

Открытие потенциальных биомаркеров рака яичников масс-спектрометрическим профилированием низкомолекулярного протеома плазмы крови

В.Е. Шевченко¹, Н.Е. Арноцкая¹, Е.В. Огородникова², Н.Р. Погосян³, А.Н. Грицай³, К.И. Жордания³

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

²отделение переливания крови с банком костного мозга ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва;

³гинекологическое отделение ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва

Контакты: Валерий Евгеньевич Шевченко vshev@nm.ru

В настоящее время нет скринингового теста для раннего детектирования и мониторинга рака яичников (РЯ) — одной из наиболее летальных форм гинекологических злокачественных опухолей. В этом исследовании разработана, унифицирована и апробирована новая методология поиска биомаркеров РЯ, основанная на профилировании низкомолекулярного протеома плазмы крови. Данный подход включает 3 основных компонента: предварительную подготовку образцов, времяпролетную масс-спектрометрию с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией, обработку данных с помощью биоинформационного пакета программ. Протестированы возможности и перспективность разработанного подхода для обнаружения потенциальных маркеров РЯ. Проведен скрининг 40 образцов плазмы крови больных РЯ и 48 контрольных образцов. В результате проведенного исследования обнаружены пептиды/полипептиды, которые могут в перспективе использоваться для детектирования этой патологии.

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

Discovery of potential ovarian cancer biomarkers using low molecular weight blood plasma proteome profiling by mass spectrometry

V.E. Shevchenko¹, N.E. Arnotskaya¹, E.V. Ogorodnikova², N.R. Pogosyan³, A.N. Gritsay³, K.I. Zhordania³

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

²Blood Transfusion Department, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow;

³Gynecology Department, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

At present, there is no screening test for the early detecting and monitoring 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 40 blood plasma samples from ovarian cancer patients and 48 control 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, proteome, blood plasma, mass spectrometry

Введение

Во многих странах рак яичников (РЯ) имеет самую высокую летальность среди онкогинекологических заболеваний [1]. В последнее десятилетие отмечается стабильная тенденция к росту заболеваемости этой патологией. Смертность от РЯ продолжает занимать лидирующее место среди новообразований женских половых органов. В настоящее время отсутствуют популяционный скрининг РЯ и надежный метод для его раннего обнаружения. В связи с бессимптомным течением процесса и его локализацией в области таза в 60–70 % случаев РЯ определяется на поздних стадиях, что обуславливает высокую летальность в течение первого года с момента установления диагноза (33 %) и 5-летнюю выживаемость не

выше 35–40 %. В то же время у пациенток с I стадией РЯ 5-летняя выживаемость составляет около 95 %, и большинство больных излечиваются полностью [2]. Таким образом, ранняя диагностика может оказать существенное влияние на показатели летальности и финансовые затраты при лечении РЯ. В клинической практике для диагностики и контроля терапии РЯ используют серологический биомаркер СА-125, однако при достаточно высокой специфичности (97 %) он имеет низкую чувствительность (65 %) [3]. Совместное применение СА-125 и трансавагинальной эхографии может обеспечить выявление приблизительно 25 % случаев РЯ на ранней стадии [4]. Лапароскопия позволяет идентифицировать почти 100 % случаев РЯ на ранней стадии, но высокая

стоимость и инвазивный характер этого метода существенно препятствуют его использованию в клинической практике [4]. В настоящее время становится очевидным, что идентификация биомаркеров рака облегчает его раннее обнаружение, обеспечивает лучший мониторинг опухолевой прогрессии и оценку эффективности противоопухолевой терапии [4, 5].

Протеомный масс-спектрометрический анализ — один из самых новых и многообещающих подходов для поиска и идентификации групп потенциальных биомаркеров заболеваний в биологических жидкостях и тканях организма [6–8]. Значительные успехи в этой области достигнуты в последние несколько лет после введения методов скрининга на основе времяпролетной масс-спектрометрии (ВПМС), таких как усиленная поверхностью лазерная десорбция/ионизация (УПЛДИ) и матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (МАЛДИ) [9]. Клинические исследования с применением УПЛДИ-ВПМС 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 неоплазии (РЯ, рака предстательной железы, мочевого пузыря, молочной железы, легкого и др.) [10–16]. Однако, используя аналитическую платформу УПЛДИ-ВПМС и однотипные образцы, различные научные группы идентифицировали разные наборы для одного и того же типа рака. Эти несоответствия могли быть обусловлены недостаточной стандартизацией протоколов предварительной подготовки образцов биологических жидкостей человека и методик их масс-спектрометрического анализа, что заметно влияло на воспроизводимость полученных результатов [17–19]. Поэтому методология протеомного фингерпринта все еще нуждается в дальнейшем усовершенствовании.

