



Диагностика ВПЧ-ассоциированных заболеваний шейки матки методом масс-спектрометрии

Н.Л. Стародубцева, В.В. Чаговец, А.С. Кононихин, А.Е. Бугрова,
Н.М. Назарова, Некрасова М.Е., В.Е. Франкевич

Научно-практическая конференция
Онкогинекология
Москва
18 октября 2019

Масс-спектрометрия в клинической практике

- Токсикология
- Эндокринология
- Клиническая микробиология
- Неонатальный скрининг

- Гинекология

- Количественный и качественный анализ биологических жидкостей (стероиды, витамины, аминокислоты и др)
- Поиск биомаркеров различных гинекологических заболеваний (маркерные пептиды, белки, метаболиты)
- Масс-спектрометрическая визуализация (ткани и биологические жидкости)

ДИАГНОСТИКА ЗАБОЛЕВАНИЙ

Дифференциальная диагностика заболеваний с помощью масс-спектрометрии

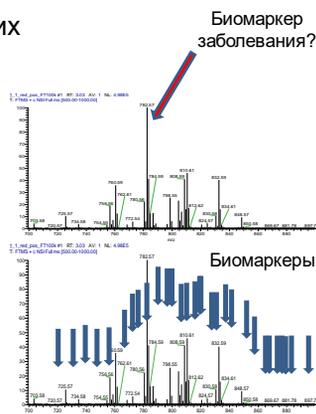
«Масс-спектрометрия является самым надежным методом диагностики»

Дифференциальная диагностика — способ диагностики, исключающий не подходящие по каким-либо фактам или симптомам заболевания, возможные у больного, что в конечном счёте должно свести диагноз к единственно вероятной болезни.

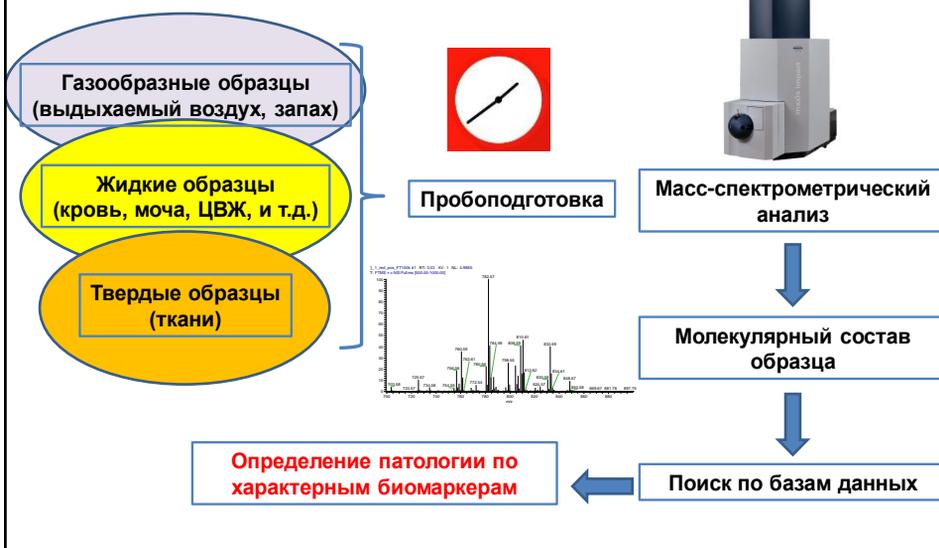
- Поиск биомаркеров в тканях и биологических жидкостях
- Молекулярное профилирование (в том числе in-vivo)
- МС-диагностические панели (протеомные или метаболомные)

