

МОШКОВСКИЙ  
Сергей Александрович

**ПРОТЕОМНЫЙ ШТРИХ-КОД ПЛАЗМЫ КРОВИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ  
ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ**

03.01.04 – биохимия

**Автореферат**  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Москва  
2012 г.

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича» Российской академии медицинских наук (ФГБУ «ИБМХ» РАМН)

**Научный консультант:** доктор биологических наук, профессор  
академик РАМН,

**Арчаков Александр Иванович**

**Официальные оппоненты:**

**Ляхович Вячеслав Валентинович**

доктор медицинских наук, профессор,  
академик РАМН, директор ФГБУ «НИИМББ»  
СО РАМН

**Васильев Андрей Валериевич**

доктор биологических наук, профессор,  
зав. отделом ФГБУ «НИИ питания» РАМН

**Ипатова Ольга Михайловна**

доктор биологических наук, зав. отделом  
ФГБУ «ИБМХ» РАМН

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биохимии им. А.Н.Баха Российской академии наук

Защита состоится 18 октября 2012 г. в 13-00 часов на заседании совета

Д 001.010.01 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича» Российской академии медицинских наук по адресу 119121, г. Москва, Погодинская ул. д.10, стр.8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ИБМХ» РАМН.

Автореферат разослан ” \_\_\_\_ ” июля 2012 г.

Ученый секретарь диссертационного совета Д 001.010.01

кандидат химических наук

Карпова Е.А.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Злокачественные опухоли являются распространенной причиной смерти человека и многих других позвоночных животных. По последним оценкам, они вызывают более десяти процентов летальных случаев в человеческой популяции ([www.cancer.org](http://www.cancer.org)). Согласно современным представлениям, фатальные поломки в организме млекопитающего вызваны патологическим усилением одного из физиологических процессов – пролиферации, с одной стороны, что вызывает злокачественные опухоли, и старения, с другой стороны, что стимулирует дистрофии и нейродегенеративные заболевания. Более того, установлены общие биологические основы рака и старения, а указанные различные исходы связаны со сдвигом равновесия в ту или иную сторону (Finkel, Serrano, and Blasco 2007).

Несмотря на очень большое разнообразие генетических предпосылок развития злокачественных опухолей, разнообразие их морфологических и, что более важно, клинических проявлений не столь велико. Иными словами, в основе двух разных, сходных по клинической картине и морфологии опухолей могут лежать мутации в различных биохимических каскадах. Примером этого явления может служить недавняя работа (Kobel et al. 2008), в которой описаны большие различия в экспрессии белков в разных морфологических типах аденокарциномы яичника, притом что в клинической практике есть потребность в диагностике этой опухоли независимо от ее клеточных и биохимических типов. Поэтому идея о единственном биохимическом биомаркере, будь то последовательность нуклеиновой кислоты, белок или метаболит, для первичной или дифференциальной диагностики большинства типов рака в настоящее время отвергнута большинством специалистов. В качестве альтернативного направления развивается понятие о молекулярной сигнатуре (Subramanian and Simon 2010) или штрих-коде (Zimmer et al. 2006). Сигнатура включает в себя набор качественно или количественно оцениваемых молекулярных параметров, например, генетических полиморфизмов, уровня экспрессии транскриптов, белков, уровня липидов или других метаболитов, измерение которых обеспечивает высокую точность диагностики заболевания (Yurkovetsky et al. 2010). Для получения мультиплексного (многопараметрического) штрих-кода клинического образца

могут использоваться различные методы. Если речь идет о протеомном, белковом штрих-коде, то это в первую очередь иммунный анализ (Edgell et al. 2010) и масс-спектрометрия (Zimmer et al. 2006; Rodriguez et al. 2010). Важным аспектом при разработке штрих-кода является статистическая обработка мультиплексных данных. Для корректного вычисления диагностической точности метода, расчета рисков и применения на практике требуется использование специальных алгоритмов распознавания данных (Hamacher et al. 2009).

В настоящей работе в качестве экспериментальной подхода к диагностике рака яичника, предстательной железы и Т-клеточной лимфомы кожи нами использованы основанные на MALDI-TOF-масс-спектрометрии плазмы<sup>1</sup> крови штрих-коды, изучена природа компонентов, обеспечивающих диагностику, а также сформулированы проблемы и перспективы новой области знания, связанной с протеомными профилями плазмы крови для диагностики.

**Целью работы** является выявление протеомного штрих-кода плазмы крови, измеряемого посредством масс-спектрометрии, подходящего для диагностики злокачественных опухолей на примере рака яичника и предстательной железы, а также Т-клеточной лимфомы кожи.

#### **Основные задачи исследования**

- Получение посредством MALDI-TOF-масс-спектрометрии мультиплексного сигнала от образцов плазмы крови пациентов с раком яичников, пациентов с раком предстательной железы, а также пациентов с Т-клеточной лимфомой кожи и соответствующих всем указанным патологиям контрольных субъектов.
- Обработка полученных MALDI-TOF-масс-спектров методами многомерной статистики для выявления маркерных компонентов протеомного штрих-кода и оценки точности, специфичности и чувствительности протеомной диагностики.
- Экспериментальная идентификация и идентификация с использованием литературных источников компонентов протеомного штрих-кода, вносящих вклад в построение оптимальной модели для диагностики рака яичника, рака предстательной железы и Т-клеточной лимфомы кожи.

---

<sup>1</sup> В разных разделах данной работы используются образцы плазмы и образцы сыворотки крови. Как правило, результаты протеомного штрих-кода мало зависят от того, какой препарат крови получают. В общих разделах работы (введение, заключение, выводы) термин «плазма крови» будет охватывать как разные виды плазмы, так и сыворотку крови.

- Сопоставление данных протеомной диагностики рака яичника, рака предстательной железы с результатами анализа принятых в клинической практике молекулярных маркеров этих опухолей.
- Применение в случае Т-клеточной лимфомы кожи в дополнение к MALDI-TOF-масс-спектрометрии направленного протеомного анализа цитокинов сыворотки крови.

**Научная новизна.** В представленной работе были впервые получены экспериментальные масс-спектрометрические штрих-коды для диагностики рака яичника, объединенные с данными иммуноферментного анализа. При анализе белковых штрих-кодов были однозначно идентифицированы некоторые его компоненты, самым значимым из которых для диагностики является сывороточный амилоид А. Для получения штрих-кодов разрабатывали и применяли оригинальные модификации методов обработки образца.

При обработке диагностических масс-спектров впервые применяли особый алгоритм для построения диагностической модели, основанный на учете некоррелирующих между собой компонентов штрих-кода с последующим применением классификатора – метода опорных векторов.

Важным результатом работы является подтверждение того, что масс-спектрометрические штрих-коды плазмы и сыворотки крови способны достоверно распознавать образцы, полученные от пациентов со злокачественными опухолями, по меньшей мере, яичника и предстательной железы. Представленная работа, кроме того, раскрывает биологический смысл наблюдаемых отличий посредством идентификации значимых компонентов профиля. В работе подчеркивается значение белка сывороточного амилоида А не только как маркера воспаления, но и его очевидная связь с патогенезом ряда злокачественных опухолей.

Цитокиновые профили плазмы крови при Т-клеточной лимфоме кожи позволили выявить новый, не описанный ранее биомаркер данного заболевания - хемокин с мотивом C-X-C 10 (CXС10).

#### **Основные положения, выносимые на защиту**

В качестве биомаркера рака яичника, предстательной железы и Т-клеточной лимфомы кожи используют мультиплексный сигнал масс-спектрометрии плазмы крови,

одновременно характеризующий множественные белки плазмы крови – протеомный штрих-код. Принятие диагностического решения осуществляют методами многомерной статистики.

Протеомный штрих-код плазмы крови, регистрируемый посредством MALDI(SELDI)-TOF-масс-спектрометрии, на тестируемых выборках обеспечивает диагностику пациентов с раком яичника и раком предстательной железы с точностью свыше 90%.

Отличия протеомных масс-спектрометрических профилей плазмы крови при раке яичника и раке простаты реализуются преимущественно за счет различных изоформ сывороточного амилоида А острой фазы (SAA) и транстретина (TTR).

В случае Т-клеточной лимфомы кожи мультиплексный анализ цитокинов в плазме крови обеспечивает точность дифференциальной диагностики лимфомы от псориаза свыше 80%, в основном, в связи с концентрацией нового биомаркера данной опухоли - хемокина с мотивом C-X-C 10 (CXC10).

**Научно-практическая значимость работы.** Высокие результаты точности диагностического метода, сочетающего данные MALDI-TOF-масс-спектрометрии и иммуноферментного анализа, иллюстрируют перспективы методов протеомики для последующего внедрения в практику, после преодоления проблемы технической variability метода.

Биомаркеры-компоненты масс-спектрометрического штрих-кода, в том числе идентифицированный в настоящей работе сывороточный амилоид А, предложены в качестве компонентов диагностических панелей для диагностики и мониторинга лечения злокачественных опухолей. Так, сывороточный амилоид А рассматривается как один из маркеров ответа пациентов с раком яичника на направленное действие лекарственного антитела цетуксимаб, со ссылкой на материалы настоящей работы (Schilder et al. 2009). Кроме того, данный белок входит в диагностическую панель, которая проходит клинические испытания для диагностики рака яичников (Edgell et al. 2010), также со ссылкой на представленную работу.

Таким образом, результаты, полученные в представленной работе, получили развитие и используются в нескольких прикладных клинических испытаниях, что указывает на потенциально высокую практическую значимость работы.

**Апробация работы.** Материалы настоящей работы представлялись на 2-й международной конференции «Геномика, протеомика и биоинформатика в медицине» в Москве (Россия) в 2004 г., на HUPO 3th Annual World Congress в Пекине (КНР) в 2004 г., на школе-конференции молодых ученых «Системная биология и биоинженерия» в Москве (Россия) в 2005 г., на HUPO 4th Annual World Congress в Мюнхене (Германия) в 2005 г., на 3-й международной конференции «Геномика, протеомика, биоинформатика и нанотехнологии в медицине» в Новосибирске (Россия) в 2006 г., на HUPO 5th Annual World Congress в Лонг-Биче (США) в 2006 г., на 3-й международной школе-конференции молодых ученых «Масс-спектрометрия в химической физике, биофизике и экологии» в Звенигороде (Россия) в 2007 г., на 4th International Symposium on Computational Methods In Toxicology and Pharmacology Integrating Internet Resources в Москве в 2007 г., на HUPO 6th Annual World Congress в Сеуле (Южная Корея) в 2007 г., на HUPO 7th Annual World Congress в Амстердаме (Нидерланды) в 2008 г., на 4-й международной конференции «Геномика, протеомика, биоинформатика и нанотехнологии в медицине» в Москве и Нижнем Новгороде (Россия) в 2008 г., на IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов в Новосибирске (Россия) в 2008 г., на HUPO 8th Annual World Congress в Торонто (Канада) в 2009 г., на HUPO 9th Annual World Congress в Сиднее (Австралия) в 2010 г., на 1-й международной научно-практической конференции молодых ученых «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» в Москве (Россия) в 2010 г., на Taiwan-Russia Research Cooperation Symposium “New mass spectrometry methods in proteomics” в Гаосюне (Тайвань) в 2011 г.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 49 печатных работ в отечественных и зарубежных изданиях, в том числе, 21 статья в научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, и 28 публикаций в трудах конференций. Индекс Хирша автора составляет 7 по данным системы Scopus.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов работы и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 239 страницах, содержит 32 рисунка, 17 таблиц. Список литературы включает 235 источников.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В обзоре литературы описано развитие методов и подходов для получения диагностических штрих-кодов плазмы и сыворотки крови посредством масс-спектрометрии, а также описаны способы статистической обработки таких масс-спектров. Обсуждается состав белков и пептидов, идентифицируемых в диагностических штрих-кодах, в контексте их дифференциальной экспрессии при злокачественных опухолях разного генеза. Кроме того, в данном разделе подводятся итоги десятилетия развития диагностической протеомики и перспективы внедрения ее результатов в клиническую практику.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Определения параметров диагностического метода.** В работе используются ключевые характеристики диагностических методов – *точность*, *чувствительность* и *специфичность* диагностики. Чувствительность и специфичность теста в общем виде представляют собой статистические характеристики бинарного теста классификации. Чувствительность представляет собой частное числа правильно определенных случаев заболевания и суммы этого числа и числа ложноотрицательных случаев (то есть, неверно определенных случаев заболевания). Специфичность равна частному числа правильно определенных случаев контроля и суммы этого числа и числа ложноположительных случаев. Чувствительность и специфичность теста взаимозависят от принятого уровня отсечения, поэтому рассматривать их по отдельности некорректно. Самостоятельной характеристикой теста является точность (*accuracy*) диагностики, представляющая собой частное числа правильно определенных случаев и общего числа случаев.

