

УДК 543.51.061:543.54.45:543.8

©Коллектив авторов

МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ФИНГЕРПРИНТИНГ ПЛАЗМЫ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

*П.Г. Лохов**, *М.И. Даштьев*, *Л.В. Бондарцов*, *А.В. Лисица*,
С.А. Мошковский, *А.И. Арчаков*

ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, Погодинская ул., д.10,
119121, Москва; эл. почта: lokhovpg@ Rambler.ru

Исследована возможность применения метаболического фингерпринтинга плазмы крови для диагностики рака предстательной железы второй степени. Полученные данные по чувствительности (95%), специфичности (96,7%) и точности (95,7%) диагностики существенно превышают данные иммуноферментного ПСА-теста (35%, 83,3% и 51,7%, соответственно) для той же выборки пациентов. Площадь под ROC-кривой, составляющая 0,994, характеризует предложенную диагностику рака предстательной железы на основе метаболического фингерпринтинга как эффективную и клинически применимую.

Ключевые слова: метаболомика, метаболический фингерпринтинг, масс-спектрометрия, рак предстательной железы.

ВВЕДЕНИЕ. Современная клиническая практика широко использует лабораторную диагностику, основанную на измерении концентрации молекулярных маркеров заболеваний (биомаркеров), которая статистически достоверно меняется в организме пациента при возникновении болезни. Однако, исследования, направленные на создание подобных диагностических методов, теряют свою перспективность, а вероятность обнаружения нового биомаркера крайне мала [1]. Данное обстоятельство привело к тому, что усилия исследователей направлены на поиск не только отдельных биомаркеров, но и совокупностей маркерных молекул, совместное измерение концентраций которых также обладает диагностической силой [2].

Особая роль в таком поиске принадлежит метаболомике – технологической платформе, позволяющей идентифицировать метаболиты в биологических объектах. Одним из наиболее простых вариантов реализации метаболомного анализа является метаболический фингерпринтинг (metabolic fingerprinting), заключающийся в классификации биопроб на основе паттернов, формируемых совокупностью входящих в них метаболитов [3]. Данный подход изначально направлен не на идентификацию метаболитов в качестве маркеров заболевания, а на сравнительный анализ формируемых ими паттернов, которые претерпевают изменения при болезни, внешнем воздействии на организм или при генетических аномалиях.

Основным способом реализации метаболического фингерпринтинга является масс-спектрометрия, которая зарекомендовала себя как эффективный метод, позволяющий идентифицировать все основные метаболиты в крови человека [4]. Следовательно, метаболический фингерпринт в масс-спектрометрическом

* - адресат для переписки

МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ФИНГЕРПРИНТИНГ ПРИ РАКЕ ПРОСТАТЫ

исполнении будет представлять *набор масс* метаболитов, характеризующий собой исследуемый биоматериал.

В данной работе исследована возможность применения метаболического фингерпринтинга, основанного на *прямом масс-спектрометрическом анализе* метаболитов плазмы крови, в диагностике рака предстательной железы. Прямой масс-спектрометрический анализ (direct mass spectrometry) подразумевает непосредственное внесение анализируемого биоматериала в источник ионизации масс-спектрометра, без какого-либо предварительного их разделения хроматографическими или иными методами [5]. Таким образом достигается быстрота исполнения, высокая воспроизводимость результатов и относительная дешевизна фингерпринтинга, что, по нашему мнению, крайне важно для последующего его внедрения в клиническую практику.

Выбор рака предстательной железы в качестве диагностируемой болезни определяется актуальностью диагностики данного заболевания. Рак предстательной железы является второй по счету причиной смертности от онкологических заболеваний среди мужчин [6]. Высокие показатели смертности от этого заболевания обусловлены длительным бессимптомным течением болезни, что является причиной позднего обращения больных к врачу, когда прогноз заболевания становится неблагоприятным. Существующая же лабораторная диагностика данного заболевания, основанная на измерении концентрации простат-специфического антигена (ПСА) в крови пациента, отличается низкой точностью [7]. Таким образом, применение современной технологической платформы, в частности метаболомики, для диагностики данного заболевания является актуальным.

