

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

ЛИПИДОМНЫЕ МАРКЕРЫ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ТИПОВ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

А.О. Токарева^{1}, В.В. Чаговец¹, Н.Л. Стародубцева¹,
В.В. Родионов¹, В.В. Кометова¹, К.С. Чингин², В.Е. Франкевич^{1,3}*

¹Национальный медицинский исследовательский центр
акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова,
117997, Москва, ул. академика Опариной, 4 стр. 2; *эл. почта: alisa.tokareva@phystech.edu

²Jiangxi Key Laboratory for Mass Spectrometry and Instrumentation, East China University of Technology,
Nanchang, 330013 P. R. China

³Сибирский государственный медицинский университет, 634050, Томск

Молекулярный профиль опухоли ассоциирован с её гистологическим типом и может быть использован как для изучения механизмов прогрессирования опухоли, так и для её диагностики. В данной работе исследовали изменения липидного профиля злокачественной опухоли молочной железы и пограничной с опухолью ткани в контексте возможности определения гистологического типа опухоли по липидному профилю ткани. Липидное профилирование выполняли, используя обратно-фазовый хромато-масс-спектрометрический анализ липидного экстракта тканей с идентификацией липидов по характерным фрагментам. Потенциальные липидные маркеры гистологического типа опухоли определяли с использованием теста Крускала-Уоллиса. Влияние потенциальных маркеров на метаболические пути оценивали с использованием возможностей MetaboAnalyst. Для построения классифицирующих моделей использовали машину опорных векторов с архитектурой 1-против-1 и линейным ядром. Валидацию модели осуществляли с использованием кросс-валидации по отдельному объекту. Модели на основе липидного профиля пограничных тканей имели точность 99% и 75%, модели на основе липидного профиля опухолевых тканей 90% и 40% для режима положительных ионов и режима отрицательных ионов соответственно. Липидный профиль пограничных тканей может быть использован для определения гистологического типа опухоли при раке молочной железы. В пограничной ткани и в опухолевой статистически значимо изменяются пути метаболизма глицерофосфолипидов.

Ключевые слова: масс-спектрометрия; липидомика; рак молочной железы; микроокружение опухоли; гистологический тип опухоли

DOI: 10.18097/PBMC20226805375

ВВЕДЕНИЕ

Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее распространённым типом злокачественных новообразований (ЗНО) у женщин, составляя до четверти всех случаев [1]. РМЖ представляет собой группу ЗНО с различными геномными и гистопатологическими особенностями, которые связаны с различной клинической историей, факторами риска и прогнозом. Наиболее распространённым гистологическим вариантами являются протоковый рак (80%), реже встречаются дольковый (15%) и смешанный варианты (5%). Около 25% всех случаев приходится на 17 гистологических подтипов, объединённых термином “специфический вариант” [2-4]. Гистологический тип опухоли влияет на выживаемость пациентов [3], ответ на проводимую химиотерапию [5] и характеризуется наличием

определённых молекулярных маркеров [6, 7]. На данный момент представляют интерес возможности идентификации гистологического типа опухоли до операции, например, с помощью магнитно-резонансной томографии [2]. Альтернативой являются методы анализа молекулярного профиля ткани, не подверженные влиянию артефактов изображения и уровня квалификации персонала, но требующие забора биопсийного материала. На данный момент показана возможность эффективной классификации молекулярных подтипов РМЖ на основе метаболомных профилей, полученных методом Рамановской спектроскопии [8, 9]. Масс-спектрометрия является эффективным методом нецелевого анализа молекулярного профиля, позволяющего различать ЗНО различных гистологических вариантов [10, 11].

Принятые сокращения: Cer-NS – ceramide, церамид; CL – cardiolipin, кардиолипин; FDR – false discovery rate, вероятность ложного открытия (скорректированное значение *p*); Ke – кетонный радикал; MGDG – monogalactosyldiacylglycerol, моногалактозилдиацилглицерол; O – алкильный липид; Ox(L) – окисленный (класс липида); P – плазмалоген; PC – phosphatidylcholine, фосфатидилхолин; PE – phosphatidylethanolamine, фосфатидилэтаноламин; PEtOH – phosphatidylethanol, фосфатидилэтанол; PG – phosphatidylglycerol, фосфатидилглицерол; PS – phosphatidylserine, фосфатидилсерин; SM – sphingomyelin, сфингомиелин; TG – triacylglycerol, триацилглицерол; X:Y – жирнокислотный остаток длиной X атомов углерода с Y двойными связями; ВЭЖХ-МС – высокоэффективная жидкостная хромато-масс спектрометрия; ЗНО – злокачественные новообразования; РМЖ – рак молочной железы.

МАРКЕРЫ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ТИПОВ ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Целью данного исследования была оценка возможности дифференциации гистологического ЗНО молочной железы по липидному профилю тканей, полученному с использованием хромато-масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС) и исследование влияния на метаболические пути типа опухоли.

