

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 618.19-006.04-078.33

Подлесных С.В.¹, Колосова Е.А.¹, Анисимов Д.С.¹, Щербаков Д.Н.¹, Рязанов М.А.¹, Петрова В.Д.³, Шойхет Я.Н.⁴, Johnston S.A.², Лазарев А.Ф.³, Шаповал А.И.^{1,2}

ВЫСОКОСПЕЦИФИЧНЫЙ И ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РЕПЕРТУАРА СЫВОРОТОЧНЫХ АНТИТЕЛ С ПОМОЩЬЮ ПЕПТИДНЫХ МИКРОЧИПОВ У ПАЦИЕНТОВ С ДИАГНОЗОМ РАК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

¹Российско-американский противораковый центр ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет», 656049, Барнаул, Россия;

²Центр инноваций в медицине, Институт Биодизайна, Университет штата Аризона, 85287, Темпе, Аризона, США;

³Алтайский филиал ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ, 656049, Барнаул, Россия

⁴ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 656038, Барнаул, Россия;

В настоящее время для ранней диагностики актуален поиск новых биомаркеров рака. В качестве альтернативы существующим биомаркерам большой интерес приобретают антитела (АТ) против антигенов, ассоциированных с опухолью. Изменение количества и специфичности АТ в сыворотке крови указывает на происходящие процессы в организме, в том числе на развитие онкологических заболеваний. В работе приведены результаты анализа репертуара антител (иммуносигнатуры) с помощью пептидных микрочипов у пациентов с диагнозом рака молочной железы (РМЖ). Мы выявили 119 информативных пептидов из 330 034 пептидов, представленных на микрочипе, связывание антител с которыми демонстрирует статистически значимые межгрупповые различия ($p < 0,001$). Эта панель пептидов помогает с высокой чувствительностью и специфичностью различать сыворотки больных и здоровых доноров. Оценка репертуара антител, взаимодействующих с панелью синтетических пептидов, может быть использована для разработки диагностических тестов при обнаружении РМЖ на ранних стадиях.

Ключевые слова: пептидные микрочипы; биомаркеры; опухольассоциированные антитела; рак молочной железы; репертуар антител; иммуносигнатура.

Для цитирования: Подлесных С.В., Колосова Е.А., Анисимов Д.С., Щербаков Д.Н., Рязанов М.А., Петрова В.Д., Шойхет Я.Н., Johnston S.A., Лазарев А.Ф., Шаповал А.И. Высокоспецифичный и чувствительный анализ репертуара сывороточных антител с помощью пептидных микрочипов у пациентов с диагнозом рак молочной железы. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62(9): 557-563. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-9-557-563>

Podlesnykh S.V.¹, Kolosova E.A.¹, Anisimov D.S.¹, Scherbakov D.N.¹, Ryazanov M.A.¹, Petrova V.D.³, Shoikhet Ya.N.⁴, Johnston S.A.², Lazarev A.F.³, Shapoval A.I.^{1,2}

THE HIGHLY SPECIFIC AND SENSITIVE ANALYSIS OF REPERTOIRE OF SERUM ANTIBODIES USING PEPTIDE MICROCHIPS IN PATIENTS WITH DIAGNOSIS OF BREAST CANCER

¹The Russian-American anti-cancer center of the Altaiiiskii state university, 656049 Barnaul, Russia

²Center for Innovations in Medicine, The Biodesign Institute, Arizona State University, 85287, Tempe, AZ, USA;

³The Altaiiiskii branch of the N.N. Blokhin Rossiiskii oncologic center of Minzdrav of Russia, 656049 Barnaul, Russia

⁴The Altaiiiskii state medical university of Minzdrav of Russia, 656038 Barnaul, Russia

Nowadays, the search for new biomarkers of cancer is actual for early diagnostic. The antibodies against antigens associated with tumors arouse an interest as an alternative to the present biomarkers. The alteration of quantity and specificity of antibodies in blood serum indicates processes occurring in the organism, including development of oncologic diseases. The article presents the results of analysis of repertoire of antibodies (immunotypes) using peptide micro-chips in patients with diagnosis of breast cancer. The study established 119 informative peptides out of 330 034 peptides, presented on the microchip. The binding of antibodies with them demonstrates statistically significant intergroup values ($p < 0.001$). This panel of peptides is effective in discerning sera of patients and healthy donors with high sensitivity and specificity. The evaluation of repertoire of antibodies interacting with panel of synthetic peptides can be used in development of diagnostic tests in case of detection of breast cancer at early stages.

Keywords: peptide microchips; biomarkers; tumor-associated antibodies; breast cancer; repertoire of antibodies; immunotype/0869-2084-2017-62-10-

For citation: Podlesnykh S.V., Kolosova E.A., Anisimov D.S., Scherbakov D.N., Ryazanov M.A., Petrova V.D., Shoikhet Ya.N., Johnston S.A., Lazarev A.F., Shapoval A.I. The highly specific and sensitive analysis of repertoire of serum antibodies using peptide microchips in patients with diagnosis of breast cancer. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (9): 557-563. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-9-557-563>

For correspondence: Podlesnykh S.V., post-graduate student, junior researcher. e-mail: step-uch@mail.ru

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 30.04.2017
Accepted 16.05.2017

Для корреспонденции: Подлесных Степан Васильевич, аспирант, мл. науч. сотр. Российско-американского противоракового центра ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет»; e-mail: step-uch@mail.ru

В структуре причин заболеваемости и смертности населения стран мира, по данным ВОЗ за 2015 г., онкологические заболевания за последние годы вышли на лидирующие позиции [1]. В структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями женского населения России ведущей онкологической патологией является рак молочной железы (РМЖ), составляющий 20,9% [2]. Около 60% РМЖ диагностируется на ранних стадиях, но приблизительно 20% диагнозов являются ложноотрицательными [3]. Пятилетняя выживаемость у пациентов с I стадией РМЖ составляет 93% и только 7% у пациентов с IV стадией [4]. Таким образом, в настоящее время наиболее актуальной является диагностика онкологических заболеваний на ранних стадиях, до манифестации клинических симптомов болезни [5—8], что может стать перспективным решением для снижения инвалидности и смертности.

