

На правах рукописи

ЕЛИФЕРОВ Василий Алексеевич

**НОВЫЙ МЕТОД БЫСТРОГО МОЛЕКУЛЯРНОГО
МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО
ПРОФИЛИРОВАНИЯ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО
МОЗГА НА ОСНОВЕ КАРТРИДЖНОЙ
ЭКСТРАКЦИИ В ЛИНИИ**

Специальность: 01.04.01 – «Приборы и методы экспериментальной
физики»

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата физико-математических наук

Москва – 2020

Работа прошла апробацию в департаменте молекулярной и биологической физики федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования “Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)” (МФТИ)

Научный руководитель: кандидат физико-математических наук, доцент,
Попов Игорь Алексеевич

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное
учреждение «Федеральный научно-клинический
центр физико-химической медицины Федерального
медико-биологического агентства»

Защита диссертации состоится «25» декабря 2020 года в 11:00 на заседании диссертационного совета ФБМФ.01.04.01.001 по адресу: 141701, Московская обл., г. Долгопрудный, Институтский пер., д. 9.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-технической библиотеке МФТИ и на сайте <https://mipt.ru/education/post-graduate/soiskateli-fiziko-matematicheskie-nauki.php>.

Работа представлена 15 октября 2020 года в Аттестационную комиссию федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)» для рассмотрения советом по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, доктора наук в соответствии с п. 3.1 ст. 4 Федерального закона «О науке и государственной научно-технической политике».

Общая характеристика работы

Актуальность работы

Развитие современной медицины в направлении применения персонализированных, автоматизированных и прецизионных подходов к лечению требует внедрения высокопроизводительных методов анализа, позволяющих производить медицинские исследования со все возрастающей частотой и с наибольшей чувствительностью. Методы молекулярного мониторинга биологических процессов, сопровождающих развитие патологий являются перспективными методами как диагностики, так и мониторинга состояния пациента в процессе лечения. Техника проведения автоматизированных манипуляций в медицине и, в частности, хирургии в настоящее время активно развивается, что тоже, в свою очередь, требует разработки новых методов автоматизированного контроля хода данных манипуляций. Молекулярный анализ может быть перспективным методом контроля хирургических операций в том случае, если он позволит предоставить более точную информацию о составе и свойствах удаляемых тканей, чем другие, методы. Масс-спектрометрия, в свою очередь, в настоящее время является лидирующим методом исследования биологических молекул, что обусловлено высокими аналитическими характеристиками метода, такими как разрешающая способность, чувствительность, порог детектирования и динамический диапазон. Кроме этого, современные методы масс-спектрометрических исследований позволяют получать данные за короткое время (десятки спектров в секунду), при этом масс-спектрометрические данные характеризуют представленность в образце большого количества молекул в одном измерении и разбивая их на группы в соответствии с массой молекул. Все это позволяет рассматривать масс-спектрометрические методы как методы высокопроизводительного и высокоинформативного анализа биологических молекул. Таким образом, методы молекулярного профилирования, в основе которых лежит масс-спектрометрическое исследование молекулярного состава тканей человека по время хирургической операции могут быть положены в основу современных подходов прецизионного сопровождения хирургических операций. Методы объективного контроля патологических изменений, базирующиеся на основе молекулярного профилирования, могут применяться как при анализе биопсийных образцов, так и могут быть интегрированы в состав сложных многофункциональных медицинских комплексов, в том числе систем, использующихся в роботизированной хирургии. Внедрение автоматизированных методов проведения хирургических операций наиболее актуально нейрохирургии опухолей мозга, что обусловлено повышенными требованиями к прецизионности операций, характерных для этой области хирургии. Первичные опухоли головного мозга составляют 1,4% всех случаев раковых заболеваний и 2,4% всех случаев смерти от рака

в США. Примерно 20,5 тысяч вновь диагностированных случаев и 12,5 тысяч случаев смертей связаны с первичными злокачественными опухолями головного мозга каждый год. Хирургическое иссечение опухоли является одним из важнейших этапов лечения опухоли головного мозга. Положительный исход операции напрямую связан с точностью определения границ опухоли, что требует точной идентификации тканей. Объем резекции опухоли остается наиболее важным прогностическим фактором для выживаемости пациента и долгосрочного наблюдения, поскольку неполное удаление опухоли может привести к рецидиву, а чрезмерное удаление ткани может резко снизить качество жизни пациента. Несмотря на наличие высоко специфичных методов идентификации опухолевой ткани (включая иммуногистохимические методы, а также визуализацию с помощью МРТ и КТ) создание автоматизированных комплексов сопровождения операций на их основе не возможно, так как все они требуют достаточно большое время для анализа (не менее 20 минут) и не могут проводиться интраоперационно, без вынужденной приостановки операции.

Методы молекулярного масс-спектрометрического профилирования биологических объектов в настоящее время бурно развиваются благодаря повсеместному внедрению методов прямого масс-спектрометрического анализа – направления масс-спектрометрии, в котором объектом исследования является биологический материал, для которого не проводится сложной подготовки проб на основе экстракции биомолекул. Однако, получаемые при помощи таких методов масс-спектрометрические профили представляют собой трудно интерпретируемые данные, содержащие информацию о нескольких сотнях биомолекул. Интерпретация масс-спектров сложных смесей биологических молекул все еще остаётся трудной задачей из-за огромного разнообразия классов и видов молекул, содержащихся в биологических тканях [3],[4]. В качестве инструмента точной идентификации компонентов сложных смесей повсеместное распространение получили методы ЖХ МС/МС, эти методы невозможно использовать для быстрого анализа, ввиду того, что исследование при помощи таких методов занимает значительное, однако, время и требует сложной пробоподготовки. Несмотря на большое разнообразие существующих в настоящее время методов прямого масс-спектрометрического анализа биологических объектов, таких как десорбционно-электроспейная ионизация (DESI-MS), быстрая испарительная ионизация (REIMS), лазерно-десорбционная электроспрейной ионизация (ELDI) и других, не все они могут применяться для сопровождения нейрохирургических операций, ввиду специфичности объекта – опухоли головного мозга не имеют выраженной структуры и отличаются малым объемом, а также сложности клинических манипуляций. Таким образом, для развития методов автоматизированного молекулярного профилирования опухолей головного мозга необходимо разработать новые

методы масс-спектрометрического профилирования опухолей головного мозга, новые подходы к анализу данных молекулярного профилирования и методы автоматизации масс-спектрометрического исследования.

Цели и задачи диссертационного исследования

Несмотря на высокие аналитические характеристики масс-спектрометрического оборудования и достижения в развитии методов и техники прямого масс-спектрометрического анализа, непосредственное применение уже существующих методов к решению задачи молекулярного профилирования опухолей головного мозга затруднено, так как не дает возможность обеспечить необходимую точность идентификации при сохранении требований к скорости и простоте реализации исследования. Поэтому для решения задачи молекулярного профилирования опухолей головного мозга необходима разработка специализированных методов прямого масс-спектрометрического исследования, включающих протоколы экспериментальных исследований, технику ионных источников и методы обработки экспериментальных результатов.

Таким образом, основной **целью** диссертационного исследования стала разработка быстрого метода молекулярного масс-спектрометрического профилирования опухолей головного мозга из образцов, получаемых интраоперационно.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Разработка ионного источника, позволяющего осуществлять экспресс-исследование образцов опухолей головного мозга интраоперационно;
2. Исследование аналитических возможностей созданного ионного источника и поиск подходов оптимизации протоколов экспериментальных исследований;
3. Исследование структуры масс-спектрометрических профилей с помощью статистических методов;
4. Определение возможности классификации опухолей головного мозга на основе анализа данных молекулярного профилирования, полученных при помощи разработанного метода.