МЕТОДИКА

В исследование были включены образцы от 84 пациенток с диагностированным раком молочной железы, проходивших лечение в Национальном медицинском исследовательском центре акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова (НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова) и задействованных ранее в исследовании липидных маркеров опухолевой прогрессии. [12] Во время хирургического вмешательства был произведён забор образцов ткани, взятых неросредственно из опухоли молочной железы и из приграничной ткани (опухолевое поле). Все образцы были

исследованы гистологически. Опухоль от 24 пациенток относилась к протоковому гистологическому типу, от 16 – к дольковому гистологическому типу, опухоли от 32 пациенток — к смешанному гистологическому типу и 12 опухолей — к специфическим гистологическим типам (табл. 1).

Липиды из тканей выделяли методом Фолча [13]. Разделение липидных экстрактов и масс-спектрометрический анализ осуществляли ранее описанным методом [12]. Предобработку полученных данных и идентификация липидов по характерным ионам фрагментации осуществляли с использованием протокола, предложенного Koelmel [12, 14].

Липиды, характеризующие различия между гистологическими типами, определяли с использованием теста Крускала-Уоллиса, с пороговым значением статистической значимости $p < 0,001$. Выбранные липиды были использованы для построения классифицирующей модели на основе машины опорных векторов с линейным ядром, использующей для решения многоклассовых задач архитектуру

Таблица 1. Клиническая характеристика опухолей каждого типа. Распределение по категориальным параметрам указано в формате “число случаев для данного типа опухоли” (“доля в процентах от общего числа случаев данного типа опухоли”). Распределение по непрерывным параметрам дано в формате “среднее значение” (“минимальное значение” – “максимальное значение”)

Клинический параметр	Значение			
	Протоковый	Дольковый	Смешанный	Специфический
Размер опухоли, см	2,5 (1,5–4,1)	3,7 (1,3–10,0)	2,5 (1,5–4,2)	2,4 (1,7–3,5)
Количество опухолевых узлов (мультифокальность)				
1	20 (83,3%)	14 (87,5%)	24 (75,0%)	10 (83,3%)
2	4 (16,7%)	0 (0,0%)	4 (12,5%)	2 (16,7%)
3	0 (0,0%)	2 (12,5%)	4 (12,5%)	0 (0,0%)
Молекулярные подтипы:				
Люминальный А	8 (33,3%)	10 (62,5%)	8 (25,0%)	6 (50,0%)
Люминальный В-	10 (41,7%)	6 (37,5%)	22 (68,8%)	2 (16,7%)
Люминальный В+	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (6,3%)	0 (0,0%)
Her2+	2 (8,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Трижды негативный	4 (16,7)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	4 (33,3%)
Степень злокачественности, G:				
1	0 (0,0%)	2 (12,5%)	2 (6,3%)	2 (16,7%)
2	8 (33,3%)	12 (75,0%)	20 (62,5%)	4 (33,3%)
3	16 (66,6%)	2 (12,5%)	10 (31,3%)	6 (50,0%)
Суммарный балл злокачественности	14,9 (10–18)	15,0 (13–16)	14,5 (10–17)	13,7 (8–17)
Ноттингемский прогностический индекс	4,7 (3,3–6,5)	5,0 (3,3–7,0)	4,6 (2,3–6,8)	4,0 (3,3–4,7)
Число метастазов в регионарные лимфоузлы	1,2 (0–7)	4,6 (0–11)	2,6 (0–16)	0,2 (0–1)
Стадия рака:				
I:	6 (25,0%)	4 (25,0%)	4 (12,5%)	6 (50,0%)
IIa	10 (41,7%)	0 (0,0%)	14 (43,8%)	4 (33,3%)
IIb	6 (25,0%)	4 (25,0%)	10 (31,3%)	2 (16,7%)
IIIa	2 (8,3%)	4 (25,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
IIIb	0 (0,0%)	4 (25,0%)	4 (12,5%)	0 (0,0%)
Эстрогеновые рецепторы:				
есть	18 (75,0%)	16 (100,0%)	32 (100,0%)	8 (66,7%)
нет	6 (25,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	4 (33,3%)
Прогестероновые рецепторы				
есть	8 (33,3%)	10 (62,5%)	32 (100,0%)	8 (66,7%)
нет	16 (66,7%)	6 (37,5%)	0 (0,0%)	4 (33,3%)
Уровень Ki67	41,8 (6–98)	17,4 (7–28)	34,6 (12–80)	43,0 (5–90)

1-против-1. Точность классификации определяли с использованием кросс-валидации по отдельному объекту. Для липидов, характеризующих различия между метаболическими путями, была проведена оценка их вовлечённости в метаболические пути исходя из гипергеометрического теста с коррекцией по Бенджамини-Хохбергу средствами MetaboAnalyst и библиотеки KEGG [15, 16]. Влияние метаболического пути оценивали вкладом маркера в путь исходя из топологического анализа и меры относительного посредничества. К путям, связанным с гистологическим типом статистически значимо, относили пути с скорректированным значением p -value (false discovery rate, FDR) меньше 0,05. Статистический анализ производили с использованием возможностей и подключаемых библиотек языка R 3.4.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В пограничной ткани молочной железы было обнаружено 38 липидов в режиме положительных ионов (дополнительные материалы, табл. S1) и 25 липидов в режиме отрицательных ионов (дополнительные материалы, табл. S2), которые

