминирующих пиков.

Благоприятный прогноз при РЯ в значительной степени зависит от распространенности заболевания на момент постановки диагноза. Таким образом, диагностика РЯ на ранней стадии может значительно улучшить результаты лечения больных. В этой связи постоянно продолжается интенсивный поиск новых высокочувствительных и специфичных маркеров, их комбинаций или набора нескольких маркеров. Протеом сыворотки/плазмы крови стал одним из наиболее важных источников для их открытия. Особый интерес связан с изучением пептидома или НМП сыворотки/плазмы, который может содержать много клинически важных неоткрытых маркеров, так как является источником молекул, способных пассивно диффундировать через барьер клеток эндотелия сосудов, который эффективно предотвращает пассивную перфузию молекул с массой выше 60 кДа. Считают, что пептидом сыворотки/плазмы крови содержит белковые фрагменты и небольшие молекулы полипептидов, образованные в пределах опухолевой ткани и ее микроокружения, которые могут отражать патофизио-

Таблица 5. Качественный состав дискриминационной модели, построенной с помощью УНС

Масса (масс-спектр), Да	Области интегрирования, используемые для классификации		Вес пика	AUC	Изменение сигнала РЯ/ДОЯ ($p < 0,01$)
	стартовая масса (масс-спектр), Да	конечная масса (масс-спектр), Да			
1007,22	1004,66	1012,53	0,017	0,78	↑
1076,42	1073,52	1080,25	0,074	0,79	↑
1178,6	1175,35	1183,22	0,056	0,79	↑
1211,5	1208,83	1215,12	0,022	0,7	—
1359,34	1355,82	1361,04	0,092	0,6	—
1458,41	1454,73	1461,07	0,057	0,78	↑
1477,85	1473,64	1478,95	0,029	0,57	—
1981,39	1976,08	1993,54	0,026	0,61	—
2108,59	2102,73	2116,1	0,047	0,75	↓
2218,75	2215,8	2224,15	0,022	0,64	↓
2230,22	2224,15	2231,64	0,05	0,74	—
2252,82	2247,54	2261,9	0,03	0,62	↓
2317,31	2314,03	2324,91	0,045	0,52	—
2384,64	2375,49	2390,89	0,028	0,71	↓
2486,08	2479,69	2494,3	0,018	0,56	—
2546,77	2542,17	2557,16	0,025	0,61	—
3142,81	3132,84	3151,37	0,051	0,7	↓
3279,76	3273,63	3287,64	0,017	0,63	—
3734,63	3730,11	3745,99	0,036	0,8	↑
7002,68	6988,44	7038,42	0,021	0,67	—
8600,68	8571,73	8620,33	0,031	0,64	—
9948,4	9929,62	9966,61	0,024	0,72	↑
12953,5	12927,8	12992,4	0,018	0,69	↑

логические изменения органа(ов) на ранней стадии заболевания [23].

Метод УПЛДИ ВП масс-спектрометрии использовался в большинстве протеомных исследований для диагностики РЯ, особенно в ранних работах по профилированию протеомов сыворотки/плазмы крови, и показал свои потенциальные возможности в качестве диагностического теста. K. R. Kozak et al. [24] представили 3 панели ДЭ белков, встречающихся

у больных РЯ. Первая панель позволяла дифференцировать больных с ДОЯ и злокачественными опухолями яичников, а 2 другие — пациенток с ранней стадией заболевания и здоровых женщин.

При тестировании 3 панелей биомаркеров был правильно классифицирован 41 из 44 образцов. Однако возникали проблемы с чувствительностью метода и воспроизводимостью полученных результатов [25].

Таблица 6. Качественный состав дискриминационной модели, построенной с помощью МОВ

Масса (масс-спектр), Да	Области интегрирования, используемые для классификации		Вес пика	AUC	Изменение сигнала РЯ/ДОЯ (p < 0,01)
	стартовая масса (масс-спектр), Да	конечная масса (масс-спектр), Да			
1007,22	1004,66	1012,53	1,00	0,78	↑
1076,42	1073,52	1080,25	0,91	0,79	↑
1178,60	1175,35	1183,22	0,85	0,79	↑
1359,34	1355,82	1361,04	1,00	0,60	—
1458,41	1454,73	1461,07	0,63	0,78	↑
2295,95	2292,45	2303,63	0,96	0,76	↑
2546,77	2542,17	2557,16	0,69	0,61	—
3142,81	3132,84	3151,37	0,58	0,70	↓
3734,63	3730,11	3745,99	0,71	0,80	↑
4610,92	4608,08	4619,38	0,58	0,61	↓
4968,10	4957,96	4979,44	0,66	0,60	—
6432,67	6418,6	6444,25	0,64	0,58	—
7002,68	6988,44	7038,42	0,60	0,67	—