Переход к неинвазивной диагностике

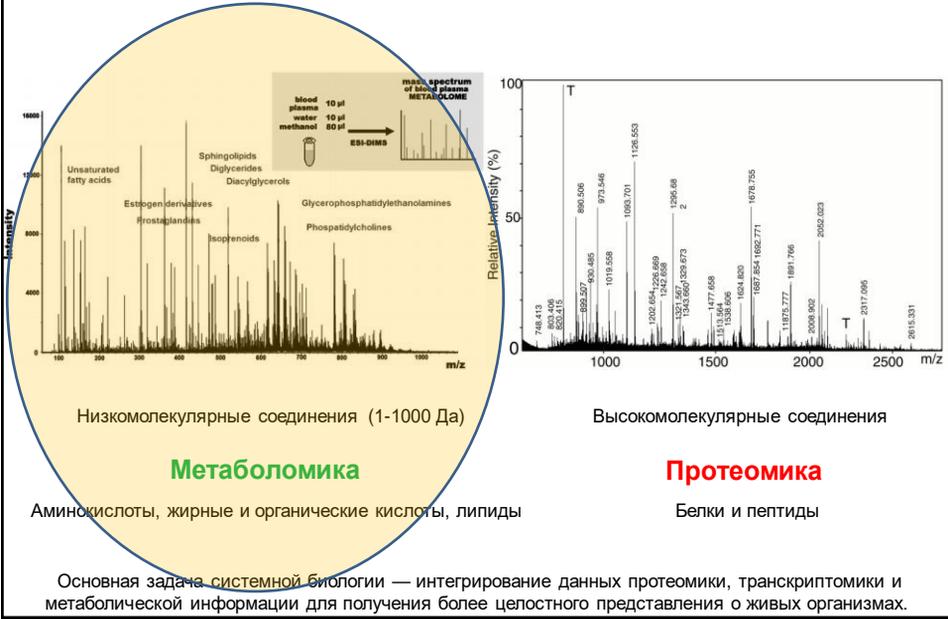
In-vivo and noninvasive



Анализ биологических образцов с помощью масс-спектрометрии



Анализ биологических образцов с помощью масс-спектрометрии



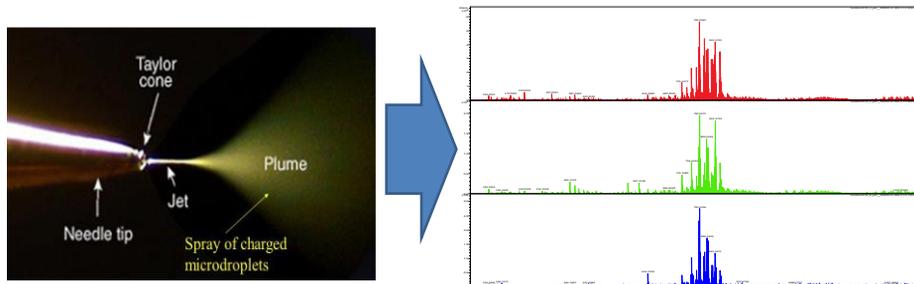
Масс-спектрометрические подходы анализа молекулярного состава тканей

(In-vivo and noninvasive)



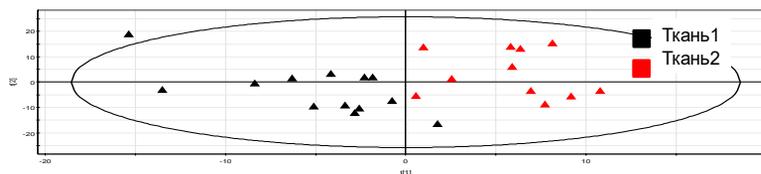


ESI-MS/MS анализ органического экстракта тканей



Многофакторный анализ полученных MS-данных (PLS-DA – проекция на скрытые структуры)

График счетов (каждая точка - образец)



Классификация тканей, основанная на их липидном составе

Дифференциальная диагностика интраэпителиальных поражений ШМ методом ESI-MS/MS

Включено в исследование 110 пациенток (ВПЧ+)