Научная новизна

Научная новизна данной диссертационной работы состоит в следующем:

1. Метод картриджной экстракции, интегрированный непосредственно в электрораспылительный ионный источник, является как новым по своей конструкции, так и его применение в для исследования опухолей головного мозга с целью их молекулярного профилирования, предложено впервые. Было продемонстрировано, что предложенный подход позволяет проводить быструю идентификацию опухолей головного мозга на основе

молекулярного профилирования образцов тканей, полученных интраоперационно;

2. Исследование информативности молекулярных профилей тканей в режиме исследования положительных или отрицательных ионов и вывод о разной роли таких профилей при решении задачи идентификации типа ткани;

3. Впервые с помощью метода картриджной экстракции в линии на примере дифференциации астроцитом и глиобластом реализован метод классификации опухолей головного мозга на основе молекулярного профилирования.

Практическая значимость

Результаты, полученные в диссертационном исследовании, представляют научную и практическую значимость. Практическая значимость, в первую очередь, связана с возможностью реализации аналитического оборудования для применения в практическом здравоохранении.

Разработанный метод картриджной экстракции в линии позволяет проводить быструю идентификацию опухолей головного мозга на основе молекулярного профилирования образцов тканей, проводимого непосредственно во время хирургического вмешательства. Таким образом, созданные методы и подходы могут быть использованы для создания аналитических комплексов, которые могут быть использованы в клинической практике. Полученные результаты могут быть обобщены и использованы при реализации аналогичных методов и подходов не только в нейрохирургии, но и в других областях медицины, в которых требуется быстрое профилирование образцов биологических тканей.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Новый метод картриджной экстракции в линии, основанный на интегрированной процедуре экстракции непосредственно в поток растворителя и электрораспылительной ионизации, для быстрой идентификации опухолей головного мозга на основе молекулярного профилирования [1].

2. Возможности метода картриджной экстракции в линии могут быть оценены при помощи методов статистического анализа на основе матриц спектрального подобия, который позволяет быстро определять надежность и воспроизводимость получаемого результата. Молекулярные масс-спектрометрические профили, измеренные в модах положительных и отрицательных ионов, играют разную роль в классификационном анализе опухолей головного мозга – молекулярные профили, измеренные положительной демонстрируют стабильность сигнала и позволяют оценить воспроизводимость данных, молекулярные профили, измеренные в отрицательной моде позволяют оценить тонкие различия между образцами

и могут быть использованы для окончательной классификации типа опухоли [2].

3. Реализация метода классификации опухолей головного мозга при помощи методов молекулярного профилирования на основе картриджной экстракции в линии продемонстрирована на примере исследования различий молекулярного строения астроцитом и глиобластом. Наилучшие результаты дифференциации астроцитом и глиобластом по молекулярному масс-спектрометрическому профилю могут быть достигнуты при помощи комбинации анализа содержания индивидуальных маркерных ионов и выявленных значимых групп ионов. Групповая идентификация ионов значительно дополняет индивидуальную, отражая естественную биологическую функциональность липидных маркеров, напрямую связанных с энергетическим и пластическим метаболизмом тканей [3,4].

Апробация работы

Основные результаты настоящего диссертационного исследования докладывались и обсуждались на следующих конференциях:

1. Vasily Elifеров; Evgeny Zhvansky; Dina Berlina; Nikita Levin; Vsevolod Shurkhay; Igor Popov; Eugene (Evgeny) Nikolaev. Inline capsular extraction of biological tissue samples for ESI for lipidomic analysis // 66TH ASMS CONFERENCE ON MASS SPECTROMETRY AND. ALLIED TOPICS. San Diego, California, USA. June 3 - 7, 2018.
2. Vasily Elifеров; Evgeny Zhvansky; Anatoly Sorokin; Vsevolod Shurkhay; Igor Popov; Eugene (Evgeny) Nikolaev. Real-time lipidomic analysis of biological tissue samples // BGRS/SB-2018: 9th International Multiconference "Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology». Novosibirsk, Russia. August 20-25, 2018.
3. Vasily Elifеров; Daniil Ivanov; Andrey Shivalin; Igor Popov; Eugene (Evgeny) Nikolaev. Optimized rapid matrix sublimation device for MALDI mass spectrometry imaging // 67TH ASMS CONFERENCE ON MASS SPECTROMETRY AND. ALLIED TOPICS. Atlanta, Georgia, USA. June 2-6, 2019.
4. Vasily Elifеров; Andrey Shivalin; Daniil Ivanov; Igor Popov; Eugene (Evgeny) Nikolaev. Matrix sublimation device with recrystallization system for MALDI mass spectrometry imaging // 68TH ASMS CONFERENCE ON MASS SPECTROMETRY AND. ALLIED TOPICS. USA, June 1-4, 2019.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в рецензируемых журналах.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, 4 глав, результатов и выводов и списка литературы. Объем диссертации составляет 88 страниц, включая 19 рисунков и 5 таблиц. В список литературы включены 106 источников.

Личный вклад автора

Автор участвовал в постановке целей и задач исследования, разработке метода, проведении масс-спектрометрических экспериментов, обработке и интерпретации результатов. Конструкция нового ионного источника с микроэкстракцией в картриджах является оригинальной идеей автора. Совместно с соавторами осуществлялась подготовка публикаций и представление полученных результатов на международных конференциях.

Содержание работы

Во введении обосновывается актуальность исследований, проводимых в рамках данной диссертационной работы, сформулированы научная новизна и практическая значимость.

В первой главе приводится обзор исследований, опубликованных в научной литературе по вопросам, связанным с тематикой диссертации: возможностей масс-спектрометрии в изучении образцов биологических тканей, методов анализа масс-спектрометрических данных, возможностей методов прямой ионизации, методов диагностики для нейрохирургии.

Вторая глава диссертации посвящена описанию нового метода картриджной экстракции в линии, основанного на интегрированной процедуре экстракции аналитов непосредственно в поток растворителя с последующей электроспрейной ионизацией.

Образцы ткани опухолей мозга как правило характеризуются, малым объемом, неоднородностью, присутствием в образцах частиц крови и растворов, используемых для обработки операционного поля. Кроме того, на структуру образца могут оказывать влияние хирургически е инструменты, используемые для резекции, например при использовании ультразвукового нейрохирургического коагулятора нарушается структурная целостность ткани. Зонды для прямой ионизации *in vivo*, например Spidermass, не могут быть использованы из-за локализации опухоли во внутреннем объеме тканей мозга. Поэтому прямое масс-спектрометрическое профилирование образцов тканей опухолей мозга требует разработки новых методов прямой ионизации, которые должны позволять проводить анализ образцов объемом от 1 мм³, независимо от их плотности и консистенции, а также обеспечивать устойчивость результатов к наличию в образце крови или побочных растворов.

На первом этапе исследования были реализована концепция метода, в котором образец биологической ткани омывается растворителем непосредственно в линии подачи растворите в ионной источник, впоследствии названный картриджной экстракцией в линии и известный в литературе как ICE (Inline Cartridge Extraction).

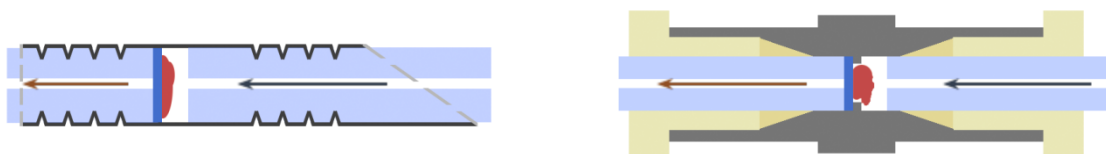


Рисунок 1 Схематичное изображение одnorазового (слева) и многоразового (справа) картриджей с цветовой маркировкой: черный- трубка из нержавеющей стали, голубой- хроматографический капилляр, синий- фильтрующая мембрана, красный- образец ткани, серый- хроматографический соединитель из нержавеющей стали, желтый- хроматографические винты, стрелками показано направление потока растворителя.

