

## ПОИСК СПЕЦИФИЧНЫХ БИОМАРКЕРОВ РАКА ЯИЧНИКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАЛДИ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

**А. Сорокина**<sup>2</sup>, кандидат медицинских наук,

**Р. Зиганшин**<sup>1</sup>, кандидат химических наук,

**Г. Арапиди**<sup>1,3</sup>, **О. Иванова**<sup>1</sup>,

**В. Радзинский**<sup>2</sup>, доктор медицинских наук, профессор,

**В. Говорун**<sup>1</sup>, член-корреспондент РАН, доктор биологических наук

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и  
Ю.А. Овчинникова РАН, <sup>2</sup>РУДН, Москва

<sup>3</sup>Московский физико-технический институт, Долгопрудный

**E-mail:** anna\_sorokina77@mail.ru

*Исследование фракционированных образцов сыворотки крови с использованием генетического алгоритма и обучаемой нейронной сети позволило построить математические модели, способные с высокой специфичностью и чувствительностью отличать группы масс-спектрометрических профилей образцов при раке яичников от таковых у практически здоровых женщин и пациенток с аденомиозом.*

**Ключевые слова:** рак яичников, аденомиоз, сыворотка крови, МАЛДИ масс-спектрометрия, масс-спектрометрическое профилирование.

Вопросы диагностики заболеваний репродуктивной системы — наиболее сложные и актуальные в научной и практической медицине. В последние годы отмечен рост частоты таких заболеваний женской репродуктивной системы, как эндометриоз, миома матки, гиперпластические процессы эндометрия, злокачественные опухоли, что является не только медицинской, но и социальной проблемой.

Среди онкологических заболеваний у женщин 4-е место по смертности занимает рак яичников. В среднем прогнозируемый 5-летний срок выживаемости пациентки при раке яичников составляет около 30%. Этот уровень выживаемости остается практически неизменным в течение последних 40 лет, несмотря на активное внедрение в практику радикальных хирургических подходов и новых интенсивных способов химиотерапии [1].

Еще одним социально значимым заболеванием женской репродуктивной системы является эндометриоз, который при гинекологической патологии в случае сохраненной менструальной функции поражает до 50% женщин, приводя к расстройствам в репродуктивной системе и отрицательно влияя на психоэмоциональное состояние больных [2–4].

Клиническая картина аденомиоза (эндометриоза тела матки) характеризуется значительным полиморфизмом. В связи с этим проведение информативных методов обследования, позволяющих в минимальные сроки установить точный диагноз и тем самым обосновать тактику

лечения больных при подозрении на данную патологию, вызывает определенные затруднения [1, 5].

Миома матки является самым частым (50–85%) сочетанным заболеванием при аденомиозе. По данным многих исследователей, в 30–35% случаев гиперпластические процессы эндометрия сочетаются с миомой небольших размеров и аденомиозом [5].

Наиболее широко используемым сегодня неинвазивным методом диагностики рака яичников является определение в крови опухолево-ассоциированного антигена СА-125; чувствительность теста составляет около 80% [6]. К тому же СА-125 не является высокоспецифичным маркером рака яичников [7], поэтому данный тест необходимо использовать в комплексе с другими методами диагностики рака яичников — трансвагинальным ультразвуковым сканированием (ТВУЗИ), морфологическим исследованием. По литературным данным, чувствительность и специфичность теста, построенного на анализе содержания СА-125 и ТВУЗИ, составляет соответственно 78 и 99,9% [8, 9].

В ряде работ освещена информативность различных методов диагностики заболеваний матки, уточнена диагностическая ценность каждого из них; наиболее информативными продолжают оставаться ТВУЗИ, лапаро- и гистероскопия, гистологическое исследование удаленных тканей. По данным ряда авторов, расхождения в диагнозе, установленном при ТВУЗИ и гистологическом исследовании удаленной матки, составляют до 50%. Таким образом, отмечаются как гипер- и гиподиагностика заболеваний, так и проблемы с дифференциальной диагностикой узловой формы аденомиоза и миомы матки, начальной стадии аденомиоза и гиперплазии эндометрия, что обуславливает ошибочную схему лечения и прогноз. В связи с этим поиск специфичных маркеров указанных заболеваний по-прежнему актуален [7, 10].