Сегодня общепризнанными биомаркерами в диагностике РМЖ являются белки, такие как CA 27.29, CA 15.3, p53, CEA, PEA, ER, PR, HER2 [6, 9—13]. Однако эти белки можно обнаружить только при уже сформировавшихся опухолях (более 2,5 см), доступных для биопсии или способных к продукции высоких концентраций белков [6, 9]. К тому же эти биомаркеры не обеспечивают достаточной чувствительности и специфичности диагностических методов, что приводит к ложноположительным и ложноотрицательным диагнозам [5, 11, 14].

Бессимптомное развитие онкологических заболеваний может происходить в течение нескольких лет, и в это время белковые биомаркеры в сыворотке крови практически невозможно выявить. В качестве альтернативы существующим биомаркерам в настоящее время большой интерес вызывают антитела (АТ) против антигенов, ассоциированных с опухолями (ТАА — tumor associated antigens) [7, 15—17]. Изменение количества и специфичности АТ в сыворотке в ответ на патофизиологические изменения при развитии онкологических заболеваний может быть использовано для диагностических целей [18, 19]. Антитела в отличие от существующих биомаркеров рака более стабильны, специфичны и характеризуются ранней продукцией в ответ на антиген. Для эффективной диагностики необходима технология, которая позволит расшифровать изменения в составе циркулирующих антител.

Нашей исследовательской группой разрабатывается метод, в основе которого лежит оценка сывороточных антител как маркеров онкологических заболеваний, в частности рака молочной железы. Метод основан на применении пептидных микрочипов со случайными аминокислотными последовательностями, которые используются для оценки взаимодействия антител с частичным или полным подобием эпитопов антигенов [7, 20]. Этот метод использован для анализа связывающей активности моноклональных антител, оценки эффективности вакцин и сравнения репертуаров сывороточных антител здоровых добровольцев и пациентов с различными диагнозами, включая болезнь Альцгеймера, инфекционные, онкологические и аутоиммунные заболевания [15, 20—25].

Цель работы — с помощью пептидных микрочипов сравнить репертуар антител в сыворотках здоровых доноров и больных с диагнозом РМЖ.

Материал и методы. Для выполнения настоящей работы сформировали 2 группы. В первую группу во-

шла 41 пациентка (средний возраст $56,4 \pm 12,2$ года) с диагнозом РМЖ, во вторую группу (контроль) — 40 здоровых женщин (средний возраст $47,1 \pm 8,5$ года). Исследование одобрено этическим комитетом Алтайского филиала РОНЦ им. Н.Н. Блохина (Барнаул). Все пациенты и здоровые доноры подписали письменное информированное согласие.

Взятие капиллярной крови из пальца производили в конические пробирки типа Микровет («Фирма Синтакон»), содержащих K_3 ЭДТА. Пробирки с образцами центрифугировали с частотой вращения 1500 об/мин при 4°C в течение 10 мин. Образцы полученной плазмы замораживали для хранения при -20°C и использовали для исследования. Оценку репертуара антител в сыворотках больных и здоровых доноров проводили с помощью микрочипов, содержащих 24 идентичных микроэррея из 330 034 пептидов со случайными аминокислотными последовательностями. Пептиды синтезированы на подложке микрочипа методом фотолитографии, как описано ранее [20]. Аминокислотная последовательность и месторасположение каждого пептида на микроэрее известно. Каждый микроэрей имеет площадь $0,5 \text{ см}^2$, размер точки каждого пептида около 8 мкм в диаметре, расстояние между соседними пептидами приблизительно 1 нм.

Для экспериментальной работы проводили предварительную подготовку микрочипов. Каждый микрочип на 60 мин отдельно помещали в чашку Петри с дистиллированной водой, затем в фосфатно-солевой буфер (ФСБ, «Биолот») на 30 мин, инкубировали при малой скорости орбитального шейкера Biosan OS 20 («Biosan»). После этого микрочипы фиксировали в штативе кюветы EasyDip и промывали полосканием в трёх свежих растворах ФСБТ (ФСБ + 0,25% Твин 20, «Helicon») и дистиллированной воде. После предварительной подготовки высушенные центрифугированием в течение 5 мин при 800 об/мин микрочипы помещали в гибридизационную кассету («Arrait Corporation») с силиконовыми прокладками, обеспечивающими разделение всех 24 микроэрреев на микрочипе. В каждую лунку кассеты, соответствующей микроэрею микрочипа, добавляли по 150 мкл инкубационного раствора, содержащего ФСБТ и 3% бычьего сывороточного альбумина (БСА, «Amresco»). Поверхность кассеты покрывали плёнкой, инкубировали микрочипы в течение 18 ч при 4°C . Предварительно удалив содержимое лунок кассеты, вносили 75 мкл инкубационного раствора. Образцы исследуемой плазмы крови разводили (1:250) в инкубационном растворе и добавляли в лунки гибридизационной кассеты в объёме 75 мкл, поверхность кассеты покрывали плёнкой и накрывали крышкой, инкубировали в течение 60 мин ($22\text{—}24^\circ\text{C}$) на орбитальном шейкере при 250 об/мин. После инкубации с помощью промывателя микропланшетов BioTek ELx50 («BioTek Instruments») микрочипы промывали тремя повторами свежего ФСБТ и промывочным раствором (ФСБТ + 1% БСА). Разборку кассет и извлечение микрочипов проводили в контейнере с дистиллированной водой, не допуская высушивания. Микрочипы помещали в четырёхлуночные планшеты, наполненные раствором «вторичных» антител против IgG человека (5 мл/лунку) с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 647 («Life Technologies») 75 пг/мл в инкубационном растворе. Планшеты с микрочипами в растворе «вторичных» антител накрывали не пропускающей свет крышкой,

