

ОБЗОР

УДК 577.1

©Коллектив авторов

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА РАКА ЯИЧНИКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОТЕОМНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

М.А. Власова¹, С.А. Мошковский¹, М.Р. Сафарова², О.В. Макаров², А.И.Арчаков¹

¹ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича РАМН,
119121, Москва, Погодинская ул., 10; факс: (095) 245-0857;
эл. почта: sergei.moshkovskii@ibmc.msk.ru

²Российский государственный медицинский университет, Москва

Рак яичника является самым распространенным из гинекологических раков. Он с трудом поддается ранней диагностике, поэтому разработка новых методов диагностики рака яичника, в особенности на ранних стадиях, является одной из наиболее актуальных проблем современной онкологии. Основным подходом к лабораторной диагностике злокачественных опухолей является поиск специфических биомаркеров заболевания в крови. Используемый в настоящее время в диагностике биомаркер рака яичников CA125 обладает некоторыми недостатками, в связи с чем в последнее время поиск других маркеров данной опухоли ведется особенно интенсивно. В частности, было доказано преимущество одновременного использования нескольких диагностических биомаркеров вместо одного. Протеомные технологии (двумерный электрофорез, масс-спектрометрические методы) в сочетании с методами биоинформатики представляют собой мощный инструмент для поиска новых биомаркеров. Наилучшим образом зарекомендовала себя в этом отношении технология SELDI-TOF (Surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight – усиленная поверхностью лазерная десорбция-ионизация с регистрацией времени пролета), совмещающая применение хроматографических белковых чипов с масс-спектрометрической детекцией. В настоящем обзоре проанализированы полученные с использованием протеомных методов данные по поиску новых биомаркеров рака яичника.

Ключевые слова: рак яичника, биомаркер, протеомика, масс-спектрометрия, белковые чипы, SELDI.

ВВЕДЕНИЕ. В современном обществе одной из основных причин смертности являются злокачественные опухоли. Огромное внимание в медицине уделяется поиску новых подходов к лечению этих заболеваний. Однако, эффективность лечения рака во многом определяется возможностью его ранней диагностики, поэтому очень важной проблемой является разработка простых и эффективных способов диагностики рака, в особенности, на ранних стадиях. Вовремя диагностированный рак в большинстве случаев вылечивается, причем для полного выздоровления зачастую оказывается достаточно лишь хирургического вмешательства. Проблема ранней диагностики в особенности актуальна в отношении рака яичника – наиболее распространенного из гинекологических раков. Ранние стадии рака яичника протекают практически бессимптомно, в результате почти в 90% случаев рак яичника диагностируют

только на поздних стадиях, когда заболевание уже плохо поддается лечению [1, 2].

Из-за отсутствия клинических симптомов на ранних стадиях рака яичника для своевременного выявления болезни необходимо проводить периодический скрининг “групп риска” - женщин, по той или иной причине имеющих индивидуальную предрасположенность к раковым заболеваниям, а также женщин после наступления менопаузы, когда опасность возникновения рака яичника существенно увеличивается [3]. Для широкомасштабного обследования населения необходимо наличие простого и дешевого, но в то же время достаточно надежного диагностического признака. В настоящее время для диагностики используют два основных подхода: ультразвуковое исследование и определение концентрации специфических опухолевых маркеров в крови, причем более или менее надежные результаты удастся получить только при параллельном использовании обоих подходов сразу [4]. В данном обзоре мы подробнее остановимся на способах диагностики, использующих белковые маркеры, на способах обнаружения новых маркеров и перспективах развития новых подходов к диагностике, появляющихся в связи с развитием совокупности инструментальных методов, объединяемых термином “протеомика”.

Анализ крови – это простая и безвредная процедура, позволяющая исследователю получить информационно емкий биологический материал. Омывая все ткани и органы человеческого организма, кровь включает в себя множество продуктов нормальных и патологических биохимических процессов. Формирование злокачественной опухоли в организме не может не отразиться на составе крови. Однако ввиду очень сложного состава крови и гетерогенной природы рака, выявить в крови универсальные белки-маркеры хотя бы для какой-то одной разновидности рака (например, для рака яичника, рака молочной железы и т. д.) оказалось очень сложной и до сих пор однозначно не решенной задачей.

1. Требования к биомаркерам.

Основные характеристики биомаркеров, по которым оценивают их пригодность для диагностики – это чувствительность, специфичность и положительная оценка предсказания (positive predictive value, PPV). Чувствительность – это процент пациентов, классифицированных с использованием данного маркера как “больные раком”, от общего числа действительно больных пациентов. Специфичность – это процент пациентов, классифицированных с использованием этого маркера как “здоровые” от общего числа действительно здоровых пациентов. Положительная оценка предсказания – это процент правильно диагностированного рака от общего числа диагнозов “рак” [5]. Для одного и того же биомаркера эти характеристики меняются в зависимости от того, какой уровень его концентрации принять за критический (пациентов с концентрацией этого маркера в крови выше критической величины классифицируют как “рак”, ниже – как “норму”). Теоретически, варьируя критическую концентрацию, для любого маркера можно получить сколь угодно высокую чувствительность, и практически все больные раком пациенты будут определены как “больные”, однако при этом также возрастет число ложных диагнозов рака, то есть понизится специфичность. И наоборот: чем выше специфичность, тем ниже чувствительность. Казалось бы, при выборе критической концентрации приоритет должен быть на стороне чувствительности – чтобы по возможности все случаи рака были зафиксированы. Однако необходимо подчеркнуть, что в любой популяции здоровых намного больше, чем больных. Например, на 100000 женщин после наступления менопаузы (группа повышенного риска) приходится в среднем 40 больных раком яичника [1]. Это значит, что даже использование маркера, обладающего специфичностью 99,6%, приведет при скрининге такой популяции к постановке примерно 400 ложных диагнозов рака. Чтобы отсеять “ложные диагнозы”, приходится проводить дополнительные исследования, в том числе и биопсию, что связано с большими экономическими затратами и с небезвредными для пациентов оперативными вмешательствами. При