**Пациенты и контрольные субъекты, привлеченные для исследования.** Образцы сыворотки и плазмы крови у субъектов использовали с их информированного согласия. На пилотной стадии работы для исследования посредством двумерного электрофореза использовали образцы 30 пациенток с раком яичника, молочной железы, матки и доброкачественными опухолями яичника, а также на группе здорового контроля из 10 женщин (всего 40). Для обнаружения биомаркера амилоида А использовали плазму крови от 27 женщин с раком яичника и 34 контрольных субъектов (всего 61). Для поиска протеомного штрих-кода рака яичника использовали сыворотку от 34 женщин с раком яичника и 56 контрольных не больных раком субъектов (всего 90). Для изучения рака



предстательной железы привлекали 36 больных и 46 здоровых субъектов (всего 82). Для исследования Т-клеточной лимфомы кожи использовали образцы от 23 пациента с лимфомой кожи, 29 пациентов с псориазом и 22 здоровых доноров (всего 74). Итого в диссертации использовали клинический материал от 347 индивидуумов.

**Методы исследования термостабильной фракции сывороток посредством двумерного электрофореза.** Исследование проводили на четырех группах пациентов с раком яичника, молочной железы, матки и доброкачественными опухолями яичника, а также на группе здорового контроля, по 10 человек в каждой. Образцы, связанные с онкогинекологией, для исследования в этом и последующих разделах работы получали на кафедре акушерства и гинекологии лечебного факультета РНИМУ им. Н.И.Пирогова в соответствии с принятыми в данной организации этическими требованиями. Термостабильную фракцию сыворотки крови получали путем подщелачивания и нагревания при 98°C с полиэтиленгликолем. Процедуру 2D-электрофореза образцов данной фракции проводили с использованием прибора для изофокусирования белков Protean IEF Cell (Bio-Rad, США) и установки для 2D-электрофореза Protean II xi Cell (Bio-Rad, США). Разделение в первом направлении проводили путем изоэлектрофокусирования на полосках (стрипах) IPG pH 3-10 (Bio-Rad, США), по инструкции производителей. Для разделения белков во втором направлении использовали 9–16% вертикальные градиентные гели, приготовленные по стандартному протоколу (Gorg and Weiss 1999). Гели окрашивали серебром с тиосульфатом натрия и кумасси голубым в соответствии с методиками, описанными в (Blum, Beier, and Gross 1987) и (Neuhoff et al. 1988), соответственно. Размер гелей для обоих типов окраски составлял 0,15×20×20 см. Отсканированные изображения гелей анализировали с использованием программы Melanie III (GeneBio, Швейцария). Оценивали отличия в интенсивности окраски белковых пятен между группами при помощи непараметрических критериев. Дифференциально экспрессирующиеся белки расщепляли в геле трипсином и идентифицировали с помощью MALDI-TOF(-TOF) масс-спектрометрии по способу пептидного фингерпринта (прибор Ultraflex, Bruker Daltonics, Германия), оснащенного ультрафиолетовым лазером 337 нм, в режиме положительных ионов. Погрешность определения масс ионов пептидных фрагментов составляла примерно 50 частей на миллион.

**Методы идентификации сывороточного амилоида А как компонента протеомного штрих-кода рака яичника.** Для анализа использовали полученную, как описано выше, до оперативного вмешательства, термостабильную фракцию плазмы крови от 27 женщин с раком яичников. В качестве контроля получали образцы от 34 женщин без гинекологической патологии. Масс-спектрометрию SELDI-TOF термостабильной фракции сыворотки осуществляли по инструкциям производителя на чипах SELDI с сильным анионообменником (SAX) (CIPHERGEN Biosystems<sup>2</sup>, США) и на чипах SELDI с металлоаффинной поверхностью Ni-IMAC3.

Для идентификации некоторых пиков белки и пептиды термостабильной фракции плазмы (20 мкл) обрабатывали 4-винилпиридином для модификации в них восстановленных остатков цистеина. Масс-спектры получали на масс-спектрометре MALDI-TOF Reflex III и Ultraflex (Bruker Daltonics, Германия). Спектры MS-MS-фрагментации расщепленных трипсином пептидов получали с использованием масс-спектрометра MALDI-TOF-TOF Ultraflex (Bruker Daltonics, Германия).

Двумерный электрофорез фракций для исследования форм сывороточного амилоида А осуществляли в основном, как описано выше в настоящем автореферате.

Для дальнейшей идентификации белков термостабильную фракцию плазмы разделяли путем ВЭЖХ. Термостабильную фракцию плазмы предобрабатывали на сделанном в лаборатории из пластикового наконечника для пипетки картридже объемом 0,1 мл, содержащем частицы хроматографической фазы Lichrosorb C18 диаметром 10 мкл с размером пор 300 Å (Merck). Анализ ВЭЖХ проводили с использованием хроматографа MilliChrom A-02 (ЗАО Институт хроматографии «ЭкоНова», Россия). Использовали колонку 75×2 мм с частицами Nucleasil C18 диаметром 5 мкм с размером пор 300 Å (Macherey-Nagel, Германия). Состав фракций оценивали посредством SELDI-TOF-MS на чипах с нормальной фазой NP20 (CIPHERGEN) по указаниям производителя.

**Методы анализа протеомного штрих-кода для диагностики рака яичника.** Для исследования использовали сыворотки 34 женщин, больных раком яичника, в том числе 7 сывороток пациенток с раком в ранней (1 и 2-ой) стадии; 13 сывороток женщин больных доброкачественными опухолями яичника и 16 – миомой матки; одна сыворотка больной

---

<sup>2</sup> В настоящее время фирмы CIPHERGEN Biosystems не существует. Технология SELDI передана в компанию Bio-Rad Laboratories (США) и коммерчески доступна от указанной компании.

миомой матки и фибромой яичника и 26 сывороток здоровых женщин. В качестве контроля были использованы 26 сывороток здоровых женщин, полученных при плановом гинекологическом обследовании.

Для определения концентрации А-SAA использовали набор для иммуноферментного анализа Human SAA (Biosource, США) в соответствии с протоколами производителя. Для измерения концентрации ракового антигена 125 (CA125) использовали набор для иммуноферментного анализа CA125 EIA (CanAg, Канада), также в соответствии с инструкцией производителя.

Для оптимизации условий профилирования SELDI-TOF использовали различные типы белковых чипов: NP20 (нормальнофазовые), SAX2 (сильные анионообменники), WCX (слабые катионообменники), H4 (обращеннофазовые) (Ciphergen Biosystems, США). Оптимальные результаты получали при использовании чипов NP20. В качестве матрицы для этого чипа использовали насыщенный раствор  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричной кислоты в 50% (об./об.) ацетонитриле, содержащем 0,5% (об./об.) трифторуксусной кислоты (ТФУ), разведенный в два раза тем же растворителем. Профилирование проводили на масс-спектрометре SELDI-TOF Protein Biology System II (PBS II) (Ciphergen, США), получая спектры автоматически в диапазоне масс 7000-70000 Да.

Пики масс-спектров в пределах  $m/z$  от 5500 до 17500 Да находили и размечали посредством программы Biomarker Wizard™ (Ciphergen). Использовали для классификации 48 таких пиков и данные иммуноферментного анализа о концентрациях А-SAA и CA125, применяя метод опорных векторов (support vector machine, SVM (Vapnik and Chapelle 2000)) и метод логистической регрессии. Перед применением SVM проводили отбор признаков для улучшения параметров модели по алгоритму рекурсивного исключения признаков (Recursive Feature Elimination, RFE, (Guyon et al. 2002)). В качестве альтернативы SVM для разработки диагностического алгоритма применяли метод логистической регрессии. Для отбора признаков для логистической регрессии использовали ступенчатую модель отбора, основанную на информационном критерии Акаике (AIC). Для проверки чувствительности и специфичности разработанных диагностических моделей, использовали 10-кратную перекрестную проверку достоверности. Для диагностических алгоритмов, полученных как методом SVM, так и методом LR использовали 10-кратную перекрестную проверку достоверности, которую

проводили по 100 раз. Для каждого диагностического алгоритма вычисляли точность, чувствительность и специфичность с доверительными интервалами. Дополнительно для классификации использовали упрощенный метод пар с наибольшим счетом TSP (Tan et al. 2005; Xu et al. 2005).

Всю статистическую обработку, включая применение кластерного анализа, метода логистической регрессии, метода опорных векторов, а также отбор признаков проводили с помощью находящегося в открытом доступе языка программирования R ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)).

**Методы анализа протеомного штрих-кода для диагностики рака предстательной железы.** В Воронежском онкологическом диспансере получали образцы плазмы крови 82 субъектов, у 36 из которых был диагностирован рак предстательной железы, подтвержденный гистологическим исследованием, а 46 субъектов были признаны здоровыми (данные приведены в диссертации). В лаборатории клинической базы у всех субъектов проводили определение в крови уровня простатоспецифического антигена (ПСА) с помощью стандартного метода хемилюминесцентного иммуноанализа. Далее осуществляли выбор метода проведения протеомного исследования образцов плазмы крови. Тестировали нормальнофазовые чипы для SELDI NP20 (Bio-Rad), катионообменные магнитные гранулы ClinProt WCX (Bruker) и хроматографические наконечники ZipTip C18 (Millipore).

Масс-спектры на MALDI-TOF-масс-спектрометре Ultraflex II (Bruker, Германия) для каждого образца получали в четырех повторах, в диапазоне  $m/z$  1500-20000 Да. Спектры выравнивали и проводили детекцию масс-спектрометрических пиков с использованием программы ClinProTools (Bruker). Масс-спектры обрабатывали следующим образом. Диагностическую модель строили посредством разработанного на языке R программного обеспечения с использованием метода опорных векторов (SVM) в комбинации с рекурсивным отбором признаков.

В данном исследовании применяли метод опорных векторов с линейным ядром. Для оценки точности диагностики использовали 10-кратную перекрестную проверку достоверности. Для вычисления доверительных интервалов для точности, чувствительности и специфичности диагностики, 10-кратную перекрестную проверку достоверности проводили 100 раз.

**Методы анализа масс-спектрометрических и цитокиновых профилей сыворотки крови для диагностики Т-клеточной лимфомы кожи.** Работу с пациентами осуществляли в ГНЦ дерматовенерологии Минздравсоцразвития России согласно этическим требованиям, принятым в данном учреждении. Все пациенты, включенные в исследование, были не моложе 18 лет, женщины не находились в периоде беременности или лактации. В критерий исключения входило наличие в истории заболевания особо опасных инфекций (туберкулеза, сифилиса, гепатитов В и С, ВИЧ) и не имеющих отношения к исследованию соматических заболеваний в развернутой стадии, а также других злокачественных опухолей. Для включения пациентов с грибвидным микозом ГМ в исследование использовали следующие критерии: I-III стадия заболевания без генерализации патологического процесса и без вовлечения в него периферической крови (последнее устанавливали по подсчету клеток Сезари на основе классификации ВОЗ/EORTC (Kempf and Sander 2010), >1000 атипических лимфоцитов на мл периферической крови требуется для постановки диагноза синдрома Сезари, который считается отдельной формой Т-клеточной лимфомы кожи); диагностированный ГМ, подтвержденный гистологией и иммунофенотипированием; отсутствие терапии ГМ в течение, по меньшей мере, 2 недель перед взятием крови. Наблюдали 23 пациента с грибвидным микозом, подтвержденным гистологией и иммунофенотипированием. Контрольные группы состояли из 29 пациентов с диагностированным псориазом и из 22 здоровых доноров. В контрольную группу включали пациентов с развернутым или умеренным псориазом, который оценивали посредством индекса площади поражения и тяжести псориаза (PASI) (Langley and Ellis 2004). Все пациенты с псориазом, вовлеченные в исследование, имели индекс PASI выше 12. Перед MALDI-TOF-масс-спектрометрией образцы сыворотки обрабатывали на нормальнофазовых хроматографических чипах NP20 для SELDI (Bio-Rad). Перед получением спектров чипы SELDI помещали в адаптер Lucid™ для масс-спектрометров производства Bruker. Масс-спектры получали в линейном режиме в интервале  $m/z$  2-30 кДа с использованием масс-спектрометра Autoflex III MALDI-TOF.