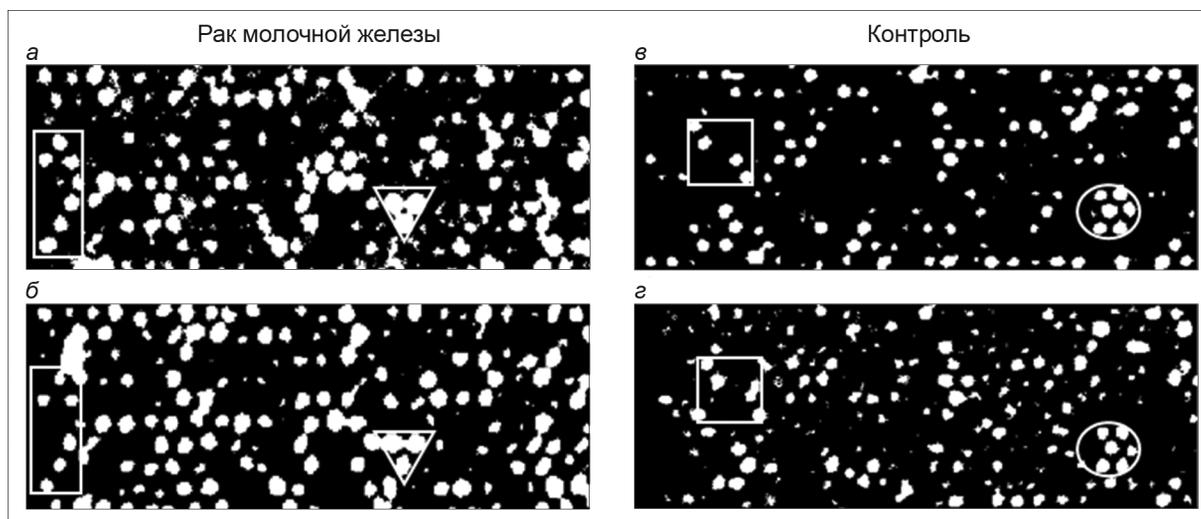


Рис. 1. Взаимодействие антител с пептидами на микрочипе. Образец сканированного изображения пептидного микрочипа высокой плотности, инкубированного с сыворотками больной РМЖ и здорового донора (два повтора для каждой сыворотки).

а, б — рак молочной железы; *в, г* — контроль; светлые точки представляют пептиды, с которыми взаимодействуют сывороточные антитела, линиями выделены скопления пептидов, отражающие воспроизводимость тестирования сыворотки на разных микрочипах.

инкубировали при температуре 22—24°C в течение 60 мин на малой скорости орбитального шейкера. После этого микрочипы, фиксированные в кюветах Easy-Dip, промывали полосканием в трёх свежих растворах ФСБТ, дистиллированной воде и в течение 5 мин высушивали центрифугированием (800 об/мин).

Высушенные микрочипы сканировали с использованием двухлазерного сканера высокого разрешения «InnoScan 900 AL» («Innopsys») при длине волн 632 и 535 нм. Положение, размер и интенсивность флуоресценции для каждого пептида оценивались с помощью программного обеспечения Marix (v. 7.3.1). Оцифрованные результаты использовали в математической и статистической обработке.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью алгоритмов анализа программного обеспечения BRB-Array Tools (<https://brb.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools/>). Каждый оцифрованный микроэрейд анализировали с использованием фильтров интенсивности флуоресценции. Нормализацию полученных данных интенсивности флуоресценции проводили с помощью алгоритма квантильной нормализации [24, 26, 27]. Дополнительно применяли алгоритм качества. Уровни интенсивности по каждому образцу логарифмировали с последующим усреднением для сравнения классов. Пептиды, разница взаимодействия с которыми в двух группах сывороток статистически значима, были выбраны с помощью *t*-критерия Стьюдента для независимых выборок с последующим иерархическим кластерным анализом [15, 21, 26, 27]. Для построения дендрограмм применен метод Уорда (Ward's method) с использованием квадрата евклидова расстояния в качестве меры сходства объектов. Для анализа пептидов применяли классификатор *k*-Nearest Neighbors с евклидовой метрикой и алгоритм перекрёстной проверки с исключением (leave-one-out cross validation). Различия считали статистически значимыми если $p < 0,001$.

Результаты и обсуждение. Образцы сыворотки крови здоровых доноров и пациентов с диагнозом РМЖ были проанализированы с помощью пептид-

ных микрочипов для оценки репертуара циркулирующих антител. Ранее мы показали, используя микрочипы с пептидами, нанесёнными на их поверхности (10 286 пептидов), что циркулирующие антитела в сыворотке здоровых добровольцев и больных с РМЖ взаимодействуют с разными группами пептидов [28]. В настоящей работе использовались микрочипы нового поколения, где пептиды (300 034 пептида) синтезировались на поверхности микрочипа с помощью метода фотолитографии [20].