характеризуют различия между гистологическими типами опухоли, преимущественно относящихся к окисленным липидам, триглицеридам, кардиолипинам, фосфатидилхолинам, фосфатидилэтаноламинам и липидам с простой эфирной связью. В опухолевой ткани молочной железы было обнаружено 15 липидов в режиме положительных ионов (дополнительные материалы, табл. S3) и 8 липидов в режиме отрицательных ионов (дополнительные материалы, табл. S4), которые характеризуют различия между гистологическими типами опухоли, относящихся преимущественно к фосфатидилхолинам, фосфатидилэтаноламинам, фосфатидилглицеридам и липидам с простой эфирной связью.

Классифицирующие модели, построенные с использованием машины опорных векторов, имели точность 99% для профиля, полученного в режиме положительных ионов из пограничной ткани (табл. 2), 75% для профиля, полученного в режиме отрицательных ионов из пограничной ткани (табл. 3), 90% для профиля, полученного в режиме положительных ионов из опухолевой ткани (табл. 4), 40% для профиля, полученного в режиме отрицательных ионов из опухолевой ткани (табл. 5).

Таблица 2. Таблица сопряжения для классифицирующей модели на основе липидов пограничной ткани, зарегистрированных в режиме положительных ионов. В скобках указаны чувствительность и специфичность определения каждого гистологического типа

	Протоковый	Дольковый	Смешанный	Специфический
Протоковый	24(100%, 100%)	0	0	0
Дольковый	0	16(100%, 100%)	0	0
Смешанный	0	0	32(100%, 98%)	1
Специфический	0	0	0	11 (92%, 100%)

Таблица 3. Таблица сопряжения для классифицирующей модели на основе липидов пограничной ткани, зарегистрированных в режиме отрицательных ионов. В скобках указаны чувствительность и специфичность определения каждого гистологического типа

	Протоковый	Дольковый	Смешанный	Специфический
Протоковый	16(67%, 87%)	0	7	1
Дольковый	0	15(94%, 99%)	1	0
Смешанный	8	1	23(72%, 79%)	2
Специфический	0	0	1	9(75%, 99%)

Таблица 4. Таблица сопряжения для классифицирующей модели на основе липидов опухолевой ткани, зарегистрированных в режиме положительных ионов. В скобках указаны чувствительность и специфичность определения каждого гистологического типа

	Протоковый	Дольковый	Смешанный	Специфический
Протоковый	20(83%, 98%)	0	1	0
Дольковый	0	15(94%, 99%)	1	0
Смешанный	3	1	30(94%, 90%)	1
Специфический	1	0	0	11(91%, 99%)

Таблица 5. Таблица сопряжения для классифицирующей модели на основе липидов опухолевой ткани, зарегистрированных в режиме отрицательных ионов. В скобках указаны чувствительность и специфичность определения каждого гистологического типа

	Протоковый	Дольковый	Смешанный	Специфический
Протоковый	9(38%, 77%)	1	6	4
Дольковый	3	6(60%, 87%)	6	0
Смешанный	10	9	17(53%, 52%)	6
Специфический	2	0	3	2(17%, 93%)

МАРКЕРЫ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ТИПОВ ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

14 липидов для модели на основе профиля пограничной ткани в режиме положительных ионов (дополнительные материалы, рис. S1), 18 липидов для модели на основе профиля пограничной ткани в режиме отрицательных ионов (дополнительные материалы, рис. S2), 14 липидов для модели на основе профиля опухолевой ткани в режиме положительных ионов (дополнительные материалы, рис. S3) хотя бы для одной бинарной классифицирующей модели имели относительный вес больше 0,5. PC 18:1_22:6, PE 18:1_20:4, CL 16:0_18:1_20:4_22:5, CL 16:0_18:1_20:4_22:5, MGDG 18:0_20:2, OхCL 18:2_20:3(OH)_20:3_20:4, PC 14:0_20:4, PC 18:1_20:4, PE 18:1_20:4 в пограничной ткани можно назвать маркерами, характеризующими протоковый тип опухоли; OхTG 22:1(OH)_18:4(OO)_14:1, PE P-16:0/18:2, TG 10:0_18:2_18:2 в пограничной ткани, PE 18:1_20:4, PE P-16:0/18:2, TG 18:2_18:2_22:6 в опухолевой ткани — потенциальные маркеры долькового типа опухоли. OхTG 14:0_16:1_18:2(OH), OхTG 16:0_18:1_22:5(OOO) в пограничной ткани характеризуют отличия специфических типов опухоли от протокового, долькового и смешанного.