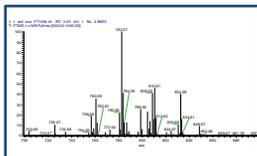
1 группа
хр. цервицит
n=30

2 группа
LSIL
n=30

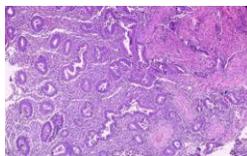
3 группа
HSIL
n=30

4 группа
РШМ
n=20

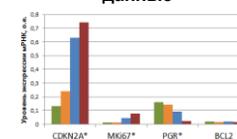
Масс-спектрометрические данные



Морфологические данные



Молекулярно-генетические данные

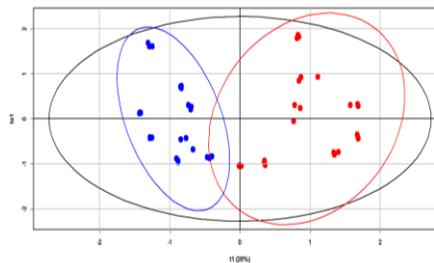


Дифференцировка тканей прямой масс-спектрометрией

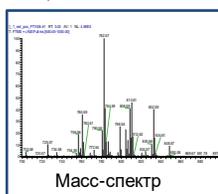
Пораженная ткань



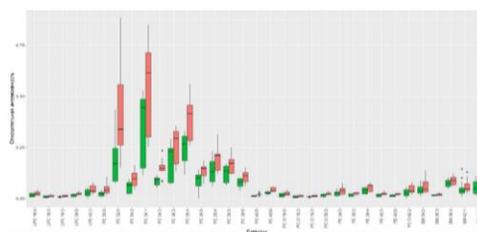
Окружающая ткань



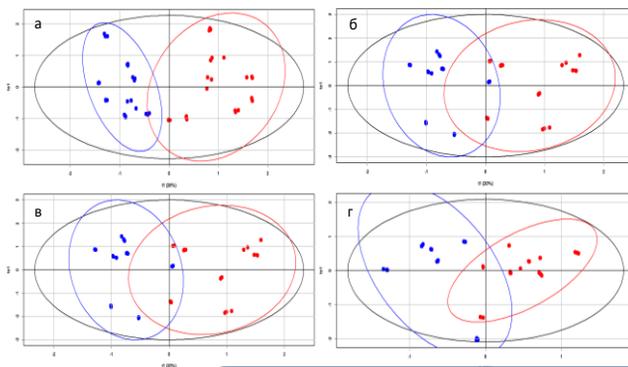
Дискриминантный анализ с помощью ортогональных проекций на скрытые структуры (OPLS-DA)



Масс-спектр



Возможности масс-спектрометрии в дифференцировании пораженных тканей от окружающих по их липидному профилю у пациенток с доброкачественными и неопластическими заболеваниями шейки матки различной степени тяжести



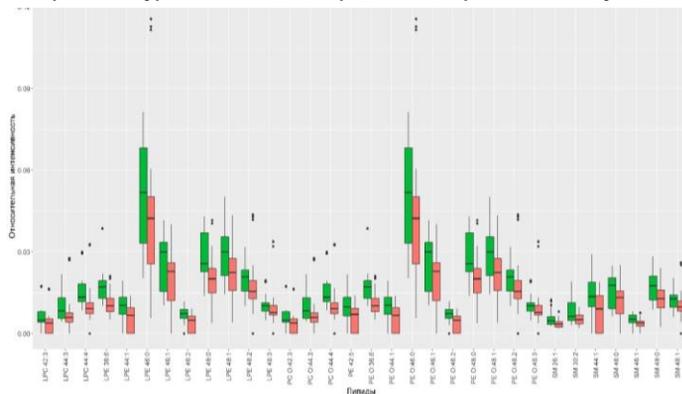
А – хр. цервицит
Б – LSIL
В – HSIL
Г – РШМ

Синие точки
соответствуют
окружающим
тканям,
красные –
пораженным

Выявлены достоверные отличия по липидному профилю между пораженными и окружающими тканями во всех группах

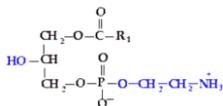
VIP переменные по результатам PLS-DA анализа

Сравнение уровней липидов, определяющих различие между видами ткани



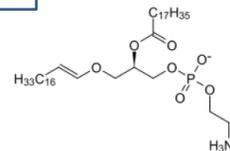
HSIL

LPE
Лизо-PE



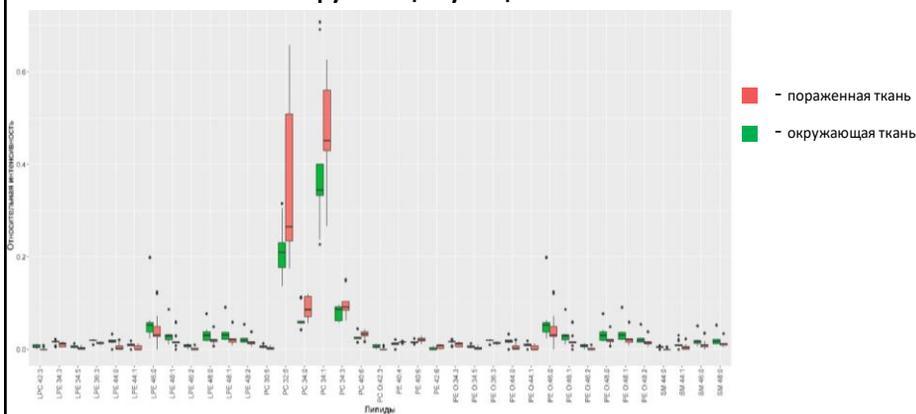
класс липида длина остатка ■ кол-во двойных
жирной кислоты жирной кислоты связей в остатке
PC **m : n** жирной кислоты