На первом этапе проведён визуальный анализ микроэрейд с разными образцами сыворотки. На рис. 1 представлены идентичные участки микроэрейд после инкубации с сыворотками и вторичными антителами. Видно, что сыворотки двух групп (РМЖ и контроль) взаимодействуют с разными группами синтетических пептидов. Анализ одних участков двух разных микроэрейд, представленных на рис. 1, свидетельствует о взаимодействии сыворотки одного донора с аналогичным набором пептидов, что говорит о хорошей воспроизводимости эксперимента при использовании технических повторов. Следует отметить некоторое количество неизбежных погрешностей, которые возникают при производстве или обработке пептидного микрочипа, однако эти артефакты не снижают информативность теста.

Следующим этапом работы стал выбор пептидов, взаимодействие с которыми контрольных и РМЖ-сывороток показывает статистически значимые отличия. Для этого сканированные изображения микрочипов оцифровывались, и оценивалась интенсивность флуоресценции каждого пептида. Интенсивность флуоресценции соответствует количеству сывороточных антител, взаимодействующих с отдельным пептидом. Медианные уровни интенсивности флуоресценции каждого из анализируемых микрочипов имели некоторые отличия. Для выравнивания медианы всех микрочипов нами применён алгоритм квантильной нормализации, позволяющий сглаживать различия между микроэрейд. Как было установлено ранее, нормализация данных

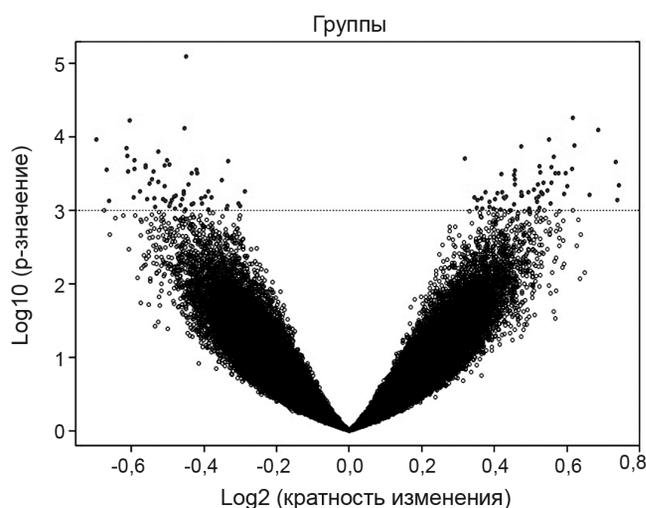


Рис. 2. Диаграмма распределения интенсивности свечения пептидов (Volcano plot). Левый массив содержит пептиды, взаимодействие с которыми выше с сыворотками больных РМЖ. Правый массив содержит пептиды, взаимодействие с которыми выше с сыворотками здоровых доноров. Точки выше пунктирной линии представляют пептиды, разница в интенсивности свечения которых в группах больных РМЖ и здоровых доноров статистически значима ($p < 0,001$)

несколько снижает уровень, но не искажает разницу во флуоресценции, вызванную биологическими эффектами связывания сывороточных антител с пептидами [28]. Дальнейший анализ результатов проводили с использованием нормализованных данных.

Распределение нормализованных интенсивностей флуоресценции пептидов, взаимодействующих с сыворотками больных РМЖ и здоровых доноров, показано на рис. 2. С помощью статистического анализа данных выявлены пептиды, которые по-разному взаимодействуют с контрольными и РМЖ-сыворотками. На рис. 2 отмечены синтетические пептиды, с которыми взаимодействуют только сыворотки больных РМЖ, а также другой набор пептидов, взаимодействующих только с сыворотками здоровых доноров. В результате оценки циркулирующих антител у здоровых доноров и больных РМЖ с помощью пептидных микрочипов (общее количество 330 034 пептидов) нами выявлено 119 пептидов, связывание с которыми сывороточных антител (IgG) показало статистически значимые межгрупповые различия ($p < 0,001$).

Иерархический кластерный анализ образцов сыворотки, с использованием выявленных 119 пептидов представлен на рис. 3. График демонстрирует четкое разделение двух групп на кластеры в зависимости от наличия или отсутствия диагноза РМЖ. При внимательном рассмотрении тепловой карты (heatmap) можно

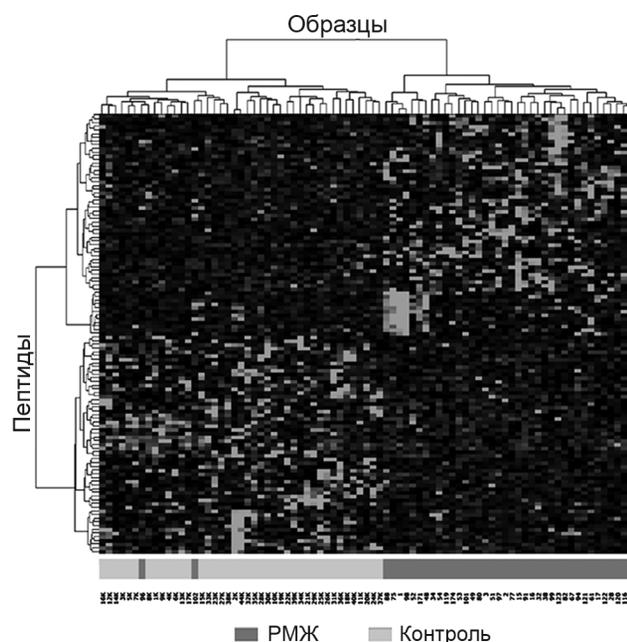


Рис. 3. Кластерный анализ и тепловая карта (heatmap) сывороток больных РМЖ и здоровых доноров.

