

ПРОТЕОМИКА

УДК 57.088.1;57.088.3

© Коллектив авторов

ПРОТЕОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ СЫВОРОТКИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РАКА ЯИЧНИКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ МАГНИТНЫХ ГРАНУЛ CLINPROT И MALDI-TOF-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Р.Х. Зиганишин^{1}, Д.Г. Алексеев¹, Г.П. Арапиди¹, В.Т. Иванов¹,
С.А. Мошковский², В.М. Говорун¹*

¹Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН,
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10; факс: (495) 335-08-12;
эл. почта: rustam@mx.ibch.ru

²ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича РАМН, 119121, Москва,
ул. Погодинская, д.10

С использованием магнитных микрочастиц ClinProt с обращенно-фазовой (MB-HIC 8 и MB-HIC 18), слабой катионообменной (MB-WCX) и металло-аффинной (MB-IMAC Cu) поверхностями из сыворотки крови человека выделяли фракции пептидов и белков для их последующего анализа MALDI-TOF-масс-спектрометрией. Протеомное профилирование сывороток крови практически здоровых женщин (47 субъектов, средний возраст 49 лет) и женщин с подтвержденным диагнозом рака яичника 1-4 стадии (47 пациентов, средний возраст 51 год) с использованием магнитных микрочастиц MB-WCX позволило построить наилучшие классификационные модели на основе генетического алгоритма и контролируемой нейронной сети со 100% чувствительностью и специфичностью при анализе тестовой выборки. Включение в математическую модель дополнительных сывороток крови больных колоректальным раком (19 образцов) и пациентов с язвенным колитом (5 образцов) подтвердило 100% распознавание рака яичника. Статистический анализ площадей вошедших в построенные классификационные модели масс-спектрометрических пиков позволил выявить 3 пика, характерных для рака яичника, и 4 пика, изменение площади которых связано как с раком яичника, так и с колоректальным раком.

Ключевые слова: протеомное профилирование, сыворотка крови, MALDI-TOF-масс-спектрометрия, магнитные частицы ClinProt, рак яичника.

ВВЕДЕНИЕ. По результатам опубликованных в США статистических данных, онкологические заболевания в структуре 10 ведущих причин смерти в 2004 году занимают в этой стране 2-е место (29,55%) после сердечно-сосудистых патологий (35,14%). По этим же данным, среди онкологических заболеваний у женщин 4-е место по смертности занимает рак яичника. В России в 2000 году было зарегистрировано 11700 новых случаев злокачественных новообразований яичника и 7300 смертей от него [1]. Необходимо отметить, что около 70-75% диагностируемых случаев рака яичника приходится на III и IV стадии, при которых прогнозируемый 5-летний срок выживаемости пациента составляет около 15%. Этот уровень выживаемости остается практически неизменным в течение последних 40 лет, несмотря на активное внедрение в практику радикальных хирургических подходов и новых интенсивных способов химиотерапии. В то же

* - адресат для переписки

время, диагностика злокачественных новообразований яичника на I-II стадии увеличивает прогнозируемый 5-летний срок выживаемости пациента до 90%, значительно снижая при этом тяжесть необходимого хирургического вмешательства и интенсивность последующего курса химиотерапии. Несмотря на то, что подобная закономерность характерна и для многих других разновидностей онкологических заболеваний, на сегодняшний день клиническая медицина не имеет на вооружении ни одного достаточно чувствительного и специфичного метода для ранней диагностики рака [2].

Единственно надежным тестом при раке яичника, причем в основном при его серозной форме, является определение в крови опухолево-ассоциированного антигена СА-125. Однако содержание данного антигена в сыворотке крови больных с I стадией заболевания практически не отличается от такового у здоровых людей, т.е. он не пригоден для ранней диагностики заболевания, а, кроме того, СА-125 не является высокоспецифичным маркером рака яичника. Увеличение продукции этого высокомолекулярного муциноподобного гликопротеина и повышение его уровня в сыворотке крови может происходить также и при карциноме поджелудочной железы, лёгкого, желудочно-кишечного тракта, при доброкачественных опухолях яичника и эндометриозе [3]. Помимо этого антигена, который сегодня широко используется в клинической диагностике, в литературе описано успешное использование оценки содержания в сыворотке крови иммуноферментным анализом комбинации из четырёх белков (лептина, пролактина, остеопонтина и инсулиноподобного ростового фактора II) для распознавания образцов сывороток крови больных раком яичника среди сывороток крови здоровых людей [4].

В последние годы для поиска в плазме (сыворотке) крови новых маркеров онкологических заболеваний все чаще используют постгеномные методы анализа, среди которых протеомные технологии занимают ведущие позиции. Следует отметить, что существующие на сегодняшний день технологические ограничения не позволяют анализировать напрямую такие сложные белковые смеси, каковыми являются, например, протеомы плазмы или сыворотки крови, включающие в себя более 100000 белков с различиями в концентрации, перекрывающими диапазон в 10-12 порядков [5]. Для решения этой проблемы используют различные методы фракционирования, позволяющие выделять из такой сложной смеси белков и пептидов достаточно ограниченные и воспроизводимые по составу фракции, которые в дальнейшем анализируют масс-спектрометрией. Одним из таких методов является времяпролетная масс-спектрометрия с усиливаемой поверхностью лазерной десорбцией-ионизацией (SELDI-TOF MS, surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry) [6]. Суть этого метода заключается в использовании в качестве масс-спектрометрической мишени селективных поверхностей, избирательно связывающих наборы белков на основе адсорбционных, электростатических или специфических аффинных взаимодействий. Фракционирование сложных смесей биологических молекул происходит прямо на поверхности масс-спектрометрической мишени, которую после процедуры связывания целевых веществ с поверхностью и отмывки от примесей помещают в масс-спектрометр для анализа. Масс-спектры образцов, полученных от группы пациентов с подтвержденным диагнозом исследуемого заболевания и контрольной группы людей, сравнивают между собой с привлечением методов математической статистики. В литературе описаны примеры успешного применения этого метода для выявления различий между образцами сыворотки или плазмы крови пациентов с раком желудка [7], прямой кишки [8], простаты [9], гепатоклеточной карциномы [10], эндометрия [11] или других видов онкологических заболеваний [12-16] и образцами крови здоровых людей.