SELDI-профиль сыворотки/плазмы

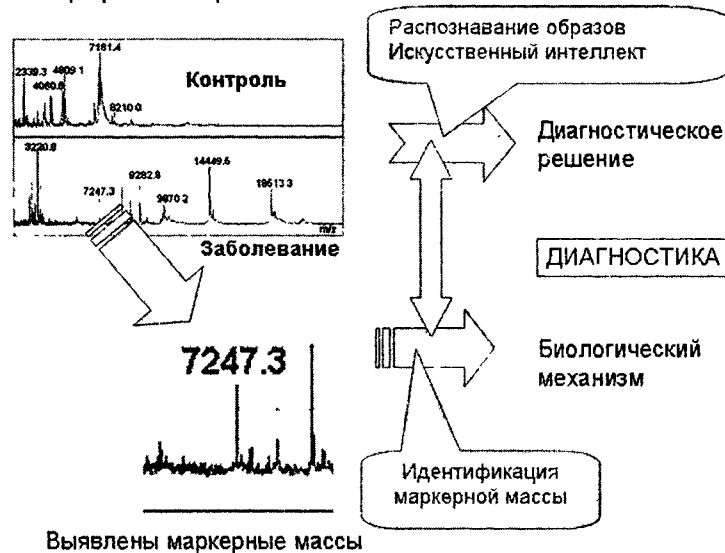


Рисунок 1.

Стратегия основанных на SELDI-масс-спектрометрии исследований по диагностике злокачественных опухолей.

5. Двумерный электрофорез.

Среди протеомных методов, используемых для непосредственного обнаружения и идентификации биомаркеров, существенную роль играет двумерный электрофорез с последующей масс-спектрометрической идентификацией белков. Метод двумерного электрофореза позволяет осуществлять разделение белков в одном направлении – путем изоэлектрофокусирования, а в другом – по массе посредством общепринятого гель-электрофореза, основанного на денатурации додецилсульфатом натрия. Изоэлектрофокусирование представляет собой разделение белков в градиенте pH: каждый белок движется в геле до тех пор, пока не достигнет значения pH, соответствующего его изоэлектрической точке. В последнее время используют иммобилизованные в геле градиенты pH, при этом доступны градиенты pH очень узкого диапазона (до 0,2), что позволяет разделять белки с близкими значениями pK и соответственно увеличивать разрешение [20]. Часто сначала производят разделение белков в широком диапазоне pH, с грубым разрешением, а затем отдельные фракции разделяют в более узком диапазоне pH. Такое предварительное разделение позволяет получить обогащенные фракции, и в результате детектировать не только мажорные, но и минорные белки [21]. Для выявления биомаркеров сравнивают интенсивность пятен на геле для нормы и болезни. Затем пятна, которые существенно различаются у нормы и болезни, вырезают из геля и идентифицируют масс-спектрометрически.

В качестве материала для двумерного электрофореза часто используют не кровь, где концентрация потенциальных маркеров болезни, скорее всего, невелика, а непосредственно опухолевые и нормальные ткани исследуемого органа, где абсолютная концентрация гипотетического маркера должна быть большей и различия в концентрации более явными. Однако как здоровые, так и опухолевые ткани представлены различными типами клеток, что усложняет воспроизводимость и интерпретацию результатов. Решить эту проблему в значительной степени позволила разработка метода лазерной микродиссекции, с помощью которого можно отделить интересующую клеточную популяцию от окружающих тканей [22, 23].

Помимо классического двумерного электрофореза для обнаружения маркеров заболеваний используют также его усовершенствованные варианты. Среди таких методов – дифференциальный электрофорез в геле (DIGE), в котором белковые экстракты из больной и здоровой тканей метятся двумя различными флуоресцентными зондами и смешиваются. Затем проводят двумерный электрофорез, после чего для каждого пятна измеряют интенсивность флуоресценции и определяют различие в интенсивности между двумя флуоресцентными метками. Такой подход позволяет достичь полной идентичности условий проведения электрофореза и за счет этого повысить воспроизводимость результатов [24, 25]. Двумерный электрофорез также применяют для скрининга сыворотки больных раком с целью выявления белков, связывающихся с аутоантителами, полученными к белкам раковых клеток [23].

Для поиска биомаркеров рака яичника с помощью двумерного электрофореза были использованы экстракты из тканей [26, 27]. Обнаружено 20 биомаркеров, часть из которых представляла собой фрагменты белков – цитокератинов bD и 8 и катепсина D, что свидетельствует о повышенной при злокачественных опухолях активности протеаз. В другой работе тех же авторов результаты двумерного электрофореза использовали для разработки правила классификации злокачественных, доброкачественных и пограничных опухолей яичника [28].