Индивидуальные пептиды (119) представлены в горизонтальных рядах, образцы сывороток от больных (41) и здоровых (40) представлены в вертикальных колонках. Светлые точки показывают высокое взаимодействие сыворотки с определённым пептидом, тёмные показывают низкое взаимодействие. Кластеризация пептидов представлена на левой стороне рисунка. Кластеризация сывороток представлена в верхней части рисунка.

заметить внутригрупповые кластеры среди больных с диагнозом РМЖ. Такая специфическая реакция взаимодействия циркулирующих антител с пептидами внутри одной группы, возможно, характеризует молекулярные подтипы этого заболевания, однако это требует дополнительного изучения. Интересно отметить, что 2 из 40 больных с диагнозом РМЖ были отнесены к группе контроля. Это может свидетельствовать о том, что набор из 119 пептидов недостаточен для выявления всех молекулярных подтипов РМЖ.

Для анализа точности классификации групп контроля и РМЖ-больных использовали классификатор ближайших соседей (k-Nearest Neighbors) с евклидовой метрикой и алгоритм перекрёстной проверки с исключением (leave-one-out cross validation). Данные в приведенной ниже таблице показывают, что с помощью 119 пептидов можно отделить контрольные образцы от образцов больных с диагнозом РМЖ с высокой чувствительностью (0,951) и специфичностью (0,854).

На рис. 4 представлены примеры 8 пептидов, которые взаимодействуют либо с сыворотками больных РМЖ

Оценка чувствительности и специфичности классификации контрольных и РМЖ-образцов сыворотки с помощью пептидного микрочипа при использовании классификатора «k-Nearest Neighbors»

Группа	Чувствительность	Специфичность	PPV	NPV
РМЖ	0,951	0,854	0,867	0,946
Здоровые	0,854	0,951	0,946	0,867

Примечание. PPV — positive predictive values (предсказательная ценность положительных результатов); NPV — negative predictive values (предсказательная ценность отрицательных результатов).