Такое решение позволяет использовать картриджную экстракцию почти с любым масс-спектрометром с электроспрейным ионным источником без внесения значимых изменений в конструкцию прибора. Были разработаны и протестированы два типа картриджей (Рисунок 1) – многоразовый (на основе хроматографических фитингов из нержавеющей стали), одnorазовый (собранный из хроматографического капилляра и трубки из нержавеющей стали). При разработке конструкции были протестированы различные материалы фильтрующей мембраны и хроматографических капилляров и в рамках решения задачи по профилированию тканей опухоли мозга человека наилучшие результаты по качеству масс-спектрометрических данных и удобству использования показали одnorазовые картриджи с фильтрующей мембраной из стеклянного фильтра и капиллярами из РЕЕК пластика.

Изменение параметров метода, таких как состав растворителя, поток растворителя, настройки ионного источника и параметры регистрации масс-спектров позволяют ориентировать метод на различные группы веществ. Для задачи профилирования образцов опухолевой ткани человека приоритетной группой веществ считались липиды. Поэтому используемый растворитель (90% метанол с добавлением 0,1% уксусной кислоты), настройки метода и параметры масс-спектрометра выбраны при оптимизации липидной части масс-спектра.

Результаты работы показали, что метод картриджной экстракции позволяет анализировать фрагменты объемом от 2 мм³, что позволяет изучать различные области внутри одного образца опухоли. Предварительная промывка картриджа позволяет избавиться от влияния на масс-спектрометрические профили наличия крови и побочных растворителей в образце.

Возможности метода для профилирования опухолевой ткани человека были продемонстрированы на образцах астроцитомы и глиобластомы, полученных прижизненно во время хирургической операции на опухолях головного мозга, проведенных в ФГАУ «НМИЦ Нейрохирургии им. ак. Н.Н. Бурденко» Минздрава России. Все образцы были получены в соответствии с утвержденными протоколами, требованиями этического комитета и с согласия пациентов. Фрагменты тканей, резецированных во время

операции, были разделены на равные части: одна половина каждого образца была подвергнута иммуногистохимическому анализу, вторая половина образцов использовалась для получения масс-спектрометрических профилей с помощью разработанного метода картриджной экстракции.

Масс-спектрометрические профили картриджной экстракции опухолевых тканей головного мозга представляют собой комплексные данные из-за большого разнообразия экстрагируемых липидов и метаболитов. Статистический анализ и методы машинного обучения позволяют компенсировать матричный эффект и выделить значимые особенности для проведения дифференциальной диагностики образцов тканей. PCA диаграммы (Рисунок 2) демонстрируют отличие профилей опухолевых тканей от неопухолевых патологий, рассматриваемых как контрольные.

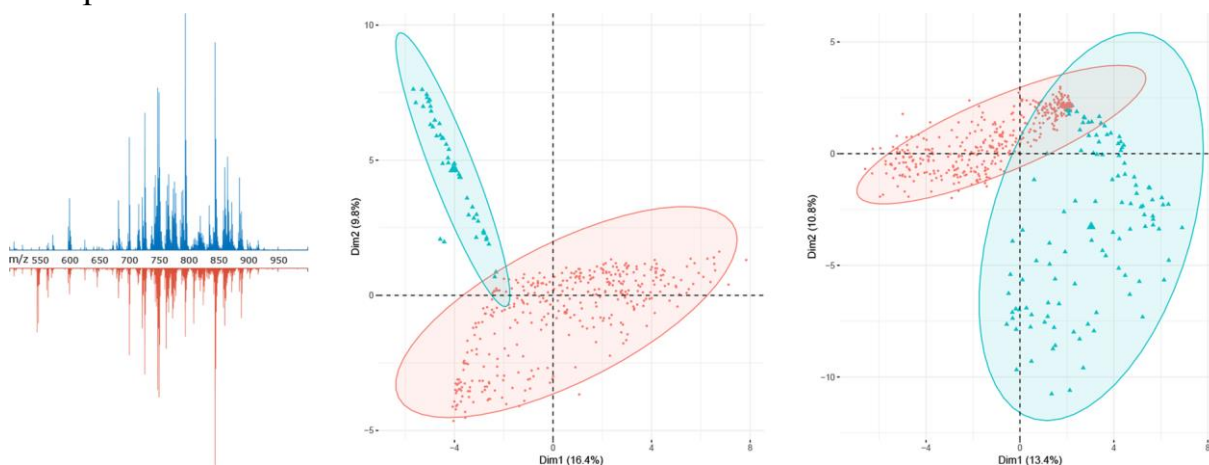


Рисунок 2 (слева) масс-спектры высокого разрешения образцов глиобластомы (вверху) и астроцитомы (внизу) в отрицательной моде; (в центре) диаграмма PCA для астроцитомы (красная) и неопухолевой патологической ткани (синяя) в отрицательной моде, данные низкого разрешения; (справа) диаграмма PCA для глиобластомы (красная) и неопухолевой патологической ткани (синяя) в положительной моде, данные низкого разрешения

Анализ PCA диаграмм позволяет сделать вывод о достаточной информативности метода картриджной экстракции для профилирования тканей опухоли головного мозга человека.

Для методов клинической диагностики критически важными параметрами являются достоверность и устойчивость к ошибкам, причем в случае нейрохирургии, как и ложноположительным, так и ложноотрицательным диагнозам. Для оценки потенциальной достоверности метода на основе молекулярных профилей созданы классификаторы для высокого и низкого разрешений и положительных и отрицательных ионов, результаты тестов на точность, чувствительность и специфичность различных классификаторов представлены в таблице 1.

Таблица 1 Точность (отношение правильно идентифицированных образцов ко всем образцам), чувствительность (отношение правильно идентифицированных образцов опухоли ко всем образцам опухоли) и специфичность (отношение правильно идентифицированных образцов неопухолевой патологии ко всем образцам неопухолевой патологии), рассчитанные для классификаторов, разработанных отдельно для каждой комбинации разрешающей способности и полярности полученных данных (83% выборок были выбраны случайным образом для тренировочного набора путем перекрестной проверки).

		Классификатор астроцитомы			Классификатор глиобластомы		
		Точность	Чув-ть	Спец-ть	Точность	Чув-ть	Спец-сть
Низкое разрешение	Положительная мода	0.993	0.999	0.909	.985	0.988	0.973
	Отрицательная мода	0.976	1.000	0.916	0.984	0.993	0.949
Высокое разрешение	Положительная мода	0.972	0.982	0.947	0.993	0.995	0.983
	Отрицательная мода	0.986	1.000	0.952	0.088	1.000	0.936

Классификаторы на данных высокого разрешения демонстрируют лучшую специфичность, что означает меньшее количество ложноположительных ошибок и, в большинстве случаев, лучшую точность.

Таким образом, созданный метод масс-спектрометрии с картриджной экстракции в линии демонстрирует высокую производительность при очень простой процедуре пробоподготовки образца. Возможность получения результатов исследования в течение нескольких минут может быть использована в клинической практике в тех случаях, когда требуется проводить экспресс-анализ во время проведения операций (в том числе радихирургических) на высокогетерогенных опухолях. Применение масс-спектрометрического профилирования дает возможность для дальнейшего повышения достоверности послеоперационного анализа тканей, необходимого для корректирования протокола лечения пациента. В целом созданный метод может применения быстрого молекулярного профилирования в медицинской диагностике, а также в дальнейших биологических исследованиях: простой, универсальный, экономичный и эффективный по времени метод прямого анализа тканей.

В третьей главе проводится исследование аналитических возможностей метода картриджной экстракции в линии с помощью статистических методов. Кроме того, в этой главе исследуется стабильность и воспроизводимость масс-спектрометрических профилей картриджной экстракции при помощи анализа матриц подобия спектров.