Однако, отметим, что выявление биомаркеров в раковой ткани само по себе еще не решает проблемы диагностики, так как в качестве материала для анализа в целях диагностики используют не экстракты тканей, а легкодоступные биологические жидкости, такие как кровь или моча. Поэтому для того, чтобы можно было использовать найденный маркер в целях диагностики, он должен присутствовать в детектируемой концентрации в какой-либо из этих жидкостей. Таким образом, после того, как путем 2D-электрофореза доказано, что концентрация какого-либо белка повышена в опухолевой ткани, необходимо проводить иммунологическое выявление данного маркера в доступных биологических жидкостях.

Безусловным преимуществом метода двумерного электрофореза является возможность его совмещения с масс-спектрометрическим определением аминокислотной последовательности белка. Тем не менее, несмотря на рассмотренные выше усовершенствования, двумерный электрофорез обладает рядом существенных недостатков. Во-первых, этот метод очень трудоемкий и плохо воспроизводимый. Из-за трудоемкости метода практически невозможно получить достаточный для статистической обработки объем данных. Кроме того, одним из недостатков в отношении поиска биомаркеров является неудобство применения двумерного электрофореза для разделения низкомолекулярных белков и пептидов. При этом есть основания полагать, что наиболее богатым источником новых биомаркеров является как раз низкомолекулярная часть (до 15000 Да) протеома, так как любой биологический процесс, в том числе и опухоль, сопровождается каскадами ферментативных реакций, и специфичный набор их продуктов–фрагментов белков можно обнаружить в крови [18]. Эта часть протеома пока исследована не полностью, однако бурное развитие масс-спектрометрических методов открывает новые перспективы в этом направлении.

6. Масс-спектрометрическая технология SELDI-TOF.

Масс-спектрометрические методы позволяют получать спектры распределения белков в смеси по массе: каждому белку соответствует определенный пик, положение которого определяется соотношением массы и заряда белка, а интенсивность неявным образом отражает количество белка. Во всех масс-спектрометрических методах белки должны быть предварительно ионизованы. В случае так называемой MALDI-ионизации (matrix-assisted laser desorption/ionization) это достигается добавлением к белкам органической матрицы, являющейся донором протонов. Матрица взаимодействует с белками и формирует кристаллоидную структуру. При облучении этой структуры лазером ионизованные

индивидуальные молекулы белков отрываются от поверхности и движутся к катоду. Чем меньше масса и чем сильнее заряд белка, тем быстрее он достигает противоположно заряженного электрода; по времени движения иона до электрода определяют соотношение массы и заряда белка. При облучении лазером образуются преимущественно однозарядные ионы, и для них соотношение массы и заряда примерно совпадает с массой [20].

Методы масс-спектрометрии позволяют очень быстро анализировать большое количество образцов, требуют сравнительно небольшого количества биологического материала, обладают высокой чувствительностью и хорошим разрешением для низкомолекулярных белков и пептидов (в отличие от двумерного электрофореза), что делает особенно перспективным их использование для поиска биомаркеров.

Из прямых масс-спектрометрических методов для обнаружения биомаркеров заболеваний лучше всего приспособлена специально для этих целей разработанная технология SELDI-TOF (Surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight), совмещающая в себе масс-спектрометрическую детекцию белков с использованием белковых чипов. Белковый чип представляет собой пластинку с 8-ю пятнами хроматографической поверхности, на которую наносят образцы исследуемой жидкости перед анализом. Используют чипы с различной хроматографической поверхностью: гидрофильной (нормально-фазные), гидрофобной (обращенно-фазные), анионообменные, катионообменные или металлоаффинные. Кроме того, выпускаются чипы с активированной поверхностью для связывания любого аффинного сорбента [20]. В зависимости от типа чипа и используемого буфера с активной поверхностью связывается разный набор белков, а несвязавшиеся белки отмывают. После отмывки чип со связавшимися белками высушивают и наносят матрицу. Затем чип помещают в вакуумную камеру, и пятна облучают лазером. Ионизованные за счет энергии лазера белки, как в обычном процессе MALDI-TOF, отрываются от поверхности чипа, по вакуумной трубке летят к противоположно заряженному электроду и там детектируются.

Использование чипов позволяет упрощать наборы белков в сложных многокомпонентных смесях, к которым относятся биологические жидкости. В результате полученные спектры содержат более или менее хорошо разрешенные пики. Анализировать такие спектры существенно легче, чем спектры, полученные при анализе всей плазмы. Методом SELDI в течение дня можно проанализировать десятки образцов. Кроме того, процедура может быть автоматизирована, и тогда производительность повышается еще во много раз [18].

В качестве биологического материала для исследования с помощью SELDI-TOF могут использоваться как биологические жидкости (плазма крови, моча), так и белковые экстракты из тканей. Технологию SELDI можно использовать как альтернативу двумерному электрофорезу для поиска биомаркеров и их дальнейшей идентификации, но идентификация белков в данном случае может стать достаточно сложной задачей. Возможностью избежать этого является другой подход. Так как процедура получения SELDI-спектров достаточно проста, эти спектры можно применять не только в качестве объекта исследования, но и как диагностический признак [29]. Задача исследователей заключается в подборе условий для получения наиболее информативных и воспроизводимых спектров и выработка правила, в соответствии с которым тот или иной спектр можно было бы классифицировать как “здоровье” или “болезнь”. Такой подход к диагностике, помимо простоты, скорости и относительной дешевизны, решает еще некоторые существенные проблемы, с которыми можно столкнуться при использовании иммунного анализа. Так, есть многочисленные данные о том, что рак сопровождается повышением активности протеаз [30, 31], в результате среди маркеров рака вполне могут быть фрагменты белков. Масс-спектрометрия позволяет отличить полноразмерную форму от фрагмента, в то время как

получение специфических антител к таким белкам, так, чтобы они взаимодействовали только с одной из форм, очень затруднительно. То же самое относится и к различным ковалентным модификациям белков. Ковалентные модификации белков, будучи тесно связанными с протеканием физиологических процессов в организме, также могут существенно различаться между нормой и онкологией [32].