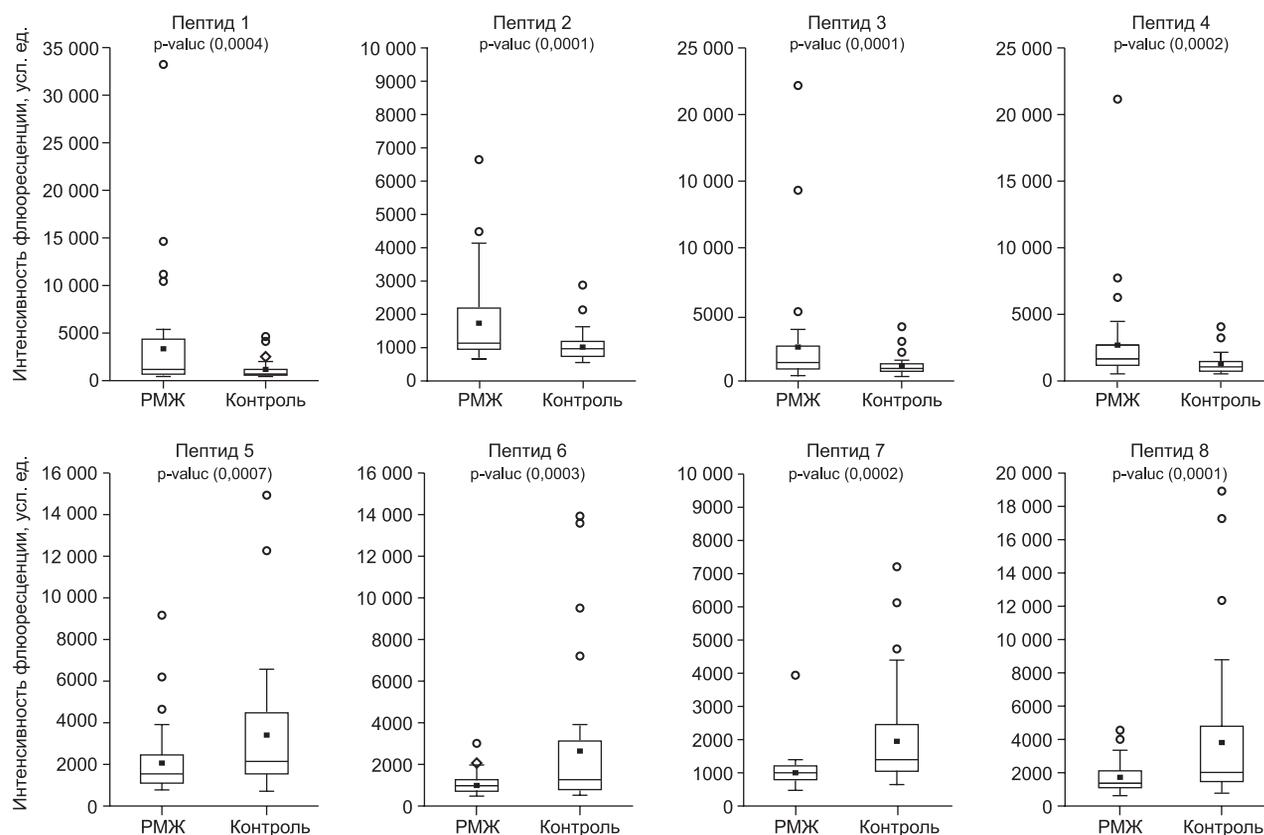


Рис. 4. Уровень флюоресценции пептидов, взаимодействующих с сыворотками больных РМЖ и здоровых доноров. На диаграммах (boxplot) представлены примеры взаимодействия сывороточных антител с различными пептидами на микрочипе. В верхнем ряду диаграмм показаны пептиды, значительно характеризующие больных (РМЖ), в нижнем ряду диаграмм — пептиды, отличающие здоровых доноров (контроль). Значком x обозначены средние значения уровня флюоресценции. Нижние границы ящиков обозначают первый квартиль (25-й перцентиль) флюоресценции, верхняя граница — третий квартиль (75-й перцентиль), внутренняя линия — медиана. Линии — «усы» на диаграмме обозначают минимально и максимально наблюдаемые значения интенсивности флюоресценции. Выбросы отмечены пустыми кругами. В верхнем углу графика приведён уровень значимости (значения p) для каждого пептида.

(верхние диаграммы), либо с сыворотками здоровых доноров (нижние диаграммы). Различия между группами статистически значимы. Однако следует отметить низкий уровень интенсивности флюоресценции, что может говорить об относительно небольшом количестве антител в сыворотках больных РМЖ и здоровых доноров, взаимодействующих с выбранными пептидами, представленными на микрочипе. Это также может быть следствием того, что существующие методы статистической обработки данных основываются на анализе средних значений с минимальной дисперсией. В результате этого пептиды, показавшие высокие уровни взаимодействия с несколькими (5—6) сыворотками, не показывают статистически значимых различий и не выбираются алгоритмом как информативные. Это может приводить к тому, что пептиды, имеющие важное физиологическое или диагностическое значение, не используются для классификации образцов.

Пептиды на микрочипе представляют случайную комбинацию всех аминокислот и являются мимотопами (подобие эпитопов) антигенов. Длина пептидов варьирует в пределах 5—15 аминокислот [20]. С помощью таких вероятных аминокислотных последовательностей можно определять связывающую молекулу для многих антител, даже при несовпадении с природными

эпитопами. Это даёт возможность наиболее адекватно оценить репертуар циркулирующих антител и установить информативные пептиды даже в тех случаях, когда антиген неизвестен.

Заключение. Проведённый анализ демонстрирует отличия репертуара сывороточных антител у больных с диагнозом РМЖ и здоровых доноров. Микрочипы с пептидами со случайными аминокислотными последовательностями могут быть использованы для анализа репертуара антител при классификации здоровых и больных с диагнозом РМЖ. Для определения диагностической ценности пептидных микрочипов при клиническом определении РМЖ требуются дополнительные эксперименты с большим количеством образцов и тестированием независимой выборки «слепых» образцов. Также необходим анализ аминокислотных последовательностей пептидов, взаимодействующих с сыворотками больных РМЖ, для определения потенциальных антигенов, характеризующих рак молочной железы. Высокая чувствительность и специфичность пептидных микрочипов при классификации образцов, полученных от больных с ранними стадиями РМЖ (T1N0M0) показывает, что эта технология может быть использована для обнаружения РМЖ на ранних стадиях. Обнаружение заболевания на раннем этапе раз-

вития, до манифестации клинических симптомов, позволит раньше начать эффективное лечение и снизить уровень смертности населения.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках конкурсной части государственного задания в сфере научной деятельности ФГБОУ ВПО «Алтайский государственный университет», задание № 6.3892.2017/4.6, грант Российского фонда фундаментальных исследований № 17-04-00321 А.

ЛИТЕРАТУРА

1. GBD 2015 Risk Factors Collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990—2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016; 388(10053): 1659—724.
2. Каприна А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность). МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России. 2017; 4—5.
3. Assi V., Warwick J., Cuzick J., Duffy S.W. Clinical and epidemiological issues in mammographic density. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2011; 9(1): 33—40.
4. Ries LAG., Melbert D., Krapcho M. SEER Cancer Statistics Review, 1975—2005; *National Cancer Institute* [Internet]. Available from: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2005/
5. Семиглазов В.Ф., Семиглазов В.В. Скрининг рака молочной железы. *Практическая онкология*. 2010; 11(2): 60—5.
6. Семиглазов В.Ф., Семиглазов В.В. Опухолевые маркеры при раке молочной железы. *Врач*. 2011; 12: 2—7.
7. Шаповал А.И., Легутки Д.Б., Стаффорд Ф., Требухов А.В., Джонстон С., Шойхет Я.Н. и др. Иммуносигнатура (immunosignature) — пептидные микроэреы для диагностики рака и других заболеваний. *Российский онкологический журнал*. 2014; 4: 6—11.
8. Shi R., Taylor H., McLarty J., Liu L., Mills G., Burton G. Effects of payer status on breast cancer survival: a retrospective study. *BMC Cancer*. 2015; 15(211): 2—8.
9. Тамкович С.Н., Войццкий В.Е., Лактионов П.П., Современные методы диагностики рака молочной железы. *Биомедицинская химия*. 2014; 60(2): 141—60.
10. Bardou V.J., Arpino G., Elledge R.M., Osborne C.K., Clark G.M. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in 2 large breast cancer databases. *Journal of Clinical Oncology*. 2003; 21: 1973—9.
11. Cheang M.C., Martin M., Nielsen T.O., Prat A., Voduc D., Rodriguez-Lescure A. et al. Defining breast cancer intrinsic subtypes by quantitative receptor expression. *Oncologist*. 2015; 20: 474—82.
12. Chlebowski R.T., Manson J.E., Anderson G.L., Cauley J.A., Aragaki A.K., Stefanick M.L. et al. Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in the Women's Health Initiative Observational Study. *Journal of the National Cancer Institute*. 2013; 105: 526—35.
13. Füzéry A.K., Levin J., Chan M.M., Chan D.W. Translation of proteomic biomarkers into FDA approved cancer diagnostics: issues and challenges. *Clinical Proteomics*. 2013; 10(1): 13—5.
14. Sawyers C.L. The cancer biomarker problem. *Nature*. 2008; 452(7187): 548—52.
15. Hughes A.K., Cichacz Z., Scheck A., Stephen W.C., Johnston S.A., Stafford P. Immunosignaturing can detect products from molecular markers in brain cancer. *PLoS One*. 2012; 7(7): 1—7.
16. Liping D., Ningjing L., Mei L., Zhang J.Y. Autoantibodies to tumor-associated antigens as biomarkers in human hepatocellular carcinoma (HCC). *Experimental Hematology & Oncology*. 2013; 2(15): 3—7.