При диагностике опухолевых заболеваний женской репродуктивной системы по-прежнему сложно точно и своевременно определить начало процесса малигнизации доброкачественных образований. Так, считается, что малигнизация эндометриоза тела матки происходит редко. Однако В. Баскаковым [1] в 17,8% случаев установлено сочетание эндометриоза и злокачественных заболеваний женских половых органов. Схожесть механизмов развития и физиологических проявлений некоторых опухолей, наличие значительного полиморфизма в структуре тканей и частое сочетание различных образований делает актуальной разработку метода диагностики путей развития опухолевого образования.

Для поиска в сыворотке крови новых маркеров различных заболеваний все чаще используются постгеномные методы анализа, среди которых ведущие позиции занимают протеомные технологии. Используемые для этих целей подходы весьма разнообразны и, как правило, включают различные методы фракционирования биологических жидкостей или экстрактов тканей с последующим масс-спектрометрическим анализом (МС) получаемых фракций. При этом идентификацию компонентов сложных пептидных смесей обычно осуществляют тандемной МС, сопряженной с высокоэффективной жидкостной хроматографией [11–15]. В основе другого МС-подхода, используемого в биомаркерных

исследованиях, лежит простая идея сравнительного МС-профилирования плазмы (сыворотки) крови от практически здоровых доноров и пациентов с определенными заболеваниями (преимущественно онкологическими). При этом используют комбинацию разнообразных методов фракционирования с последующим анализом получаемых фракций времяпролетной МС с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ) [15, 16–34]. Этот подход позволяет находить воспроизводимые отличия между сравниваемыми группами МС-профилей, для чего наборы МС-данных анализируют с использованием специальных классификационных алгоритмов, строят на их основе математические модели, которые могут быть использованы для диагностических целей.

В литературе описано множество примеров успешного применения данного метода для выявления потенциальных биомаркеров в сыворотке крови при различных заболеваниях: при раке желудка [25], прямой кишки [24], предстательной железы [19], эндометрия [20], гепатоклеточной карциноме [34] и других онкологических заболеваниях [15, 20, 30, 32, 33]. Отдельные работы по поиску потенциальных биомаркеров уже находятся на стадии клинических исследований. В 2009 г. управление по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов (FDA) США одобрило первый тест на содержание в крови 5 белков, который может с высокой эффективностью определить наличие рака в опухолевом образовании яичников.

Большинство исследовательских групп в работах по обнаружению потенциальных биомаркеров используют при построении классификационных моделей в качестве группы сравнения (контроль) образцы, полученные от практически здоровых доноров. Однако такой подход может приводить (несмотря на высокие значения специфичности и чувствительности модели по отношению к сравниваемым группам) к неудовлетворительным результатам при использовании для диагностики у пациентов с иными заболеваниями. Целью данного исследования являлось построение на основе МС-профилирования образцов сыворотки крови классификационных моделей для диагностики рака яичников, проверка их специфичности на образцах сыворотки крови, полученных от пациенток с доброкачественными заболеваниями яичников и матки, и корректировка построенных моделей для повышения их специфичности.

Были обследованы 22 пациентки с раком яичников III стадии (средний возраст – 51 год), 35 – с аденомиозом (средний возраст – 40 лет), 18 – с миомой матки (средний возраст – 41 год), 20 – с гиперплазией эндометрия (средний возраст – 43 года), 22 – с эндометриодными кистами яичников (средний возраст – 41 год), 11 – с доброкачественными новообразованиями яичников (средний возраст – 41 год) и 33 практически здоровые женщины (контрольная группа; средний возраст – 49 лет). Диагноз аденомиоза, миомы матки и гиперплазии эндометрия установлен на основании данных гистероскопии и результатов морфологического исследования; диагноз рака яичников, эндометриодных кист яичников и доброкачественных новообразований яичников – на основании данных морфологического исследования.

Сыворотки крови больных аденомиозом, миомой матки, пациентки с эндометриодными кистами яичников, с гиперплазией эндометрия, новообразованиями яичников и больных раком яичников были получены из ГКБ № 64, ГКБ № 29, НМХЦ им. Н. И. Пирогова Росздрава, поликлиники № 1, РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН (Москва). В качестве контроля использованы образцы сывороток крови практически здоровых женщин, полученные из клинико-диагностической лаборатории ООО НПФ «Литех» (Москва).