В пограничной ткани статистически значимым изменениям подвергся метаболизм глицерофосфолипидов (табл. 6, рис. 1). Статистически незначимым изменениям подверглись пути метаболизма липидов с простой эфирной связью, глицеролипидов и биосинтеза гликозилфосфатидилинозитоловых якорей.

Аналогично, на метаболизм глицерофосфолипидов статистически значимое влияние оказывается и в опухолевой ткани (табл. 7, рис. 2). Статистически незначимое влияние оказывается на пути метаболизма сфинголипидов, липидов с простой эфирной связью, глицеролипидов и биосинтез гликозилфосфатидилинозитоловых якорей.

Метаболизм глицерофосфолипидов, различия в котором статистически значимо проявляются и для опухолевой, и для пограничной ткани при различающихся гистологических типах опухоли, изменяется при трансформации нормальной ткани в злокачественную, причём изменения нарастают по мере прогрессирования заболевания [17]. Для ацильных фосфатидилхолинов пограничной ткани характерно повышение уровня в случае опухолей протокового типа относительно других групп, за исключением PC 12:0_14:1 и PC 16:1_16:1

(дополнительные материалы, табл. S1). Уровни данных фосфатидилхолинов пограничной ткани максимальны в случае смешанного типа опухоли и специфического типа опухоли соответственно (дополнительные материалы, табл. S1, S2). При этом для уровней фосфатидилхолинов в пограничных тканях опухолей смешанного типа нехарактерно занятие промежуточных значений между уровнями в пограничной ткани протокового типа и долькового типа. Аналогичная картина характерна для ацильных фосфолипидов опухолевой ткани (дополнительные материалы, табл. S1, S2). Уровни фосфатидилхолина в опухолевой ткани положительно коррелируют со степенью дифференцировки опухоли и уровнем Ki67 в ней [12]. Уровень кардиолипидов в тканях микроокружения коррелирует со стадией развития рака. Кроме того, кардиолипид является участником сигнальных путей, связанных с активацией апоптоза, окисление кардиолипидов упрощает прохождение жидкостей через митохондриальную мембрану [18]. И в пограничной, и в опухолевой ткани

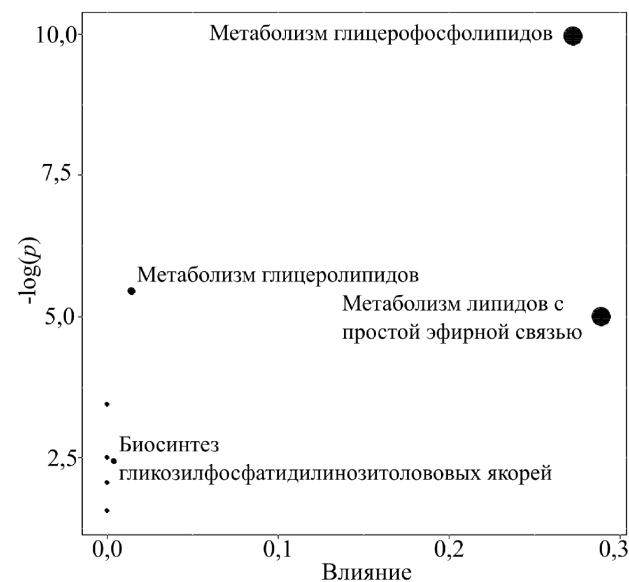


Рисунок 1. График влияния на метаболические пути липидов-маркеров в пограничной ткани. Подписаны пути, для которых значение влияния отлично от нуля. $\log(p)$ — десятичный логарифм статистической значимости влияния.

Таблица 6. Число соединений, задействованных в липидных метаболических путях в пограничной ткани, число липидных маркеров в каждой, влияние маркеров на путь и статистическая значимость влияния (не скорректированная и с корректировкой)

Путь	Всего	Липиды-маркеры	p	FDR	Влияние
Метаболизм глицерофосфолипидов	36	4	<0,001	0,004	0,270
Метаболизм глицеролипидов	16	2	0,004	0,180	0,010
Метаболизм липидов с простой эфирной связью	20	2	0,007	0,190	0,270
Метаболизм линолеиновой кислоты	5	1	0,030	0,670	0,000
Метаболизм альфа-линоленовой кислоты	13	1	0,008	1,000	0,000
Биосинтез гликозилфосфатидилинозитоловых якорей	14	1	0,090	1,000	0,004
Метаболизм сфинголипидов	21	1	0,130	1,000	0,000
Метаболизм арахидоновой кислоты	36	1	0,210	1,000	0,000

Таблица 7. Число соединений, задействованных в липидных метаболических путях в опухолевой ткани, число липидных маркеров в каждой, влияние маркеров на путь и статистическая значимость влияния (не скорректированная и с корректировкой)