Основанный на технологии xMAP мультиплексный анализ проводили на приборе Bio-Plex 200 System (Bio-Rad) с использованием набора для определения цитокинов Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-Plex Panel (Bio-Rad). Панель цитокинов состояла из тестов на

27 цитокинов, включая PDGF-bb, IL-1b, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, эотаксин, основной FGF, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IP-10, MCP-1(MCAF), MIP-1a, MIP-1b, RANTES, TNF-a, VEGF. Анализ проводили по инструкции производителя. Результаты измерения представляли с использованием программного обеспечения Bio-Plex Manager 5.0 (Bio-Rad). Статистическую обработку данных проводили с использованием Microsoft Excel и статистического языка программирования R, находящегося в открытом доступе ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)). Обработку масс-спектрометрических данных и выравнивание пиков проводили с использованием программного обеспечения ClinProTools 2.0 (Bruker Daltonics). Процедура обработки данных масс-спектрометрии и цитокинового анализа для построения диагностического правила была в общих чертах одинаковой и включала анализ главных компонент (PCA) и кластеризацию. Поиск значимых различий по площади индивидуальных пиков или по концентрации конкретных цитокинов между группами выполняли с использованием теста Крускала-Уоллиса для трех групп и U-теста Манна-Уитни для двух групп, если их считали независимыми, используя поправку Бонферрони. Диагностические характеристики каждой переменной и их комбинации рассчитывали с использованием площади под ROC-кривой. Также вычисляли точность, чувствительность и специфичность диагностики. Диагностические модели строили с использованием классификатора метода опорных векторов (SVM) и/или линейного дискриминанта Фишера.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Пилотное исследование термостабильной фракции сывороток пациентов с различными злокачественными опухолями, характерными для женщин, методом двумерного электрофореза.** Анализировали термостабильные фракции сыворотки крови пациенток, страдающих от рака яичника, матки, молочной железы, от доброкачественных опухолей яичников, а также здоровых женщин, для поиска дифференциально экспрессирующихся в этих состояниях биомаркерных белков. Температурную обработку сыворотки крови использовали для частичного избавления от преобладающих высококопийных белков. Эффективность данного метода для избавления от сывороточного альбумина доказывали посредством 2D-электрофореза (данные приведены в диссертации).

На электрофореграммах выявляли дифференциально экспрессирующиеся белки в сыворотках пациентов с различными злокачественными опухолями, характерными для женщин. Достоверные различия между группами были найдены в шести областях электрофоретической карты. После идентификации белков по пептидному фингерпринту оказалось, что эти пятна соответствуют следующим белкам: кислому гликопротеину- $\alpha$ 1 (область 1), кластерину (аро J) (область 2), транстиретину (область 3), аро A-I (область 4), фрагментам аро A-I (область 5) и  $\alpha$ 1-цепи гаптоглобина (область 6) (см. рис. 1). В таблицу 1 сведены данные об относительной суммарной интенсивности окраски (площадь  $\times$  интенсивность окраски) перечисленных пятен для каждой из исследуемых групп.

**Таблица 1.** Различия в относительной суммарной интенсивности окраски белковых пятен между группами пациентов с раком яичника, матки, молочной железы, с доброкачественными опухолями яичников и контрольной группой.

Об- ласть	Название белка	%Vol					
		Критерий Крускала- Уоллиса <sup>3</sup>	Контроль	Рак яичника	Рак матки	Рак молочной железы	Доброкачествен- ная опухоль яичника
1	кислый гликопротеин α-1	<0,001	3,26±0,79	1,04±0,43**	1,04±0,68**	<b>0,33±0,25**</b>	1,73±1,08**
2	кластерин (аполипопротеин J)	<0,001	0,99±0,79	0,22±0,20**	0,21±0,24**	<b>0,07±0,04**</b>	0,32±0,25*
3	транстиретин, пятно I	<0,001	1,38±0,32	<b>0,93±0,15**</b>	1,31±0,31	1,63±0,35	1,36±0,21
3	транстиретин, пятно II	<0,001	0,77±0,21	<b>0,35±0,15**</b>	0,56±0,16	0,65±0,13	0,66±0,24
4	аполипопротеин A-I (6 пятен)	<0,001	1,21±0,51	0,11±0,09**	0,23±0,19**	0,08±0,06**	0,47±0,43
5	аполипопротеин A-I, пятно I	<0,01	0,15±0,09	0,04±0,02**	0,04±0,03**	0,02±0,01**	0,06±0,06*
5	аполипопротеин A-I, пятно II	<0,01	0,51±0,59	0,09±0,08**	0,08±0,07**	0,08±0,05**	0,21±0,25
6	гаптоглобин α1, пятно I	<0,025	0,40±0,40	1,06±0,61**	0,35±0,49	0,87±0,39**	0,62±0,42
6	гаптоглобин α1, пятно II	<0,01	0,24±0,25	0,81±0,41**	0,23±0,35	0,58±0,29*	0,30±0,29

\*\* -  $p < 0.01$ ; \* -  $p < 0.05$ , критерий Вилкоксона; особенно выраженные группоспецифические отличия выделены жирным шрифтом.

<sup>3</sup> В колонке “Критерий Крускала-Уоллиса” показаны вероятности 0-гипотезы (между выборками нет различий).



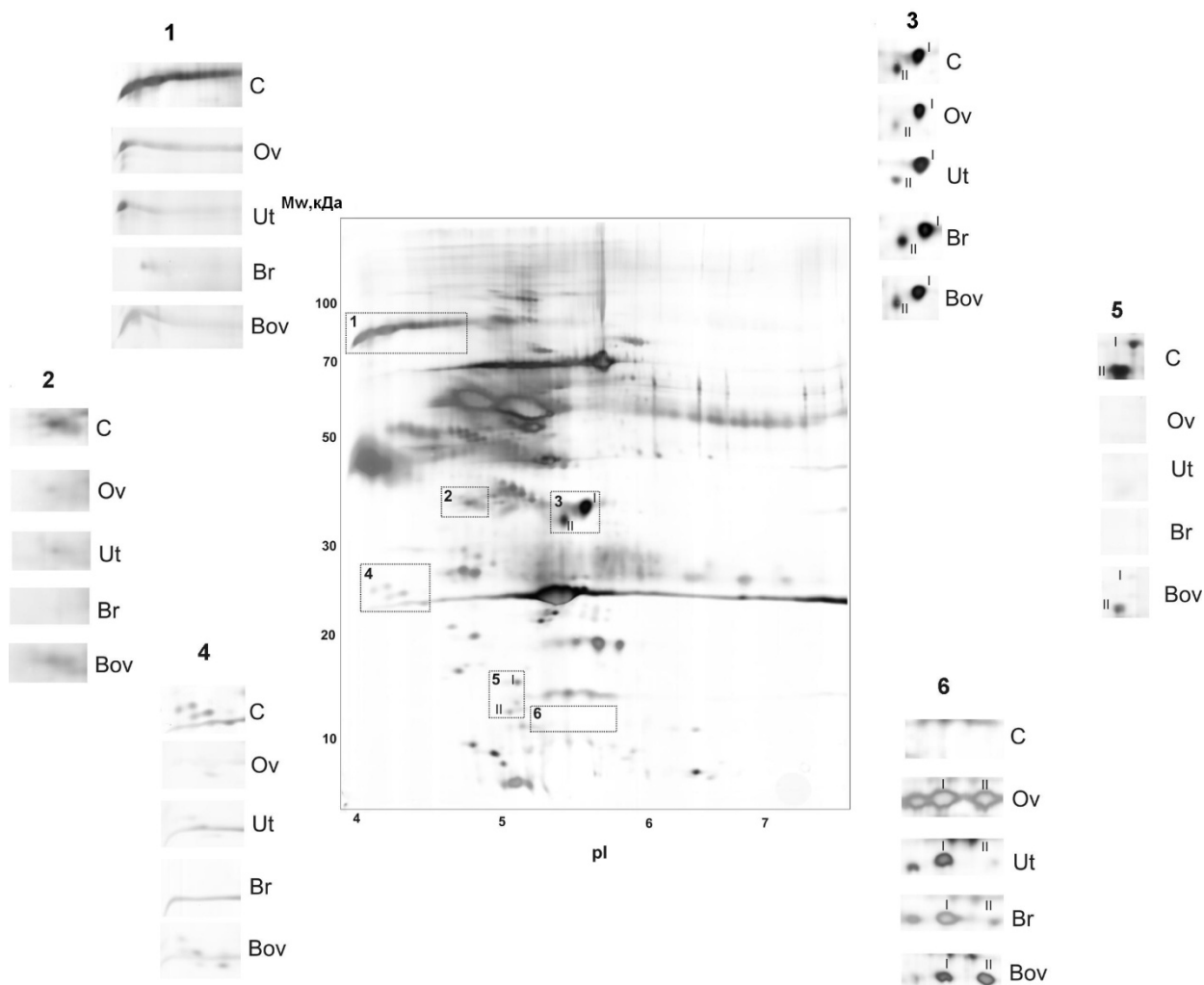
Из табл. 1 видно, что пятна кислого гликопротеина- $\alpha 1$  (область 1, рис. 2) и кластерина (область 2) имеют меньшую относительную суммарную интенсивность окраски по сравнению с контрольной группой при всех исследованных заболеваниях. Однако в наибольшей степени снижение относительной суммарной интенсивности окраски этих пятен выражено в случае рака молочной железы.

Заметное снижение относительной суммарной интенсивности окраски пятна транстретина (область 3) специфично для рака яичников, тогда как в остальных группах относительная интенсивность окраски этого пятна практически не отличается от контрольной группы.

Хорошо известно, что на двумерной электрофоретической карте сыворотки или плазмы видны несколько пятен, соответствующих различным изоформам аполипопротеина А (см., например, базу данных SWISS 2D-PAGE <http://www.expasy.ch/ch2d>). На наших гелях пятна, соответствующие apoA-I (области 4, 5, рис.2) исчезают или существенно уменьшаются для всех видов рака. Доброкачественные опухоли яичника занимают в этом отношении промежуточное положение: пятна apoA-I имеют интенсивность ниже, чем в контрольной группе, но выше, чем при раке. Пятно гаптоглобина  $\alpha 1$  существенно увеличено для рака молочной железы и рака яичника, но его интенсивность практически не меняется по сравнению с контрольной группой в случае рака матки и доброкачественных опухолей яичников. Заметим, что, предположительно, гаптоглобин может помочь различить рак яичника от доброкачественной опухоли, что является одной из основных проблем в диагностике рака яичника.

Еще два белка, для которых была обнаружена связь с опухолевым процессом, представляют собой кластерин (аполипопротеин J) и кислый гликопротеин- $\alpha 1$  (оросомукоид 1), понижение концентрации которых особенно характерно для рака молочной железы. Кластерин, липид-ассоциированный белок с неустановленной биологической функцией, ранее не был ассоциирован со злокачественными опухолями. Оросомукоид, представитель семейства липокалинов, в наших экспериментах имеет нетипичное расположение на геле. Наблюдаемое пятно соответствует удвоенной массе гликозилированной формы оросомукоида, которая равна

примерно	41–43	кДа.
----------	-------	------



**Рисунок 1.** Образец 2DE-геля термостабильной фракции сыворотки для контрольной группы (C) и примеры изменения областей для рака яичника (Ov), рака матки (Ut), рака молочной железы (Br) и доброкачественной опухоли яичника (Bov). Номера областей соответствуют белкам в табл. 1.