Кровь из вены (около 4 мл) собирали в пробирки без антикоагулянта, инкубировали ее при комнатной температуре в течение 1 ч и центрифугировали при 1900 об. в течение 15 мин при комнатной температуре. Надосадочную жидкость (сыворотку) отбирали и по 1 мл переносили в предварительно промаркированные пробирки типа эппендорф. Образцы замораживали и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Для фракционирования образцов сывороток крови использовали набор для профилирования (Bruker Daltonics; Германия), содержащий магнитные микрочастицы со слабой катионообменной поверхностью MB-WCX [35]. Фракционирование сывороток крови проводили на специализированном роботе ClinProt robot (Bruker Daltonics, Германия) по протоколу, рекомендованному производителем магнитных микрочастиц.

Масс-спектры получали с использованием времяпролетного МАЛДИ масс-спектрометра Ultraflex (Bruker Daltonics, Германия).

Анализ МС-данных и построение классификационных моделей проводили с использованием компьютерной программы ClinProTools 2.1 (Bruker Daltonics, Германия). Математические модели для классификации МС-профилей строили на основе генетического алгоритма (ГА) [36] и обучаемой нейронной сети (ОНС – Supervised Neural Network) [37].

Для построения классификационных моделей наборы МС-профилей сравниваемых групп разбивали на 2 подгруппы; одну пару использовали для построения классификационных моделей, другую – для их внешней валидации.

Для построения классификационной модели с более высокой специфичностью по отношению к раку яичников была сформирована группа «условный контроль», в которую в равной пропорции были включены МС-профили контрольной группы и больных аденомиозом. МС-профили образцов сыворотки крови больных миомой матки, с гиперплазией эндометрия, эндометриодными кистами яичников и доброкачественными новообразованиями яичников использовали для определения специфичности классификационных моделей.

В результате сравнительного МС-профилирования образцов сыворотки крови пациенток с раком яичников и практически здоровых женщин были построены классификационные модели с использованием обоих математических алгоритмов. При использованных параметрах обработки масс-спектров в них воспроизводимо детектировали 165 пиков. Для оценки чувствительности и специфичности классификационных моделей были использованы МС-профили образцов сыворотки крови больных раком яичников ( $n=16$ ) и обследованных контрольной группы ( $n=16$ ), не использовавшихся для построения моделей. В результате получены следующие

значения чувствительности (% правильно идентифицированных сывороток крови группы «рак яичников») и специфичности (% правильно идентифицированных сывороток крови группы «контроль»): для ГА – соответственно 100 и 100%; для ОНС – 93 и 100%. Анализ статистических диаграмм девиации площадей МС-пиков, вошедших в построенные классификационные модели, позволил выявить 4 пика, вносящих наибольший вклад в точность модели. Подобные пики не соответствуют высокоспецифичным маркерам, поскольку не способны по отдельности эффективно отнести образцы к конкретной экспериментальной группе. При проверке специфичности построенной на основе ГА модели по отношению к МС-профилям образцов сыворотки крови пациенток с аденомиозом, миомой матки, гиперплазией эндометрия, эндометриоидными кистами яичников и доброкачественными новообразованиями яичников получены значения соответственно 22,6%; 41,2; 45,5; 48,2 и 50%. Значения специфичности на уровне 50% для построенной модели говорят о случайном характере классификации образцов: 50% образцов отнесено к больным раком яичников, 50% – к контрольной группе. Следует заметить, что поскольку для оценки специфичности были использованы малые выборки образцов, говорить о точных статистических оценках не приходится. Поэтому мы рассматривали значения специфичности в пределах 40–60% как значения на уровне 50%. Специфичность построенной модели по отношению к аденомиозу составила 22,6%, что явно указывает на определенное сходство между МС-профилями образцов сыворотки крови от пациенток с раком яичников и аденомиозом. Из литературных источников известно, что уровень опухолеассоциированного антигена СА-125 повышен как при раке яичников, так и при аденомиозе (и эндометриозе вообще). Доброкачественные опухоли из числа рассматриваемых в данной работе, а также кисты яичников не сопровождаются повышением уровня СА-125 [38–42].