В своем исследовании мы исходили из того, что биомаркеры РЯ могут секретироваться в более высоких концентрациях в кровотоке у больных РЯ III стадии по сравнению с больными ДОЯ: во-первых, самой раковой опухолью или окружающими ее тканями, во-вторых, другими органами и тканями в ответ на рост злокачественного новообразования. Учитывая вышесказанное, можно обнаруживать потенциальные биомаркеры опухолевого роста и в дальнейшем использовать их для дифференциальной диагностики РЯ.

В отличие от УПЛДИ ВП масс-спектрометрии для сравнительного профилирования НМП плазмы крови больных РЯ и ДОЯ мы использовали технологию МАЛДИ ВП масс-спектрометрии после предварительного фракционирования образцов на магнитных частицах со слабым катионообменным покрытием MB-WCX (Bruker Daltonics). Эта технологическая платформа значительно увеличивала чувствительность и воспроизводимость анализа, что подтверждалось рядом исследований по профилированию образцов сыворотки/плазмы крови онкологических больных [26–28]. Кроме того, МАЛДИ ВП масс-спектральный анализ в комбинации с современными биоинформационными программами (например, СРТ, используемой в этом исследовании) может применяться для поиска потенциальных маркеров заболеваний человека и увеличивать потенциал клинических про-

теомных исследований. В своей работе мы подтвердили это мнение.

При обработке полученных данных с помощью СРТ 2,1 (Bruker Daltonics) были обнаружены 115 ионов, которые отвечали ДЭ протонированным пептидам/полипептидам. Как видно из табл. 1, некоторые дискриминационные пики имели повышенную интенсивность сигнала у больных РЯ в сравнении с ДОЯ (например, с массой 1007; 1076; 1747 и др.), в то время как другие – пониженную (например, с массой 1339; 2109; 2803 и др.). Модели, созданные всеми четырьмя алгоритмами (ГА, МОВ, УНС, АБК), показывали среднюю распознавательную способность в процессе обучения, а также чувствительность и специфичность при внешней валидации. Значения этих параметров могут быть существенно улучшены при использовании большего количества образцов больных РЯ, ДОЯ и распределения их в обучающем тесте с учетом клинического диагноза. Полученные данные демонстрируют потенциальную возможность моделей для их использования при дифференциальной диагностике РЯ.

По нашему мнению, обнаруженные потенциальные маркеры РЯ представляют собой циркулирующие в крови пептиды/полипептиды или их фрагменты, уровни концентраций которых модулируются опухолевым процессом. Можно утверждать с большой долей вероятности, что часть отобранных маркеров обладает

высокой дискриминационной способностью. Как отмечалось выше, число проанализированных нами образцов плазмы крови больных РЯ и ДОЯ относительно невелико, что может сказываться на проверке качества представленных моделей. В этой связи необходимы дальнейшие исследования для подтверждения и уточнения полученных результатов на большем количестве образцов. После идентификации и синтеза ключевых пептидов/полипептидов могут быть созданы антитела для разработки высокопроизводительных тест-систем. В дальнейшем эти наборы могут включаться в проспективные испытания для оценки диагностической эффективности этих белков в распознавании РЯ.

Заключение

В настоящей работе продолжены исследования в лаборатории онкопротеомики ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН по поиску маркеров РЯ при сравнительном профилировании НМП (1–17 кДа) плазмы крови больных РЯ и ДОЯ. Продемонстрированы возможности и перспективность разработанного ранее подхода для обнаружения потенциальных маркеров РЯ при скрининге 56 образцов плазмы крови больных РЯ и 36 образцов ДОЯ. В результате проведенного исследования обнаружены пептиды/полипептиды, которые могут в перспективе использоваться при дифференциальной диагностике РЯ, в частности, в комбинации с СА-125 и НЕ4 для повышения их чувствительности и специфичности.