МЕТОДИКА.

Пробы плазмы крови. Кровь для измерения концентрации ПСА в крови мужчин, имеющих подозрение на патологию предстательной железы, получали в лаборатории ООО “Новые медицинские технологии” г. Воронеж, по направлению участковых урологов Воронежа и Воронежской области. Концентрацию общего ПСА в пробах измеряли иммуноферментным способом. Со всех пациентов брали информированное согласие на научное использование полученных образцов. Пациентов затем обследовали в Воронежском областном клиническом онкологическом диспансере (пальцевое исследование, УЗИ, пункционная биопсия), после чего выставляли диагноз или признавали пациентов здоровыми. Таким образом, кровь брали до начала лечения. Для масс-спектрометрического анализа были отобраны 40 проб плазмы крови от больных светлоклеточной мелкоацинарной аденокарциномой предстательной железы 2-ой стадии (T2NxMO) и 30 проб от здоровых пациентов. Возраст здоровых пациентов и больных раком предстательной железы варьировал от 55 до 80 лет.

Протокол забора крови: кровь брали из кубитальной вены, натошак, в объёме 10 мл, в стеклянные пробирки, содержащие цитрат натрия. 3,8%-ную цитратную кровь, не позднее 15 мин после забора, центрифугировали при комнатной температуре в течение 15 мин при 3000 об/мин (1600 g). Затем 2,5 мл плазмы разделяли на 4 равные части (аликвоты) и разливали в пластиковые пробирки, маркировали и замораживали при -80°C . Транспортировку образцов проводили в замороженном состоянии в термоконтейнерах. Хранение образцов до проведения анализа осуществляли при -80°C . Используемые для анализа пробы были заморожены/разморожены не более одного раза.

Подготовка проб плазмы крови для масс-спектрометрического анализа метаболитов. Для осаждения белков 100 мкл плазмы крови смешивали со 100 мкл воды (“LiChrosolv”, “Merck”, США) и 800 мкл метанола (“Fluka”, Германия) и инкубировали 10 мин при 4°C . Центрифугированием при 13000 g (центрифуга MiniSpin plus, “Eppendorf”, Германия) в течение 10 мин осаждали белок и супернатант переносили в чистые пластиковые пробирки (типа Эппендорф). Растворитель упаривали при 45°C в течение 3 ч на вакуумном испарителе

SpeedVac (“Eppendorf”). Полученный сухой осадок растворяли в 100 мл 95% раствора ацетонитрила (“Acros Organics”, США), с добавлением 0,1% муравьиной кислоты (“Fluka”). Для лучшего растворения осадка, пробы обрабатывали ультразвуком в ультразвуковой мойке Bandelin RM 40UH (“Sonorex Technik”, Германия) два раза по 30 сек. Далее пробы центрифугировали 10 мин при 13000 g и полученный супернатант использовали для масс-спектрометрического анализа.

Масс-спектрометрия. Масс-спектрометрический анализ проводили гибридным квадрупольно-времяпролетным масс-спектрометром MicrOTOF-Q (“Bruker Daltonics”, Германия), имеющим электроспрейный источник ионизации. Масс-спектрометр был настроен на приоритетную детекцию ионов в диапазоне от 250 до 1500 Да/заряд. Спектры снимали в режиме детекции как положительно, так и отрицательно заряженных ионов. Время снятия одного спектра 1 мин, поток пробы, подаваемой в электроспрейный источник ионизации, 500 мкл/час. Для инъекции пробы в электроспрейный источник ионизации использовали стеклянный шприц (“Hamilton Bonaduz”, Швейцария), установленный в шприцевой инъекционный насос (“KD Scientific”, США). Масс-спектры получали в программе DataAnalysis (версия 3.4, “Bruker Daltonics”) суммированием записанных минутных сигналов.