Недавно была разработана технология профилирования низкомолекулярного протеома (НМП) биологических жидкостей, использующая магнитные частицы с модифицированной поверхностью, для фракционирования сложных протеомов совместно с МАЛДИ-ВПМС. Мы и ряд других авторов показали эффективность этой методики для поиска потенциальных биомаркеров рака легкого, предстательной железы, молочной железы и др. [20–24].

В настоящей работе продемонстрированы возможности и перспективность разработанного метода для выявления потенциальных маркеров РЯ. В результате проведенного исследования обнаружен ряд пептидов/белков, которые могут в перспективе использоваться для выявления этой 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-дигидроксibenзойная кислота, α -цианогидрокси-коричная кислота, набор пептидных калибрантов II и набор протеиновых калибрантов I получены от Bruker Daltonics (Германия), ацетонитрил — от Merck KGaA (Германия), этанол — от Sigma-Aldrich, Inc. (США).

Образцы крови. Образцы крови больных РЯ получали из гинекологического отделения НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН. В качестве контрольных использовали образцы крови практически здоровых женщин, полученные в отделении переливания крови НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН. От всех больных и здоровых доноров получено информированное согласие на проведение исследований.

Протокол получения и хранения плазмы крови. Забор крови из вены (около 4 мл) проводили в пробирки Vacuta (с антикоагулянтом этилендиаминтетрауксусной кислотой) натошак у больных до хирургического вмешательства или до начала 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 температуре -80°C . Перед использованием образцы размораживали при комнатной температуре в течение 15 мин и немедленно обрабатывали.

Клиническая характеристика больных. Для исследования использовали плазму 40 больных с гистологически подтвержденным диагнозом «серозный РЯ» (T3bN0M0 — 8 пациенток, T3cN0M0 — 32; FIGO) и 48 практически здоровых женщин. Возраст больных РЯ варьировался от 19 до 62 лет, женщин контрольной группы — от 18 до 57 лет. В каждой группе образцы произвольно делили на равные подгруппы, одну из которых использовали для построения классификационных моделей (процесс обучения) с помощью биоинформационного пакета ClinProToolsTM 2.1 (CPT, Bruker Daltonics), другую — для 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-лу-

ночную МАЛДИ-мишень (Bruker MTP 384 target plate polished steel TF) в 2 повторах, после высушивания на воздухе образец покрывали 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 [25].

Времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией. Протеомный анализ проводили на времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex II (Bruker Daltonics) по методике, разработанной нами ранее [26]. В результате был получен сигнал суммарной интенсивностью 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 m/z 1–17 кДа. При построении классификационных моделей (процесс обучения) с помощью СРТ и внешней проверки их дискриминационной способности образцы каждой из групп делили на 2 равные подгруппы, одну из которых использовали при построении моделей (обучение), а вторую — при их внешней валидации. В результате получали серию нор-

мализованных площадей пиков в каждом спектре, которые использовались программой СРТ при формировании средних масс-спектров каждого класса и построении моделей, отличающих образцы больных РЯ и контрольной группы.

Методы классической статистики применялись 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 женщин контрольной группы, и это различие можно использовать для поиска потенциальных маркеров опухолевого роста. Сравнение масс-спектральных профилей случая и контроля, полученных программой СРТ из серии данных в обучающей фазе эксперимента, показало их подобие, однако ряд ионов, соответствующих молекулам пептидов/полипептидов, имели различные интенсивности для 2 популяций (табл. 1).