17. Zhang J.Y., Casiano C.A., Peng X.X., Koziol J.A., Chan E.K., Tan E.M. Enhancement of antibody detection in cancer using panel of recombinant tumor-associated antigens. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention Journal*. 2003; 12(2): 136—43.
18. Sykes K.F., Legutki J.B., Stafford P. Immunosignaturing: a critical review. *Trends in Biotechnology*. 2013; 31(1): 45—51.
19. Zaenker P., Ziman M.R. Serologic autoantibodies as diagnostic cancer biomarkers — a review. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention Journal*. 2013; 22(12): 2161—81.
20. Legutki J.B., Zhao Z.G., Greving M., Woodbury N., Johnston S.A., Stafford P. Scalable high-density peptide arrays for comprehensive health monitoring. *Nature Communications*. 2014; 5: 4785.
21. Kukreja M., Johnston S.A., Stafford P. Comparative study of classification algorithms for immunosignaturing data. *BMC Bioinformatics*. 2012; 13(139): 2—15.
22. Legutki J.B., Magee D.M., Stafford P., Johnston S.A. A general method for characterization of humoral immunity induced by a vaccine or infection. *Vaccine*. 2010; 28(28): 4529—37.
23. Restrepo L., Stafford P., Magee D.M., Johnston S.A. Application of immunosignatures to the assessment of Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*. 2011; 70(2): 286—95.
24. Steinhoff C., Vingron M. Normalization and quantification of differential expression in gene expression microarrays. *Briefings in Bioinformatics*. 2006; 7(2):166—77.
25. Lacombe J., Mangé A., Solassol J. Use of autoantibodies to detect the onset of breast cancer. *Journal of Immunology Research*. 2014; 8.
26. Brown J.R., Stafford P., Johnston S.A., Dinu V. Statistical methods for analyzing immunosignatures. *BMC Bioinformatics*. 2011; 12(349): 2—15.
27. Simon R., Lam A.P., Li M.C., Ngan M., Menenzes S., Zhao Y. Analysis of gene expression data using BRB-Array Tools. *Cancer Informatics*. 2007; 2: 11—7.
28. Подлесных С.В., Колосова Е.А., Щербачев Д.Н., Шайдуров А.А., Анисимов Д.С., Рязанов М.А. и др. Взаимодействие антител сыворотки крови пациентов при раке молочной железы с синтетическими пептидами. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2016; 161(6): 775—9.

REFERENCES

1. GBD 2015 Risk Factors Collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990—2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016; 388(10053): 1659—724.
2. Каприна А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность). МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России. 2017; 4—5. (in Russian)
3. Assi V., Warwick J., Cuzick J., Duffy S.W. Clinical and epidemiological issues in mammographic density. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2011; 9(1): 33—40.
4. Ries LAG., Melbert D., Krapcho M. SEER Cancer Statistics Review, 1975—2005; *National Cancer Institute* [Internet]. Available from: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2005/
5. Semiglazov V.F., Semiglazov V.V. Screening of breast cancer. *Prakticheskaya onkologiya*. 2010; 11(2): 60—5. (in Russian)
6. Semiglazov V.F., Semiglazov V.V. Tumor markers in breast cancer. *Vrach*. 2011; 12: 2—7. (in Russian)
7. Шаповал А.И., Легутки Д.Б., Стаффорд Ф., Требухов А.В., Джонстон С.А., Шойхет Я.Н. и др. Иммуносигнатура — пептидный микроэреы для диагностики рака и других заболеваний. *Российский онкологический журнал*. 2014; 4: 6—11. (in Russian)
8. Shi R., Taylor H., McLarty J., Liu L., Mills G., Burton G. Effects of payer status on breast cancer survival: a retrospective study. *BMC Cancer*. 2015; 15(211): 2—8.
9. Tamkovich S.N., Voickij V.E., Laktionov P.P. Modern methods