ЛИТЕРАТУРА

- Jacobs I., Oram D., Fairbanks J. et al. A risk of malignancy index incorporating CA 125, ultrasound and menopausal status for the accurate preoperative diagnosis of ovarian cancer. *Br J Obstet Gynecol* 1990;97(10): 922–9.
- Bast R.C. Jr., Brewer M., Zou C. et al. Prevention and early detection of ovarian cancer: Mission impossible? *Recent Results Cancer Res* 2007;174:91–100.
- 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.
- 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.
- Шевченко В.Е. Современные масс-спектрометрические методы в ранней диагностике рака. *Масс-спектрометрия* 2004;1(2):103–26.
- Etzioni R., Urban N., Ramsey S. et al. The case for early detection. *Nat Rev Cancer* 2003;3(4):243–52.
- Aldred S., Grant M.M., Griffiths H.R. The use of proteomics for the assessment of clinical samples in research. *Clin Biochem* 2004;37(11):943–52.
- Banks R.E., Dunn M.J., Hochstrasser D.F. et al. Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities. *Lancet* 2000; 356(9243):1749–56.
- Diamandis E.P. Proteomic patterns in serum and identification of ovarian cancer. *Lancet* 2002;360(9327):170.
- Guillaume E., Zimmermann C., Burkhard P.R. et al. A potential cerebrospinal fluid and plasmatic marker for the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Proteomics* 2003;3(8):1495–99.
- Howard B.A., Wang M.Z., Campa M.J. et al. Identification and validation of a potential lung cancer serum biomarker detected by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight spectra analysis. *Proteomics* 2003;3(9):1720–4.
- Koopmann J., Zhang Z., White N. et al. Serum diagnosis of pancreatic adenocarcinoma using surface-enhanced laser desorption and ionization mass spectrometry. *Clin Cancer Res* 2004;10(3):860–8.
- Menon U., Jacobs I. Screening for ovarian cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2002;16(4):469–82.
- 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.
- Zheng P.P., Luider T.M., Pieters R. et al. Identification of tumor-related proteins by proteomic analysis of cerebrospinal fluid from patients with primary brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003;62(8):855–62.
- Шевченко В.Е., Арноцкая Н.Е., Трифонова О.П. и др. Профилирование низкомолекулярного протеома плазмы крови для обнаружения потенциальных маркеров рака легкого. *Масс-спектрометрия* 2007;4(4):245–54.
- Shevchenko V.E., Arnotskaya N.E., Zaridze D.G. Detection of lung cancer using plasma protein profiling by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng)* 2010;16(4):539–49.
- Пятницкий М.А., Лисица А.В., Шевченко В.Е. и др. Выявление дифференциальных признаков плоскоклеточного рака легкого с помощью масс-спектрометрического профилирования плазмы крови. *Масс-спектрометрия* 2011;8(2):99–105.
- Villanueva J., Shaffer D.R., Philip J. Differential exoprotease activities confer tumour-specific serum peptidome patterns. *J Clin Invest* 2006;116(1):271–84.
- Ketterlinus R., Hsieh S.Y., Teng S.H. et al. Fishing for biomarkers: analyzing mass spectrometry data with the new ClinProTools software. *Biotechniques* 2005;Suppl:37–40.
- Сорокина А.В., Радзинский В.Е., Мустафина Е.А. и др. Масс-спектрометрия – новый подход в диагностике аденомиоза и рака тела матки. *Опухоли женской репродуктивной системы* 2011;(2):65–72.
- Шевченко В.Е., Мадина Х., Поддубная И.В. и др. *Вестн РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН* 2011;22(3):27–33.
- Zhou M., Lucas D.A., Chan K.C. et al. An investigation into the human serum “interactome”. *Electrophoresis* 2004; 25(9):1289–98.
- 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.
- Callesen A.K., Mogensen O., Jensen A.K. et al. Reproducibility of mass spectrometry based protein profiles for diagnosis of ovarian cancer across clinical studies: A systematic review. *J Proteomics* 2012;75(10):2758–72.
- Fiedler G.M., Baumann S., Leichtle A. et al. Standardized peptidome profiling of human urine by magnetic bead separation and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Chem* 2007;53(3):421–8.
- Schaub N.P., Jones K.J., Nyalwidhe J.O. et al. Serum proteomic biomarker discovery reflective of stage and obesity in breast cancer patients. *J Am Coll Surg* 2009;208(5):970–7.
- Schwamborn K., Krieg R.C., Grosse J. et al. Serum proteomic profiling in patients with bladder cancer. *Eur Urol* 2009;56(6): 989–99.