PEO
PE-плазмалоген



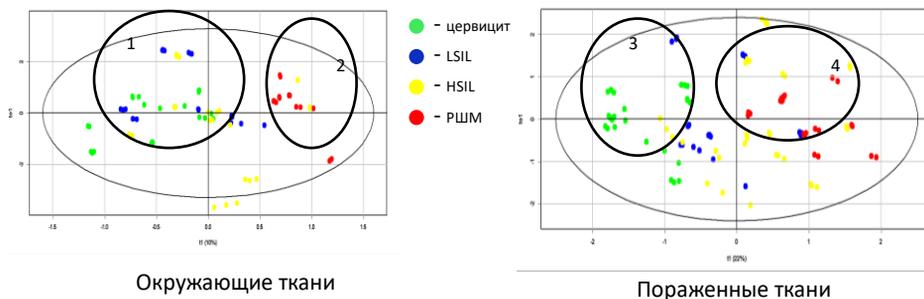
Липидом при HSIL характеризуется отсутствием PC, преобладанием LPE, PEO, SM и выраженным снижением их уровней.

Липиды, ответственные за дифференцирование пораженных тканей от окружающих у пациенток с РШМ



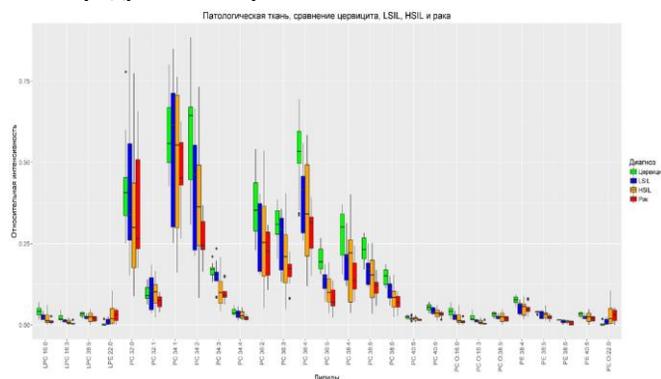
В раковых тканях шейки матки значимыми для дифференцирования оказались 37 липидов: LPC – 1, LPE – 11, PC – 6, PCO – 1, PE – 3, PEO – 11, SM – 4. Липидом при РШМ характеризуется значительным преобладанием LPE и PEO, а также выраженным снижением их уровней. Кроме того, в тканях шейки матки с РШМ были выявлены высокие уровни PC.

Возможности масс-спектрометрии в дифференцировании доброкачественных, предраковых и раковых тканей шейки матки по их липидному профилю



Липидомный анализ тканей дифференцирует доброкачественные (воспалительные) заболевания шейки матки от предраковых и злокачественных

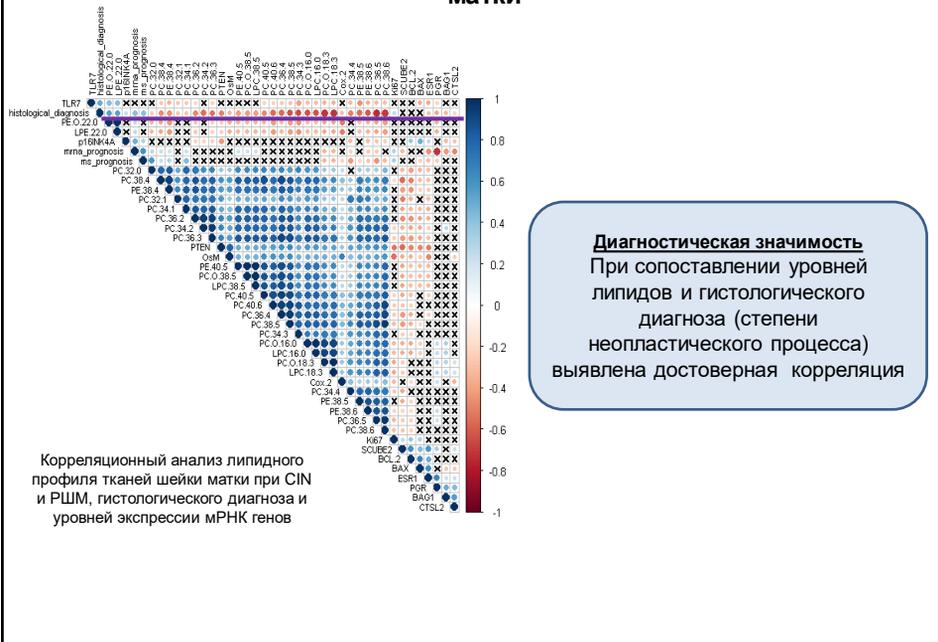
Липиды, ответственные за дифференцирование доброкачественных, предраковых и раковых тканей шейки матки