В последнее время активно используется другой метод выделения из плазмы и сыворотки крови репрезентативных наборов пептидов при помощи высокопроизводительных, легко поддающихся автоматизации способов

фракционирования на основе различных вариантов хроматографии с последующей регистрацией выделенных пептидов времяпролетной MALDI-масс-спектрометрией [17-23]. Эта технология обладает рядом преимуществ по отношению к SELDI. Основным из них является то, что фракционирование на модифицированной поверхности масс-спектрометрической мишени SELDI менее чувствительно, чем фракционирование в объеме. Это свойство обусловлено значительно меньшей площадью поверхности плоской масс-спектрометрической мишени для SELDI, на которой происходит разделение (обогащение) образца. Во-вторых, разрешение и чувствительность масс-спектрометров для SELDI значительно уступают таковым современных MALDI-масс-спектрометров, что накладывает дополнительные ограничения на проведение высококачественного и чувствительного масс-спектрометрического анализа. Специфичность и чувствительность определения в сыворотке крови маркеров соответствующих заболеваний методом SELDI иногда достигают 90% (как правило, эти значения находятся в диапазоне 80-85%) [9-16], а методы фракционирования сыворотки крови на магнитных микрочастицах или микроколонках не уступают SELDI, приближаясь по данным параметрам к 95-97% [17-22]. Необходимо отметить, что все работы по поиску новых биомаркеров онкологических заболеваний с использованием протеомных подходов пока не вышли за рамки экспериментальных исследований. Внедрение этих методов в практическую медицину потребует значительных усилий по валидации найденных белков и пептидов на больших массивах клинических образцов, определения их специфичности по отношению к конкретным формам рака, а также их идентификации.

Целью данного исследования являлось выявление посредством технологии ClinProt в сыворотке крови человека потенциальных пептидных маркеров, в сочетании подходящих для диагностики рака яичника.

МЕТОДИКА.

Образцы сывороток крови. Сыворотки крови пациенток с раком яичника были получены из Белорусского онкологического центра (г. Минск). Всего в работе были использованы образцы от 47 пациенток, средний возраст которых составлял 51 год, а среднее значение СА-125 - 3925 ± 148 Е/мл (далее “рак яичника”). Стадию заболевания определяли цитоморфологическими исследованиями биоптатов. Распределение по стадиям заболевания было следующим: I – 20 образцов, II – 10, III – 12, IV – 5. В качестве контроля были использованы образцы сывороток крови 47 практически здоровых женщин (далее “контроль”), полученные из клинико-диагностической лаборатории ООО НПФ “Литех”, Москва. Средний возраст женщин контрольной группы был 49 лет, среднее значение СА-125 - 16 ± 2 Е/мл. В качестве дополнительных групп сравнения использовали сыворотки крови пациентов обоего пола с колитом (5 образцов) и колоректальным раком (19 образцов), полученные с кафедры пропедевтики внутренних болезней и гастроэнтерологии Московского государственного медико-стоматологического университета. Для колоректального рака диагноз также подтверждали цитоморфологическими исследованиями биоптатов.

Для изучения влияния возможных вариаций в протоколах получения сывороток крови на воспроизводимость их масс-спектрометрических профилей, были использованы образцы крови 6 практически здоровых женщин. Сыворотки из этих образцов крови получали по трем различным протоколам, различающимся длительностью инкубации крови при комнатной температуре (30, 60 и 120 мин, группы “30”, “60” и “120” соответственно) до отделения сыворотки от сгустка центрифугированием (1000 g, 15 мин, при комнатной температуре).

Обработка образцов сыворотки крови. Для фракционирования образцов сывороток крови использовали наборы для профилирования, содержащие магнитные микрочастицы с функционализированной поверхностью MB-NIC 8, MB-NIC 18, MB -WCX и MB-IMAC Cu производства компании “Bruker Daltonics” (Германия). Описание этих наборов для профилирования, а также рекомендованных

ПРОТЕОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ СЫВОРОТКИ В ДИАГНОСТИКЕ РАКА ЯИЧНИКОВ

для них протоколов фракционирования можно найти на Интернет странице компании - www.bdal.de. Фракционирование сывороток крови проводили на специализированном роботе ClinProt robot ("Bruker Daltonics"), по протоколу, рекомендованному производителем магнитных микрочастиц с незначительными модификациями. Элюаты наносили на стальную полированную 384-точечную масс-спектрометрическую мишень (MTP 384 target plate polished steel TF) в двух повторах, после высушивания на воздухе на образец наносили раствор матрицы. В качестве матрицы использовали раствор 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (3 мг/мл) и альфа-циано-гидроксикоричной кислоты (2,4 мг/мл) в смеси метанол/ацетонитрил/вода 5:4:1.