Концентрация модифицированной формы оросомукоида понижена при всех исследованных заболеваниях, в то же время есть некоторые данные об увеличении уровня оросомукоида в плазме при злокачественных опухолях (Duché et al. 2000).

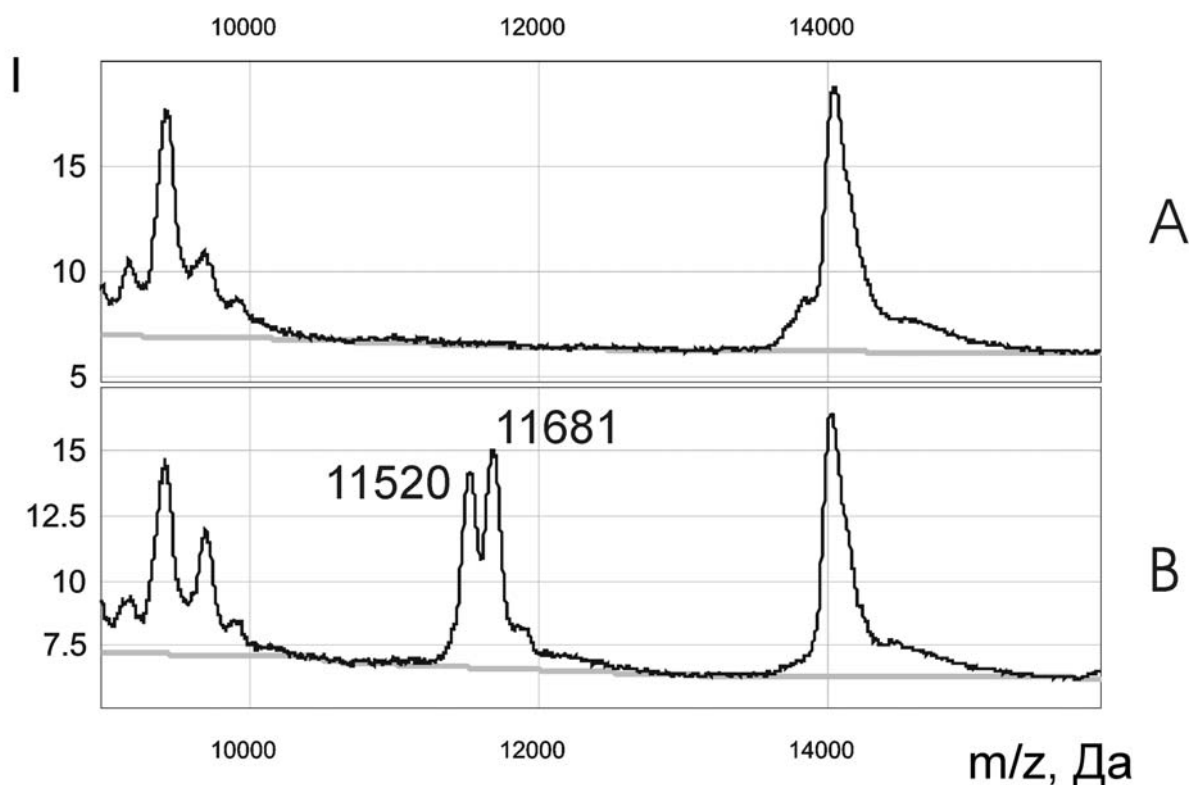
Пилотное исследование на небольшой группе образцов выявило основное направление изменений, которые происходят в высококопийной области протеома плазмы крови при разных опухолях, характерных для женщин. Следует полагать, что изменяющиеся при разных патологиях белки могут войти в состав штрих-кода плазмы крови, получаемого путем прямой MALDI-TOF-масс-спектрометрии.

**Сывороточный амилоид А в составе масс-спектрометрического протеомного штрих-кода при раке яичника.** В образцах термостабильной фракции плазмы крови пациенток с раком яичников при помощи SELDI-TOF-масс-спектрометрии ясно выделялся пик с соотношением  $m/z$  11,7 кДа. Анализ предшествующей литературы показал, что исследователи по-разному интерпретировали природу данного пика. В работе (Ye et al. 2003) он был косвенным образом идентифицирован как гликозилированная субъединица гаптоглобина-альфа 1 (HA1), тогда в другой работе (Howard et al. 2003) предполагалось, что эта масса относится к сывороточному амилоиду А (SAA1). Кроме того, еще в одной публикации (Wagner, Naik, and Pothen 2003) осуществляли интерпретацию данных, полученных с использованием сыворотки крови, по протеому раковых клеток, и ставили в соответствие описанный пик с  $m/z$  11,7 кДа ингибитору протеинкиназы С (рассчитанная молекулярная масса 11,5 кДа). Следует полагать, что указанный пик имеет одну и ту же природу. В настоящей работе решали задачу по устранению несоответствия интерпретации данного компонента штрих-кода.

При визуальной оценке профиля термостабильной фракции, полученного путем SELDI-TOF на поверхности с сильным анионообменником, четко выделяли дифференциальный пик с  $m/z$ , примерно равным 11,68 кДа, который характеризовал плазму пациенток. Указанный пик неизменно присутствовал в спектрах с другим пиком с  $m/z$  около 11,52 Да, имеющим сходную интенсивность (рис. 2). Расщепление на два пика указывало на то, что оба они представляют собой модификации одного и того же белка. Из 27 образцов плазмы пациентов с раком, использованных в данном разделе, 15 (55,6%) характеризовались такой парой пиков, в то время как лишь в 2 образцах из 34 контролей (5,8%) данные пики были выражены, но с очень низкой интенсивностью.

Для того, чтобы выявить, относятся ли указанные выше пики к сывороточному амилоиду А1, усредненное  $m/z$  однозарядного пика которого с учетом изотопного распределения соответствует 11682 Да, или к гаптоглобину альфа-1 (Ye et al. 2003), или к другому продукту, применяли метод модификации цистеинов, который до этого использовался для идентификации белков с небольшой молекулярной массы посредством масс-спектрометрии (Zhang et al. 2002). Модификация цистеинов

посредством группы 4-винилпиридина (4-VP) массой 105 Да приводит к сдвигу молекулярной массы, который соответствует числу остатков цистеина в последовательности, если они там имеются. Поскольку последовательность гаптоглобина альфа-1 содержит 3 цистеиновых остатка, а последовательность SAA1 вообще не содержит их, предложенный подход обеспечивает решение поставленной задачи.



**Рисунок 2.** Дифференциальный пик штрих-кода рака яичника с  $m/z$  11,5/11,7 кДа. Масс-спектры SELDI-TOF типовых термостабильных фракций с поверхности чипа с сильным анионообменником (SAX). А – контрольный образец №35; В – образец рака яичника №1, с указанием дифференциальных  $m/z$ . I – интенсивность сигнала,  $m/z$  – отношение массы к заряду.

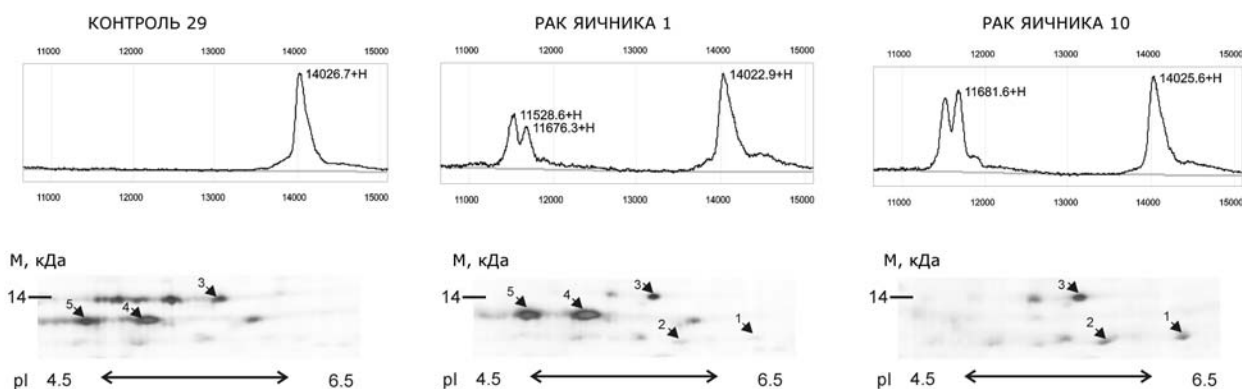
Показано, что описанная пара пиков с  $m/z$  11530/11682 Да не сдвигалась после модификации 4-VP (данные приведены в диссертации). В то же время, пик 13766 Да сдвинулся до 13869 Да, т.е. на один модифицированный остаток цистеина, и данный пик может интерпретироваться как пик транстиретина (инвентарный номер базы знаний UniProt P02766) со расчетным средним  $m/z$  однозарядного пика 13760 Да и

одним остатком цистеина в последовательности. Сходным образом, сдвигались и некоторые другие пики в спектрах. Отсутствие сдвига пиков 11530/11684 Да после модификации позволяет заключить, что данные пики соответствуют белковым молекулам без остатков цистеина в последовательности.

Данные SELDI-TOF-масс-спектрометрии далее сравнивали с картами 2D-электрофореза в контексте молекул сывороточного амилоида А для подтверждения результатов независимым методом. Для этого термостабильные фракции выбранных образцов плазмы подвергали процедуре 2D-электрофореза. Два пятна на данных гелях, которые были расположены в зоне ниже маркера молекулярной массы 14 кДа надежно идентифицировали посредством пептидного фингерпринта как SAA (NCBI ID gi:225986). Кроме того, предсказанные по результатам фингерпринта последовательности некоторых пептидов из масс-спектра расщепленных белков подтверждали путем фрагментации в масс-спектрометре TOF-TOF.

Для оценки связи между пиками SELDI-TOF и пятнами SAA на гелях, проводили серию экспериментов, в которых использовали образцы с разной интенсивностью окраски пятен SAA на геле и разной интенсивностью его предполагаемых пиков. Как показано на рис.3, наблюдалась четкая связь между интенсивностью пиков SELDI-TOF и относительную интенсивностью окраски пятен SAA.

Далее осуществляли выделение продукта с молекулярной массой 11,7 кДа из термостабильной фракции плазмы посредством жидкостной хроматографии и его прямую идентификацию путем масс-спектрометрии. Фракции, содержащие, по существу, выделенный продукт с интересующей массой, что подтверждалось масс-спектрометрией этих фракций, расщепляли трипсином. В результате получали хорошо представленный пептидный фингерпринт SAA1, который характеризовался 89%-ным покрытием последовательности этого белка (спектры приведены в диссертации). Предсказанные из фингерпринта последовательности двух из них подтверждали с помощью фрагментации TOF-TOF (спектры приведены в диссертации).