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

Mass (m/z), Da	DAve	PTTA	Ave1	Ave2	StdDev1	StdDev2	AUC
6175,56	4,17	3,0E-18	5,85	1,68	1,57	0,53	1,00
4301,03	16,65	2,2E-16	21,91	5,26	6,99	1,83	1,00
1458,42	2,87	1,5E-15	5,27	2,40	1,34	0,68	0,98
3242,12	563,3	3,2E-15	927,15	1490,45	264,26	207,11	0,98
2847,69	75,22	4,9E-14	117,63	192,85	35,57	34,36	0,93
5536,95	1,45	8,1E-14	2,89	1,45	0,76	0,39	0,97
12 950,93	0,33	1,5E-13	0,48	0,16	0,17	0,06	0,98
4460,97	7,93	9,1E-13	11,75	3,82	4,46	1,63	0,95
3883,45	11,47	2,9E-12	17,38	5,91	6,72	3,36	0,96
13 864,86	0,21	3,3E-12	0,35	0,14	0,12	0,05	0,99
7670,51	2,96	3,5E-12	4,03	1,07	1,72	0,34	1,00
4628,7	72,1	5,1E-12	99,32	27,22	42,86	11,24	0,96
3734,4	5,13	6,7E-12	7,50	2,37	3,09	0,95	0,96
3726,98	2,08	7,5E-12	3,70	1,62	1,27	0,49	0,98
3346,68	9,36	9,3E-12	11,56	2,2	5,75	2,00	0,94
7397,6	1,58	1,1E-11	2,44	0,86	0,98	0,28	0,97
5518,15	1,33	2,0E-11	2,27	0,94	0,83	0,20	0,99
3921,6	9,58	2,1E-11	13,34	3,76	6,07	2,12	0,96
7467,59	5,16	2,1E-11	7,00	1,84	3,25	0,66	0,94

Примечание. Mass — m/z иона; DAve — разность средних значений площадей пиков для двух классов; PTТА — p -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.

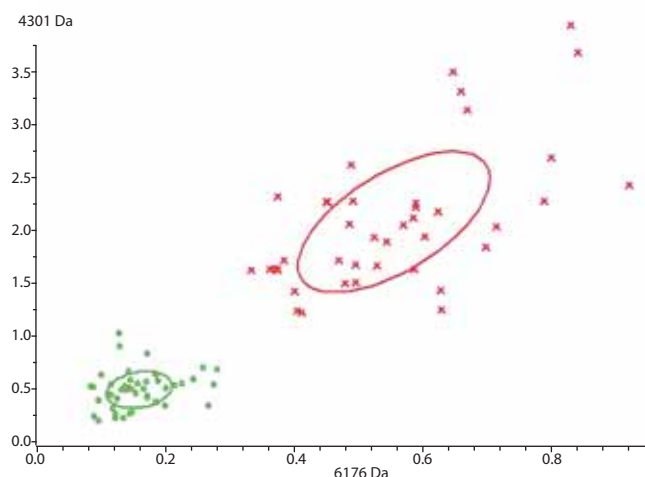


Рис. 1. Статистическое распределение образцов плазмы крови (РЯ/контроль), основанное на значениях площадей пиков с m/z 4301 и 6176 Да (в произвольных единицах) в процессе обучения биоинформационного пакета CPT: × — распределение площадей пиков, принадлежащих образцам плазмы крови больных РЯ; ○ — распределение площадей пиков, принадлежащих образцам плазмы крови женщин контрольной группы

Анализ показал, что пики масс-спектра представляли в основном однозарядные ионы протонированных пептидов/полипептидов. В обучающем тесте воспроизводимо детектировали 232 различных пика на спектр при отношении сигнал/шум > 3 в диапазоне масс от 1 до 17 кДа (216 для 1–10 кДа, 16 для 10–17 кДа), что давало матрицу из 232×88 интенсивностей (площадей) пиков для двух классов. Данные статистической обработки, часть из которых представлены в табл. 1, выявили 157 пиков с достоверно различающимися уровнями сигналов ($p < 0,01$) в масс-спектрах образцов плазмы больных РЯ и практически здоровых женщин. Анализ усредненных масс-спектров показал, что у больных РЯ интенсивности 136 пиков увеличивались, а 21 пик — уменьшались ($p < 0,01$). Все эти ионы относились к дифференциально экспрессированным 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 различались между двумя классами (РЯ/контроль): m/z 6176 (5,85 vs 1,68), 4301 (21,91 vs 5,26), 1458 (5,27 vs 2,40), 5537 (2,89 vs 1,45), 12 951 (0,48 vs 0,16) и некоторые другие. Как видно из табл. 1, эти пики имели высокие значения площади ($AUC \geq 0,9$) под ROC-кривой (receiver operating characteristic, операционная характеристика приемника), характеризующей их дискриминационную способность. Распределение числа пиков масс-спектра в зависимости от диапазона AUC иллюстрирует табл. 2. Анализ полученных данных показал, что 72 из 157 дифференциально экспрессированных пиков