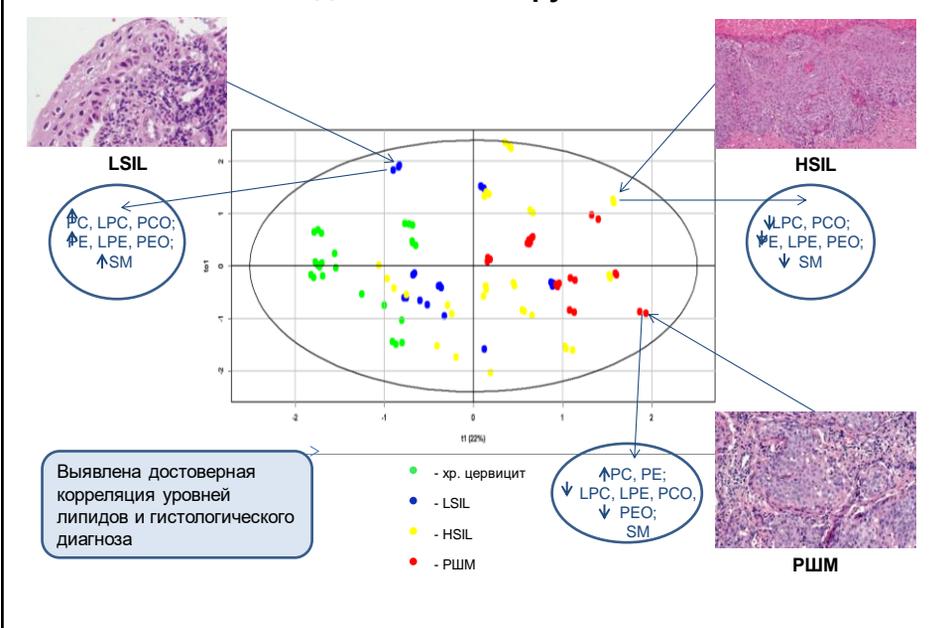
Были выявлены липиды, достоверно классифицирующие группы между собой и относящиеся к фосфатидилхолинам (PC 32:0, PC 34:1, PC 36:4, PC 34:0, PC 38:4), этаноламинам (PE O-46:0, LPE 46:0, PE O-48:0, LPC 48:0, PE O-46:1) и сфингомиелинам (SM 34:0, SM 42:2) в тканях, подвергшихся неопластической трансформации

Данные классы липидов связаны с подавлением апоптоза, нарушением метаболизма клеток, стимуляцией пролиферативных процессов, что позволяет их рассматривать в качестве потенциальных биомаркеров для ранней и дифференциальной диагностики степени тяжести поражения эпителия.

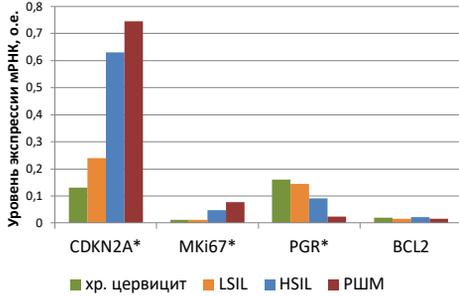
Диагностическая значимость липидного анализа тканей шейки матки



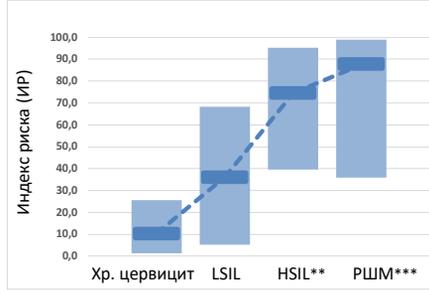
Корреляционный анализ липидома с гистологическим диагнозом по группам