Анализ масс-спектрометрических данных. Применяя программу DataAnalysis, по пикам масс-спектрограмм устанавливали массы ионов метаболитов. Для этого проводили детекцию пиков в спектре, используя порог отсечения по соотношению сигнал/шум равный 10. Полученные списки масс отрицательно и положительно заряженных ионов метаболитов объединяли и, используя программный пакет Matlab v.12 (“Mathworks”, США), переводили в бинарный код, формируя бинарно представленный метаболический отпечаток проб плазмы крови (далее просто отпечаток). Для этого диапазон детектированных масс разбивали на фрагменты с шагом 0,01 Да, где диапазону, включающему массу иона метаболита, соответствует “1” и, соответственно, “0” - при отсутствии таковой массы.

Метод главных компонент (МГК). Метаболические отпечатки анализировали методом главных компонент, используя функцию $[comp, score] = princomp(X)$ программного пакета Matlab, где X является матрица, содержащая отпечатки, comp – рассчитанная матрица главных компонент, score – матрица проекций отпечатков на главные компоненты. Для визуализации результатов анализа использовали функцию *plot3*, которой в качестве входных данных передавали проекции отпечатков на главные компоненты.

Модель диагностической системы. Для построения модели диагностической системы использовали метод опорных векторов (SVM–support vector machine), применяя свободно распространяемое программное обеспечение OSU Support Vector Machines Toolbox (версия 3.0, <http://sourceforge.net/projects/svm/>). Применяли нелинейный SVM классификатор с радиальным ядром (функция RbfSVC) и основными параметрами: γ - 1, ε - 0,001, C - 1 (значения параметров смотри в описании программного обеспечения). Входными данными для классификации являлись координаты проекций отпечатков на выбранные три главных компонента.

Тестирование модели диагностической системы проводили способом *leave-one-out* [8], заключающемся в попеременном удалении из выборки одного экземпляра и обучении классификатора на основе оставшихся экземпляров с последующим тестированием классификатора на экземпляре, не участвовавшем в обучении. Таким образом, модель диагностической системы была протестирована на 70 отпечатках.

Для определения параметров модельной диагностической системы, таких как специфичность, чувствительность и точность, а также построения ROC (Receiver Operating Characteristic)-кривой и вычисления площади под ROC-кривой, использовали статистический пакет для социальных наук “Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)” (“SPSS Inc.”, США), версии 10,0.

МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ФИНГЕРПРИНТИНГ ПРИ РАКЕ ПРОСТАТЫ

Полученную чувствительность модельной диагностической системы сравнивали с чувствительностью и специфичностью диагностики, основанной на концентрации ПСА в крови пациентов. Учитывая возраст больных раком предстательной железы, за нормальные значения концентрации ПСА принимали величины от 0 до 5,36 нг/мл (от 0 до $0,16 \times 10^{-9}$ М).

Доверительный интервал надежности для характеристик модельной диагностической системы рассчитывали методом, предложенным Вапником для расчета доверительных интервалов надёжности для классификатора с учителем [9]. Расчет проводили для доверительной вероятности 0,95.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Высокие показатели смертности от рака предстательной железы обусловлены длительным бессимптомным течением болезни, что является причиной несвоевременной диагностики. Более 60% больных обращаются к врачу уже при наличии метастазов в отдаленных органах. При этом группу риска составляют мужчины старше 50-55 лет [10]. Таким образом, исходя из актуальности диагностики ранних стадий рака предстательной железы и проведения диагностики у граждан определенного возраста, для формирования выборки проб плазм крови были использованы здоровые добровольцы 55-ти и более лет, а так же больные того же возраста с раком предстательной железы 2-ой степени.

В результате проведенного прямого масс-спектрометрического анализа в пробах было детектировано примерно 1900 ионов метаболитов (см. табл. 1). Число положительно заряженных ионов метаболитов было чуть больше, чем отрицательно заряженных. Существенных различий в количестве детектированных ионов у больных и здоровых пациентов не установлено.