Как и в исследовании из главы 2, образцы первичных опухолей головного мозга были предоставлены ФГАУ НМИЦ нейрохирургии им. академика Н.Н. Бурденко Минздрава России и проанализированы под утвержденным протоколом совета института с соблюдением всех предписанных законом процедур.

При переносе данных из лаборатории в клинику требуется учитывать не только особенности оборудования, но и различия в пробоподготовке и протокола использования образцов. В частности то, как влияет заморозка и транспорт образцов в лабораторию на стабильность и воспроизводимость спектров. Кроме того, в отличие от модельных организмов, образец опухоли может быть очень неоднородным, что создает определенные проблемы для анализа клинических образцов. С одной стороны наличие неоднородности позволяет определять пограничную область опухоли, с другой ухудшает стабильность и воспроизводимость результатов исследования гетерогенных опухолей. Для изучения значимости этих факторов образец с гистологическим диагнозом анапластическая астроцитома был разделен на 3 части S1, S2 и S3. Части S1 и S2 гистологически были диагностированы как ядро опухоли, а S3 являлась зоной роста с 90% содержанием опухолевых клеток. После этого каждая часть была разделена на два фрагмента, первые из которых были проанализированы в клинике в низком разрешении, не подвергаясь заморозке, вторые фрагменты каждой из частей были заморожены при -80°C и транспортированы в лабораторию, где были исследованы как в высоком, так и в низком разрешениях. Для контроля полученных результатов были построены матрицы подобия спектров для широкого (100-2000) и узкого (500-1000) диапазона m/z масс-спектров в режиме положительных и отрицательных ионов (рис. 3).

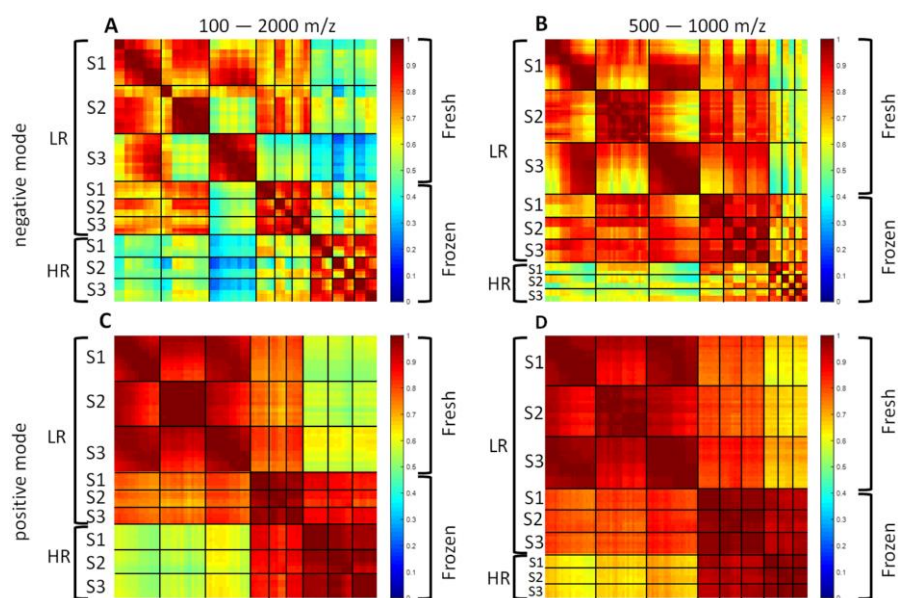


Рисунок 3 Матрицы подобия спектров для образца #1034, гистологический диагноз-анапластическая астроцитома. Образец был разделен на три части, для каждой было проведено гистологическое исследование: S1 и S2- ядро опухоли, S3- зона роста опухоли с 90% содержанием опухолевых клеток. Каждая диаграмма представляет собой комбинацию наборов данных в трех случаях: не замороженный фрагмент в низком разрешении, замороженный фрагмент в низком и высоком разрешениях. В каждом случае спектры регистрировались в диапазонах m/z 100-200 и 500-1000. Черными линиями на диаграмме отделяется каждый фрагмент.

Матрицы подобия спектров являются универсальным и удобным инструментом для анализа стабильности и повторяемости масс-

спектрометрических данных, получаемых при помощи методов прямого МС профилирования. При построении матрицы подобия каждая ее клетка содержит величину метрики схожести двух спектров, соответствующих индексам столбца и строки. Диаграмма матрицы подобия использует псевдоцвета для отображения этих величин.

На диаграммах матриц подобия исследованных фрагментов (рис.3) видно, что стабильность спектров в положительной моде гораздо выше, чем в отрицательной независимо от ширины используемого диапазона масс. При этом сравнение матриц на рисунке 3А и 3В показывает, что сужение диапазона заметно увеличивает подобие как между свежими и замороженными спектрами, так и между спектрами низкого и высокого разрешения. Этот эффект менее выражен в спектрах положительной моды (рис. 3С и 3D). Кроме того, заметно что режим положительных ионов позволяет отфильтровать выбросы, тогда как неоднородность в отрицательном режиме характеризует вариабельность внутри образца

Отдельный интерес представляет заметное отличие фрагмента S3 от всех остальных данных на диаграмме для режима отрицательных ионов в диапазоне m/z 100-2000. Фрагмент S3 был гистологически классифицирован как образец ткани из зоны роста опухоли, что позволило сделать предположение о чувствительности метода к процентному содержанию опухолевых клеток в ткани. Для подтверждения гипотезы из этого образца были дополнительно взяты 2 фрагмента: ядра опухоли и зоны роста опухоли с процентным содержанием злокачественных опухолевых клеток 70%. Изображения гистологических срезов исследуемых образцов и соответствующие им масс-спектры показаны на рисунке 4.

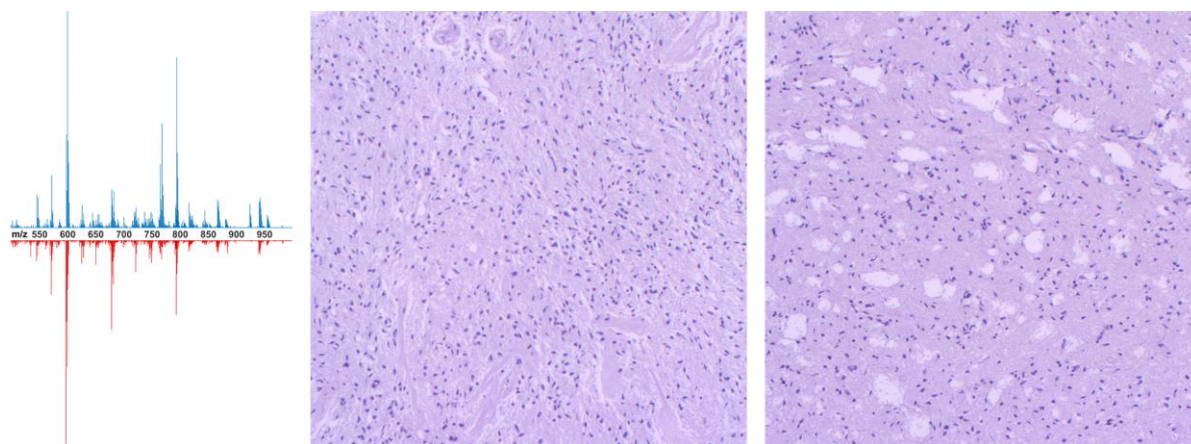


Рисунок 4 (слева) Масс-спектры высокого разрешения ядра опухоли (вверху) и зоны роста опухоли (содержащие 70% злокачественных клеток, внизу) образцов глиобластомы в отрицательном режиме. Гистологические изображения ядра опухоли (в центре) и зоны роста опухоли (справа).