Пути	Всего	Липиды-маркеры	p	FDR	Влияние
Метаболизм глицерофосфолипидов	36	4	<0,001	0,004	0,270
Метаболизм сфинголипидов	21	2	0,007	0,310	0,270
Метаболизм линолеиновой кислоты	5	1	0,030	0,890	0,000
Метаболизм альфа-линоленовой кислоты	13	1	0,080	1,000	0,000
Биосинтез гликозилфосфатидилинозитоловых якорей	14	1	0,090	1,000	0,004
Метаболизм глицеролипидов	16	1	0,100	1,000	0,010
Метаболизм липидов с простой эфирной связью	20	1	0,120	1,000	0,110
Метаболизм арахидоновой кислоты	36	1	0,210	1,000	0,000

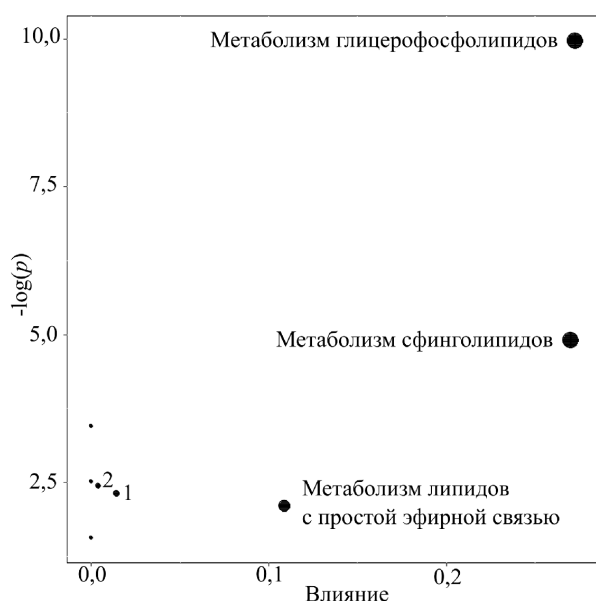


Рисунок 2. График влияния на метаболические пути липидов-маркеров в пограничной ткани. Подписаны пути, для которых значение влияния отлично от нуля. $\log(p)$ — десятичный логарифм статистической значимости влияния.

для случаев опухолей протокового типа характерно повышение уровня кардиолипина (дополнительные материалы, табл. S2, S4). В то же время только для пограничной ткани специфических типов опухоли характерно падение уровней кардиолипина относительно других гистологических типов опухоли (дополнительные материалы, табл. S2). Уровень фосфатидилсеринсинтазы, отвечающей за синтез фосфатидилсерина, который является предшественником фосфатидилэтаноламина, падает по мере развития опухоли [19]. Уровень фосфатидилхолинспецифичной фосфолипазы C, отвечающей за катаболизм фосфатидилэтаноламинов и фосфатидилхолинов до диацилглицеролов, повышается при образовании раковых клеток и стимулирует метастатические процессы и рост опухоли [20, 21]. Повышение уровня холинфосфотрансферазы, отвечающей за обратный процесс, приводит к росту пролиферации клеток [22]. Уровень экспрессии этаноламинфосфотрансферазы

растёт в клетках аденокарциномы лёгких по сравнению с нормальными клетками и является признаком худшей выживаемости пациентов при раке лёгких [23]. Уровень фосфатидилэтаноламинов в пограничных тканях в основном падает в следующем порядке перечисления случаев: протоковый тип, дольковый тип, смешанный тип (дополнительные материалы, табл. S1, S2). Исключения составляют PE 18:0_22:3, где уровни в случае смешанного типа занимают промежуточное значение и PE 18:1_20:4, где уровни в случаях смешанного типа и долькового типа близки (дополнительные материалы, табл. S1). В опухолевой ткани для PE 18:1_20:4 характерен наиболее высокий уровень в случае долькового типа и наименее — в случае смешанного типа. Уровень PE 20:4_20:5 изменяется в ряду специфический тип и протоковый тип — смешанный тип — дольковый тип (дополнительные материалы, табл. S3). Плазманилэтаноламиндесатураза наряду с фосфолипазой C, холинфосфотрансферазой, этаноламинфосфотрансферазой является участником метаболизма липидов с простой эфирной связью, также ассоциирована с процессами опухолеобразования [24]. В то же время дефицит плазмалогенов в мембранах макрофагов приводит к снижению их способности к фагоцитозу [25]. Также повышение уровня плазмалогенов в микроокружении опухоли и в опухолевой ткани является потенциальным маркером развития метастатического процесса в регионарных лимфоузлах при раке молочной железы [26]. В опухолевой ткани наблюдается положительная корреляция уровня плазмалогенов с размером опухоли, в пограничной ткани уровни плазмалогенов положительно коррелируют со стадией рака [12]. При этом отношение уровней липидов с эфирной связью в пограничной ткани зависит от их жирнокислотного состава (дополнительные материалы, табл. S1, S2, S3, S4). В то же время можно говорить о преимущественно повышенном уровне липидов с эфирной связью в опухолях протокового и специфического типов относительно смешанного и долькового, за исключением PE P-16:0/18:2 (дополнительные материалы, табл. S3). PE P-18:0/22:6 имеет схожее отношение уровней в зависимости от типа опухоли в пограничной и опухолевой тканях (дополнительные материалы, табл. S1, S3, S4).