Оценка риска прогрессии заболевания с учетом уровня экспрессии мРНК



Профиль экспрессии мРНК генов



Индекс риска прогрессии заболевания по группам

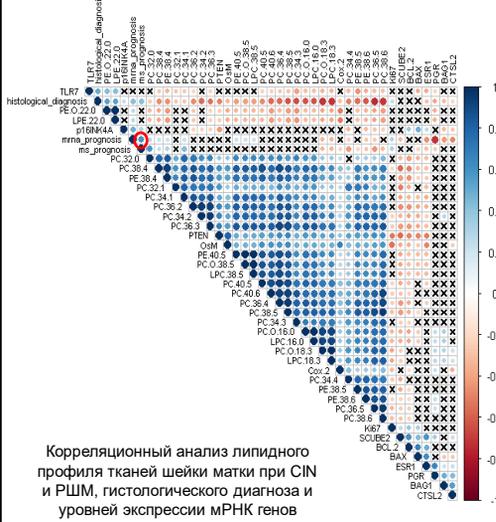
* Уровень экспрессии мРНК генов CDKN2A (p16), MKI67 (Ki67) и PGR достоверно выявляет группу с высоким риском развития HSIL и РШМ и определяет дальнейший прогноз течения заболевания (p<0,05).

** достоверность различий по сравнению с группой хронической цервицит (p=0,03).
 *** достоверность различий по сравнению с группой хронической цервицит (p=0,02).

Индекс риска прогрессии заболевания: $IP = \frac{1}{1+e^{-Z}}$
 $Z = 0,8 * \ln \frac{MKI67}{PGR} + 1,6 * \ln \frac{CDKN2A}{BCL2} - 4,$
 где Ki67, PGR, p16 и BCL2 – уровень экспрессии мРНК

Разделяющая граница ранее была рассчитана с помощью ROC-анализа и составляет 57 единиц 100-балльной шкалы.

Прогностическая значимость липидного анализа тканей шейки матки



Прогностическая значимость
 При корреляционном анализе МС показателей и значений мРНК-прогноза выявлена положительная корреляция (rS = 0,59; p = 6,7 x 10⁻¹⁰).