Несмотря на множество преимуществ технологии SELDI-TOF, на данный момент ее реальные возможности не вполне ясны. Одной из основных проблем является присутствие в сыворотке больших концентраций мажорных белков (например, альбумина). По сравнению с ними концентрации большинства гипотетических биомаркеров, вероятнее всего, ничтожны. При этом поверхности всех чипов, используемых для профилирования, лишены селективности и могут связывать разнообразные наборы белков, различающиеся для каждого типа чипа. В условиях конкуренции за место связывания с хроматографической поверхностью между присутствующими в огромном количестве мажорными белками и белками, присутствующими в следовых количествах, последние, скорее всего, просто не свяжутся с чипом. По этой же причине количество связавшегося белка, и, следовательно, интенсивность пика может зависеть не только от его количества, но и от концентрации других белков в сыворотке [33]. К сожалению, реальные пределы чувствительности метода при работе не с изолированными белками, а со сложной смесью, такой как сыворотка, пока не определены. На данном этапе технология SELDI-TOF широко применяется для разработки диагностики различных видов рака, оставаясь при этом в значительной степени эмпирическим методом.

7. Использование технологии SELDI-TOF для диагностики рака яичника.

К настоящему моменту опубликован ряд работ по разработке метода диагностики рака яичника с применением технологии SELDI-TOF. Остановимся на подробном анализе полученных в этих работах результатов.

7.1. Общий подход к разработке правил диагностики на основе масс-спектров.

Во всех исследованиях для разработки правила диагностики рака яичника применяли, в общих чертах, одну и ту же стратегию. Для исследования отбирали достаточно большие группы пациентов, больных раком, и людей, не страдающих раком. Для этой выборки получали масс-спектры плазмы или сыворотки, которые статистически обрабатывали для выявления пиков, достоверно различающихся между исследуемыми группами по интенсивности. С помощью методов биоинформатики разрабатывали правило, по которому комбинация интенсивностей этих пиков распознается как “рак” или “не рак”. Затем эффективность разработанного подхода проверяли на новом наборе немаркированных сывороток, среди которых присутствовали сыворотки больных и здоровых. Поставленные диагнозы затем сравнивали с результатами биопсии и оценивали чувствительность, специфичность и PPV разработанного метода диагностики.

Так как одной из главных проблем в существующей диагностике является разграничение злокачественных и доброкачественных опухолей, в большинстве работ исследовали три группы людей: “здоровых” (то есть не страдающих ни раком, ни доброкачественными опухолями, но, возможно, страдающими другими заболеваниями), людей с доброкачественными опухолями и людей, больных раком. При этом в некоторых работах ставили задачу разработки диагностики всех трех состояний [34], а в других – только задачу поиска отличий рака от “не рака” [2, 7, 35, 36]. Ввиду особой важности ранней диагностики рака, для исследования отбирали существенное количество пациентов с диагностированным раком в начальной стадии.

Большинство исследователей ставили только задачу выявления значимых отличий в спектрах, без выяснения природы этих отличий, и разработки на их основе правила диагностики [2, 34-36], другие – идентифицировали различающиеся пики [7, 37].

Таблица. Сравнительный анализ данных профилирования сыворотки с использованием технологии SELDI-TOF с целью выявления маркеров рака яичника. Жирным шрифтом выделены значения маркерных масс, присутствующих, по меньшей мере в двух публикациях. Курсивом показаны предполагаемые различные формы одного и того же белка - транстиретина.

Ссылка	Выявленные биомаркеры (масса/заряд, Да)	Исследованная выборка	Пред-обработка сыворотки	Белковый чип
[2]	534, 989, 2111, 2251 и 2465	100 контролей из популяции высокого риска или страдающие нераковыми заболеваниями (эндометриоз, ревматоидный артрит) 100 больных раком яичника всех основных эпителиальных подтипов. 6 пациентов – стадия 1	Нет	S16-H4 (обращенно-фазовый)
[34]	Опухоль/отсутствие опухоли: 4400, 15900, 18900, 23000, 30100 Рак/не рак: 3100, 13900, 21000, 79000, 106700 или 5100, 16900, 28000, 93000	56 здоровых женщин, 19 человек с доброкачественными опухолями, 109 больных раком яичника	9М мочевиная, 2%-CHAPS	SAX2 (сильный анионообменник)
[35]	5540, 6650, 11690 (IMAC-Cu) 4460, 21500 (SAX2)	34 здоровых женщин, 61 с доброкачественными заболеваниями и 44 больных раком яичника, из них 14 в начальной стадии	8М мочевиная, 1%-CHAPS	SAX2 (сильный анионо-обменник), IMAC-Cu (металло-аффинный на основе сульфата меди)
[36]	168, 321, 322, 359, 386, 413, 434, 435, 444, 445, 1222, 1528, 3345, 3449, 3473, 3529, 6102, 6124	207 здоровых женщин и 262 больных раком.	Нет	WCX2 (слабый катионо-обменник)
[7]	3272 (фрагмент интер- α -трипсинового ингибитора), 12828 (укороченная форма транстиретина), 28043 (аполипо-протеин A1)	142 здоровых женщин, 162 с доброкачественными опухолями 20 больных другими типами рака. Около 200 больных раком яичника, 65 в начальной стадии	Предварительное фракционирование с помощью анионо-обменной хроматографии	IMAC-Cu
[37]	11520, 11680 (две формы сывороточного амилоида A1)	34 здоровых женщин и 27 больных раком яичника	Получение термостабильной фракции	SAX2

7.2 Результаты применения технологии SELDI для диагностики рака яичника.