Показано, что метаболизм сфинголипидов в опухолевой ткани зависит от гистологического типа опухоли РМЖ. В то же время уровень экспрессии кислой церамидазы при раке яичников зависит от гистологического типа опухоли, а при РМЖ ассоциирован с положительным эстроген-рецепторным подтипом. Кроме того, более высокий уровень экспрессии кислой церамидазы относится к факторам, позволяющим прогнозировать более высокие шансы пациента на выживание [27].

Число соединений в пограничной ткани, уровень которых ассоциирован с гистологическими типами опухоли превышает число соединений в опухолевой ткани, уровень которых ассоциирован с гистологическими типами опухоли. Кроме того, модели, построенные на основе липидного профиля опухолевого поля, имеют лучшее качество, чем модели, построенные на основе липидного профиля опухоли. Гистологический тип опухоли влияет на выживаемость пациентов и на эффективность химиотерапии [3, 5] — параметров, условно ассоциированных с эко-характеристиками опухоли [28]. В предыдущей работе показано наличие более выраженной корреляции эко-параметров опухоли с липидным профилем пограничной ткани по сравнению с липидным профилем опухолевой ткани [12].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Гистологические типы РМЖ характеризуются различным липидным профилем опухоли. Кроме того, изменения в липидном портрете происходят и в пограничных тканях молочной железы. Классификационные модели, построенные на основе липидного профиля пограничных тканей, обладают высокой точностью и потенциально могут быть использованы для определения типа опухоли по результату биопсии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при совместной финансовой поддержке РФФИ (№ 19-515-55021) и ГФЕН (№ 81961138016).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все клинические исследования проводили в соответствии с принципами, изложенными в Хельсинкской декларации. Все пациенты прочитали и подписали информированное согласие, одобренное этическим комитетом НМИЦ имени академика В.И. Кулакова (протокол №9 от 22.11.2018).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Дополнительные материалы доступны в электронной версии статьи на сайте журнала (pbmc.ibmc.msk.ru).

ЛИТЕРАТУРА

1. Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I., Parkin D.M., Piñeros M., Znaor A., Bray F. (2021) Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int. J. Cancer*, **149**(4), 778-789. DOI: 10.1002/IJC.33588
2. Durhan G., Poker A., Settazade E., Karakaya J., Kösemehmetoğlu K., Akpınar M.G., Demirkazık F.B. (2021) Magnetic resonance imaging findings of invasive breast cancer in different histological grades and different histopathological types. *Clin. Imaging*, **76**(1), 98-103. DOI: 10.1016/J.CLINIMAG.2021.01.039
3. Metzger-Filho O., Ferreira A.R., Jeselsohn R., Barry W.T., Dillon D.A., Brock J.E., Vaz-Luis I., Hughes M.E., Winer E.P., Lin N.U. (2019) Mixed invasive ductal and lobular carcinoma of the breast: Prognosis and the importance of histologic grade. *Oncologist*, **24**(7), e441-e449. DOI: 10.1634/THEONCOLOGIST.2018-0363
4. Weigelt B., Geyer F.C., Reis-Filho J.S. (2010) Histological types of breast cancer: How special are they? *Mol. Oncol.*, **4**(3), 192-208. DOI: 10.1016/J.MOLONC.2010.04.004
5. Kunuru S.K.R., Thiyagarajan M., Martin Daniel J., Balaji Singh K. (2020) A study on clinical and pathological responses to neoadjuvant chemotherapy in breast carcinoma. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, **12**, 259-266. DOI: 10.2147/BCTT.S277588
6. Bonacho T., Rodrigues F., Liberal J. (2020) Immunohistochemistry for diagnosis and prognosis of breast cancer: A review. *Biotech. Histochem.*, **95**(2), 71-91. DOI: 10.1080/10520295.2019.1651901
7. Bandyopadhyay S., Bluth M.H., Ali-Fehmi R. (2018) Breast Carcinoma: Updates in molecular profiling 2018. *Clin. Lab. Med.*, **38**(2), 401-420. DOI: 10.1016/J.CLL.2018.02.006
8. Becker-Putsche M., Bocklitz T., Clement J., Rösch P., Popp J. (2013) Toward improving fine needle aspiration cytology by applying Raman microspectroscopy. *J. Biomed. Optics*, **18**(4), 047001. DOI: 10.1117/1.JBO.18.4.047001
9. Talari A.C.S., Rehman S., Rehman I.U. (2019) Advancing cancer diagnostics with artificial intelligence and spectroscopy: identifying chemical changes associated with breast cancer. *Exp. Rev. Mol. Diagn.*, **19**(10), 929-940. DOI: 10.1080/14737159.2019.1659727
10. Mas S., Torro A., Fernández L., Bec N., Gongora C., Larroque C., Martineau P., de Juan A., Marco S. (2020) MALDI imaging mass spectrometry and chemometric tools to discriminate highly similar colorectal cancer tissues. *Talanta*, **208**(10), 120455. DOI: 10.1016/J.TALANTA.2019.120455
11. Sun R., Lyu M., Liang S., Ge W., Wang Y., Ding X., Zhang C., Zhou Y., Chen S., Chen L., Guo T. (2022) A prostate cancer tissue specific spectral library for targeted proteomic analysis. *Proteomics*, **22**(7), 2100147. DOI: 10.1002/PMIC.202100147
12. Токарева А.О., Стародубцева Н.Л., Чаговец В.В., Родионов В.В., Кометова В.В., Чингин К.С., Франкевич В.Е. (2022) Липидные маркеры опухолевой прогрессии у больных раком молочной железы. *Биомедицинская химия*, **68**(2), 144-152. [Tokareva A.O., Starodubtseva N.L., Chagovets V.V., Rodionov V.V., Kometova V.V., Chingina K.S., Frankevich V.E. (2022) Lipidomic markers of tumor progress in breast cancer patients. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **68**(2), 144-152.] DOI: 10.18097/PBMC20226802144
13. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**(1), 497-509.