Низкая специфичность классификационной модели, построенной на основе сравнения МС-профилей сывороток крови пациенток с раком яичников и практически здоровых женщин по отношению к перечисленным выше доброкачественным заболеваниям женской репродуктивной сферы сделала очевидной необходимость ее серьезной корректировки. Для этой цели нами была сформирована группа «условный контроль», в которую в равном соотношении были включены МС-профили обследованных контрольной группы и больных аденомиозом. На основе сравнения МС-профилей больных раком яичников и группы «условный контроль» нами были построены новые классификационные модели. При использовавшихся параметрах обработки масс-спектров этих групп в них воспроизводимо детектировали 170 пиков. Для оценки чувствительности и специфичности построенных моделей были использованы образцы сыворотки крови больных раком яичников (n=16) и группы «условный контроль» (n=32), не применявшиеся ранее для построения классификационных моделей. При этом были получены следующие значения чувствительности и специфичности математической модели: для ГА – соответственно 90,9 и 96,8%; для ОНС –

81,8 и 100%. Как и для предыдущей классификационной модели, анализ статистических диаграмм девиации площадей, вошедших в модель МС-пиков, позволил выявить 4 из них, пересечение диапазонов девиации площадей которых между группами составляло <50%. При проверке специфичности построенной на основе ГА модели по отношению к МС-профилям образцов сыворотки крови здоровых доноров, пациенток с аденомиозом, миомой матки, гиперпластическими изменениями эндометрия, эндометриоидными кистами яичников и новообразованиями яичников были получены значения соответственно 93,8%; 100; 100; 95,2; 88,9 и 100%. Таким образом, использование в качестве группы сравнения смешанной группы, включающей в себя образцы, полученные от практически здоровых доноров и пациенток с аденомиозом, значительно улучшило специфичность классификационной модели по отношению ко всем исследованным группам пациентов. По всей видимости, добавление в группу сравнения образцов, полученных от пациенток с аденомиозом, позволило включить в рассмотрение классификационных алгоритмов МС-пики, соответствующие веществам, изменение содержания которых в крови коррелирует с различными нарушениями в женской репродуктивной системе, но не связано со злокачественными новообразованиями яичников.

Отдельного внимания заслуживают величины специфичности построенной модели по отношению к каждой конкретной патологии. Классификация образцов пациенток с аденомиозом, миомой матки и гиперпластическими изменениями эндометрия дали практически одинаковые результаты (соответственно 100, 100 и 95,2%). Согласно литературным данным, довольно часто аденомиоз у больных сочетается с миомой матки, поскольку механизмы развития этих процессов похожи [7]. В. Баскаков и соавт. отмечают, что дисгормональный характер аденомиоза нередко выражается в виде сочетания с гиперплазией эндометрия, миомой матки [1].

Полученные результаты демонстрируют важность правильного подбора групп сравнения для расчета корректных классификационных моделей при диагностике различных заболеваний и будут использованы нами в последующей работе по идентификации специфичных для рака яичников сывороточных пептидов.

*Список литературы см. на сайте [www.rusvrach.ru](http://www.rusvrach.ru)*

#### SEARCH FOR BIOMARKERS SPECIFIC FOR OVARIAN CANCER BY MALDI MASS SPECTROMETRY

**A. Sorokina**<sup>2</sup>, Candidate of Medical Sciences, **R. Ziganshin**<sup>1</sup>, Candidate of Chemical Sciences, **G. Arapid**<sup>3</sup>, **O. Ivanova**<sup>1</sup>, **V. Radzinsky**<sup>2</sup>, **V. Govorun**<sup>1</sup>, MD, Corresponding Member of the Russian Academy Medical Sciences

<sup>1</sup>M.M. Shemyakin & Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences; <sup>2</sup>Russian Peoples' Friendship University;

<sup>3</sup>Moscow Physico-Technical Institute, Dolgoprudny

The study of fractionated serum samples, by using the genetic algorithm and taught neural network, could build mathematical models that were able to distinguish with a high degree of specificity and sensitivity the groups of the mass spectrometric sample profiles in ovarian cancer from those in apparently healthy women and patients with adenomyosis.

**Key words:** ovarian cancer, adenomyosis, serum, MALDI mass spectrometry, mass spectrometric profiling.