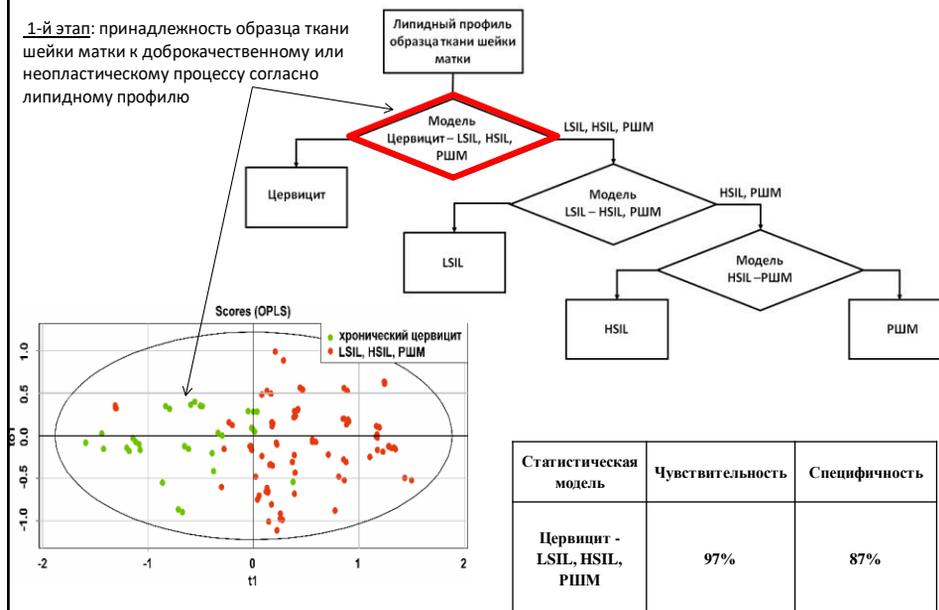


Выводы

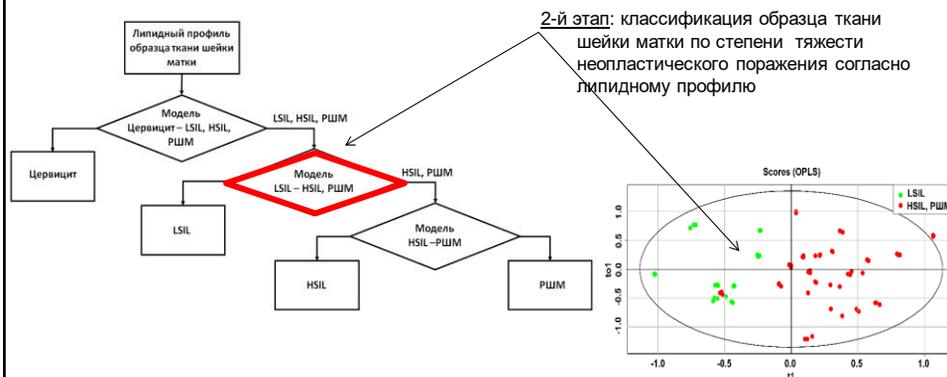
- Определена панель липидов у пациенток с ВПЧ-ассоциированными заболеваниями шейки матки, позволяющая выявлять группы риска по развитию HSIL и РШМ.
- Наиболее значимыми оказались фосфатидилхолины, фосфатидилэтаноламины и сфингомиелины, что позволяет их рассматривать в качестве потенциальных биомаркеров для ранней и дифференциальной диагностики степени тяжести поражения эпителия шейки матки при ВПЧ-ассоциированных заболеваниях.

Математическая модель для ранней и дифференциальной диагностики ВПЧ-ассоциированных заболеваний шейки матки

1-й этап: принадлежность образца ткани шейки матки к доброкачественному или неопластическому процессу согласно липидному профилю



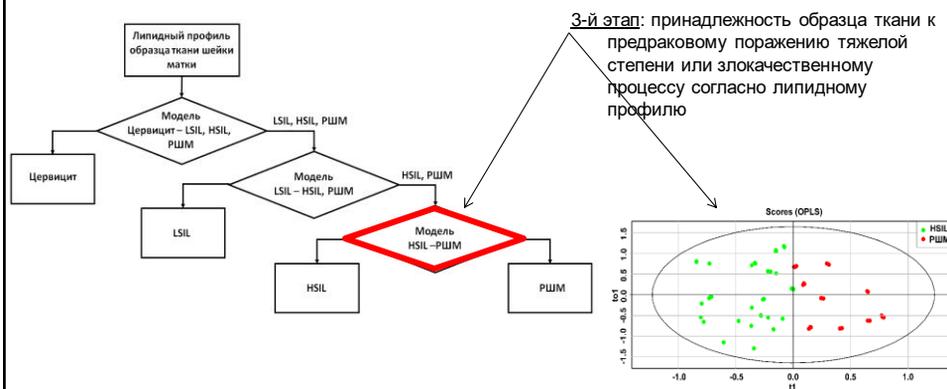
Математическая модель для ранней и дифференциальной диагностики ВПЧ-ассоциированных заболеваний шейки матки



Статистическая модель	Чувствительность	Специфичность
LSIL - HSIL, P13M	88%	71%

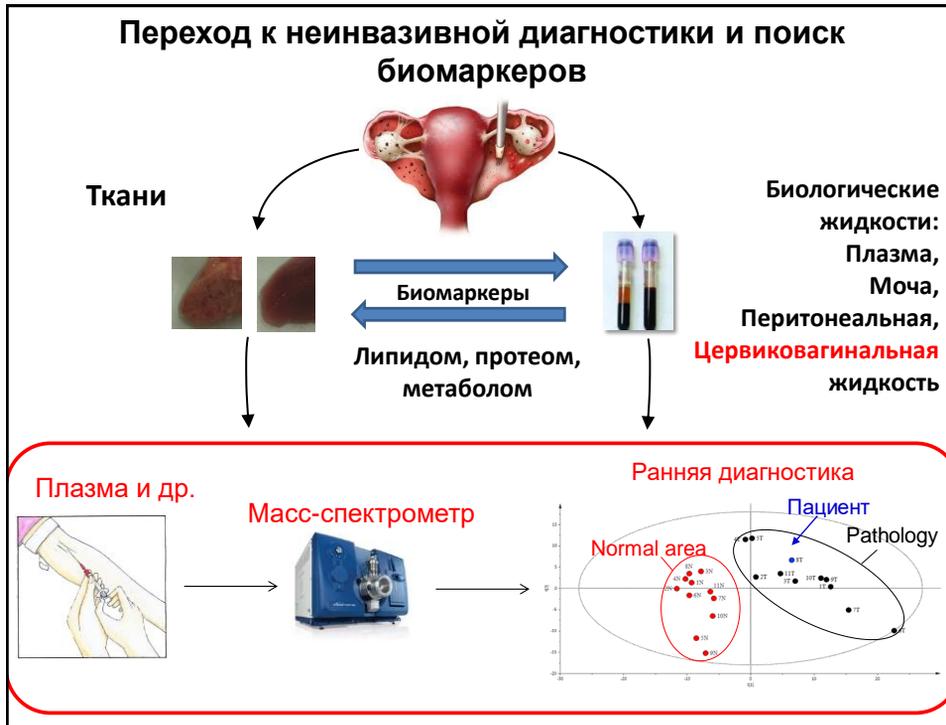
Данная модель позволяет классифицировать степень неопластического поражения шейки матки по липидному профилю тканей по аналогии с гистологической классификацией CIN.