14. Koelmel J.P., Kroeger N.M., Ulmer C.Z., Bowden J.A., Patterson R.E., Cochran J.A., Beecher C.W.W., Garrett T.J., Yost R.A. (2017) LipidMatch: An automated workflow for rule-based lipid identification using untargeted high-resolution tandem mass spectrometry data. *BMC Bioinformatics*, **18**(1), 1-11. DOI: 10.1186/S12859-017-1744-3
15. Pang Z., Chong J., Zhou G., De Lima Morais D.A., Chang L., Barrette M., Gauthier C., Jacques P.É., Li S., Xia J. (2021) MetaboAnalyst 5.0: Narrowing the gap between raw spectra and functional insights. *Nucl. Acids Res.*, **49**(W1), W388-W396. DOI: 10.1093/NAR/GKAB382
16. Ogata H., Goto S., Fujibuchi W., Kanehisa M. (1998) Computation with the KEGG pathway database. *BioSystems*, **47**(1-2), 119-128. DOI: 10.1016/S0303-2647(98)00017-3
17. Yang T., Hui R., Nouws J., Sauler M., Zeng T., Wu Q. (2022) Untargeted metabolomics analysis of esophageal squamous cell cancer progression. *J. Transl. Med.*, **20**(1), 1-11. DOI: 10.1186/S12967-022-03311-Z
18. Montero J., Mari M., Colell A., Morales A., Basañez G., Garcia-Ruiz C., Fernández-Checa J.C. (2010) Cholesterol and peroxidized cardiolipin in mitochondrial membrane properties, permeabilization and cell death. *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics*, **1797**(6-7), 1217-1224. DOI: 10.1016/j.bbabi.2010.02.010
19. Piyaathana D.W.B., Rajendiran T.M., Putluri V., Vantaku V., Soni T., von Rundstedt F.C., Donepudi S.R., Jing F., Maity S., Ambati C.R., Dong J., Gödde D., Roth S., Störkel S., Degener S., Michailidis G., Lerner S.P., Pennathur S., Lotan Y., Coarfa C., Sreekumar A., Putluri N. (2018) Distinct lipidomic landscapes associated with clinical stages of urothelial cancer of the bladder. *European Urology Focus*, **4**(6), 907-915. DOI: 10.1016/J.EUF.2017.04.005
20. Podo F., Paris L., Cecchetti S., Spadaro F., Abalsamo L., Ramoni C., Ricci A., Pisanu M.E., Sardanelli F., Canese R., Iorio E. (2016) Activation of phosphatidylcholinespecific phospholipase C in breast and ovarian cancer: Impact on MRS-detected choline metabolic profile and perspectives for targeted therapy. *Front. Oncol.*, **6**(8), 2-9. DOI: 10.3389/fonc.2016.00171
21. Paris L., Podo F., Spadaro F., Abalsamo L., Pisanu M.E., Ricci A., Cecchetti S., Altabella L., Buoncervello M., Lozneanu L., Bagnoli M., Ramoni C., Canevari S., Mezzanzanica D., Iorio E., Canese R. (2017) Phosphatidylcholine-specific phospholipase C inhibition reduces HER2-overexpression, cell proliferation and *in vivo* tumor growth in a highly tumorigenic ovarian cancer model. *Oncotarget*, **8**(33), 55022-55038. DOI: 10.18632/oncotarget.18992
22. Akech J., Roy S.S., Das S.K. (2005) Modulation of cholinephosphotransferase activity in breast cancer cell lines by Ro5-4864, a peripheral benzodiazepine receptor agonist. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **333**(1), 35-41. DOI: 10.1016/J.BBRC.2005.05.071
23. Lesko J., Triebl A., Stacher-Priehe E., Fink-Neuböck N., Lindenmann J., Smolle-Jüttner F.M., Köfeler H.C., Hrzenjak A., Olschewski H., Leithner K. (2021) Phospholipid dynamics in *ex vivo* lung cancer and normal lung explants. *Exp. Mol. Med.*, **53**(1), 81-90. DOI: 10.1038/S12276-020-00547-X
24. Yu J., Qu L., Xia Y., Zhang X., Feng J., Duan M., Guo P., Lou Y., Lv P., Lu W., Chen Y. (2022) TMEM189 negatively regulates the stability of ULK1 protein and cell autophagy. *Cell Death Disease*, **13**(4), 1-10. DOI: 10.1038/S41419-022-04722-Y
25. Rubio J.M., Astudillo A.M., Casas J., Balboa M.A., Balsinde J. (2018) Regulation of phagocytosis in macrophages by membrane ethanolamine plasmalogens. *Front. Immunol.*, **9**(7), 1-14. DOI: 10.3389/FIMMU.2018.01723
26. Токарева А.О., Чаговец В.В., Родионов В.В., Кометова В.В., Родионова М.В., Стародубцева Н.Л., Франкевич В.Е. (2020) Липидные маркеры метастатического поражения регионарных лимфоузлов у больных раком молочной железы. *Акушерство и гинекология*, №8, 133-140. [Tokareva A.O., Chagovets V.V., Rodionov V.V., Kometova V.V., Rodionova M.V., Starodubtseva N.L., Frankevich V.E. (2020) Lipid markers of metastatic lesions in regional lymph nodes in patients with breast cancer. *Obstetrics and gynecology*, no. 8, 133-140.] DOI: 10.18565/AIG.2020.8.133-140
27. El-Balat A., Karn T., Holtrich U., Becker S., Kommos S., Györfy B., Anglesio M.S., Huntsman D.G., Drosos Z., Rody A., Gevensleben H., Hanker L.C. (2020) Histotype-specific analysis of acid ceramidase expression ovarian cancer. *Virchows Archiv*, **476**(6), 855-862. DOI: 10.1007/S00428-019-02728-0
28. Maley C., Aktipis A., Graham T., Sottoriva A., Boddy A., Janiszewska M., Silva A., Gerlinger M., Yuan Y., Pienta K., Anderson K., Gatenby R., Swanton C., Posada D., Wu C., Schiffman J., Hwang E., Polyak K., Anderson A., Brown J., Greaves M., Shibata D. (2017) Classifying the evolutionary and ecological features of neoplasms. *Nature Reviews Cancer*, **17**(10), 605-619. DOI: 10.1038/nrc.2017.69