Времяпролетная MALDI-масс-спектрометрия. Масс-спектры получали с использованием времяпролетного масс-спектрометра Ultraflex ("Bruker Daltonics"). Десорбцию образцов осуществляли иррадиацией азотным лазером (длина волны 337 нм), работающим при частоте 25 Гц. Для удаления пиков матрицы использовали максимальный уровень подавления сигнала вплоть до 900 Да. Спектры регистрировали в линейном режиме положительно заряженных ионов в диапазоне масс 1-15 кДа. Для калибровки использовали калибровочную смесь, содержащую пептиды и белки в диапазоне масс 1-17 кДа. Для увеличения чувствительности детекции избыток матрицы удаляли 10 импульсами лазера при мощности 45% с последующей аккумуляцией данных при мощности лазера 27%. Для каждого спектра суммировали результаты 600 лазерных импульсов (по 60 импульсов с 10 различных точек пятна). Суммировали спектры с отношением сигнал/шум >5 и разрешением >300.

Анализ масс-спектрометрических данных. Масс-спектрометрические данные анализировали с использованием компьютерной программы ClinProTools 2.1 ("Bruker Daltonics"). Математические модели для классификации масс-спектров смеси пептидов и белков, полученных после фракционирования сывороток крови, строили на основе генетического алгоритма (ГА) и управляемой нейронной сети (Supervised Neural Network, УНС).

Концепция генетического алгоритма была разработана J. Holland [24]; принцип базируется на идее эволюции, в которой наиболее приспособленные индивидуумы имеют наибольший шанс для выживания. В контексте исследования генетический алгоритм работает с популяциями, состоящими из множества комбинаций масс-спектрометрических пиков. Отбор наиболее приспособленных комбинаций пиков осуществляется при помощи оптимизации функции стоимости, направленной на разделение сравниваемых классов с наибольшим расхождением между ними. Каждая комбинация пиков ранжируется с использованием данной функции стоимости по уровню затрат, которые и являются мерой приспособленности данной комбинации пиков. Используемая алгоритмом процедура скрещивания объединяет случайно выбранные пары комбинаций пиков с образованием дочерних комбинаций, которые замещают родительские. Целью такого скрещивания является создание из двух достаточно хороших комбинаций пиков еще лучшей. Конечно, в результате такого скрещивания могут возникать и менее приспособленные комбинации пиков, но они в процессе эволюции не смогут выживать в течение продолжительного времени. Наконец, ограниченное количество комбинаций пиков случайным образом модифицируется посредством "мутаций" - замены некоторых пиков в комбинациях на другие, выбранные случайным образом. Это делается для предупреждения преждевременного схождения эволюционирующих комбинаций пиков в локальные минимумы. Преимущество ГА перед методом прямого перебора всех возможных вариантов заключается в значительно меньших затратах вычислительного времени, необходимых для его проведения, и обеспечивающего, тем не менее, достаточно хороший результат.

УНС представляет собой модифицированную версию алгоритма, разработанного В. Hammer с соавторами [25], и является частным случаем метода дискриминантного анализа. Принцип работы этого обучаемого математического

алгоритма основан на определении оптимальной границы, разделяющей два множества данных.

При построении классификационных моделей использовали следующие параметры. Для генетического алгоритма: количество пиков, входящих в создаваемую модель классификации - не более 20, число поколений - не более 200. Количество пиков, используемых для построения классификационной модели на основе УНС, выбиралось алгоритмом автоматически (но не более 25). Для построения классификационных моделей масс-спектры каждой из групп "контроль" и "рак яичника" разделяли на две группы, одну пару использовали для построения классификационной модели, а вторую - для проверки её достоверности.

РЕЗУЛЬТАТЫ.

Влияние длительности инкубации крови в процессе ее свертывания на масс-спектрометрический профиль сыворотки. Сыворотки крови, полученные при различной длительности инкубации образцов крови (30, 60 и 120 мин) до отделения сыворотки от сгустка центрифугированием, были фракционированы с использованием четырех перечисленных типов магнитных микрочастиц. Кроме того, аликвоты сывороток крови всех трех групп сравнения были оставлены на 24 часа при комнатной температуре, после чего их фракционировали с использованием магнитных микрочастиц MB-WCX.

Анализ данных, полученных после фракционирования сывороток крови групп "30 минут", "60 минут" и "120 минут" не выявил радикальных изменений в масс-спектрометрических профилях между этими группами. Для группы "60" обнаружено 9% пиков, средняя площадь которых изменилась по отношению к соответствующим пикам группы "30" более чем на 30%. Для группы "120" доля таких пиков составляла 4%.

Фракционирование сывороток крови с использованием магнитных микрочастиц MB-HIC 8 и MB-HIC 18. Масс-спектрометрические профили сывороток крови после их фракционирования на магнитных микрочастицах MB-HIC 8 и MB-HIC 18 различались между собой незначительно. Количество детектируемых в масс-спектрах пиков при использовавшихся параметрах обработки составляло 135 и 137 соответственно. Значения чувствительности и специфичности построенных математических моделей классификации приведены в таблице 1. Из таблицы видно, что пептидные наборы, полученные при использовании этих магнитных микрочастиц, не обеспечивают создания на их основе классификационных моделей, обладающих высокими значениями чувствительности и специфичности одновременно. Визуальный анализ статистических диаграмм вариаций площадей масс-спектрометрических пиков, вошедших в построенные классификационные модели, показал, что диапазоны вариаций площадей соответствующих пиков в различных группах сывороток крови существенно (более 50%) пересекаются друг с другом, что не позволяет рассматривать эти пики в качестве специфичных биомаркеров рака яичника.

Таблица 1. Значения чувствительности и специфичности моделей классификации, построенных на основе алгоритмов управляемой нейронной сети (УНС) и генетического алгоритма (ГА) для всех использованных магнитных микрочастиц.