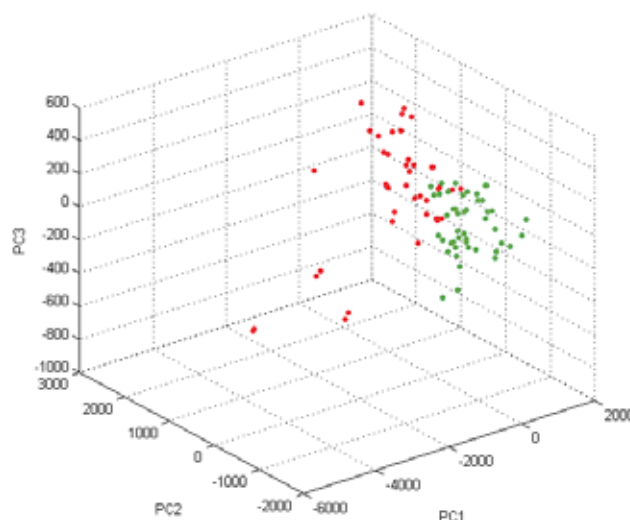


Рис. 2. Распределение образцов в координатах PCA
• — образцы плазмы крови больных РЯ;
• — образцы плазмы крови женщин контрольной группы

масс-спектра проявляли высокую дискриминационную способность ($AUC \geq 0,9$). Наивысшее значение $AUC = 1,0$ относилось к пептидам/полипептидам, которым соответствовали ионы с m/z 6176, 4301, 7671, 6678 Да.

Для иллюстрации дискриминационной способности комбинации из двух таких пиков масс-спектра на рис. 1 представлено двумерное распределение их площадей (в произвольных единицах) для каждого образца (РЯ/контроль), используемого в процессе обучения CPT. Величины m/z пиков в спектре указаны над осями X и Y. По оси X отложены значения площадей для пика с m/z 6176, по оси Y — для пика с m/z 4301. Эллипсами выделены стандартные отклонения этих значений для каждого класса. Как можно видеть из приведенного графика, большая часть значений площадей этих пиков увеличена в образцах больных РЯ по сравнению с образцами практически здоровых женщин. Мы использовали метод принципиального компонентного анализа (PCA) для оценки разделения образцов по классам, получения большей информации о гомогенности и гетерогенности серий полученных

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
$AUC \geq 0,95$	45
$0,94 \geq AUC \geq 0,90$	27
$0,89 \geq AUC \geq 0,80$	46
$0,79 \geq AUC \geq 0,60$	39

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

Классификационный алгоритм	Перекрестная валидация (%)			
	средняя по классам	РЯ	контроль	распознавательная способность
ГА	99,3	98,6	100	100
МОВ	93,2	87,3	99	100
УНС	98,6	97,3	100	100
АБК	96,5	93,0	100	100

масс-спектров. РСА выполнялся приложением MATLAB, входящим в СРТ. Результаты РСА, представленные на рис. 2 в РС-координатах, демонстрируют распределение образцов случая и контроля как между классами, так и внутри каждого класса.

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 обучающей серии образцов, которые демонстрируют высокую распознавательную способность по классам моделей, построенных методами ГА, МОВ, УНС, АБК (100 %).

Полученные при анализе обучающей серии образцов наборы пиков, отличающие образцы плазмы крови больных РЯ от контрольных, использовали для внешней проверки в независимой серии из 48 образцов. Основываясь на результатах испытательной серии, вычисляли чувствительность и специфичность построенных дискриминационных моделей. Как видно из табл. 4, все модели могли классифицировать образцы случая и контроля с достаточно высокой чувствительностью и специфичностью. Наивысшие значения этих параметров имели наборы пиков, сформированные методом ГА. Анализ каче-

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

Классификационный алгоритм	Чувствительность (%)	Специфичность (%)
ГА	97,5	100
МОВ	95,0	100
УНС	82,5	100
АБК	85,0	100