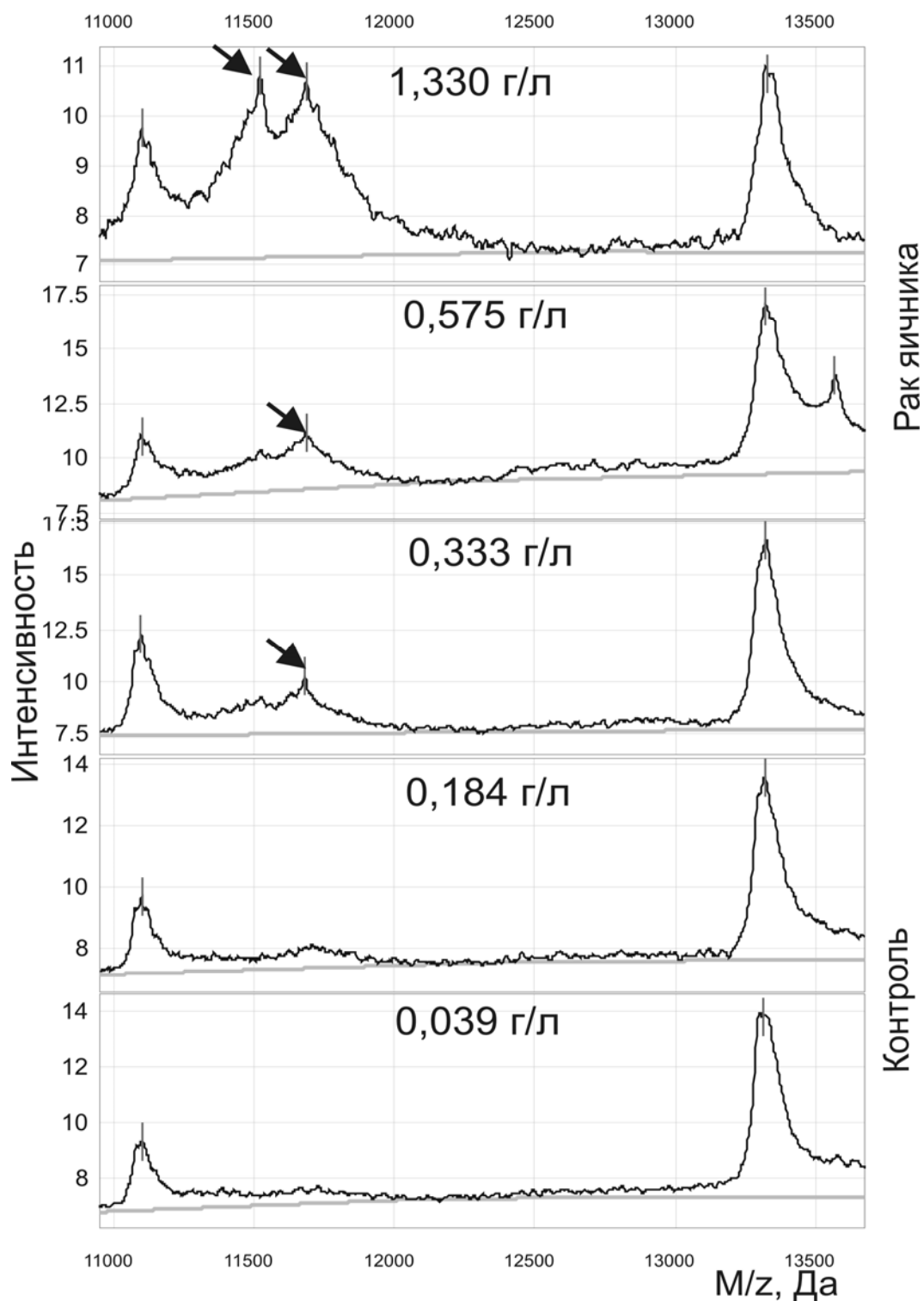
**Рисунок 3.** Сравнение данных SELDI-MS (поверхность SAX) и 2D-электрофореза для термостабильных фракций 3 взятых в качестве примера образцов плазмы (№29 – контроль; №1, №10 – рак яичника). Вверху: SELDI-MS: пик с  $m/z$  11,7 кДа – полноразмерная форма SAA1; пик с  $m/z$  11,5 кДа – форма с отщепленным N-концевым аргинином. Ось ординаты – интенсивность сигнала, ось абсциссы – отношение массы к заряду ( $m/z$ ), Да; оси на рисунке не обозначены для удобства восприятия. Внизу: 2D-EF: 1 – пятно SAA1 (NCBI ID gi:225986), идентифицированное путем пептидного фингерпринта (PMF) и фрагментации TOF-TOF, предполагаемая полноразмерная форма; 2 – пятно SAA1, идентифицированное путем пептидного фингерпринта (PMF), предполагаемая форма с отщепленным N-концевым аргинином; 3 – пятно транстиретина, (gi:4507725), идентифицированное путем PMF; 4, 5 – пятна гаптоглобина альфа-1 (gi:67586, остатки 19-101), идентифицированные путем PMF. М, Да – молекулярная масса, Да.

Таким образом, дифференциальный компонент масс-спектрометрического штрих-кода плазмы крови, присущий раку яичника, с  $m/z$  11,5-11,7 кДа, идентифицировали тремя способами как белок острой фазы сывороточный амилоид А.

**Протеомный штрих-код сыворотки крови для диагностики рака яичника.** Протеомный штрих-код, как совокупность диагностически значимых пиков масс-спектра, получали посредством метода SELDI-TOF. Дополнительно проводили иммунный анализ с учетом полученных знаний о значимости белка сывороточного амилоида А при раке яичника. Для всех работ данного раздела использовали сыворотки крови как более универсальный и просто обрабатываемый в клинике биоматериал. Для исследования использовали новую группу пациентов по сравнению с предыдущим разделом.

Концентрацию А-SAA измеряли методом иммуноферментного анализа во всех сыворотках. Во многих относящихся к раку сыворотках наблюдался существенно повышенный уровень А-SAA, который составлял до 3 г/л (примерно  $2,6 \times 10^{-4}$  М), тогда как в норме концентрация А-SAA составляет не более 0,03 г/л ( $2,6 \times 10^{-6}$  М). А-SAA как отдельный биомаркер рака яичника при критическом значении концентрации 0,3 г/л ( $2,6 \times 10^{-5}$  М) обладает чувствительностью 50% (17 определенных рака из 34) и специфичностью 96,4% (54 из 56 сывороток женщин, не больных раком).

Осуществляли масс-спектрометрическую детекцию белка А-SAA в сыворотке крови. Лучших результатов по выявлению его пиков удалось добиться при применении нормальнофазовых чипов NP20. В итоге осуществляли профилирование всех вовлеченных в исследование сывороток на чипах для SELDI NP20. При этом пик массой 11,68 кДа выявляли во всех сыворотках с концентрацией А-SAA 0,33 г/л и более (по данным иммуноферментного анализа). Иными словами, все 19 сывороток с концентрацией А-SAA выше 0,3 г/л имеют хорошо выраженный пик в интересующем нас интервале значений  $m/z$  (рис. 4). На основе имеющихся данных можно утверждать, что чувствительность масс-спектрометрического определения А-SAA в сыворотке лежит в пределах концентраций 0,2-0,3 г/л ( $1,7-2,6 \times 10^{-5}$  М). Важно отметить, что критический уровень А-SAA, детектируемый с помощью масс-спектрометрии SELDI-TOF, очень близок критическому уровню этого белка для ряда острых и хронических заболеваний (Casl, Surina, et al. 1995; Casl, Bulatovic, et al. 1995), и поэтому возможно использовать прямое масс-спектрометрическое профилирование для быстрого определения повышенного уровня А-SAA в сыворотке. Для дальнейшей диагностической классификации спектров сыворотки использовали жесткие условия для детектирования пиков в масс-спектрах всех 90 проб. В результате выявляли 48 пиков в интервале  $m/z$  5500-17500 Да, каждый из которых имеет высокую интенсивность (соотношение сигнал/шум  $> 5$ ), по крайней мере, в одной исследованной пробе. Список интенсивностей полученных пиков для всех сывороток, разделенных на два класса (рак и отсутствие рака), использовали в качестве исходных данных для разработки диагностических алгоритмов с использованием различных статистических методов.



**Рисунок 4.** Чувствительность определения А-SAA в сыворотке с помощью масс-спектрометрии SELDI-TOF. Для каждого спектра показаны значения концентрации А-SAA, измеренные методом иммуноферментного анализа. Стрелками показаны пики А-SAA на спектрах.



**Таблица 2.** Результаты применения метода опорных векторов и метода логистической регрессии для классификации раковых сывороток и сывороток субъектов, не больных раком. Чувствительность и специфичность определяли с использованием 10-кратной перекрестной проверки достоверности

Метод	Точность, %	Специфичность, %	Чувствительность, %
SVM (CA125) <sup>а</sup>	86,2±0,7 <sup>с</sup>	98,8±0,3	64,7±1,7
SVM (ИФА) <sup>б</sup>	86,4±0,7	96,5±0,5	70,3±1,8
SVM RFE (MS) <sup>в</sup>	89,5±0,7	93,3±0,7	83,6±1,6
SVM (TSP(MS)+ИФА) <sup>г</sup>	86,7±0,7	92,8±0,8	77,5±1,6
SVM RFE (ИФА+MS) <sup>д</sup>	95,2±0,4	98,1±0,4	90,8±1,1
LR (CA125)	85,1±0,7	95,6±0,5	67,5±1,7
LR (ИФА)	86,6±0,7	94,3±0,6	74,2±1,7
LR (MS)	86,0±0,7	87,5±1,3	83,7±1,5
LR AIC (TSP(MS)+ИФА)	90,7±0,6	96,9± 0,5	81,2±1,4
LR AIC (ИФА+MS)	91,9±0,6	92,7±0,7	90,7±1,1

*Сокращения:* SVM – метод опорных векторов, LR – логистическая регрессия, RFE – рекурсивный отбор признаков, AIC – информационный критерий Акаике, TSP – метод пар с наибольшим коэффициентом.

<sup>а</sup> В качестве единственной переменной применяли уровень CA125.

<sup>б</sup> В качестве переменных использовали концентрации CA125 и A-SAA, измеренные методом иммуноферментного анализа.

<sup>в</sup> В качестве переменных использовали 48 значений интенсивности пиков SELDI- спектров.

<sup>г</sup> Два значения концентраций, измеренных с помощью ИФА, совместили с бинарной переменной, полученной путем применения TSP к масс-спектрометрическим данным.

<sup>д</sup> 48 переменных масс- спектров SELDI-TOF комбинировали с двумя переменными ИФА.

<sup>с</sup> Доверительный интервал вычисляли для доверительной вероятности, равной 0,05.

Далее разрабатывали диагностический алгоритм на основе комбинированных протеомных данных с использованием метода опорных векторов и логистической регрессии (таблица 2).

Диагностический алгоритм создавали на основе (1) данных ИФА о концентрации принятого биомаркера рака яичника CA125; (2) данных ИФА о концентрациях CA125 и A-SAA; (3) данных масс-спектрометрии, то есть значений интенсивностей 48 SELDI-MS  $m/z$  пиков; (4) комбинированных данных ИФА о концентрациях CA125 и A-SAA и масс-спектрометрических данных; и (5) данных ИФА о концентрациях CA125 и A-SAA в комбинации с бинарной переменной, полученной после применения TSP-анализа. Точность, чувствительность и специфичность полученных диагностических алгоритмов приведены в таблице 2.

Наилучшей точности распознавания (95,2%) рака и отсутствия рака удалось достичь при использовании SVM для обработки комбинированных данных ИФА и масс-спектрометрии.

Затем анализировали идентичность дискриминаторных пиков SELDI-TOF, характерных для рака яичника и отобранных различными классификаторами. Среди таких пиков несколько соответствуют разным формам сывороточного амилоида А. Кроме того, в списке присутствуют пики, соответствующие нативной и цистеинилированной формам транстиретина. Кроме того, одним из маркерных пиков, отобранных методом опорных векторов, является пик 6441 Да, соответствующий апополипротеину С1 с отщепленными N-концевыми треонином и пролином.