Тип магнитных микрочастиц	Генетический Алгоритм		Управляемая Нейронная Сеть	
	Чувствительность	Специфичность	Чувствительность	Специфичность
MB-HIC C8	88%	96%	88%	98%
MB-HIC C18	98%	83,3%	81,3%	100%
MB-IMAC C8	97,2%	88%	100%	90%
MB-WCX	100%	100%	100%	100%

Примечание: Чувствительность - процент правильно идентифицированных сывороток крови группы "рак яичников". Специфичность - процент правильно идентифицированных сывороток крови группы "контроль".

ПРОТЕОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ СЫВОРОТКИ В ДИАГНОСТИКЕ РАКА ЯИЧНИКОВ

Фракционирование сывороток крови с использованием магнитных микрочастиц MB-IMAC Cu. Значения чувствительности и специфичности классификационных моделей, построенных на основе масс-спектров элюатов, полученных после фракционирования сывороток крови с использованием магнитных микрочастиц MB-IMAC Cu приведены в таблице 1, а значения m/z пептидов, вошедших в эти классификационные модели - в таблице 2. Количество детектируемых в масс-спектрах пиков при использовавшихся параметрах обработки составляло 115.

Таблица 2. Потенциальные биомаркеры рака яичника, выявленные при масс-спектрометрическом анализе элюатов, полученных после фракционирования сывороток крови на MB-IMAC Cu.

m/z (Da)	Статистический вес (Г)	Статистический вес (УНС)
1382	0,50	-
1406	0,39	-
1425	0,23	-
1522	-	0,12
1655	1,16	0,33
1712	1,28	-
2084	-	0,08
2282	1,37	0,24
2826	0,68	-
3090	1,31	-
3158	0,87	-
3349	0,62	-
3512	0,45	-

Приведенные в таблице 2 статистические веса масс-спектрометрических пиков соответствуют числовым значениям коэффициентов в алгебраических выражениях классификационных моделей и пропорциональны относительно влиянию площадей конкретных пиков на отнесение масс-спектра образца к той или иной классификационной группе. Как и в случае магнитных микрочастиц с обращено-фазовой поверхностью, фракционирование сыворотки крови при помощи микрочастиц MB-IMAC Cu не позволяет построить классификационные модели с высокими значениями чувствительности и специфичности одновременно.

Фракционирование сывороток крови с использованием магнитных микрочастиц MB-WCX. Наилучшие результаты показали классификационные модели, построенные на основе масс-спектров, полученных после разделения сывороток крови на магнитных микрочастицах со слабой катионообменной поверхностью (MB-WCX). Количество детектируемых в масс-спектрах пиков при использовавшихся параметрах обработки составляло 96. 100%-ная чувствительность и специфичность построенных классификационных моделей была подтверждена на масс-спектрах дополнительных групп сравнения (“колит”, “колоректальный рак”, описанные выше группы сывороток “30 минут”, “60 минут” и “120 минут”, а также контрольная группы сывороток после инкубации при комнатной температуре в течение 24 часов), причем при классификации ни один из масс-спектров этих дополнительных групп сравнения не был отнесен к группе “рак яичника”. Значения m/z потенциальных биомаркеров рака яичника, выявленных в сыворотках крови при помощи построенных классификационных моделей, относящихся к частицам MB-WCX, приведены в таблице 3. Визуальный анализ статистических диаграмм изменения площадей масс-спектрометрических пиков между различными группами образцов позволил классифицировать

некоторые из пиков, как характерные для рака яичника. Диапазоны вариаций площадей таких пиков в группе “рак яичника” не пересекаются с диапазонами вариаций площадей соответствующих пиков в других группах образцов (один из таких примеров приведен на рис. 1А), а, следовательно, возможно однозначное диагностирование заболевания только на основании оценки площадей таких пиков в масс-спектрах. Это заключение было подтверждено следующим экспериментом. Принудительное исключение единственного пика, входящего в классификационную модель, построенную на основе управляемой нейронной сети, с последующим повторным построением модели (которая имела такие же 100% показатели чувствительности и специфичности, что и ее предшественница), приводило к нахождению следующего специфичного для рака яичника масс-спектрометрического пика.

Таблица 3. Масс-спектрометрические пики потенциальных биомаркеров рака яичника, полученные из классификационных моделей на основе управляемой нейронной сети и генетического алгоритма.

m/z (Да)	Статистический вес (ГА)	Статистический вес (УНС)	Результаты визуального анализа
1490	1,41		Исключен из модели
1832	7,09		Специфичен для рака яичников
2231	6,71	0,39	Специфичен для рака яичников
2547	3,06		Специфичен для рака
2663	2,47		Годен для классификации
3092	1,76		Исключен из модели
3314	6,17		Специфичен для рака яичников
3456	2,42		Исключен из модели
3877	4,28		Специфичен для рака
3923	3,42		Специфичен для рака
1887	3,52		Специфичен для рака

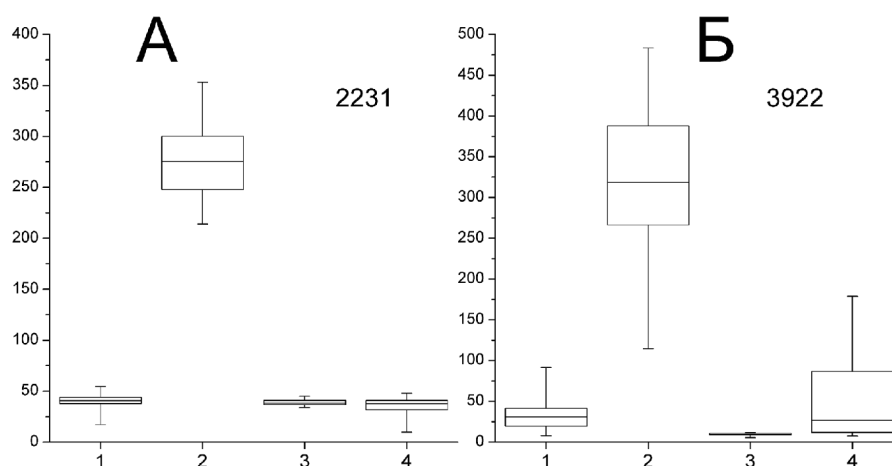


Рисунок 1.