Стабильность масс-спектрометрического сигнала была исследована в рамках измерения свежих образцов астроцитомы при регистрации спектров в широком m/z 100-2000 и узком m/z 500-1000 диапазонах и обоих режимах полярности (рис.5). Наиболее высокий уровень вариации (количество желтых и синих полос) наблюдается на рисунке 5А, при этом можно выделить две относительно стабильных области (отмечены пунктирными линиями), граница между которыми соответствует времени проведения профилактического обслуживания масс-спектрометра. На панелях В-Д рисунка 5 такая структура отсутствует.

Отличительной особенностью матрицы на рисунке 5С являются четкие желтые полосы, соответствующие низкокачественным спектрам. Полосы низкого подобия присутствуют на тех же позициях и в отрицательных спектрах (рис. 5А) но они менее заметны на фоне общей вариабельности в режиме отрицательных ионов. Такой анализ показывает, что совместный анализ спектров в разных режимах и диапазонах позволяет отфильтровывать спектры низкого качества.

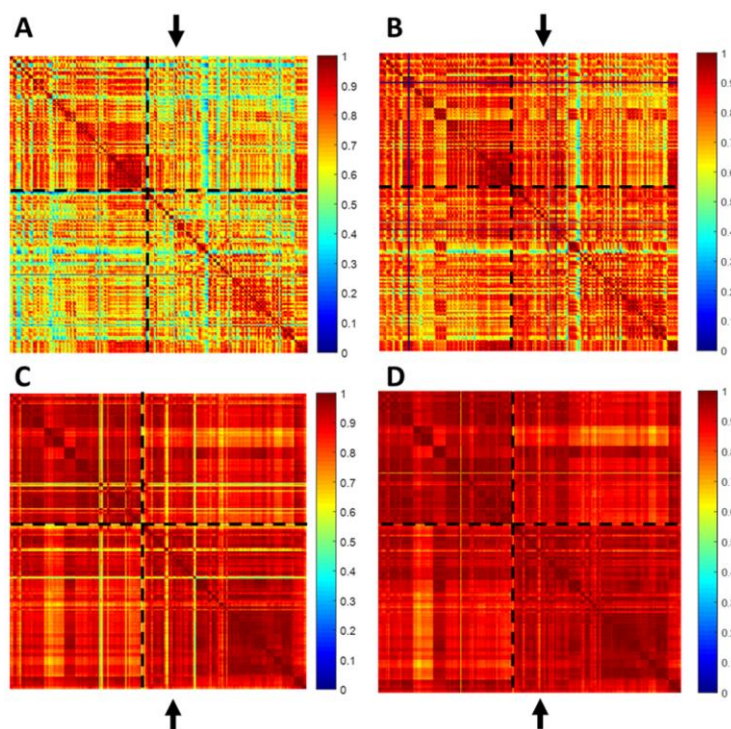


Рисунок 5 Матрицы подобия спектров для масс-спектрометрического профиля образца астроцитомы в низком разрешении. А - m/z 100-2000 Да, отрицательные ионы, В - m/z 500-1000 Да, отрицательные ионы, с - m/z 100-2000 Да, положительные ионы, D - m/z 500-1000, положительные ионы.

Метод анализа матриц подобия спектров позволяет наблюдать и контролировать особенности процесса экстракции и регистрации сигнала. Это удобнее делать в режиме отрицательных ионов, вследствие высокой вариабельности сигнала. Профили в режиме отрицательных ионов также содержат нестабильность в начале измерения (рис. 6), но она становится

значимо меньше после 5ти минут экстракции (рис. 7). Это можно объяснить тем, что в процессе экстракции исчерпались низкомолекулярные фракции в поверхностном слое образца и в его спектрах заметнее проявляются липидные фракции.

Средний спектр на левой панели рисунков 6 и 7, слабо коррелирующий с соседними спектрами демонстрирует наиболее частую причину появления выбросов на матрице подобия спектров: высокоинтенсивный пик низкомолекулярного контаминанта, подавляющий наиболее информативную липидную часть спектра (500-1000) отмеченную на левой панели вертикальными линиями. Сравнение средних панелей на рисунках 6 и 7 позволяет заметить, как снижение интенсивности контаминанта делает более заметным спектр в липидной части. Сравнение верхней и нижней панелей на рисунках 6 и 7 друг с другом позволяет увидеть, как из образца вымываются низкомолекулярные метаболиты и в спектре начинает доминировать либидная фракция.

Таким образом, метод анализа матриц подобия спектров обеспечивает быстрый и надежный инструмент для обнаружения выбросов, а также контроля наличия группового эффекта в наборах данных масс-спектрометрических профилей. Выбросы могут быть обнаружены путем выделения наиболее разнородных спектров положительном и отрицательном режимах и исключены из рассмотрения, а анализ соответствующих спектров позволяет установить причину появления выброса. Профили, измеренные в положительном режиме, характеризуются высокой стабильностью сигнала и позволяют контролировать воспроизводимость данных. Профили, измеренные в отрицательном режиме, содержат стабильные пики в диапазоне m/z 500-1000, которые позволяет объяснить различия между образцами, и могут быть использованы для тренировки классификаторов, регрессоров и других методов машинного обучения.

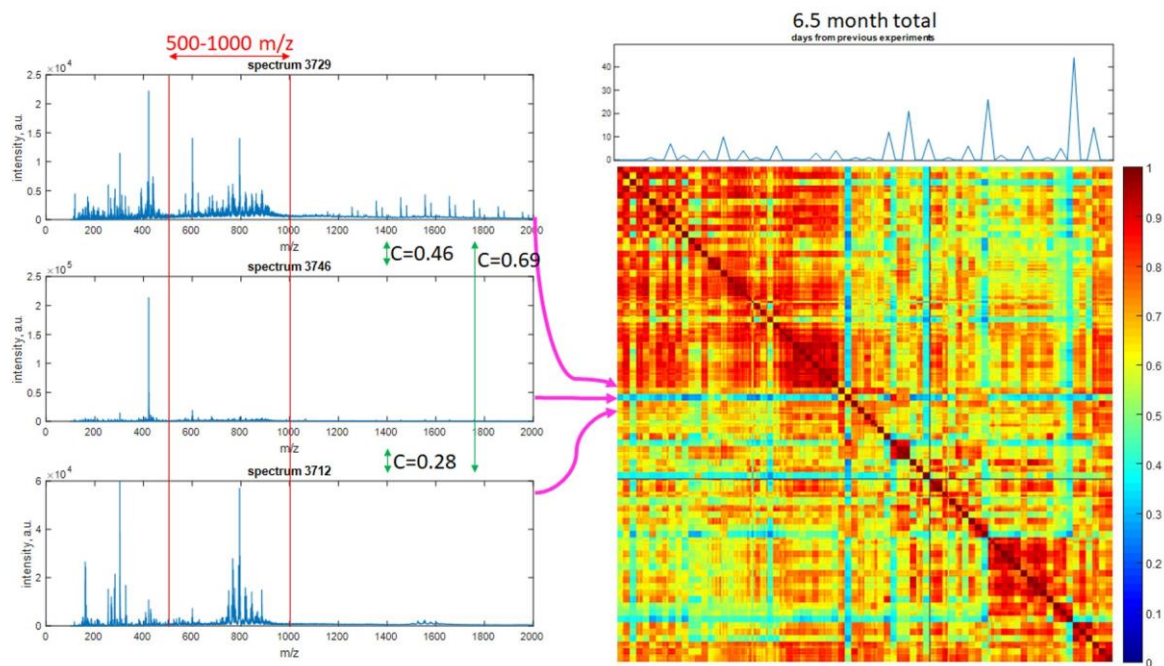


Рисунок 6 Матрица подобия спектров образца астроцитомы в низком разрешении первые 30 секунд регистрации. Спектры трех выделенных сканов представлены на левой панели. Верхний график правой панели интервал между измерениями в днях.