Прежде всего, отметим, что во всех работах были продемонстрированы методы диагностики с очень высокими по сравнению с используемыми в настоящее время чувствительностью и специфичностью, вплоть до 100% у Zhu с соавторами [36]. Тем не менее, возможность использования полученных данных в клинической диагностике пока ставится под сомнение по рассмотренным ниже причинам.

Результаты, полученные в различных работах, объединены в таблице. Первое, что бросается в глаза при взгляде на таблицу полученных результатов – это то, что наборы дискриминаторных пиков, полученные разными исследователями, совершенно разные. Из 47 приведенных в таблице маркеров только 2 явно встречаются более чем в одной работе: это маркер массой примерно 11,7 кДа [35, 37], идентифицированный в нашей научной группе как сывороточный амилоид A1 [37] (спектр SELDI см. на рис.2), и маркер с массой примерно 28 кДа [7, 34], идентифицированный в работе Zhang с соавторами как аполипопротеин A1 [7].

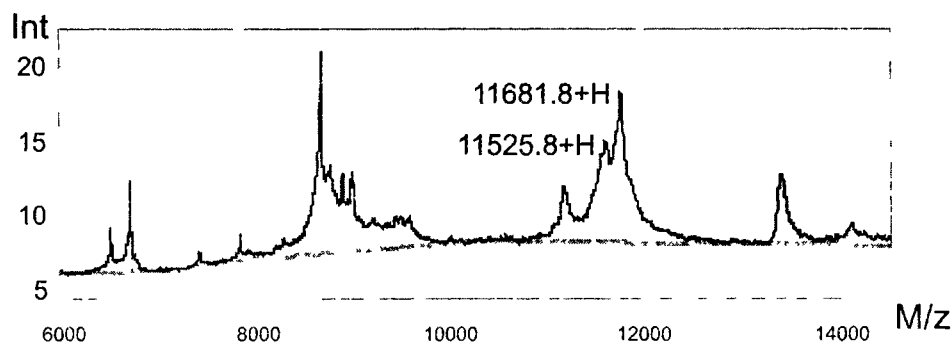


Рисунок 2.

SELDI-TOF-масс-спектр сыворотки крови пациента с раком яичника, полученный на чипе с нормально-фазовым хроматографическим носителем (фрагмент). Указаны пики сывороточного амилоида A1 [37]. Int - относительная интенсивность сигнала, M/z - соотношение молекулярная масса/заряд, Да

7.3 Возможные причины расхождения результатов

Существующие различия могут быть объяснены по-разному. В тех случаях, когда работы проводились с использованием разных белковых чипов, такие различия вполне естественны, так как с разными хроматографическими поверхностями связываются разные наборы белков. Другой причиной расхождения результатов могло быть то, что в разных исследованиях сыворотка подвергалась различной предобработке: обработке мочевиной [34, 35], фракционированию на анионообменной хроматографической колонке [7] или для исследования использовали термостабильную фракцию сыворотки [37]. Однако вариации методик вряд ли должны были привести к настолько радикальным различиям. Более того, в работах Vlahou с соавторами [35] и Kozak с соавторами [34] были использованы одни и те же белковые чипы и приблизительно одна и та же предобработка сывороток, и тем не менее полученные результаты совершенно различны. Не исключено, что метод SELDI-TOF очень чувствителен к небольшим изменениям условий хранения сывороток и проведения эксперимента, а это ставит под сомнение возможность использования протеомного профиля как универсального диагностического маркера. Еще одним возможным объяснением различий может быть то, что общее количество потенциальных биомаркеров рака в сыворотке очень велико, и какие из них признаны наилучшими – дело случая [33]. Выбор наилучших дискриминаторных пиков может в определенной степени зависеть от использованного биоинформатического метода. Нельзя также

трипсинолиза и масс-спектрометрических методов.

Остановимся подробнее на свойствах идентифицированных белков. Сывороточный амилоид A1 – это известный белок воспаления, уровень которого повышается при многих инфекционных заболеваниях, травмах и воспалительных процессах [41]. Есть, в том числе, данные о повышении его концентрации в крови при раке легких [42, 43] и почек [44].

Транстиретин является основным переносчиком тироксина и трийодтиронина в крови и способствует транспорту ретинола через взаимодействие с ретинол-связывающим белком. У трансгенных мышей, не экспрессирующих транстиретин, очень сильно понижен уровень ретинола и ретинол-связывающего белка, что, в свою очередь ассоциировано с повышенной скоростью злокачественного перерождения эпителия яичника [7].

Аполипротеин A1 также продуцируется печенью и его концентрация напрямую связана с наличием или отсутствием воспалительного процесса [45].