Статистические диаграммы изменений площадей пиков 2231 Да (А) и 3923 Да (Б) между группами образцов. По оси ординат отложены нормированные площади масс-спектрометрического пика, по оси абсцисс – группы спектров: 1 – “контроль”; 2 – “рак яичника”; 3 – “колит”; 4 – “колоректальный рак”. Диаграмма состоит из столбцов, отсекающих 25% и 75% квантили, медиан столбцов и “усиков” – максимальных и минимальных значений площадей пиков в группах.

ПРОТЕОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ СЫВОРОТКИ В ДИАГНОСТИКЕ РАКА ЯИЧНИКОВ

Для 4 масс-спектрометрических пиков, вошедших в классификационную модель, построенную на основе генетического алгоритма, характерно пересечение диапазонов вариаций интенсивностей между группами “рак яичника” и “колоректальный рак”. Не являясь специфичными биомаркерами рака яичника, эти пики позволяют отличать масс-спектры сывороток крови больных раком яичника и колоректальным раком от масс-спектров других групп образцов. Пример пика с таким поведением приведен на рисунке 1Б.

Для пика со значением m/z 2663 Да между группой “рак яичника” и другими экспериментальными группами есть пересечения в диапазонах изменения площади, но пересечение это составляет менее 50%, т.е. не пересекаются 25% и 75% квантили. Такие пики могут быть использованы в классификационных моделях, но рассматривать их в качестве специфических биомаркеров рака яичника нельзя, поскольку при значениях площадей пиков, существенно отличающихся от среднего для группы, корректное отнесение образца к конкретной группе невозможно.

В группу масс-спектрометрических пиков, исключённых из классификационной модели, попали пики, диапазоны вариаций площадей которых пересекаются более, чем на 50%. Такие пики не пригодны для классификации и тем более не могут рассматриваться как биомаркеры, они попадают в список пиков классификационных моделей на этапе перебора возможных комбинаций пиков и не отсеиваются вследствие конечного (малого) числа итераций.

Детальный анализ статистических диаграмм изменений площадей масс-спектрометрических пиков элюатов в зависимости от условий получения и хранения образцов сывороток крови не выявил таких отклонений этих значений, которые могли бы повлиять на результаты классификации этих образцов (рис. 2). Итоговый анализ групп “рак яичника” и “контроль”, на котором показаны фрагменты усредненных масс-спектров, относящихся к маркерным пикам, представлен на рисунке 3.

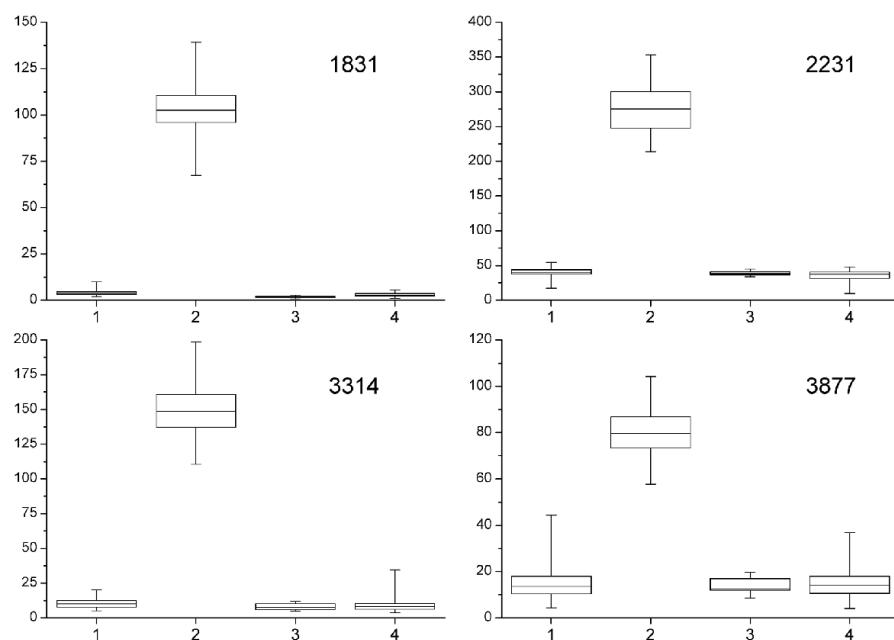


Рисунок 2.

Статистические диаграммы площадей пиков биомаркеров рака яичника в образцах, полученных от больных различных групп и от контрольной группы. По оси ординат отложены нормированные площади масс-спектрометрического пика, по оси абсцисс – группы спектров: 1 – “контроль”; 2 – “рак яичника”; 3 – группа “120”; 4 – контрольная группа сывороток крови, инкубированная в течение 24 часов при комнатной температуре. Диаграмма состоит из столбцов, отсекающих 25% и 75% квантили, медиан столбцов и “усиков” – максимальных и минимальных значений площадей пиков в группах.