Математическая модель для ранней и дифференциальной диагностики ВПЧ-ассоциированных заболеваний шейки матки



Статистическая модель	Чувствительность	Специфичность
HSIL - P13M	90%	92%

Данная модель позволяет дифференцировать рак от HSIL по липидному профилю тканей по аналогии с гистологической классификацией CIN.



Received 29 January 2019 | Revised 8 May 2019 | Accepted 12 May 2019
DOI: 10.1002/jms.4376

RESEARCH ARTICLE WILEY Interscience MASS SPECTROMETRY

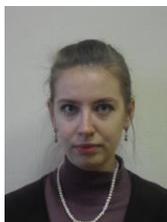
Label-free cervicovaginal fluid proteome profiling reflects the cervix neoplastic transformation

Natalia L. Starodubtseva^{1,2} | Alexander G. Brzhozovskiy¹ | Anna E. Bugrova^{1,3} | Alexey S. Kononikhin^{4,5} | Maria I. Indeykina^{3,2} | Kiril I. Gusakov⁴ | Vitaliy V. Chagovets¹ | Niso M. Nazarova⁴ | Vladimir E. Frankevich³ | Gennady T. Sukhikh³ | Eugene N. Nikolaev^{4,5}

Abstract
Cervicovaginal fluid (CVF) is a valuable source of clinical information about the female reproductive tract in both nonpregnant and pregnant women. The aim of this study is to specify the CVF proteome at different stages of cervix neoplastic transformation by label-free quantitation approach based on liquid chromatography tandem mass spectrometry LC-MS/MS method. The proteome composition of CVF from 40 women of reproductive age with human papillomavirus (HPV)-associated cervix neoplastic transformation (low-grade squamous intraepithelial lesion [LSIL], high-grade squamous intraepithelial lesion [HSIL], and CANCER) was investigated. Hierarchical clustering and principal component analysis (PCA) of the proteomic data obtained by a label-free quantitation approach show the distribution of the sample set between four major clusters (no intraepithelial lesion or malignancy [NILM], LSIL, HSIL and CANCER) depending on the form of cervical lesion. Multisample ANOVA with subsequent Welch's t test resulted in 117 that changed significantly across the four clinical stages, including 27 proteins significantly changed in cervical cancer. Some of them were indicated as promising biomarkers previously (ACTN4, VTN, ANXA1, CAP1, ANXA2, and MUC5B). CVF proteomic data from the discovery stage were analyzed by the partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) method to build a statistical model, allowing to differentiate severe dysplasia (HSIL and CANCER) from the mild/normal stage (NILM and LSIL), and receiver operating characteristic (ROC) area under the curve (AUC) were obtained on an independent set of 33 samples. The sensitivity of the model was 77%, and the specificity was 94%. AUC was equal to 0.87. CVF proteome proved to be reflect the stage of cervical epithelium neoplastic process.

KEYWORDS
cervical cancer, cervicovaginal fluid, HSIL, label-free proteomics, LSIL, mass spectrometry

1 | INTRODUCTION
A dramatic increase of cervical cancer almost in two times has been observed over the past decade.^{1,2} Cervical cancer keeps one of the leading positions in female mortality causes. According to the World Health Organization, 569.8 thousand new cases of cervical cancer were detected in 2018 worldwide.³ Cervical cancer is preceded by cervical intraepithelial neoplasia of different degrees of severity



Асатурова А.В.



Отдел системной биологии



Назарова Н.М.



БЛАГОДАРЮ ЗА ВНИМАНИЕ