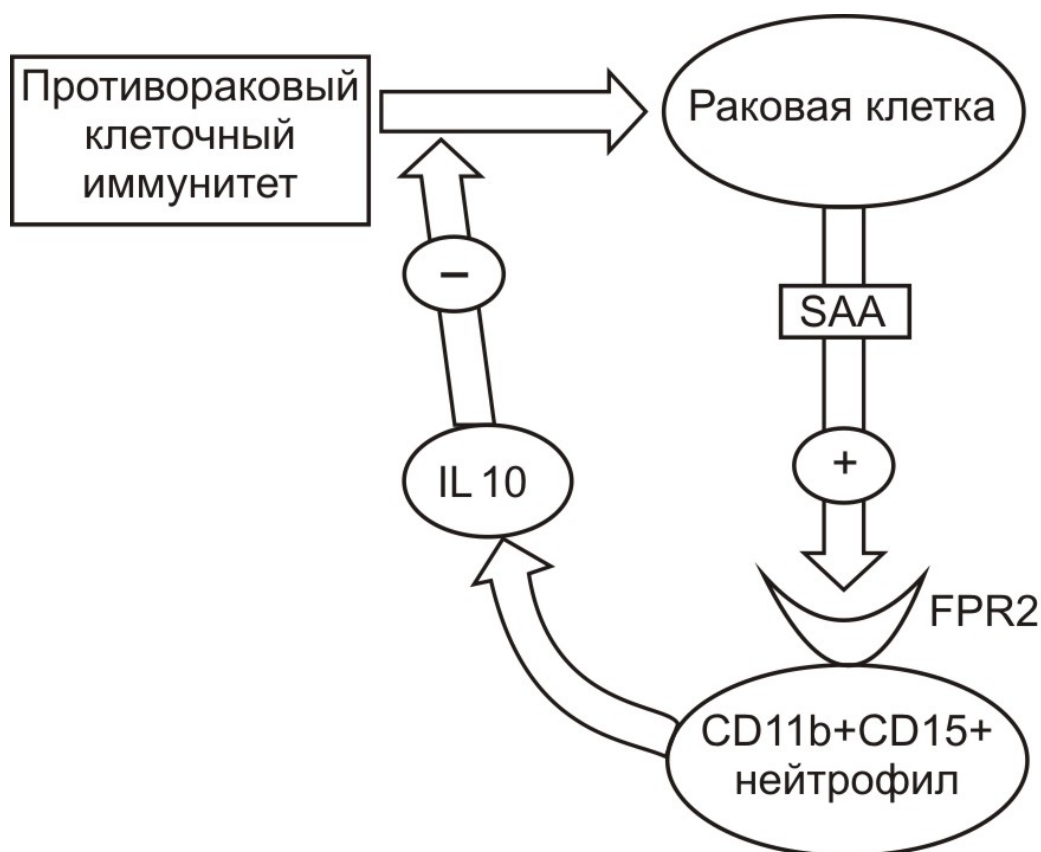
Таким образом, протеомный масс-спектрометрический штрих-код, полученный при помощи технической простого метода SELDI-TOF-масс-спектрометрии, обеспечивал на экспериментальной выборке достаточной эффективное разделение образцов от пациентов с раком яичника и от субъектов без этой патологии. В разделе продемонстрирована возможность совместной обработки и введения в состав общего диагностического «штрих-кода» данных, полученных разными способами, например, масс-спектрометрией и иммунным анализом.

В настоящей работе показано, что одним из важнейших компонентов профиля, присущего сыворотке и плазме пациенток с раком яичника, является белок сывороточный амилоид А острой фазы. Часто повышается уровень этого белка и при

других злокачественных опухолях. В данной работе мы, основываясь на собственных и литературных данных, предлагаем возможный механизм участия А-SAA в опухолевом процессе. Предположение, что SAA в этих случаях продуцируется печенью, как при воспалительных заболеваниях, и является частью неспецифического ответа организма на повреждение опухолью, не оправдалось. Было обнаружено, что при многих опухолях из перечисленных, указанный белок продуцируется непосредственно опухолевыми клетками. Каков биологический смысл этого явления? Какие преимущества получают раковые клетки за счет экспрессии SAA? По последним данным, полученным при исследовании злокачественной меланомы, амилоид А способен усиливать продукцию иммуносупрессорными нейтрофилами, находящимися в опухоли, интерлейкина-10, подавляющего клеточный иммунитет (De Santo et al. 2010). По-видимому, приобретенная путем мутагенеза способность опухолевых клеток продуцировать сывороточный амилоид А увеличивает их сопротивляемость Т-клеточному иммунитету за счет активации иммуносупрессорных гранулоцитов (рис.5).

Этот вероятный механизм объясняет маркерные свойства SAA, наблюдаемые в данной работе и в других статьях и позволяет задуматься о связанных с этим белком разработках для практического применения. Так, SAA в ряде случаев может входить в диагностические и прогностические панели (Edgell et al. 2010). Кроме того, взаимодействие амилоида А с его рецептором FPR2 представляет собой интерес для блокирования потенциальными лекарственными средствами с целью индукции противоопухолевого иммунитета.

**Протеомный штрих-код плазмы крови для диагностики рака предстательной железы.** В данном разделе получали протеомный штрих-код для диагностики рака предстательной железы с использованием профилирования плазмы крови на MALDI-TOF-масс-спектрометре UltraFlex II, сравнивая результаты исследования с данными традиционного маркера простатоспецифического антигена.



**Рисунок 6.** Гипотетическая схема регуляции сывороточным амилоидом А острой фазы (SAA) противоопухолевого иммунитета (по [De Santo et al, 2010]). Продуцируемый раковой клеткой SAA посредством рецептора FPR2 активирует иммуносупрессорные гранулоциты фенотипа CD11b<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup>. Последние осуществляют выброс интерлейкина-10, который подавляет локальный Т-клеточный иммунитет, обеспечивая конкурентные преимущества экспрессирующей SAA опухолевой клетке.

Вначале оптимизировали условия получения масс-спектрометрических штрих-кодов плазмы крови, применяя методы хроматографических белковых чипов SELDI, магнитных гранул ClinProt WCX и хроматографических наконечников ZipTip C18. Для получения масс-спектрометрических штрих-кодов плазмы крови испытывали три разных коммерчески доступных подхода к выделению фракции пептидов и низкомолекулярных белков перед масс-спектрометрическим профилированием. В итоге, для проведения профилирования в целях разработки диагностического алгоритма выбирали метод с предварительным фракционированием на наконечниках ZipTip C18, так как он позволял получать наиболее воспроизводимые результаты и детектировать больше масс-спектрометрических пиков, по сравнению с SELDI и ClinProt (данные приведены в диссертации).

На основе полученных выбранным способом масс-спектров MALDI-TOF создавали диагностический алгоритм. Указанным методом с использованием фракционирования на ZipTip C18 и MALDI-TOF-масс-спектрометрии на приборе Ultraflex получали протеомные штрих-коды для 36 образцов цитратной плазмы крови от пациентов с раком предстательной железы и для 46 субъектов, не страдающих данной патологией.

Для всех переменных были вычислены значения площади под диагностической ROC-кривой (AUC) для оценки их дискриминаторной способности. Среди всех переменных наибольшим значением AUC (0,79) обладал масс-спектрометрический пик с  $m/z$  2376. По анализу литературы удалось установить вероятную идентичность указанного пика, который, по-видимому, представлял собой фрагмент альфа-цепи фибриногена.

Далее к масс-спектрометрическим данным применяли метод опорных векторов (SVM) с линейным ядром. В качестве метода снижения размерности данных использовали процедуру рекурсивного отбора признаков (RFE). Оценку параметра  $C$  и точности классификаторов проводили путем применения 100 запусков процедуры 10-кратной перекрестной проверки. Получены 95%-ные доверительные интервалы для значений точности, чувствительности и специфичности классификации.

Устанавливали зависимость точности предсказания от числа переменных, входящих в диагностическую модель. Максимальная точность классификации достигается при 19 переменных в составе штрих-кода. При этом достигается точность  $93,7 \pm 0,8\%$ , чувствительность  $89,1 \pm 1,8\%$  и специфичность  $97,9 \pm 0,8\%$ . Для ряда масс-спектрометрических переменных, входящие в состав оптимального алгоритма диагностики, из литературных и собственных данных удалось предсказать идентичность. Так, в составе штрих-кода наблюдаются варианты SAA и транстиретина, присущие также штрих-коду рака яичника.

В итоге продемонстрирована возможность разработки диагностического алгоритма для рака предстательной железы на основе масс-спектрометрических штрих-кодов MALDI-TOF с точностью диагностики (94%), существенно превышающей таковую для PSA (около 75% в выбранной когорте).

**Масс-спектрометрические и цитокиновые профили сыворотки крови для диагностики Т-клеточной лимфомы кожи.** Первичная Т-клеточная лимфома кожи является распространенной формой злокачественной опухоли кожи. Наиболее часто встречается форма этой опухоли, называемая грибовидным микозом (ГМ). Клиническая диагностика указанного заболевания затруднена по причине его разнообразных клинических проявлений, которые часто сходны с симптомами хронического воспалительного дерматоза (Zackheim and McCalmont 2002). Особенно трудно диагностировать ГМ на его ранней стадии. В данном разделе мы оценивали возможность лабораторной диагностики Т-клеточной лимфомы кожи в форме грибовидного микоза с использованием протеомного профилирования образцов сыворотки крови. Для этого применяли профилирование путем MALDI-TOF-масс-спектрометрии и другой способ мультиплексного протеомного анализа, основанной на технологии флуоресцентных гранул xMAP (Kellar and Iannone 2002). Этот метод, по существу, сочетает в себе иммунофлуоресцентный анализ с лазерной сортировкой полимерных частиц, технически подобной сортировке меченых клеток в проточном цитофлуориметре-сортере. Выбор целевых белков для мультиплексной диагностики Т-клеточной лимфомы кожи основан на существующем знании о патогенезе заболевания. Цитокины являются белками, тесно связанными с патогенезом злокачественных опухолей, особенно, связанных с тканями иммунной системы.

Таким образом, мы исследовали образцы сыворотки крови от пациентов с Т-клеточной лимфомой кожи в форме грибовидного микоза (ГМ), от пациентов с псориазом и от здоровых доноров в качестве контрольных групп путем анализа протеомных профилей, полученные посредством MALDI-TOF-масс-спектрометрии, и цитокиновых профилей, полученных с использованием иммунофлуоресцентной технологии xMAP.

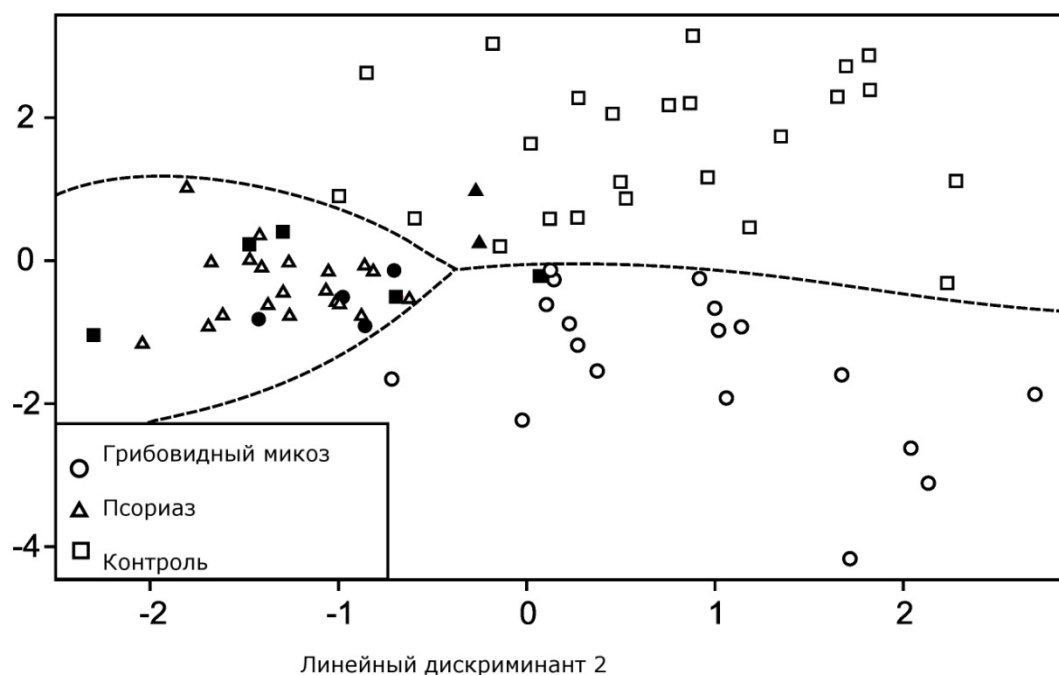
Масс-спектрометрический штрих-код сыворотки при Т-клеточной лимфоме кожи, полученный путем MALDI-TOF-масс-спектрометрии выявил ряд отличий в исследуемых группах. Статистическая обработка данных, полученных путем масс-спектрометрии (183 пика), продемонстрировала значимые отличия между группами пациентов с ГМ и псориазом по двум белковым пикам ( $p < 0,05$ ) со значениями  $m/z$  4326,8 and 7674,4 Да. Тем не менее, продемонстрированная по масс-

спектрометрическим данным точность диагностики ГМ, не превышающая 75%, не дает возможность рассматривать указанную модель как подходящую для дальнейших клинических испытаний. Проявления ГМ в основном затрагивают кожу, что в малой степени отражается на составе крови, в отличие от проявлений солидных опухолей.