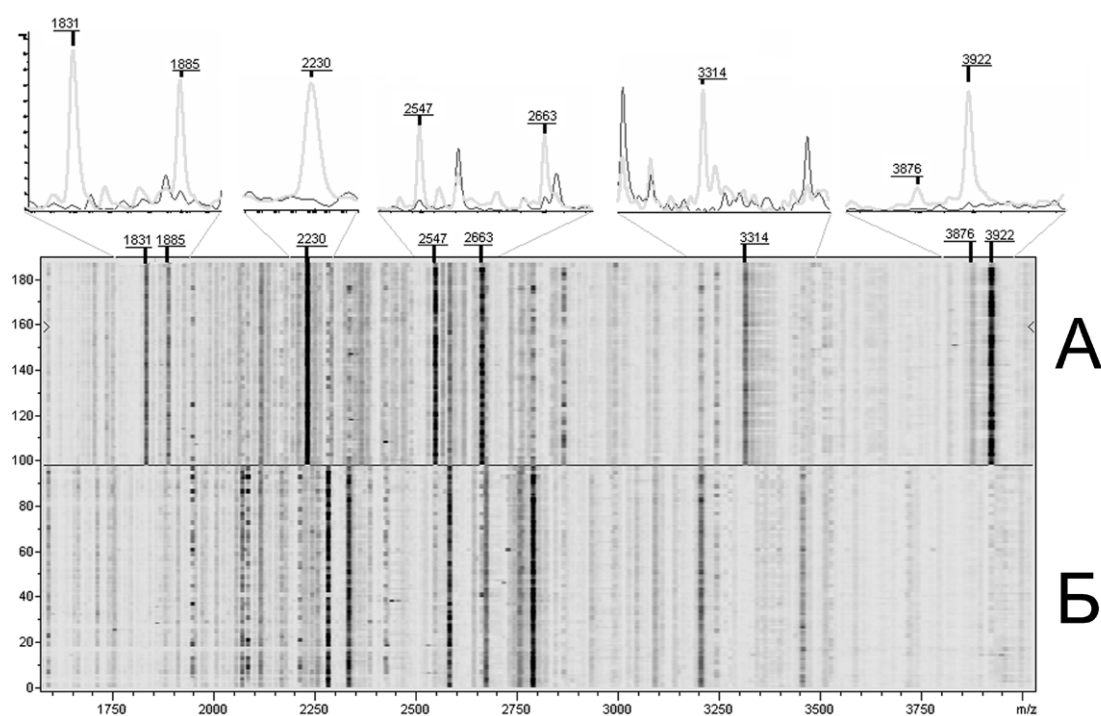


Рисунок 3.

Визуализация масс-спектров сывороток крови групп “рак яичника” (А) и “контроль” (Б), полученная при помощи программы ClinProt Tools 2.1 в виде псевдогеля. По оси ординат отложены номера спектров, по оси абсцисс - отношение массы к заряду в Да. Интенсивность окрашивания точек соответствует интенсивности пика в спектре, сверху отмечены пики потенциальных биомаркеров рака яичника. Усредненные масс-спектры пиков потенциальных биомаркеров рака яичника приведены на врезках сверху

ОБСУЖДЕНИЕ. Привлекательность использования плазмы (сыворотки) крови для диагностики различных заболеваний человека обусловлена, главным образом, тем обстоятельством, что она наиболее полно представляет фенотип человека, его состояние в конкретный момент времени [26]. Еще одно немаловажное достоинство плазмы (сыворотки) крови – ее доступность, поскольку она является наиболее распространенным в медицинской практике первичным клиническим образцом. Сопоставление масс-спектрометрических профилей, полученных после фракционирования плазмы и сыворотки крови, выявило между ними значительные качественные различия, что делает невозможным их совместное использование в биомаркерных исследованиях [27, 28]. Несмотря на то, что плазма крови, по мнению некоторых авторов, является более адекватным образцом для поиска потенциальных биомаркеров различных заболеваний, чем сыворотка [27], последняя используется в подобных работах значительно чаще. Этот факт можно объяснить высокой лабильностью низкомолекулярной части протеома плазмы крови, состав которой в значительной мере зависит от условий ее получения (например, от используемых для забора крови пробирок, антикоагулянтов, условий центрифугирования) [27], что обуславливает высокие требования к воспроизводимости протоколов получения плазмы крови, не всегда достижимые в реальной клинической практике. В качестве основного аргумента против использования сыворотки крови в биомаркерных исследованиях называют генерацию избыточного количества пептидных сигналов в результате процесса свертывания крови, что может