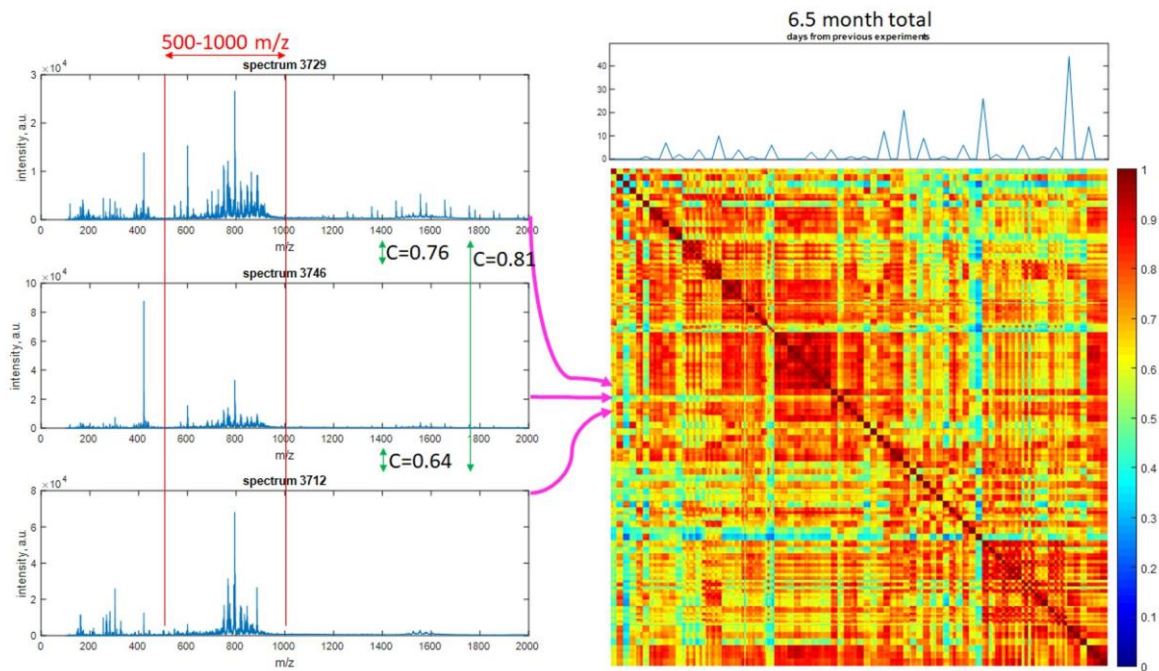


Рисунок 7 Матрица подобия спектров образца астроцитомы в низком разрешении 6:00 – 6:30 минут экстракции. Спектры трех выделенных сканов представлены на левой панели. Верхний график правой панели интервал между измерениями в днях.

В четвертой главе образцы опухоли мозга человека профилируются с использованием масс-спектрометрических профилей низкого разрешения. Интерпретация масс-спектров сложных смесей биологических молекул всё ещё остаётся трудной задачей из-за огромного разнообразия классов и видов молекул, содержащихся в биологических тканях. Несмотря на повсеместное распространение методов жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (ЖХ-МС/МС), которые используются в качестве инструмента для точной идентификации компонентов сложных смесей, эти методы невозможно использовать для быстрого анализа ввиду того, что исследование при помощи таких методов занимает значительное время и требует сложной пробоподготовки. Методы прямого МС-анализа, в которых производится исследование биоматериала без предварительной подготовки и хроматографического разделения, хоть и являются альтернативой методам ЖХ-МС/МС в целом не могут быть использованы для применения к конкретным аналитическим задачам исследования биологических объектов без соответствующей методической подготовки.

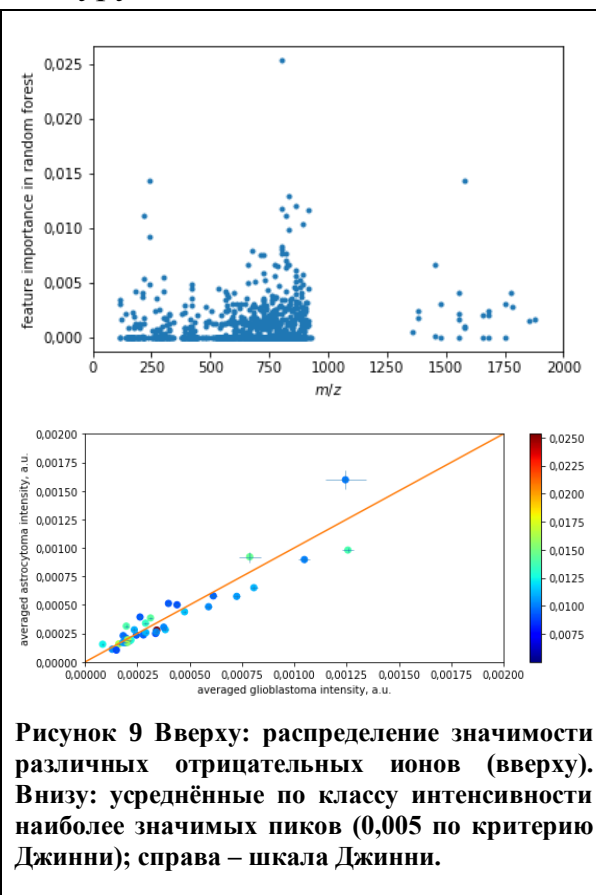
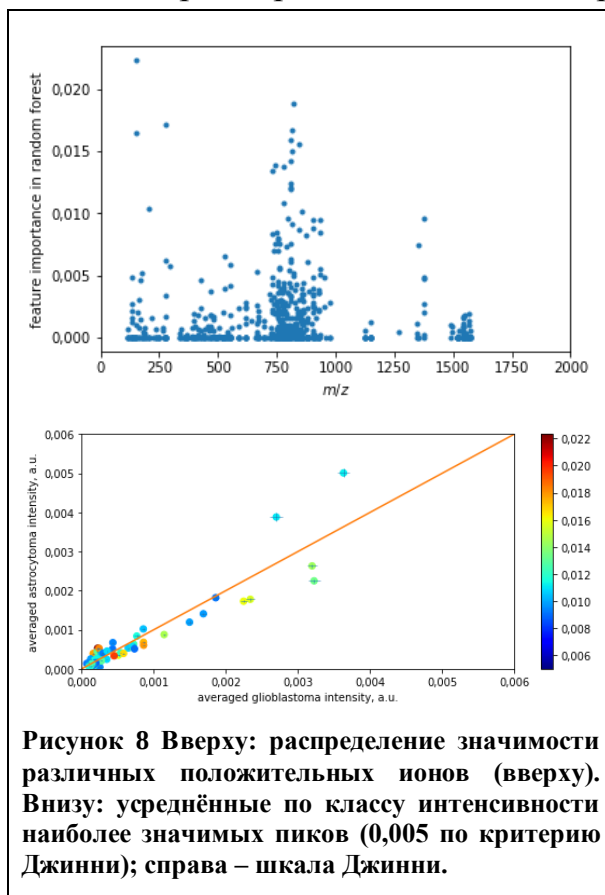
Глиальные опухоли, сильно неоднородные по своей структуре, можно разделить на различные подтипы на основе морфологических и генетических данных в соответствии с классификацией ВОЗ. Заметные морфологические вариации наблюдаются не только между тканями разных пациентов, но даже среди образцов, иссеченных у одного пациента из-за неоднородности опухолей, состоящих из частей с различной степенью злокачественности. Внутренняя вариабельность может стать серьёзной проблемой для быстрого, точного и объективного определения уровня злокачественности опухоли. Задачи обнаружения опухолевых клеток в пограничной зоне наиболее актуальны для клинические применения, однако для их реализации требуется разработка аналитического подхода, позволяющего детектировать опухолевые клетки в окружении интактных слабо модифицированных клеток. Для решения задачи дифференциации опухолевых клеток при помощи методов масс-спектрометрического профилирования был проведен анализ зависимости результатов идентификации от состава молекулярных профилей и выделены отличия в масс-спектрометрических профилях опухолей. Для этого были собраны максимально однородные по структуре образцы глиобластом и астроцитом, для которых были проведены детальные исследования масс-спектрометрического профиля с многократными повторениями и идентификацией индивидуальных компонент, участвующих в формировании профилей.