Поступила в редакцию: 01. 09. 2022.

После доработки: 05. 10. 2022.

Принята к печати: 14. 10. 2022.

LIPIDOMIC MARKERS OF BREAST CANCER MALIGNANT TUMOR HISTOLOGICAL TYPES

A.O. Tokareva^{1}, V.V. Chagovets¹, N.L. Starodubtseva¹,
V.V. Rodionov¹, V.V. Kometova¹, K.S. Chingir², V.E. Frankevich^{1,3}*

¹Academician V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology,
4 bld. 2 Oparina str., Moscow, 117513 Russia; *e-mail: alisa.tokareva@phystech.edu

²Jiangxi Key Laboratory for Mass Spectrometry and Instrumentation, East China University of Technology,
Nanchang, 330013 P. R. China

³Siberian State Medical University, Tomsk, 634050 Russia

The molecular profile of a tumor is associated with its histological type and can be used both to study the mechanisms of tumor progression and to diagnose it. In this work, changes in the lipid profile of a malignant breast tumor and the adjacent tissue were studied. The potential possibility of determining the histological type of the tumor by its lipid profile was evaluated. Lipid profiling was performed by reverse-phase chromatography-mass spectrometry analysis of the lipid extract with identification of lipids by characteristic fragments. Potential lipid markers of the histological type of tumor were determined using the Kruskal-Wallis test. Impact of lipid markers was calculated by MetaboAnalyst. Classification models were built by support vector machines with linear kernel and 1-vs-1 architecture. Models were validated by leave-one out cross-validation. Accuracy of models based on microenvironment tissue, were 99% and 75%, accuracy of models, based on tumor tissue, were 90% and 40% for the positive ion mode and negative ion mode respectively. The lipid profile of marginal (adjacent) tissue can be used for identification of histological types of breast cancer. Glycerophospholipid metabolism pathway changes were statistically significant in the adjacent tissue and tumor tissue.

Key words: mass-spectrometry; lipidomics; breast cancer; tumor microenvironment; histology tumor type

Funding. The study was jointly supported by RFBR (No. 19-515-55021) and National Natural Science Foundation of China (No. 81961138016).

Received: 01.09.2022; revised: 05.10.2022; accepted: 14.10.2022.