значительно снижать чувствительность детекции эндогенных пептидов [27]. На сегодняшний день нет однозначного ответа на вопрос, в какой связи находятся регистрируемые в сыворотке крови изменения пептидно-белковых профилей с исследуемым патологическим процессом в организме. Предполагается, что эти изменения могут отражать реальные колебания концентраций белков и пептидов, напрямую ассоциированных с заболеванием, но, с другой стороны, нельзя исключить и возможность их возникновения, например, в результате вызванных патологией отклонений в процессах свертывания крови *ex vivo* при получении из нее сыворотки. С нашей точки зрения, диагностическая ценность найденных “пептидных сигнатур” не зависит от природы их возникновения, при условии строгой воспроизводимости их появления в сыворотке крови больных. В соответствии с литературными данными, успешное проведение биомаркерных исследований с использованием сыворотки крови обусловлено таким же строгим соблюдением протокола ее получения, как и в случае плазмы крови. Так, например, было показано, что процедура получения сыворотки, а именно, длительность временной задержки до отделения сыворотки от образовавшегося сгустка в процессе свертывания крови в наибольшей степени влияет на её масс-спектрометрический профиль [27-29]. Однако, в ходе нашего исследования мы не увидели такой зависимости между условиями получения сыворотки крови и ее масс-спектрометрическим профилем. Напротив, было обнаружено, что лишь небольшое количество масс-спектрометрических пиков (4-9%) существенно меняет свою площадь в зависимости от протокола получения сыворотки крови. Возможно, использованные нами при получении сыворотки крови различия в длительностях инкубации крови при ее свертывании были недостаточны для развития более значительных изменений в масс-спектрометрических профилях (в работе [28] авторы инкубировали кровь в течение 1 часа, 6 часов и 24 часов до отделения сыворотки от сгустка). Теоретическая модель образования биомаркеров и их ассоциации с высокомолекулярными белками-носителями плазмы/сыворотки крови была предложена и экспериментально подтверждена ранее Geho с соавторами [30]. В соответствии с этой моделью пептиды, содержащиеся в плазме крови в исчезающе малых концентрациях (включая и потенциальные биомаркеры заболеваний), способны накапливаться и длительное время сохраняться в кровеносном русле благодаря их сорбции на основных белках крови (таких как альбумин, иммуноглобулины, тиреоглобулин). Высокое содержание альбумина в элюатах, полученных после фракционирования сывороток крови на магнитных микрочастицах с функционализированной поверхностью, было подтверждено нами при исследовании элюатов 1D-электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (данные не приведены). В последние 2-3 года рядом исследователей были предложены методы поиска сывороточных биомаркеров различных заболеваний (рака яичника в том числе), основанные на выделении и идентификации связанных с альбумином пептидов [22, 30, 31]. Эти методы позволили выделить и идентифицировать в сыворотке крови значительное количество пептидов, ранее в сыворотке не обнаруживавшихся. Однако, созданные на их основе классификационные модели по значениям чувствительности и специфичности принципиально не отличались от разработанных ранее с использованием других методов фракционирования сыворотки крови. Высокая чувствительность и специфичность классификационных моделей, построенных на основе фракционирования сывороток крови пациенток с раком яичника на магнитных микрочастицах MB-WCX, не говорит о заведомом предпочтении этого типа микрочастиц для поиска биомаркеров других заболеваний. Так, например, при профилировании сывороток крови пациентов с колоректальным раком наиболее чувствительные и специфичные модели нами были получены при фракционировании сывороток крови на магнитных микрочастицах MB-IMAC Cu (неопубликованные данные). С нашей точки зрения, использование магнитных микрочастиц с возможно более широким спектром

поверхностной функциональности при профилировании такого сложного объекта, как сыворотка крови, значительно увеличивает вероятность нахождения специфических биомаркеров конкретного заболевания.

Ближайшая перспектива настоящего исследования включает в себя установление структуры выявленных в сыворотках крови пептидов - потенциальных биомаркеров рака яичника. Примеры подобных работ описаны в литературе и связаны, как правило, с использованием тандемной масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (ESI-MS-MS), сопряжённой с обращённо-фазовой жидкостной нанопотоковой хроматографией [22, 32, 33].

ЛИТЕРАТУРА

1. Аксель Е.М., Давыдов М.И. (2002) Сборник "Злокачественные новообразования в России и странах СНГ в 2000", РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва.
2. Posadas E.M., Simpkins F., Liotta L.A., MacDonald C., Kohn E.C. (2005) *Ann. Oncol.*, **16**, 16-22.
3. Bidart J.M., Thuillier F., Augereau C., Chalas J., Daver A., Jacob N., Labrousse F., Voïtot H. (1999) *Clin Chem.*, **45**, 1695-1707.
4. Mor G., Visintin I., Lai Y., Zhao H., Schwartz P., Rutherford T., Yue L., Bray-Ward P., Ward D. C. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 7677-7682.
5. Anderson N. L., Anderson N. G. (2002) *Mol. Cell Proteomics*, **1**, 845-867.
6. Merchant M., Weinberger S.R. (2000) *Electrophoresis*, **21**, 1164-1177.
7. Su Y., Shen J., Qian H., Ma H., Ji J., Ma L., Zhang W., Meng L., Li Z., Wu J., Jin G., Zhang J., Shou C. (2007) *Cancer Sci.*, **98**, 37-43.
8. Smith F.M., Gallagher W.M., Fox E., Stephens R.B., Rexhepaj E., Petricoin E.F., 3rd, Liotta L., Kennedy M.J., Reynolds J.V. (2007) *Ann. Surg.*, **245**, 259-266.
9. Skjtt A., Thysell E., Stattin P., Stenman U.H., Antti H., Wikstrom P. (2007) *Int. J. Cancer*, **121**, 615-620.
10. Kanmura S., Uto H., Kusumoto K., Ishida Y., Hasuike S., Nagata K., Hayashi K., Ido A., Stuver S.O., Tsubouchi H. (2007) *Hepatology*, **45**, 948-956.
11. Zhu L.R., Zhang W.Y., Yu L., Zheng Y.H., Zhang J.Z., Liao Q.P. (2006) *Int. J. Gynecol. Cancer*, **16**, 1374-1378.
12. Li J., Zhang Z., Rosenzweig J., Wang Y.Y., Chan D.W. (2002) *Clin. Chem.*, **48**, 1296-1304.
13. Zhou L., Cheng L., Tao L., Jia X., Lu Y., Liao P. (2006) *Acta Otolaryngol.*, **126**, 853-860.
14. Zheng G.X., Wang C.X., Qu X., Deng X.M., Deng B.P., Zhang J. (2006) *Exp. Oncol.*, **28**, 282-287.
15. Zhang H., Kong B., Qu X., Jia L., Deng B., Yang Q. (2006) *Gynecol. Oncol.*, **102**, 61-66.
16. Wang J.X., Yu J.K., Wang L., Liu Q.L., Zhang J., Zheng S. (2006) *Proteomics*, **6**, 5344-5349.
17. de Noo M.E., Deelder A., van der Werff M., Ozalp A., Mertens B., Tollenaar R. (2006) *Onkologie*, **29**, 501-506.
18. Ebert M.P., Niemeyer D., Deininger S.O., Wex T., Knippig C., Hoffmann J., Sauer J., Albrecht W., Malfertheiner P., Rocken C. (2006) *J. Proteome Res.*, **5**, 2152-2158.
19. Shin S., Cazares L., Schneider H., Mitchell S., Laronga C., Semmes O.J., Perry R.R., Drake R.R. (2007) *J. Am. Coll. Surg.*, **204**, 1065-1071.
20. Villanueva J., Philip J., Entenberg D., Chaparro C.A., Tanwar M.K., Holland E.C., Tempst P. (2004) *Anal. Chem.*, **76**, 1560-1570.
21. Villanueva J., Philip J., Chaparro C.A., Li Y., Toledo-Crow R., DeNoyer L., Fleisher M., Robbins R.J., Tempst P. (2005) *J. Proteome Res.*, **4**, 1060-1072.

ПРОТЕОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ СЫВОРОТКИ В ДИАГНОСТИКЕ РАКА ЯИЧНИКОВ

22. *Lopez M.F., Mikulskis A., Kuzdzal S., Golenko E., Petricoin E.F., 3rd, Liotta L.A., Patton W.F., Whiteley G.R., Rosenblatt K., Gurnani P., Nandi A., Neill S., Cullen S., O'Gorman M., Sarracino D., Lynch C., Johnson A., McKenzie W., Fishman D. (2007) Clin. Chem., **53**, 1067-1074.*
23. *Whiteaker J.R., Zhang H., Eng J.K., Fang R., Piening B.D., Feng L.C., Lorentzen T.D., Schoenherr R.M., Keane J.F., Holzman T., Fitzgibbon M., Lin C., Cooke K., Liu T., Camp D.G., 2nd, Anderson L., Watts J., Smith R.D., McIntosh M.W., Paulovich A.G. (2007) J. Proteome Res., **6**, 828-836.*
24. *Holland J.H. (1975) Adaptation in Natural and Artificial Systems. University of Michigan Press, Ann Arbor.*
25. *Hammer B., Strickert M., Villmann T. (2005) Neural Processing Letters, **21**, 21-44.*
26. *Anderson N. L., Anderson N. G. (2002) Mol. Cell Proteomics, **1**, 845-867.*
27. *Tammen H., Schulte I., Hess R., Menzel C., Kellmann M., Mohring T., Schulz-Knappe P. (2005) Proteomics, **5**, 3414-3422.*
28. *Hsieh S.Y., Chen R.K., Pan Y.H., Lee H.L. (2006) Proteomics, **6**, 3189-3198.*
29. *Baumann S., Ceglarek U., Fiedler G.M., Lembcke J., Leichtle A., Thiery J. (2005) Clin. Chem., **51**, 973-980.*
30. *Geho D.H., Liotta L.A., Petricoin E.F., Zhao W., Araujo R.P. (2006) Curr. Opin. Chem. Biol., **10**, 50-55.*
31. *Lopez M.F., Mikulskis A., Kuzdzal S., Bennett D.A., Kelly J., Golenko E., DiCesare J., Denoyer E., Patton W.F., Ediger R., Sapp L., Ziegert T., Lynch C., Kramer S., Whiteley G.R., Wall M.R., Mannion D.P., Della Cioppa G., Rakitan J.S., Wolfe G.M. (2005) Clin. Chem., **51**, 1946-1954.*
32. *Lowenthal M.S., Mehta A.I., Frogale K., Bandle R.W., Araujo R.P., Hood B.L., Veenstra T.D., Conrads T.P., Goldsmith P., Fishman D., Petricoin E.F., 3rd, Liotta L.A. (2005) Clin. Chem., **51**, 1933-1945.*
33. *Zheng X., Baker H., Hancock W.S. (2006) J. Chromatogr. A, **1120**, 173-184.*

Поступила: 11. 04. 2008.

SERUM PROTEOME PROFILING FOR OVARIAN CANCER DIAGNOSIS USING CLINPROT MAGNETIC BEAD TECHNIQUE AND MALDI-TOF-MASS-SPECTROMETRY

R.H. Ziganshin¹, D.G. Alexeev¹, G.P. Arapidi¹, V.T. Ivanov¹, S.A. Moshkovskii², V.M. Govorun¹

¹Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, 117997 Russia; fax: (495) 335-08-12; e-mail: rustam@mx.ibch.ru

²Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, RAMS, Pogodinskaya ul., 10, Moscow 119121, Russia

Using reverse-phase (MB-HIC 8 and HB-HIC 18) weak cation exchange (MB-WCX) and metal affinity ClinProt magnetoc beads peptides and protein fractions were obtained from human sera for their profiling by MALDI-TOF mass spectrometry. Proteome profiling of sera from I-IV stage ovarian cancer patients (47 women, average age 51) and from healthy women (47 subjects, average age 49) using MB-WCX beads allowed calculation of the best diagnostic models based on the Genetic Algorithm and Supervised Neural Network classifiers; these model generated 100% sensitivity and specificity when the test set of subjects was analyzed. Introduction of additional sera from patients with colorectal cancer (19) and ulcerous colitis (5) to the statistical model confirmed 100% ovarian cancer recognition. Statistical mass-spectrometry analysis of mass-spectrometry peak areas included to the diagnostic classifiers showed 3 peaks distinctive for ovarian cancer and 4 peaks distinctive for ovarian and colorectal cancer.

Key words: proteome profiling, serum, MALDI-TOF-mass-spectrometry, ClinProt magnetic beads, ovarian cancer.