ственного состава модели ГА (табл. 5) показал, что она состояла из 5 пиков (в диапазоне m/z от 2917 до 12 529 Да), которые имели достоверно различающиеся уровни сигнала ($p < 0,01$) для 2 классов, а 4 пика имели значения $AUC \geq 0,95$, что подтверждало их высокую дискриминационную способность. Из 5 пиков 4 отвечали протонированным пептидам/полипептидам, экспрессия которых увеличивалась при РЯ в сравнении с контролем (см. табл. 5). Данная модель разделяла образцы плазмы крови больных РЯ и практически здоровых женщин с чувствительностью 97,6 % (39/40) и специфичностью 100 % (48/48) (см. табл. 4). Для сравнения в табл. 6 приведены подобные параметры для модели, построенной с помощью МОВ, состоящей из 3 пиков (в диапазоне m/z от 1458 до 4301 Да) с достоверно различающимися уровнями сигнала ($p < 0,01$) для двух классов, 2 из которых имели значения $AUC > 0,9$. Эта дискриминационная модель разделяла образцы плазмы крови больных РЯ и женщин контрольной группы с чувствительностью 95,0 % (38/40) и специфичностью 100 % (48/48) (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 уменьшить число смертельных исходов. В этой связи поиск новых высокочувствительных и специфичных

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

Масса (m/z), Да	Области интегрирования, используемые для классификации		Вес пика	AUC	Изменение сигнала РЯ/контроль ($p < 0,01$)
	стартовая масса (m/z), Да	конечная масса (m/z), Да			
3242,12	3233,35	3253,56	1,68	0,98	↓
4301,03	4285,43	4314,59	2,30	1,00	↑
4460,97	4451,67	4470,27	1,67	0,95	↑
2917,07	2909,84	2922,75	1,07	0,83	↑
12 528,90	12513,37	12567,10	1,45	0,96	↑

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

Масса (m/z), Да	Области интегрирования, используемые для классификации		Вес пика	AUC	Изменение сигнала РЯ/контроль ($p < 0,01$)
	стартовая масса (m/z), Да	конечная масса (m/z), Да			
1458,42	1454,79	1460,70	1,56	0,98	↑
2917,07	2909,84	2922,75	1,54	0,83	↑
4301,03	4285,30	4314,59	1,43	1,00	↑

маркеров, их комбинаций или набора множества маркеров интенсивно развивается. 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 молекулярной 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 патофизиологические изменения одного или нескольких органов на ранней стадии заболевания [27].

Подход УПЛДИ-ВПМС использовался для диагностики РЯ в большинстве протеомных исследований, особенно в ранних работах по профилированию протеомов сыворотки/плазмы крови, и показал свои потенциальные возможности в качестве диагностического теста. Однако возникали проблемы с чувствительностью метода и воспроизводимостью полученных результатов [28].

В своем исследовании мы исходили из того, что биомаркеры РЯ могут секретироваться в кровотоке в более высоких концентрациях при III–IV стадиях заболевания по сравнению с I–II стадиями: во-первых, самой опухолью или окружающими ее тканями, во-вторых, другими органами и тканями в ответ на опухолевый рост. Учитывая вышесказанное, можно более надежно обнаруживать потенциальные биомаркеры опухолевого роста и в дальнейшем использовать их для ранней диагностики РЯ.

В отличие от УПЛДИ-ВПМС для сравнительного профилирования НМП плазмы крови больных РЯ и практически здоровых женщин мы использовали технологию МАЛДИ-ВПМС 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 [29–31]. Кроме того, МАЛДИ-ВПМС в комбинации с современными биоинформационными программами (например, СРТ, используемой в этом исследовании) может применяться для поиска потенциальных маркеров заболеваний человека и увеличивать потенциал клинических протеомных исследований. В своей работе мы подтвердили это мнение.

При обработке полученных данных с помощью программы СРТ были обнаружены 157 ионов, которые соответствовали дифференциально экспрессированным протонированным пептидам/полипептидам. Как видно из табл. 1, некоторые дискриминационные пики у больных РЯ имели повышенную интенсивность сигнала в сравнении с контролем (например, с m/z 3347; 3734; 7650 и др.), в то время как другие – пониженную (например, с m/z 2848; 3242 и др.). Модели, созданные всеми 4 алгоритмами (ГА, МОВ, УНС, АБК), показывали высокую распознавательную способность в процессе обучения, а также чувствительность и специфичность при внешней валидации. Полученные данные демонстрируют потенциал моделей для использования в 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. Тем не менее число проанализированных нами образцов плазмы крови больных РЯ 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 исследования для оценки диагностической эффективности этих белков в распознавании РЯ.