Оценим примерный диапазон концентраций в сыворотке указанных биомаркеров. Для сывороточного амилоида это концентрации, равные примерно 2,5 мкМ в норме и до 170 мкМ при патологии [37], для аполипопротеина A1 – около 50 мкМ, для транстиретина около 15 мкМ [7]. Исходя из этих цифр, можно сделать вывод, что концентрации идентифицированных к настоящему моменту биомаркеров, детектируемых методом SELDI, сопоставимы и достаточно высоки. Поэтому реальная чувствительность SELDI, по-видимому, невелика и вряд ли можно рассчитывать на то, что с помощью этого метода можно будет выявить маркеры, присутствующие в следовых количествах.

Все идентифицированные на настоящий момент белки являются продуктами не самой раковой ткани, а печени и, следовательно, повышение их концентрации в крови является следствием системного ответа организма на присутствие злокачественного новообразования. Изменение концентрации многих из найденных биомаркеров может быть вызвано не только раком, но и другими воспалительными процессами. Но значит ли это, что на основе соотношения концентраций нельзя диагностировать рак с высокой специфичностью?

7.6. Анализ модификаций белков с использованием технологии SELDI.

В работе Fung с соавторами [46] продемонстрировано, что анализ модификаций указанных белков позволяет существенно повысить специфичность диагностики. Несмотря на общность белков, участвующих в процессе воспаления, для каждого заболевания, в том числе для различных видов рака, в деталях этот ответ различается [47]. Важную роль в иммунном ответе организма на воспаление играют протеазы и ингибиторы протеаз [48]. Сами эти белки находятся в крови и тканях в ничтожных количествах, но результатом их активности становится появление в крови специфических наборов протеолитических фрагментов, в том числе и мажорных белков, к которым можно отнести и описанные выше биомаркеры. Fung с соавторами продемонстрировали [46], что технология SELDI-TOF, по крайней мере в некоторых случаях, может быть успешно использована для анализа соотношения различных модификаций одного и того же белка; в этом заключается бесспорное преимущество SELDI-TOF по сравнению с традиционным иммуноферментным анализом. В работе были исследованы соотношения в сыворотках пациентов, больных разными видами рака (толстой кишки, простаты, молочной железы и яичника), разных форм транстиретина и интер- α -трипсинового ингибитора. К указанным белкам были получены антитела, и с их использованием была проведена аффинная хроматография сывороток пациентов, больных раком, и здоровых людей. Белки и их фрагменты, связавшиеся с антителами, наносили на катионообменный и анионообменный чипы. Полученные спектры анализировали.

Такая процедура позволила выявить наличие четырех форм транстиретина: полноразмерного немодифицированного транстиретина, формы с отщепленными десятью N-концевыми аминокислотами, а также двух форм, модифицированных

цистеином и глутатионом. При этом соотношение четырех указанных форм для исследованных видов рака существенно различалось. Особенно интересные результаты были получены при анализе рака толстой кишки: согласно полученным ранее с помощью иммуноферментного анализа данным, у пациентов с раком толстой кишки уровень транстиретина был существенно снижен, как и у пациентов с раком яичника [7], в то же время, подробный анализ форм транстиретина показал, что если концентрация полноразмерной формы и формы с отщепленным N-концевым участком действительно понижается при обоих видах рака, то концентрация цистеинилированной и глутатионилированной форм существенно понижена только при раке яичника [46].

Полученные Fung с соавторами результаты [46] демонстрируют новую перспективу развития SELDI, позволяющие совместить профилирование с использованием антител к белкам и проводить анализ модификаций предполагаемых биомаркеров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. В свете изложенного выше, можно отметить, что для использования технологии SELDI для диагностики, надо решить несколько проблем. Прежде всего, необходимо идентифицировать как можно больше биомаркеров. Измерение концентрации найденных биомаркеров альтернативными методами, такими как иммуноферментный анализ, поможет выяснить реальную чувствительность метода SELDI при работе со сложными биологическими жидкостями и определить, в каких пределах концентраций его данные можно считать количественными. Кроме того, идентификация биомаркеров поможет выяснить причины их появления в крови, позволит ответить на вопрос, являются ли они непосредственными продуктами опухоли или следствием системного ответа организма на присутствие опухоли.

Перспективы использования SELDI-TOF можно по-прежнему свести к двум направлениям: одно из них предполагает обязательную идентификацию маркеров, другое предполагает создание системы диагностики на основе протеомного профиля как такового. Преимущества и возможности первого подхода, пожалуй, наиболее ярко продемонстрированы в работе Fung с коллегами [46]. Другое огромное преимущество работы с идентифицированными биомаркерами – это относительно простой контроль за воспроизводимостью результатов и в большинстве случаев – возможность проверки результатов альтернативными методами.

Развитие второго направления, без идентификации биомаркеров, основной своей задачей имеет получение хорошей воспроизводимости результатов внутри и между лабораториями. Для достижения этой цели необходимо проведение совместных работ многими лабораториями с использованием одного и того же материала для исследования. Также должен осуществляться контроль воспроизводимости результатов в зависимости от времени. Первые попытки проверки сходимости результатов, получаемых с помощью SELDI были проведены большой научной группой [49]. Было продемонстрировано, что достижение хорошей воспроизводимости результатов между лабораториями возможно при соблюдении строго стандартизованных условий эксперимента.