Таблица 1. Количественные характеристики масс-спектров, полученных при анализе метаболитов плазмы крови здоровых добровольцев и больных раком предстательной железы.

<i>Масс-спектры метаболитов плазмы крови здоровых добровольцев</i>	
положительно заряженных ионов метаболитов	1041 ± 152*
отрицательно заряженных ионов метаболитов	836 ± 198
всего ионов метаболитов	1877 ± 274
<i>Масс-спектры метаболитов плазмы крови больных раком предстательной железы</i>	
положительно заряженных ионов метаболитов	1037 ± 213
отрицательно заряженных ионов метаболитов	875 ± 194
всего ионов метаболитов	1912 ± 264

Примечание: * - указаны средние значения ± стандартное отклонение.

Спектры, полученные в режиме детекции отрицательно и положительно заряженных ионов, существенно отличались, сохраняя общий характер распределения масс ионов (см. рис. 1). В режиме детекции положительно заряженных ионов наблюдалось равномерное распределение масс ионов до 750 Да/заряд, после чего в районе 780-900 Да/заряд наблюдалось характерное распределение интенсивных масс-спектрометрических пиков (см. рис. 1А), судя по всему соответствующих фракции липидов (фосфолипидов, триглицеридов и т.д.) [11]. В режиме детекции отрицательно заряженных ионов наблюдалась похожая картина, но с большей интенсивность пиков в районе до 750 Да/заряд (см. рис. 1Б).

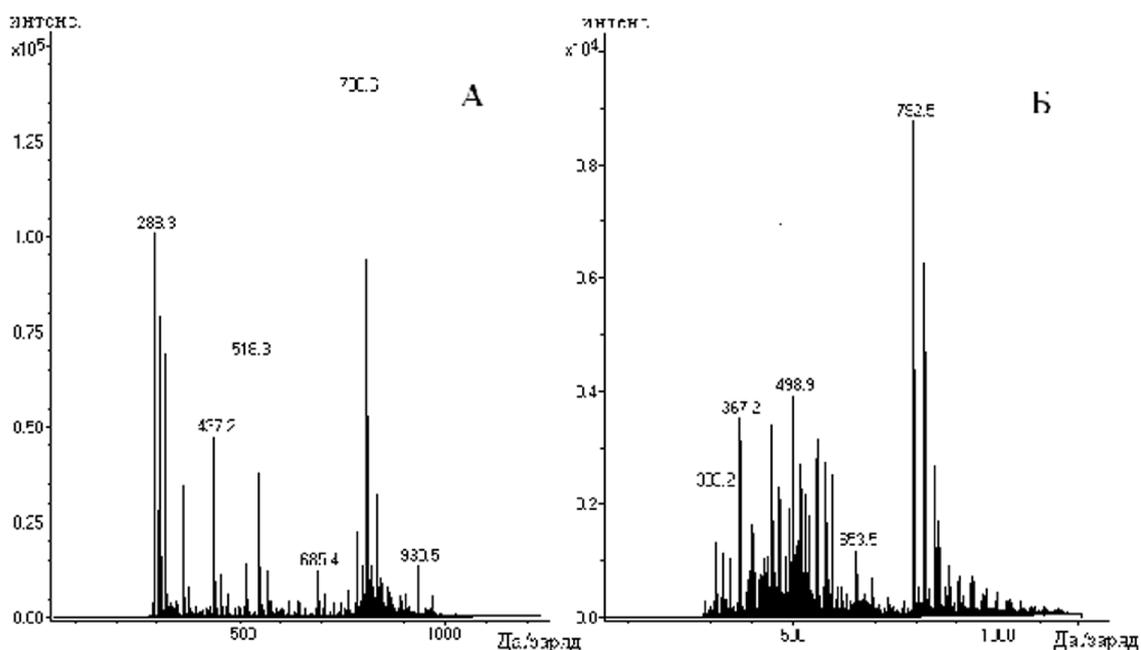


Рисунок 1.