- of breast cancer diagnostics. *Biomedicinskaya himiya*. 2014; 60(2): 141—60. (in Russian)
10. Bardou V.J., Arpino G., Elledge R.M., Osborne C.K., Clark G.M. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in 2 large breast cancer databases. *Journal of Clinical Oncology*. 2003; 21: 1973—9.
 11. Cheang M.C., Martin M., Nielsen T.O., Prat A., Voduc D., Rodriguez-Lescure A. et al. Defining breast cancer intrinsic subtypes by quantitative receptor expression. *Oncologist*. 2015; 20: 474—82.
 12. Chlebowski R.T., Manson J.E., Anderson G.L., Cauley J.A., Aragaki A.K., Stefanick M.L. et al. Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in the Women's Health Initiative Observational Study. *Journal of the National Cancer Institute*. 2013; 105: 526—35.
 13. Füzéry A.K., Levin J., Chan M.M., Chan D.W. Translation of proteomic biomarkers into FDA approved cancer diagnostics: issues and challenges. *Clinical Proteomics*. 2013; 10(1): 13—5.
 14. Sawyers C.L. The cancer biomarker problem. *Nature*. 2008. 452(7187): 548—52.
 15. Hughes A.K., Cichacz Z., Scheck A., Stephen W.C., Johnston S.A., Stafford P. Immunosignaturing can detect products from molecular markers in brain cancer. *PLoS One*. 2012; 7(7): 1—7.
 16. Liping D., Ningjing L., Mei L., Zhang J.Y. Autoantibodies to tumor-associated antigens as biomarkers in human hepatocellular carcinoma (HCC). *Experimental Hematology & Oncology*. 2013; 2(15): 3—7.
 17. Zhang J.Y., Casiano C.A., Peng X.X., Koziol J.A., Chan E.K., Tan E.M. Enhancement of antibody detection in cancer using panel of recombinant tumor-associated antigens. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention Journal*. 2003; 12(2): 136—43.
 18. Sykes K.F., Legutki J.B., Stafford P. Immunosignaturing: a critical review. *Trends in Biotechnology*. 2013; 31(1): 45—51.
 19. Zaenker P., Ziman M.R. Serologic autoantibodies as diagnostic cancer biomarkers — a review. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention Journal*. 2013; 22(12): 2161—81.
 20. Legutki J.B., Zhao Z.G., Greving M., Woodbury N., Johnston S.A., Stafford P. Scalable high-density peptide arrays for comprehensive health monitoring. *Nature Communications*. 2014; 5: 4785.
 21. Kukreja M., Johnston S.A., Stafford P. Comparative study of classification algorithms for immunosignaturing data. *BMC Bioinformatics*. 2012; 13(139): 2—15.
 22. Legutki J.B., Magee D.M., Stafford P., Johnston S.A. A general method for characterization of humoral immunity induced by a vaccine or infection. *Vaccine*. 2010; 28(28): 4529—37.
 23. Restrepo L., Stafford P., Magee D.M., Johnston S.A. Application of immunosignatures to the assessment of Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*. 2011; 70(2): 286—95.
 24. Steinhoff C., Vingron M. Normalization and quantification of differential expression in gene expression microarrays. *Briefings in Bioinformatics*. 2006; 7(2): 166—77.
 25. Lacombe J., Mangé A., Solassol J. Use of autoantibodies to detect the onset of breast cancer. *Journal of Immunology Research*. 2014; 8.
 26. Brown J.R., Stafford P., Johnston S.A., Dinu V. Statistical methods for analyzing immunosignatures. *BMC Bioinformatics*. 2011; 12(349): 2—15.
 27. Simon R., Lam A.P., Li M.C., Ngan M., Menenzes S., Zhao Y. Analysis of gene expression data using BRB-Array Tools. *Cancer Informatics*. 2007; 2: 11—7.
 28. Podlesnykh S.V., Kolosova E.A., Shcherbakov D.N., Shajdurov A.A., Anisimov D.S., Ryazanov M.A. et al. Interaction of serum antibodies from breast cancer patients with synthetic peptides. *Bulleten' experimental'noy biologii i meditsiny*. 2016; 161(6): 775—9. (in Russian)

Поступила 30.04.17

Принята к печати 16.05.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 618.145-002.1-076.5-078.33

Агарков Н.М.¹, Макконен К.Ф.², Аксёнов В.В.¹, Яковлев А.П.¹, Луценко В.Д.²

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ И ДИАГНОСТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СИСТЕМНОГО КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ОСТРОГО ЭНДОМЕТРИТА

¹ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный университет», 305040, Курск, Российская Федерация;

²ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», 308015, Белгород, Российская Федерация

Острый эндометрит (ОЭ) — наиболее распространённая патология среди женщин репродуктивного возраста. В его развитии ведущая роль принадлежит иммунной системе, однако сведения о наиболее информативных параметрах клеточного иммунитета отсутствуют. Цель исследования — совершенствование диагностики ОЭ посредством иммунологического метода с объективной оценкой диагностической ценности показателей системного клеточного иммунитета. Показатели клеточного иммунитета изучены у 78 больных послеродовым ОЭ и 54 практически здоровых женщин методом проточной цитометрии с последующим расчетом для каждого показателя информативности и дезинтеграции, объективизирующих отбор диагностически значимых параметров. Показано, что для полноценной диагностики ОЭ достаточно определять абсолютное и относительное содержание Т-хелперов и натуральных киллеров, обладающих высокой величиной информативности и дезинтеграции. Это позволяет сократить количество исследуемых параметров системного клеточного иммунитета и финансовые расходы на диагностику ОЭ.

Ключевые слова: острый эндометрит; клеточный иммунитет; метод проточной цитометрии.

Для корреспонденции: Агарков Николай Михайлович, д-р мед. наук, проф. каф. биомедицинской инженерии Юго-Западного государственного университета; e-mail: vitalaxen@mail.ru