В заключение следует отметить, что, несмотря на значительные успехи в разработке протеомных методов диагностики рака яичника, ни один из них пока широко в клинической практике не используется. Однако стремительное развитие новых технологий позволяет надеяться, что в ближайшем будущем появится доступный и надежный метод диагностики рака яичника, в том числе на ранних стадиях. При этом введение в медицинскую практику методов протеомики не исключает одновременное применение “классических” маркеров, обнаруженных предложенными ранее методами, например, посредством онкоиммунологии. Представляется, что успех ранней диагностики злокачественных опухолей может быть достигнут именно путем объединения результатов, полученных в разных областях технологии, одной из которых является протеомика.

Работа выполнена при поддержке программы “Протеомика в медицине”
Российской академии медицинских наук.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Jacobs I.J., Menon U.* (2004) *Mol. Cell. Proteomics.*, **3**, 355-366
2. *Petricoin E.F. III, Ardekani A.M., Hitt B.A., Levine P.J., Fusaro V.A., Steinberg S.M., Mills G.B., Simone C., Fishman D.A., Kohn E.S.* (2002) *Lancet*, **359**, 572-577
3. *Key T.J., Allen N.E., Verkasalo P.K., Banks E.* (2001) *Proc. Nutr. Soc.*, **60**, 81-89
4. *Murta E.F., da Silva C.S., Gomes R.A., Tavares-Murta B.M., Melo A.L.* (2004) *Eur. J. Gynaecol. Oncol.*, **25**, 707-712
5. *Adam B.L., Qu Y., Davis J.W., Ward M.D., Clements M.A., Cazares L.H., Semmes O.J., Schellhammer P.F., Yasui Y., Feng Z., Wright G.L. Jr.* (2002) *Cancer Res.*, **62**, 3609-3614
6. *Jacobs I., Bast R.C. Jr.* (1989) *Hum. Reprod.*, **4**, 1-12
7. *Zhang Z., Bast R.C., Yu J., Li J., Sokoll L.J., Rai A.I., Rosenzweig J.M., Hacker N.F., Bruijn H.W., Zee A.G., Jacobs I.J., Fung E.T., Chan D.W.* (2004). *Cancer Res.*, **64**, 5882-5890
8. *Skates S.J., Horick N., Yu Y., Xu F.J., Berchuck A., Havrilesky L.J., de Bruijn H.W., van der Zee A.G., Woolas R.P., Jacobs I.J., Zhang Z., Bast R.C. Jr.* (2004) *J. Clin. Oncol.*, **22**, 4059-4066
9. *Jacobs I.J., Rivera H., Oram D.H., Bast R.C. Jr.* (1993) *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, **100**, 1120-1124
10. *Woolas R.P., Conaway M.R., Xu F., Jacobs I.J., Yu Y., Daly L., Davies A.P., O'Brian K., Berchuck A., Soper J.T.* (1995) *Gynecol. Oncol.*, **59**, 111-116
11. *Zhang Z., Barnhill S.D., Zhang H., Xu F., Yu Y., Jacobs I., Woolas R.P., Berchuck A., Madyastha K.R., Bast R.C. Jr.* (1999) *Gynecol. Oncol.*, **73**, 56-61
12. *Li J., Zhang Z., Rosenzweig J.M., Wang Y.Y., Chan D.W.* (2002) *Clin. Chem.*, **48**, 1296-1304
13. *Katopodis N., Glantz M.J., Kim L., Dafni U., Wu J.K., Perides G.* (2001) *Cancer*, **92**, 856-862
14. *Brower S.T., Tartter P., Weiss S., Luderer A.A., Lehrer S.* (1995) *Mt. Sinai J. Med.*, **62**, 419-421
15. *Xu F.J., Yu Y.H., Daly L., Anselmino L., Hass G.M., Berchuck A., Rodriguez G.C., Soper J.T., Clarke-Pearson D.L., Hollis D., et al.* (1994) *Cancer*, **73**, 1855-1858
16. *Nozawa S., Aoki D., Yajima M., Tsukazaki K., Kobayashi T., Kimura E., Terashima Y., Inaba N., Takamizawa H., Negishi Y., et al.* (1992) *Cancer Res.*, **52**, 1205-1209
17. *Skates S., Troiano R., Knapp R.C.* (2003) *Int. J. Gynecol. Cancer*, **13**, 693-696
18. *Petricoin E.F. III, Liotta L.A.* (2004) *Current Opinion in Biotechnology*, **15**, 24-30
19. *Xiao Z., Prieto D., Conrads T.P., Veenstra T.D., Issaq H.J.* (2005) *Mol. Cell. Endocrinol.*, **230**, 95-106
20. *Говорун В.М., Арчаков А.И.* (2002) *Биохимия*, **67**, 1341-1359.
21. *Hanash S.* (2003) *Nature*, **422**, 226-232
22. *Craven R.A., Totty N., Harnden P., Selby P.J., Banks R.E.* (2002) *Am. J. Pathol.*, **160**, 815-822
23. *Wulfschle J.D., Liotta L.A., Petricoin E.F. III.* (2003) *Nature Reviews*, **3**, 267-275
24. *Unlu M., Morgan M.E., Minden J.S.* (1997) *Electrophoresis*, **18**, 2071-2077
25. *Zhou G., Li H., DeCamp D., Chen S., Shu H., Gong Y., Flaig M., Gillespie J.W., Hu N., Taylor P.R., Emmert-Buck M.R., Liotta L.A., Petricoin E.F. III, Zhao Y.* (2002) *Mol. Cell. Proteomics*, **1**, 117-124
26. *Alaiya A.A., Franzen B., Moberger B., Silfversward C., Linder S., Auer G.* (1999) *Electrophoresis*, **20**, 1039-1046