Всего в рамках данной задачи было проанализировано 57 образцов опухолевых тканей, которые были предоставлены Национальным медицинским исследовательским центром (НМИЦ) нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко. Каждый исследуемый образец ткани, удалённый во время планового нейрохирургического вмешательства, был разделён на две

части. Первая часть была охарактеризована при помощи окрашивания гематоксилином и эозином и дальнейшего иммуногистохимического анализа для определения диагноза и степени злокачественности. Вторая часть была помещена в физиологический раствор, промыта в нём, заморожена и находилась при -80°C до проведения масс-спектрометрических измерений. В результате 26 образцов ткани были охарактеризованы как астроцитомы с различными вариантами мутаций гена IDH-1 (17 анапластических астроцитом (WHO Grade III, среди них 8 опухолей с IDH-1 R132H мутацией), 8 диффузных астроцитом (WHO Grade II, среди них 6 опухолей с IDH-1 R132H мутацией), 1 гемистоцитарная астроцитома WHO Grade II (с IDH-1 R132H мутацией)). Кроме этого, 31 образец ткани был охарактеризован как глиобластомы (WHO Grade IV, 10 опухолей с IDH-1 R132H мутацией). Каждый образец опухолевой ткани был разделён на 3 фрагмента, для каждого из которых был измерен МС-профиль.

Масс-спектрометрическое профилирование образцов осуществлялось при помощи экстракции во встроенном картридже (ICE) с последующей электроспрейной ионизацией. Масс-спектрометрические профили измерялись по протоколу, описанному в третьей главе диссертации, с использованием масс-спектрометра Thermo LTQ XL (Thermo Fisher Scientific, США) в режиме регистрации как положительных, так и отрицательных ионов (диапазон m/z 100—2000). Измерения проводили непрерывно с чередующимся режимом полярности и диапазоном измерения m/z , с четырёхкратным повторением в течение 10 мин. Таким образом, интервал между повторами условий измерения составлял 2,5 мин. Масс-спектры обрабатывались по алгоритму, разработанному при участии автора настоящей диссертации. Масс-спектры перевели в векторное пространство с шириной биннинга 0,25 m/z , произвели фильтрацию скользящим медианным значением с шириной и шагом окна в 51 спектр и нормировали на полный ионный ток. Корректировку базовой линии в спектрах проводили с использованием скользящего минимального значения. Все интенсивности в спектре меньше 10% от интенсивности основного пика (максимальной интенсивности в спектре) для масс-спектрометрических профилей, измеренных в режиме положительных ионов, и меньше 20% — в режиме отрицательных ионов, приравнивали к 0. Идентификация ионов производилась путём сопоставления спектров низкого разрешения и ранее измеренных спектров высокого разрешения аналогичных тканей с использованием тандемной масс-спектрометрии со столкновительной диссоциацией. Классификация исследуемых типов опухолей осуществлялась при помощи так называемого алгоритма случайного леса, реализованного в библиотеке машинного обучения Scikit-learn. Оптимизация гиперпараметров производилась на обучающей выборке при помощи пятикратной кросс-валидации, при этом масс-спектрометрические профили разных образцов попадали либо только в тренировочную выборку, либо только в обучающую. Далее оценивали точность классификации на

тестовой выборке и исследовали вклад различных признаков (ионов) на основе вычисления критерия Джини (отбирались только те ионы, вклад которых превышал значение 0,005). Для анализа статистической достоверности отличий в интенсивности наиболее важных признаков-ионов, которые также были идентифицированы при помощи тандемной масс-спектрометрии, использовали процедуру ANOVA пакета MATLAB.



Классификатор, построенный для двух видов опухолей, обладает точностью около 75% в режиме измерения масс-спектров положительных ионов и около 65% – в режиме отрицательных ионов. Невысокая точность классификации может быть опосредована естественной гетерогенностью ткани опухоли и биологической вариабельностью образцов. Среди наиболее важных с точки зрения классификации ионов на спектрах в основном присутствуют ионы липидов, большинство из которых обладают статистически достоверными отличиями нормализованных интенсивностей в разных типах опухолей. Важнейшие идентифицирующие ионы (Рисунок 3, Рисунок 4) ложатся не на прямую равенства средних значений интенсивностей пиков в группах астроцитом и глиобластом, а смещены либо больше к оси астроцитом, либо глиобластом, что отражает большие относительные концентрации липидов в астроцитомах или глиобластомах соответственно.

Из шестидесяти наиболее значимых ионов в этой области удалось идентифицировать молекулярную природу для шести соединений в режиме положительных ионов и пяти в отрицательном режиме (таблицы 1 и 2). Для каждого из идентифицированных ионов мы провели анализ вариативности сравнительной интенсивностей МС-пигов, в результате которого было установлено что интенсивности пяти из шести значимо (на уровне p-value 5%) различаются между классами опухолей.

Таблица 2 Идентификации молекул и их значимость в классификаторе. Режим положительных ионов

m/z	p-value	значимость	identification
816.75	$5 \cdot 10^{-48}$	0.0167	PC(37:5)+Na;
818.5	$1.5 \cdot 10^{-29}$	0.0052	PC-O(38:4)+Na
808.75	$2 \cdot 10^{-10}$	0.012	PC(36:2)+Na
780.5	$5 \cdot 10^{-19}$	0.0109	PC(34:2)+Na
754.75	$7 \cdot 10^{-23}$	0.008	PC(32:1)+Na
750.5	$1.6 \cdot 10^{-1}$	0.0084	PE-O(36:3)+Na

Таблица 3 Идентификации молекул и их значимость в классификаторе. Режим отрицательных ионов

m/z	p-value	значимость	identification
726,75	$5 \cdot 10^{-2}$	0,0081	PE-O(36:3)-H
830,75	$4 \cdot 10^{-16}$	0,0141	PC-O(38:4)+Cl
572,5	$6 \cdot 10^{-5}$	0,0056	Cer(34:1)+Cl
916,5	$1,2 \cdot 10^{-6}$	0,0075	ST(26:1)-H
888,75	$6 \cdot 10^{-1}$	0,006	PI(38:4)-H

Из таблиц 1 и 2 видно, что часть липидов (PC(37:5), PC-O(38:4), PC(36:2), PC(34:2), PC(32:1), Cer(34:1), ST(26:1) и PI(38:4)) характеризуется статистически значимыми различиями по уровню интенсивности в спектрах, и их отличия можно трактовать отдельно. Другую часть липидов (PE-O(36:3) и PE-O(36:3)) невозможно рассматривать как отдельные маркеры из-за низкого уровня их значимости, несмотря на высокий индекс Джини.

Фосфатидилхолин PC(34:2) чаще обнаруживается в некротических тканях и кровоизлияниях. В то же время некроз и местные кровоизлияния более характерны для клинической картины глиобластомы, а не астроцитомы. Этот факт находится в полном соответствии со статистически значимыми отличиями масс-спектров. Также было показано ранее, что PC(34:2) является одним из соединений, чётко отличающих

морфологически нормальную железистую ткань и опухолевую ткань. В свою очередь, фосфатидилхолин PC (36:2) по-разному участвует в процессах опухолевого липогенеза: для колоректального рака обычно характерна пониженная концентрация липида, а для глиобластом — повышенная. Ранее было показано, что относительная концентрация PC(32:1) повышена в нормальной ткани лёгких по сравнению с опухолевыми тканями; содержание PC(36:2) значительно повышено в тканях немелкоклеточного рака лёгких; PC(38:4) — повышено, а PC(34:2) — понижено в опухолевых тканях почек по сравнению со здоровыми. Специфическая форма фосфатидилэтаноламина PE-O(36:3) была ранее ассоциирована с колоректальным раком и раком простаты. Таким образом, поскольку липидный состав опухолей естественным образом изменяется вследствие изменения биохимических процессов синтеза липидов *de novo* и окислительного фосфорилирования, липидный состав астроцитом и глиобластом также отличается вследствие различного патогенеза опухолей.