**Таблица 3.** Диагностические характеристики цитокинов со значимо различающимися концентрациями между группами грибвидного микоза (ГМ), псориаза и здоровых доноров.

Цитокин	Инвентарный номер UniProt	Кратность изменения средней концентрации белка	Уровень значимости <i>p</i>	AUC (площадь под ROC-кривой)	Точность, %	Чувствительность, %	Специфичность, %	Уровень отсечения для концентрации цитокина в сыворотке, нг/л
Цитокины, значимо различающиеся между группами грибвидного микоза и здоровых доноров								
IL-1ra	P18510	1,75	$4,6 \times 10^{-5}$	0,85	82,2	91,3	72,7	58,77
IL-4	P05112	1,49	0,0032	0,77	75,5	91,3	59	4,53
G-CSF	P09919	2,23	0,0003	0,82	80	78,2	81,8	17,33
IP-10	P02778	7,2	$2,4 \times 10^{-7}$	0,92	88,8	82,6	95,4	3233,9
Цитокины, значимо различающиеся между группами грибвидного микоза и псориаза								
IP-10	P02778	4,06	0,00029	0,8	76,9	65,2	86,2	5264,84

Линейный дискриминант 1



**Рисунок 7.** Классификация образцов от грибовидного микоза (ГМ; кружки), псориаза (квадраты) и от здоровых доноров (контроль; треугольники) с использованием линейного дискриминанта Фишера на основе концентраций 27 цитокинов. Закрашенные фигуры обозначают случаи, идентифицированные неверно.

В этом смысле ожидаемо, что штрих-коды MALDI-TOF-MS при Т-клеточной лимфоме кожи не смогли выявить ярких, существенных изменений, предоставляющих высокую точность диагностики.

В сыворотках от пациентов с ГМ и псориазом, а также от здоровых доноров анализировали уровень 27 цитокинов. Значительное повышение концентрации хемокина с мотивом C-X-C 10 (IP-10, CXCL10) ( $p = 0,00029$ ) наблюдали в группе пациентов с ГМ (таблица 3) по сравнению с группой псориаза. При сравнении между группами ГМ и здоровых доноров выявляли значимое изменение в уровне 4 цитокинов ( $p < 0,05$ ) (таблица 3), включая тот же IP-10, белок-антагонист рецептора интерлейкина 1 альфа (IL-1ra), интерлейкин 4 (IL-4) и гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF). Анализ ROC-кривых на данных по уровню



IP-10 дал значения площади под кривой (AUC) для отделения ГМ от псориаза и контроля, равные 0,8 и 0,92, соответственно.

Для оптимизации диагностической модели использовали концентрации всех цитокинов, и строили мультипараметрическую модель диагностики ГМ с использованием линейного дискриминанта Фишера. В данной модели классифицировали сразу 3 группы (ГМ, псориаз и контроль) и получали точность диагностики, равную 80% ( $0,8 \pm 0,03$ ) (рис. 7).

Значимым результатом анализа является впервые обнаруженное значительное повышение в крови пациентов с грибвидным микозом хемокина с мотивом C-X-C 10 (IP-10, CXCL10). Отдельно или в сочетании с существующими молекулярными методами диагностики, тест на IP-10 следует далее испытывать для возможного клинического применения.

## ВЫВОДЫ

1. В качестве биомаркера рака использован мультиплексный сигнал масс-спектрометрии плазмы крови, одновременно характеризующий множественные белки плазмы крови – протеомный штрих-код. В настоящей работе протеомный штрих-код опробован на образцах плазмы крови от групп пациентов с раком яичника, предстательной железы и Т-клеточной лимфомы кожи для диагностики по отношению к образцам от соответствующих контрольных групп. Принятие диагностического решения осуществляли методами многомерной статистики, в частности, такими как метод опорных векторов (SVM), логистическая регрессия и линейный дискриминант Фишера.

2. Протеомный штрих-код плазмы крови, регистрируемый посредством MALDI(SELDI)-TOF-масс-спектрометрии, обеспечивает достоверное разграничение образцов от пациентов с раком яичника и образцов от контрольных субъектов с точностью диагностики, равной 90%, что превосходит точность, обеспечиваемую общепринятым маркером СА-125. Компоненты штрих-кода, вносящие вклад в диагностику, представляют собой высококопийные белки и пептиды плазмы крови, связанные с общей реакцией организма на опухоль, преимущественно, различные изоформы сывороточного амилоида А острой фазы (SAA) и транстиретины (TTR). Объединение данных масс-спектрометрии плазмы крови и иммуноферментного анализа принятого маркера рака яичника СА-125 предоставляет значимое повышение точности диагностика рака до 95%.

3. Протеомный штрих-код плазмы крови, регистрируемый посредством MALDI-TOF-масс-спектрометрии, обеспечивает достоверное разграничение образцов от пациентов с раком предстательной железы и от контрольных субъектов с точностью диагностики, равной 93%, что превосходит точность, обеспечиваемую принятым маркером PSA. Идентифицированные компоненты штрих-кода, вносящие вклад в диагностику, сходны с таковыми для рака яичника.

4. В случае Т-клеточной лимфомы кожи масс-спектрометрический протеомный штрих-код плазмы крови не характеризовался высокой точностью, по всей видимости, в связи с местнораспространенным характером опухоли.

Проведенный дополнительно мультиплексный анализ цитокинов в плазме крови обеспечивает точность дифференциальной диагностики лимфомы от псориаза свыше 80% и предоставляет информацию о новом, ранее неизвестном биомаркере Т-клеточной лимфомы кожи - хемокине с мотивом C-X-C 10 (CXCL10).

5. В связи с разнообразием молекулярных механизмов злокачественных опухолей при сходных клинических проявлениях использование отдельных молекулярных биомаркеров не обеспечивает высокой эффективности диагностики. Мультиплексный протеомный штрих-код является перспективным способом диагностики злокачественных опухолей для дальнейшего внедрения в клиническую практику.

#### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Lokhov P.G., Tikhonova O.V., Moshkovskii S.A., Goufman E.I., Serebriakova M.V., Maksimov B.I., Toropyguine I.Y., Zgoda V.G., Govorun V.M., Archakov A.I. Database search postprocessing by neural network: Advanced facilities for identification of components in protein mixtures using mass spectrometric peptide mapping. // *Proteomics*. 2004. V.4(3). p.633-642.
2. Moshkovskii S.A., Serebryakova M.V., KuteykinTeplyakov K.B., Tikhonova O.V., Goufman E.I., Zgoda V.G., Taranets I.N., Makarov O.V., Archakov A.I. Ovarian cancer marker of 11.7 kDa detected by proteomics is a serum amyloid A1. // *Proteomics*. 2005. V.5(14) p. 3790-3797.
3. Власова М.А., Мошковский С.А., Сафарова М.Р., Макаров О.В., Арчаков А.И. Молекулярная диагностика рака яичника с использованием протеомных технологий // *Биомедицинская химия*. 2005. Т. 51(4). С. 367-383.
4. Власова М.А., Мошковский С.А. Молекулярные взаимодействия сывороточного амилоида А острой фазы: возможное участие в патогенезе злокачественных опухолей // *Биохимия*. 2006. Т.71(10) С.1301-1311.
- 4а. Vlasova M.A., Moshkovskii S.A. Molecular interactions of acute phase serum amyloid A: possible involvement in carcinogenesis. // *Biochemistry (Mosc)*. 2006. V.71(10). P.10511059.

5. Гоуфман Е.И., Мошковский С.А., Тихонова О.В., Лохов П.Г., Згода В.Г., Серебрякова М.В., Торопыгин И.Ю., Власова М.А., Сафарова М.Р., Макаров О.В., Арчаков А.И. Протеомное исследование термостабильной фракции сыворотки пациентов с различными опухолями с применением двумерного электрофореза. // Биохимия. 2006. Т. 71(4). С.445-463.
- 5a. Goufman E.I., Moshkovskii S.A., Tikhonova O.V., Lokhov P.G., Zgoda V.G., Serebryakova M.V., Toropygin I.Y., Vlasova M.A., Safarova M.R., Makarov O.V., Archakov A.I. Two-dimensional electrophoretic proteome study of serum thermostable fraction from patients with various tumor conditions. *Biochemistry (Mosc)*. 2006. V.71(4). P.354-360.
6. Moshkovskii S.A., Vlasova M.A., Pyatnitskiy M.A., Tikhonova O.V., Safarova M.R., Makarov O.V., Archakov A.I. Acute phase serum amyloid A in ovarian cancer as an important component of proteome diagnostic profiling. *Proteomics Clin. Appl.* 2007. V.1(1). P.107-117.
7. Зиганшин Р.Х., Алексеев Д.Г., Арапиди Г.П., Иванов В.Т., Мошковский С.А., Говорун В.М. Протеомное профилирование сыворотки для диагностики рака яичника с использованием технологии магнитных гранул ClinProt и MALDI-TOF-масс-спектрометрии // Биомедицинская химия. 2008. Т.53(4). С.408-419.
8. Пономаренко Е.А., Лисица А.В., Петрак Ж., Мошковский С.А., Арчаков А.И. Выявление дифференциально экспрессирующихся белков с использованием автоматического мета-анализа протеомных публикаций. // Биомедицинская химия. 2009. Т. 55(1). С. 514.
9. Пахарукова Н.А., Пастушкова Л.Х., Трифонова О.П., Пятницкий М.А., Власова М.А., Никитин И.П., Мошковский С.А., Николаев Е.Н., Ларина И.М. Оптимизация метода профилирования сыворотки крови здорового человека. // Физиология человека. 2009. Т.35(3). С.101-107.
10. Ulukaya E., Yilmaz Y., Moshkovskii S., Karpova M., Pyatnitskiy M., Atug O., Dolar E. Proteomic analysis of serum in patients with nonalcoholic steatohepatitis using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. // *Scand. J. Gastroenterol.* 2009. V. 44(12) P. 1471-1476.
11. Karpova M.A., Moshkovskii S.A., Toropygin I.Y., Archakov A.I. Cancer-specific MALDI-TOF profiles of blood serum and plasma: biological meaning and perspectives. // *J. Proteomics.* 2010. V.73(3). P.537-551.

12. Pyatnitskiy M., Karpova M., Moshkovskii S., Lisitsa A., Archakov A. Clustering mass spectral peaks increases recognition accuracy and stability of SVM-based feature selection // J. Proteomics Bioinform. 2010. V.3. P. 48-54.
13. Trifonova O., Larina I., Grigoriev A., Lisitsa A., Moshkovskii S., Archakov A. Application of 2DE for studying the variation of blood proteome. // Expert Rev. Proteomics. 2010. V. 7(3). P. 431-438.
14. Piruzian E., Bruskin S., Ishkin A., Abdeev R., Moshkovskii S., Melnik S., Nikolsky Y., Nikolskaya T. Integrated network analysis of transcriptomic and proteomic data in psoriasis. // BMC Syst. Biol. 2010 V.4. P.41.
15. Агрон И.А., Автономов Д.М., Кононихин А.С., Попов И.А., Мошковский С.А., Николаев Е.Н. База данных по точным массово-временным меткам для хромато-масс-спектрометрического анализа протеома мочи. // Биохимия. 2010. Т.75(4). С.598-605.
- 15a. Agron I.A., Avtonomov D.M., Kononikhin A.S., Popov I.A., Moshkovskii S.A., Nikolaev E.N. Accurate mass tag retention time database for urine proteome analysis by chromatography-mass spectrometry. // Biochemistry (Mosc). 2010. V.75(5). P.636-641.
16. Lisitsa A.V., Petushkova N.A., Thiele H., Moshkovskii S.A., Zgoda V.G., Karuzina I.I., Chernobrovkin A.L., Skipenko O.G., Archakov A.I. Application of slicing of one-dimensional gels with subsequent slice-by-slice mass spectrometry for the proteomic profiling of human liver cytochromes P450. // J. Proteome Res. 2010. V.9(1). P. 95-103.
17. Пахарукова Н.А., Пастушкова Л.Х., Трифонова О.П., Мошковский С.А., Ларина И.М. Вариабельность низкомолекулярного субпротеома сыворотки крови здорового человека в обычных условиях жизнедеятельности // Физиология человека. 2011. Т. 37(2). С. 7785.
18. Агрон И.А., Автономов Д.М., Кононихин А.С., Попов И.А., Мельник С.А., Мошковский С.А., Николаев Е.Н. Комбинация подходов точной массово-временной метки и мечения изотопом кислорода  $^{18}\text{O}$  для количественного анализа протеома мочи человека // Труды МФТИ. 2011. Т.3(3). С.310.
19. Пятницкий М.А., Лисица А.В., Мошковский С.А., Арноцкая Н.Е., Ахмедов Б.Б., Заридзе Д.Г., Полоцкий Б.Е., Шевченко В.Е. Выявление дифференциальных признаков

плоскоклеточного рака легкого с помощью масс-спектрометрического профилирования плазмы крови // Масс-спектрометрия. 2011. Т. 8(2). С. 99-105.