Заключение

В настоящем исследовании унифицирована и апробирована новая методология поиска маркеров РЯ при сравнительном профилировании НМП (1–17 кДа) плазмы крови больных РЯ и практически здоровых женщин. Данный подход включал: предварительное фракционирование образцов магнитными микрочастицами с катионообменным покрытием для специфического захвата биомолекул, МАЛДИ-ВПМС-анализ, обработку данных с помощью биоинформационного пакета программ. Данная платформа успешно использовалась для подготовки клинических образцов и проведения МАЛДИ-ВПМС-профилирования НМП плазмы кро-

ви. Мы изучили возможность использования различных классификационных алгоритмов для генерации диагностически значимых наборов пептидов/полипептидов из масс-спектрометрических данных для дискриминации образцов больных РЯ и женщин контрольной группы. Продемонстрированы возможности и перспективность разработанного подхода для обнаружения потенциальных маркеров РЯ при скрининге 40 образцов плазмы крови больных РЯ и 48 контрольных образцов. В результате проведенного исследования обнаружены пептиды/полипептиды, которые могут в перспективе использоваться для детектирования этой патологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Permuth-Wey J., Sellers T.A. Epidemiology of ovarian cancer. *Methods Mol Biol* 2009;472:413–37.
2. Шевченко В.Е., Арноцкая Н.Е., Макаров Д.Е. и др. Протеомика в диагностике рака яичников. *Опухоли женской репродуктивной системы* 2011;(2):56–64.
3. Rai A.J., Zhang Z., Rosenzweig J. et al. Proteomic approaches to tumor marker discovery. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126(12):1518–26.
4. Tung C.S., Wong K.K., Mok S.C. Biomarker discovery in ovarian cancer. *Womens Health (Lond Engl)* 2008;4:27–40.
5. 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.
6. Шевченко В.Е. Современные масс-спектрометрические методы в ранней диагностике рака. *Масс-спектрометрия* 2004;1(2):103–26.
7. Etzioni R., Urban N., Ramsey S. et al. The case for early detection. *Nat Rev Cancer* 2003;3(4):243–52.
8. 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.
9. Banks R.E., Dunn M.J., Hochstrasser D.F. et al. Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities. *Lancet* 2000;356(9243):1749–56.
10. Diamandis E.P. Proteomic patterns in serum and identification of ovarian cancer. *Lancet* 2002;360(9327):170.
11. 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):1495–9.
12. 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.
13. 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.
14. Menon U., Jacobs I. Screening for ovarian cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2002;16(4):469–82.
15. 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.
16. 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.
17. Whiteley G.R., Colantonio S., Sacconi A., Saul R.G. Analytical considerations for mass spectrometry profiling in serum biomarker discovery. *Clin Lab Med* 2009;29(1):57–69.
18. Baggerly K.A., Morris J.S., Edmonson S.R., Coombes K.R. Signal in noise: evaluating reported reproducibility of serum proteomic tests for ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005;97(4):307–9.
19. Kristina G., Radomir P., Eva B. et al. When one chip is not enough: augmenting the validity of SELDI-TOF proteomic profiles of clinical specimens. *Lab Chip* 2009;9(7):1014–17.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. Villanueva J., Shaffer D.R., Philip J. et al. Differential exoprotease activities confer tumor-specific serum peptidome patterns. *J Clin Invest* 2006;116(1):271–84.
24. 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.
25. 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.
26. Шевченко В.Е., Мадина Х., Поддубная И.В. и др. Массспектрометрическое профилирование низкомолекулярного протеома плазмы крови для обнаружения потенциальных маркеров рака молочной железы. *Вестн РОНЦ* 2011;22(3):27–33.
27. Zhou M., Lucas D.A., Chan K.C. et al. An investigation into the human serum «interactome». *Electrophoresis* 2004;25(9):1289–98.
28. 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.
29. Fiedler G.M., Baumann S., Leichte 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.
30. Schaub N.P., Jones K.J., Nyawidwe J.O. et al. Serum proteomic biomarker discovery reflective of stage and obesity in breast cancer patients. *J Am Coll Surg* 2009;208(5):970–8.
31. Schwamborn K., Krieg R.C., Grosse J. et al. Serum proteomic profiling in patients with bladder cancer. *Eur Urol* 2009;56(6):989–96.