Совокупный анализ данных приводит к заключению, что групповая идентификация ионов позволяет существенно повысить точность экспресс-идентификации биологических образцов по сравнению с подходом, использующим для классификации отдельные индивидуальные ионы. Для некоторых из идентифицированных ионов уже была показана ассоциация с канцерогенезом, что позволяет предположить интерпретацию их роли в разделении астроцитом и глиобластом. Ионы разного знака по-разному участвуют в классификации, а именно в режиме отрицательных ионов в большей степени подвержены влиянию биологической вариабельности внутри образца и между образцами, в то время как режим положительных ионов более устойчив и характеризуется липидами, ассоциированными с конкретной тканью в целом.

Таким образом, наилучшие результаты дифференциации астроцитом и глиобластом по МС-профилю могут быть достигнуты комбинацией анализа содержания индивидуальных маркерных ионов и выявленных значимых групп ионов. Групповая идентификация ионов значительно дополняет индивидуальную, отражая естественную биологическую функциональность липидных маркеров, напрямую связанных с энергетическим и пластическим метаболизмом тканей.

Заключение

В рамках данной диссертационной работы был разработан охарактеризован новый метод прямой ионизации с картриджной экстракцией в линии. На основании полученных результатов могут быть сделаны следующие выводы:

1. Новый метод картриджной экстракции в линии, основанный на интегрированной процедуре экстракции непосредственно в поток растворителя и электрораспылительной ионизации, для быстрой идентификации опухолей головного мозга на основе молекулярного профилирования [1].
2. Возможности метода картриджной экстракции в линии могут быть оценены при помощи методов статистического анализа на основе матриц спектрального подобия, который позволяет получать быстро определять надежность и воспроизводимость получаемого результата. Молекулярные масс-спектрометрические профили, измеренные в модах положительных и отрицательных ионов, играют разную роль в классификационном анализе опухолей головного мозга – молекулярные профили, измеренные положительной демонстрируют стабильность сигнала и позволяют оценить воспроизводимость данных, молекулярные профили, измеренные в отрицательной моде позволяют оценить тонкие различия между образцами и могут быть использованы для окончательной классификации типа опухоли [2].
3. Реализация метода классификации опухолей головного мозга при помощи методов молекулярного профилирования на основе картриджной экстракции в линии продемонстрирована на примере исследования различий молекулярного строения астроцитом и глиобластом. Наилучшие результаты дифференциации астроцитом и глиобластом по молекулярному масс-спектрометрическому профилю могут быть достигнуты при помощи комбинации анализа содержания индивидуальных маркерных ионов и выявленных значимых групп ионов. Групповая идентификация ионов значительно дополняет индивидуальную, отражая естественную биологическую функциональность липидных маркеров, напрямую связанных с энергетическим и пластическим метаболизмом тканей [3,4].

Публикации автора по теме диссертации

Статьи в рецензируемых изданиях

1. Pekov S. I. **Elifero V. A.**, Sorokin, A. A., Shurkhay, V. A., Zhvansky, E. S., Vorobyev, A. S., Potapov A.A., Nikolaev E.N., Popov I.A. Inline cartridge extraction for rapid brain tumor tissue identification by molecular profiling //Scientific Reports. – 2019. – Т. 9. – №. 1. – С. 1-7.
2. Zhvansky E. S. **Elifero V. A.**, Sorokin A. A., Shurkhay V. A., Pekov S. I., Bormotov D. S., Ivanov D.G., Zavorotnyuk D.S., Bocharov K.V.,

Khaliullin I.G., Belenikin M.S., Potapov A.A., Nikolaev E.N., Popov I.A. Assessment of variation of inline cartridge extraction mass spectra //Journal of Mass Spectrometry. – 2020. – С. e4640. <https://doi.org/10.1002/jms.4640>

3. **Елиферов В. А.**, Жванский Е. С., Сорокин А. А., Шурхай В. А., Бормотов Д. С., Пеков С. И., Никитин П.В. Рыжова М.В., Куликов Е.Е., Потапов А.А., Николаев Е.Н., Попов И.А. Роль липидов при классификации астроцитомы и глиобластомы при помощи масс-спектрометрического профилирования опухолей //Биомедицинская химия. – 2020. – Т. 66. – №. 4. – С. 317-325.

4. Д.Г. Иванов, С.И. Пеков, К.В. Бочаров, Д.С. Бормотов, А.И. Спасский, Е.С. Жванский, А.А. Сорокин, **В.А. Елиферов**, Д.С. Заворотнюк, С.И. Ткаченко, И.Г. Халиуллин, А.Ю. Куксин, В.А. Шурхай, А.С. Кононихин, Е.Н. Николаев, И.А. Попов. Новые возможности масс-спектрометрии для сопровождения онкологических операций // Химическая физика. – 2020. – Т. 39. – №. 6. – С. 41-46. DOI: 10.31857/S0207401X20060035

Тезисы на конференциях

5. Vasily Elifеров; Evgeny Zhvansky; Dina Berlina; Nikita Levin; Vsevolod Shurkhay; Igor Popov; Eugene (Evgeny) Nikolaev. Inline capsular extraction of biological tissue samples for ESI for lipidomic analysis // 66TH ASMS CONFERENCE ON MASS SPECTROMETRY AND. ALLIED TOPICS. San Diego, California, USA. June 3 - 7, 2018.

6. Vasily Elifеров; Evgeny Zhvansky; Anatoly Sorokin; Vsevolod Shurkhay; Igor Popov; Eugene (Evgeny) Nikolaev. Real-time lipidomic analysis of biological tissue samples // BGRS/SB-2018: 9th International Multiconference “Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology». Novosibirsk, Russia. August 20-25, 2018.

7. Vasily Elifеров; Daniil Ivanov; Andrey Shivalin; Igor Popov; Eugene (Evgeny) Nikolaev. Optimized rapid matrix sublimation device for MALDI mass spectrometry imaging // 67TH ASMS CONFERENCE ON MASS SPECTROMETRY AND. ALLIED TOPICS. Atlanta, Georgia, USA. June 2-6, 2019.

8. Vasily Elifеров; Andrey Shivalin; Daniil Ivanov; Igor Popov; Eugene (Evgeny) Nikolaev. Matrix sublimation device with recrystallization system for MALDI mass spectrometry imaging // 68TH ASMS CONFERENCE ON MASS SPECTROMETRY AND. ALLIED TOPICS. USA, June 1-4, 2019.

ЕЛИФЕРОВ ВАСИЛИЙ АЛЕКСЕЕВИЧ

НОВЫЙ МЕТОД БЫСТРОГО МОЛЕКУЛЯРНОГО МАСС-
СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО ПРОФИЛИРОВАНИЯ ОПУХОЛЕЙ
ГОЛОВНОГО МОЗГА НА ОСНОВЕ КАРТРИДЖНОЙ ЭКСТРАКЦИИ В
ЛИНИИ

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Подписано в печать 22.10.2020. Формат 60х90 $\frac{1}{16}$. Усл. печ. л. 1.25. Тираж
50 экз. Заказ № 18061. Печать трафаретная. Типография «11-й ФОРМАТ».
ИНН 7726330900. 115230, Москва, Варшавское ш., 36.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
“Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)”
141701, Московская обл., г. Долгопрудный, Институтский пер., д. 9.