Масс-спектры метаболитов плазмы крови. А - масс-спектр положительно заряженных метаболитов, Б - масс-спектр отрицательно заряженных метаболитов.

Математическое преобразование масс-спектров в бинарный код позволило получить фингерпринты, представляющие собой мультивариационные характеристики плазмы крови, где переменными являются бинарные значения, указывающие на наличие или отсутствие определенной массы в масс-спектре. Применяя метод главных компонент, удалось выявить в фингерпринтах вариабельность, ассоциированную с диагностируемой болезнью. Выбранные три главных компонента, охватывающие 41% всей вариабельности, представленной в компонентах, позволили эффективно разделить в трехмерном пространстве фингерпринты по признаку принадлежности к пробам больных или здоровых пациентов (см. рис. 2). Любые иные комбинации главных компонент либо не позволяли разделить пробы, либо разделение было менее эффективным (результаты не представлены).

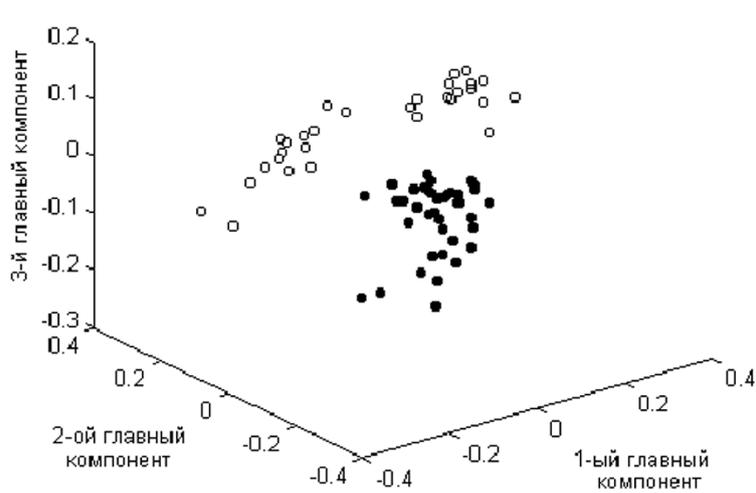


Рисунок 2.

Проекция метаболитических фингерпринтов на три главных компонента.

- - проекция фингерпринтов метаболитов плазмы крови больных раком предстательной железы;
- - проекция фингерпринтов метаболитов плазмы крови здоровых добровольцев.

МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ФИНГЕРПРИНТИНГ ПРИ РАКЕ ПРОСТАТЫ

При осмотре проекции фингерпринтов на три выбранных главных компонента становится очевидной возможность разделения их разграничивающей плоскостью на два класса. Для построения такой плоскости использовали метод опорных векторов, который позволяет классифицировать многомерные данные, разделяя их на классы построением гиперплоскости в заданном многомерном пространстве. Формально разделение биопроб на классы является моделью диагностической системы, направленной на выявление рака предстательной железы, эффективность которой может быть установлена тестированием и определением таких параметров как специфичность, чувствительность и точность.

Эффективность модели диагностической системы проверялась тестированием *leave-one-out*. Поочередно, исключая по одному тестовому фингерпринту из выборки, строили разграничивающую плоскость между проекциями фингерпринтов на три главных компонента, соответствующих метаболитам плазмы здоровых и больных пациентов. После чего устанавливали к какому классу будет отнесен тестовый фингерпринт. Результаты классификации по 70 фингерпринтам использовали для построения ROC-кривой (см. рис. 3), площадь под которой дает представление об эффективности и клинической применимости диагностического метода. Клинически применимыми считаются диагностические системы, имеющие значения площади под ROC-кривой не менее 0,6, хорошими считаются системы со значениями более 0,8 [12]. Предложенную нами модель диагностической системы можно отнести к “очень хорошим”, так как она имеет значение более 0,9. Следует отметить, что ПСА-тест для той же выборки пациентов имеет площадь под ROC-кривой 0,59, что согласуется с данными из других источников (0,51 и 0,54 для тестовых наборов фирмы Roche и Bayer соответственно [7]) и указывает на то, что применение ПСА-теста для диагностики рака предстательной железы 2-ой степени является сомнительным.