19a. Pyatnitskii M.A., Lisitsa A.V., Moshkovskii S.A., Arnotskaya N.E., Akhmedov B.B., Zaridze D.G., Polotskii B.E., Shevchenko V.E. Differential diagnostics of squamous cell lung carcinoma by means of the mass spectrometry profiling of blood plasma. // Journal of Analytical Chemistry. 2011. V. 66(14) P. 1369-1375.

20. Moshkovskii S.A., Sokolova E.E., Brattseva E.V., Karpova M.A., Pyatnitskiy M.A., Kubanova A.A., Archakov A.I. Proteome and cytokine serum profiling to diagnose a mycosis fungoides. // Proteomics Clin. Appl. 2011. V. 5(78). P. 432-439.

21. Мошковский С.А. Почему клетки злокачественных опухолей продуцируют сывороточный амилоид А острой фазы? // Биохимия. 2012. Т. 77(4). С.433-436.

21a. Moshkovskii S.A. Why do cancer cells produce serum amyloid A acute phase protein? // Biochemistry (Moscow). 2012. V. 77(4). P. 339-341.

#### **Материалы трудов конференций**

22. Moshkovskii S.A., Serebryakova M.V., Kuteykin-Тепляков К.В., Tikhonova O.V., Goufman E.I., Makarov O.V., Archakov A.I. Ovarian cancer marker of 11.7 kDa detected by proteomics is a serum amyloid A1 // Abstr. 2<sup>nd</sup> International Conference "Genomics, Proteomics and Bioinformatics for Medicine". Moscow, Russia. 2004. P. 2.10.

23. Moshkovskii S., Serebryakova M., Taranets I., Makarov O., Archakov A. "Ovarian cancer marker of 11.7 kDa detected by proteomics is a serum amyloid A1" // Abstr. HUPO 3th Annual World Congress. Beijing, China. Molecular & Cellular Proteomics. 2004. V.3(10) (Supplement). P. S222.

24. Moshkovskii S., Vlasova M., Safarova M., Makarov O., Archakov A. "Serum amyloid A as ovarian cancer biomarker" // Abstr. HUPO 4th Annual World Congress. Munich, Germany. Molecular & Cellular Proteomics. 2005. V. 4(8) (Supplement 1). P. S122.

25. Власова М. А., Мошковский С. А., Арчаков А. И. Комбинирование данных масс-спектров SELDI и концентрации СА125 для диагностики рака яичника // Мат. докл. Международной школы-конференции молодых ученых «Системная биология и биоинженерия». Москва. 2005. С.18.

26. Moshkovskii S.A., Vlasova M. A., Pyatnitskiy M. A., Archakov A.I. Acute phase serum amyloid A in ovarian cancer as an important component of proteome diagnostic profile. // Abstr. 3rd International Conference "Genomics, Proteomics, Bioinformatics and Nanotechnologies for Medicine". Novosibirsk, Russia. 2006. P.64.
27. Moshkovskii S.A., Vlasova M.A., Pyatnitskiy M.A., Archakov A.I. Serum amyloid A and tranthyretin forms constitute discriminatory SELDI profile for ovarian cancer. // Abstr. HUPO 5th Annual World Congress. Long Beach, CA, USA. Molecular & Cellular Proteomics. 2006. V.5(10) (Supplement). P.S143.
28. Пятницкий М.А., Мошковский С.А. Кластеризация пиков масс-спектров как способ снижения размерности // Мат. докл 3-ей Международной школы-конференции молодых ученых «Масс-спектрометрия в химической физике, биофизике и экологии». Звенигород. 2007. С.82.
29. Мошковский С.А. Масс-спектрометрия в диагностической протеомике // Мат. докл 3-ей Международной школы-конференции молодых ученых «Масс-спектрометрия в химической физике, биофизике и экологии». Звенигород. 2007. С. 142.
30. Харыбин О.Н., Згода В.Г., Кононихин А.С., Мошковский С.А., Попов И.А., Николаев Е.Н. Исследование белкового состава мочи человека // Мат. докл 3-ей Международной школы-конференции молодых ученых «Масс-спектрометрия в химической физике, биофизике и экологии». Звенигород. 2007. С. 158.
31. Moshkovskii S., Pyatnitskiy M., Archakov A. Analysis of Peak Intensity Correlations to Maximize Biological Meaning of Proteome Diagnostic Mass Spectra // Abstr. HUPO 6th Annual World Congress. Seoul, Korea. 2007. P. 150.
32. Moshkovskii S.A, Pyatnitskiy M.A., Archakov A.I. Analysis of peak intensity correlations to maximize biological meaning of proteome diagnostic mass-spectra // Abstr. 4th International Symposium on Computational Methods In Toxicology and Pharmacology Integrating Internet Resources. Moscow, Russia. 2007. P.29.
33. Мошковский С.А., Власова М.А., Арчаков А.И. Протеомное профилирование плазмы крови посредством MALDI-TOF-масс-спектрометрии в диагностике злокачественных опухолей // Мат. докл. IV Съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. Новосибирск. 2008. С.286.

34. Moshkovskii S.A., Vlasova M.A., Toropygin I.Y., Pyatnitsky M.A., Archakov A.I. Plasma proteome profiling by MALDI-TOF-mass-spectrometry for cancer diagnostics // Abstr. 4th International Conference "Genomics, Proteomics, Bioinformatics and Nanobiotechnologies for Medicine". Moscow-Nizhny Novgorod-Moscow, Russia. 2008. P.17.
35. Moshkovskii S., Vlasova M., Pyatnitskiy M., Toropygin I., Archakov A. Analysis of peak intensity correlations to improve diagnostic accuracy and maximize biological meaning of mass-spectral diagnostics of ovarian and prostate cancer // Abstr. HUPO 7th Annual World Congress. Amsterdam, Netherlands. 2008. P-TUE-165. P.111.
36. Ponomarenko E., Lisitsa A., Petrak J., Moshkovskii S., Archakov A. Automated meta-analysis confirms the hit-parade of repeatedly identified proteins // Abstr. HUPO 7th Annual World Congress. Amsterdam, Netherlands. 2008. P-TUE-172. P.111.
37. Andreewski T.V., Zgoda V.G., Kurbatov L.K., Kopylov A.T., Moshkovskii S.A., and Archakov A.I. Possible Reasons of Ambiguity in Expression Study by Microarray and Ion Trap Proteomics. // Abstr. HUPO 8th Annual World Congress. Toronto, Canada. 2009. P.66.
38. Nikolaev E.N., Popov I.A., Kononikhin A.S., Agron I.A., Avtonomov D.M., Moshkovskii S.A., Larina I.M., Zamulaeva I.A., Masselon C., Archakov A.I. Accurate mass tag retention time data base for urine proteome. // Abstr. HUPO 8th Annual World Congress. Toronto, Canada. 2009. P.72.
39. Melnik A., Zgoda V.G., Moshkovskii S.A., Kopylov A.T., Ponomarenko E.A., Fomchenkova E.Y., Archakov A.I. Proteomics of Mouse Liver Microsomes: Performance of Different Protein Separation Workflows for LC-MS/MS. // Abstr. HUPO 8th Annual World Congress. Toronto, Canada. 2009. P.76.
40. Moshkovskii S.A., Zgoda V.G., Melnik S.A., Chernobrovkin A.L., Andreewski T.V., Ponomarenko E.A., Lisitsa A.V., Archakov A.I. Gene-Centric View to the Proteins of 18th Chromosome Identified in Blood Plasma: Potential Biomarkers. // Abstr. HUPO 8th Annual World Congress. Toronto, Canada. 2009. P.86.
41. Moshkovskii S.A., Karpova M.A., Toropygin I.Y., Archakov A.I. Proteome bar-code for cancer diagnostic: the state-of-the-art and prospects // Abstr. 5th International Conference "Genomics, Proteomics, Bioinformatics and Nanobiotechnologies for Medicine". Saint-Petersburg, Russia. 2010. P.58.



42. Moshkovskii S.A. Mass-spectrometry-based plasma proteome barcode to discriminate the prostate cancer samples // Abstr. HUPO 9th Annual World Congress. Sydney, Australia. 2010. P.86.
43. Белоусов П.В., Копылов А.Т., Твардовский А.А., Мельник С.А., Ким Я.С., Ланцаков К.В., Ванушко В.Э., Мошковский С.А., Купраш Д.В., Недоспасов С.А. Иммунопротеомный анализ аутоантигенного репертуара папиллярного рака щитовидной железы: идентификация кандидатных дифференциально-диагностических объектов // Мат. докл. 1-ой международной научно-практической конференции молодых ученых «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». Москва. 2010. С.38.
44. Мошковский С.А., Карпова М.А., Соколова Е.Е., Арчаков А.И. Масс-спектрометрические профили плазмы крови для диагностики злокачественных опухолей: настоящее и перспективы // Мат. докл. 1-ой международной научно-практической конференции молодых ученых «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». Москва. 2010. С.52.
45. Николаев Е.Н., Попов И.А., Кононихин А.С., Мошковский С.А., Агрон И.А., Автономов Д.М. Масс-спектрометрия в протеомных исследованиях. Протеом мочи // Мат. докл. 1-ой международной научно-практической конференции молодых ученых «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». Москва. 2010. С. 53.
46. Трифонова О.П., Пахарукова Н.А., Пастушкова Л.Х., Лисица А.В., Мошковский С.А., Ларина И.М. Анализ межиндивидуальной вариабельности протеома крови здорового человека // Мат. докл. 1-ой международной научно-практической конференции молодых ученых «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». Москва. 2010. С. 57.
47. Шишкин С.С., Ковалев Л.И., Ковалева М.А., Иванов А.В., Лисицкая К.В., Еремина Л.С., Садыхов Э.Г., Торопыгин И.Ю., Мошковский С.А. Протеомные технологии и поиск новых маркеров для диагностики рака простаты // Мат. докл. 1-ой международной научно-практической конференции молодых ученых «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». Москва. 2010. С. 61.
48. Moshkovskii S.A., Ponomarenko E.A., Lisitsa A.V., Archakov A.I. Automated text mining to search disease-related protein encoded b human 18-th chromosome and its comparison to the

biocuration data. // Abstr. Taiwan-Russia Research Cooperation Symposium “New mass spectrometry methods in proteomics”. Kaosiung, Taiwan. 2011. P. 27.

49. Ponomarenko E.A., Zgoda V.G., Ivanov A.S., Moshkovskii S.A., Lisitsa A.V., Archakov A.I. Progress in Proteome of 18th Chromosome (Russian part of HPP) // Abstr. Taiwan-Russia Research Cooperation Symposium “New mass spectrometry methods in proteomics” Kaosiung, Taiwan. 2011. P. 43.

Финансирование работы осуществлялось из средств программы Российской академии медицинских наук «Протеомика в медицине и биотехнологии», грантов Российского фонда фундаментальных исследований и государственных контрактов по заказу Министерства образования и науки Российской Федерации.