27. Bergman A.C., Benjamin T., Alaiya A., Waltham M., Sakaguchi K., Franzen B., Linder S., Bergman T., Auer G., Appella E., Wirth P.J., Jornvall H. (2000) Electrophoresis, **21**, 679-686
28. Alaiya A.A., Franzen B., Hagman A., Dysvik B., Roblick U.J., Becker S., Moberger B., Auer G., Linder S. (2002) Int. J. Cancer, **98**, 895-899
29. Rodland K.D. (2004) Dis. Markers, **20**, 129-130
30. Stanciute D., Didziapetriene J., Kadziauskas J. (2004) Medicina (Kaunas) **40**, 1143-1150
31. Madri J.A. (2003) Curr. Top. Dev. Biol., **54**, 391-410
32. Petricoin E.F. III, Liotta L.A. (2003) Clin. Chem., **3**, 1276-1278
33. Diamandis E.P. (2003) Clin. Chem., **3**, 1272-1276
34. Kozak K.R., Amneus M.W., Pusey S.M., Su F., Luong M.N., Luong S.A., Reddy S.T., Farias-Eisner R. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **100**, 12343-12348
35. Vlahou A., Schorge J.O., Gregory B.W., Coleman R.L. (2003) J. Biom. Biotechnol., **5**, 308-314
36. Zhu W., Wang X., Ma Y., Rao M., Glimm J., Kovach J.S. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **100**, 14666-14671
37. Moshkovskii S., Serebryakova M., Kuteykin-Teplyakov K., Tikhonova O., Goufman E., Zgoda V., Taranets I., Makarov O., Archakov A. (2005) Proteomics, **5**, in press.
38. Nicole White C., Zhang Z., Chan D.W. (2005) Clin. Chem. Lab. Med., **43**, 125-126
39. Kuesel A.C., Kroft T., Prefontaine M., Smith I.C. (1992) Int. J. Cancer., **52**, 341-346
40. Mahlick C.G., Grankvist K. (1994) Gynecol. Obstet. Invest., **37**, 135-140
41. Urieli-Shoval S., Cohen P., Eisenberg S., Matzner Y. (1998) J. Histochem. Cytochem., **46**, 1377-1384
42. Howard B.A., Wang M.Z., Campa M.J., Corro C., Fitzgerald M.C., Patz E.F. Jr (2003) Proteomics, **3**, 1720-1724
43. Khan N., Cromer C.J., Campa M., Patz E.F. Jr (2004) Cancer, **101**, 379-384
44. Kimura M., Tomita Y., Imai T., Saito T., Katagiri A., Ohara-Mikami Y., Matsudo T., Takahashi K. (2001) Cancer, **92**, 2072-2075
45. Chait A., Han C.Y., Oram J.F., Heinecke J.W. (2005) J. Lipid Res., **46**, 389-403
46. Fung E.T., Yip T.T., Lomas L., Wang Z., Yip C., Meng X.Y., Lin S., Zhang F., Zhang Z., Chan D.W., Weinberger S.R. (2005) Int. J. Cancer, **115**, 783-789
47. Sheth K., Bankey P. (2001) Curr. Opin. Crit. Care, **7**, 99-104
48. Bank U., Kruger S., Langner J., Roessner A. (2000) Adv. Exp. Med. Biol., **477**, 349-378
49. Semmes O.J., Feng Z., Adam B.L., Banez L.L., Bigbee W.L., Campos D., Cazares L.H., Chan D.W., Grizzle W.E., Izbicka E., Kagan J., Malik G., McLerran D., Moul J.W., Partin A., Prasanna P., Rosenzweig J., Sokoll L.J., Srivastava S., Srivastava S., Thompson I., Welsh M.J., White N., Winget M., Yasui Y., Zhang Z., Zhu L. (2005) Clin. Chem., **51**, 102-112

Поступила 07.12.2004

MOLECULAR DIAGNOSTICS OF OVARIAN CANCER USING PROTEOME
TECHNIQUES

M.A. Vlasova¹, S.A. Moshkovskii¹, M.R. Safurova², O.V. Makarov², A.I. Archakov¹

¹Institute of Biomedical Chemistry; 10 Pogodinskaya Str., Moscow, 119121 Russia;
e-mail: sergei.moshkovskii@ibmc.msk.ru; fax: 007-095-245-0857

²Russian State Medical University

Ovarian cancer is most common gynecological malignancy which is difficult for early diagnostics. Development of new methods for diagnostics of ovarian cancer, especially, on early stage, is the urgent problem of modern oncology. A general approach to early diagnostics of cancer is a discovery of specific blood disease biomarkers. Ovarian cancer biomarker used in the modern art, CA125, has some drawbacks resulting in extensive research recently directed to this tumor diagnosis. In particular, it was shown the advantage of parallel use of several diagnostic biomarkers instead of the single one. Proteome techniques (two-dimensional electrophoresis, mass-spectrometry methods) in connection to bioinformatics represent a powerful tool for new biomarker discovery. In this respect, the best method of choice is shown to be SELDI-TOF (Surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight) technique which combines chromatography protein chip application and mass-spectrometry-based detection. In this review, new ovarian biomarker data obtained by proteome methods are summarized.

Key words: ovarian cancer, biomarker, proteomics, mass-spectrometry, protein chips, SELDI