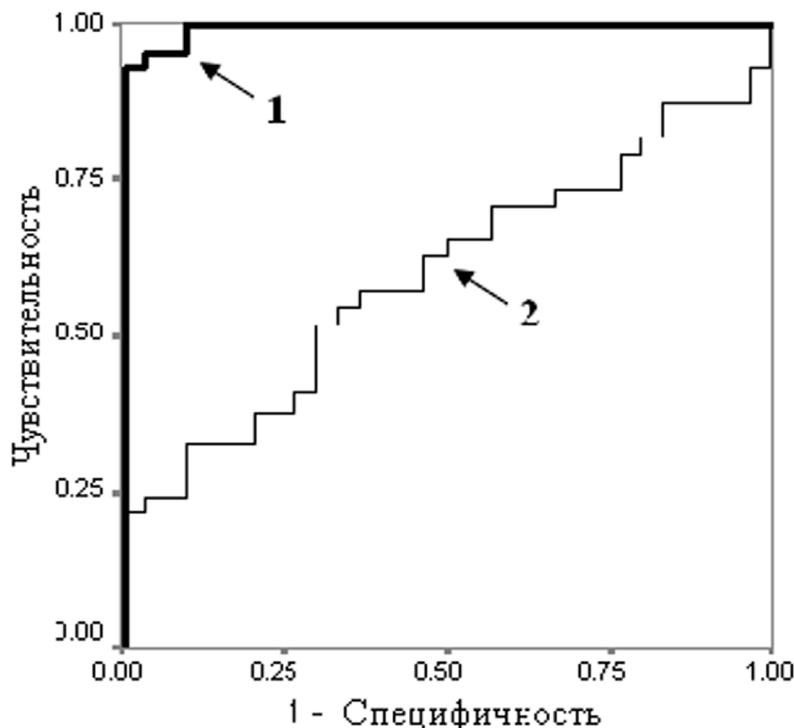


Рисунок 3.

ROC-кривые для модельной диагностической системы рака предстательной железы на основе метабологического фингерпринта (1) и концентрации общего ПСА (2) плазмы крови. Для построения кривой использовали пробы плазм крови 40 больных раком предстательной железы и 30 здоровых добровольцев. Разделение метабологических фингерпринтов на соответствующие группы проводили методом опорных векторов, применённого к проекции фингерпринтов на три главных компонента.

Таким образом, модель диагностической системы характеризуется высокими чувствительностью, специфичностью и точностью (см. табл. 2). Следует отметить, что диагностирование, проведенное на основе измерения концентрации ПСА в крови пациентов, показало низкую эффективность. У 26 из 40 больных раком предстательной железы его значения соответствовали возрастным нормам, а у 5 из 30 здоровых пациентов превышало возрастную норму, что определило соответствующие низкие значения чувствительности, специфичности и точности ПСА-теста (см. табл. 2). Из чего можно сделать заключение о хороших перспективах применения метаболитического фингерпринтинга как эффективного средства диагностики рака предстательной железы, значительно превосходящего общепринятый и повсеместно распространенный ПСА-тест.

Таблица. 2. Характеристики методов диагностики рака предстательной железы 2-ой стадии на основе классификации метаболитических фингерпринтов и концентрации ПСА в крови пациентов.

<i>Диагностика на основе метаболитического фингерпринтинга</i>	
Чувствительность	95,0 ± 2,5 %
Специфичность	96,7 ± 2,1%
Точность	95,7 ± 1,6 %
Площадь под ROC-кривой	0,994 ± 0,01
<i>Диагностика на основе концентрации ПСА</i>	
Чувствительность	35,0 %
Специфичность	83,3%
Точность	51,4 %
Площадь под ROC-кривой	0,59 ± 0,13

Примечание: доверительный интервал надежности вычисляли для доверительной вероятности - 0,95.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. В работе показана эффективность диагностической методики, основанной на метаболитическом фингерпринте. В основе предложенной статистической модели лежит комбинация метода главных компонент и метода опорных векторов в сочетании с отображением качества диагностической системы в виде ROC-кривой. МГП позволяет объективно определить основные классы данных в режиме “без учителя”. Разделение на классы наблюдалось визуально (рис. 2), что позволило перейти от избыточного пространства признаков, включавшего более 1000 масс-зарядных пиков метаболитов (табл. 1), к анализу только 3-х признаков, представленных главными компонентами. Классификация образцов проводилась методом опорных векторов, т.е. методом “обучающимся”, однако поскольку в качестве признаков фигурировали только главные компоненты, то не происходило эффекта “переобучения”, который часто наблюдается в многопараметрических диагностических моделях. За счет такой двухстадийной обработки данных, сначала “без учителя”, а только потом - “с учителем”, было достигнуто высокое качество параметров результирующей ROC-кривой.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Anderson N.L., Anderson N.G.* (2002) *Molecular & Cellular Proteomics*, **1**, 845-867.
2. *Diamandis E.P.* (2004) *Molecular & Cellular Proteomics*, **3**, 367-378.
3. *Dettmer K., Hammock B.D.* (2004) *Environ. Health Perspect.*, **112**, 396–397
4. *Beecher C.W.W.* (2003) In: *Metabolic profiling: Its role in biomarker discovery and gene function analysis* (George G., Harrigan R.G., eds.) Springer, New York, pp. 311-335.
5. *Dettmer K., Aronov P.A., Hammock B.D.* (2007) *Mass Spectrom. Rev.*, **26**, 51-78.
6. *Каприн А.Д., Найговзина Н.Б., Иванов С.А., Баумаков В.А.* (2006) *Вопросы онкологии*, **6**, 680-685.
7. *Lein M., Kwiatkowski M., Semjonow A., Luboldt H.J., Hammerer P., Stephan C., Klevecka V., Taymoorian K., Schnorr D., Recker F., Loening S.A., Jung K.* (2003) *J. Urol.*, **170**, 1175-1179.
8. *Martens H.A., Dardenne P.* (1998) *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **44**, 99-121.
9. *Вапник В.Н. (ред.)* (1984) *Алгоритмы и программы восстановления зависимостей*. М.: Наука, Главная редакция физико-математической литературы.
10. *Hankey B.F., Feuer E.J., Clegg L.X., Hayes R.B., Legler J.M., Prorok P.C., Ries L.A., Merrill R.M., Kaplan R.S.* (1999) *J. Nat. Cancer Inst.*, **91**, 1017-1024.
11. *Wang C., Xie S., Yang J., Yang Q., Xu G.* (2004) *Anal. Chim. Acta*, **525**, 1–10.
12. *Metz C.E.* (1978) *Sem. Nuc. Med.*, **8**, 283-298.

Поступила: 15. 12. 2008.

METABOLIC FINGERPRINTING OF BLOOD PLASMA FOR PATIENTS WITH PROSTATE CANCER

P.G. Lokhov, M.I. Dashtiev, L.V. Bondartscov, A.V. Lisitsa, S.A. Moshkovskii, A.I. Archakov

Institute of Biomedical Chemistry RAMS, Pogodinskaya st.10, Moscow, 119121 Russia;
e-mail: lokhovpg@rambler.ru

Application of blood plasma metabolites fingerprinting for the diagnostic of the 2nd stage of prostate cancer has been investigated. The diagnostic sensitivity (95%), specificity (96,7%) and accuracy (95,7%) of the metabolic fingerprinting were much higher then those for PSA test (35%, 83,3% and 51,7%, respectively) for the same patients. Area under the ROC-curve (0,994) suggests that the proposed approach is effective and can be used for clinical applications.

Key words: metabolomics, metabolic fingerprinting, mass spectrometry, prostate cancer.