

НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ СОПРОВОЖДЕНИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ОПЕРАЦИЙ

© 2020 г. Д. Г. Иванов^{1,3}, С. И. Пеков^{2,3}, К. В. Бочаров^{2,3}, Д. С. Бормотов^{1,3}, А. И. Спасский²,
Е. С. Жванский³, А. А. Сорокин^{3,4}, В. А. Елиферов³, Д. С. Заворотнюк³,
С. И. Ткаченко³, И. Г. Халиуллин³, А. Ю. Куксин³, В. А. Шурхай^{2,5},
А. С. Кононихин^{1,3,7}, Е. Н. Николаев^{1,3,7*}, И. А. Попов^{2,3,6}

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

²Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова Российской академии наук, Москва, Россия

³Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

⁴Институт биофизики клетки Российской академии наук, Пущино, Россия

⁵Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко, Москва, Россия

⁶Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова, Москва, Россия

⁷Сколковский институт науки и технологий, Сколково, Россия

*E-mail: ennikolaev@gmail.com

Поступила в редакцию 05.06.2019;

после доработки 05.06.2019;

принята в печать 20.06.2019

Широкое применение масс-спектрометрического анализа в клинической практике невозможно без совершенствования физико-химических основ этого метода. Создание новых методов ионизации и анализа ионов значительно расширило набор биомолекул, анализируемых в диагностических целях, что позволило применить прямую (без пробоподготовки) масс-спектрометрию для сопровождения хирургических операций. В работе представлен краткий обзор последних достижений в области применения масс-спектрометрии в онкохирургии и, в частности, нейрохирургии. Продемонстрированы новые достижения авторов в этой области, в том числе показано, что совместное применение различных масс-спектрометрических подходов позволяет повысить общую информативность анализа.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, прямая ионизация, масс-спектрометрия высокого разрешения, нейрохирургия, онкология, масс-спектрометрическая визуализация.

DOI: 10.31857/S0207401X20060035

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время масс-спектрометрические методы широко используются в клинической диагностике. Масс-спектрометрия, впервые получившая распространение в анализе наркотических и фармакологических субстанций более 30 лет назад, в настоящее время является рутинным методом в широкопрофильном скрининге патологий новорожденных, анализе гормонов и идентификации микроорганизмов в анализах крови [1]. Этот прогресс был бы невозможен без развития физико-химических методов анализа, постоянно расширяющих аналитические возможности лабораторной диагностики [2–7]. Развитие методов “мягкой” ионизации, технологий фрагментации и детектирования ионов в сочетании с совершенствованием хроматографических методов позво-

лило применить масс-спектрометрию ко всем классам биомолекул. В зависимости от задачи, качественное и количественное определение аналитов выполняется на основе уникального для каждого вещества набора характеристик – молекулярной массы, времени удерживания, спектра фрагментации родительского иона.

В начале XXI века получает широкое распространение молекулярное профилирование, позволяющее идентифицировать объект на основе специфического набора ионов в масс-спектре без идентификации отдельных компонент, а разнообразные “омиксные” технологии находят широкое применение в области биомедицинских исследований. В настоящее время активно развивается масс-спектрометрическая визуализация, которая, как предполагается, может заменить и автоматизи-

зировать рутинную гистологию и иммуногистохимический анализ. Предпринимаются успешные попытки адаптировать методы прямой масс-спектрометрии для экспресс-анализа проб непосредственно в процессе хирургического вмешательства для повышения точности и эффективности работы хирурга [8–10].

Преимущество методов прямой ионизации состоит в том, что анализ биологических образцов проводится без предварительной подготовки пробы. Это обеспечивает высокую скорость и простоту анализа, что наиболее востребовано в области онкохирургии, так как успех оперативного вмешательства зависит от полноты резекции патологических тканей [11]. Полная резекция злокачественных образований может быть затруднена нечеткостью границы между немодифицированной и патологической тканью. Это требует применения различных навигационных систем, которые могут заметно влиять на длительность операции, либо оказываются неприменимы для определенных видов опухолей [12]. Масс-спектрометрическое профилирование с применением методов прямой масс-спектрометрии может оказаться универсальным решением для экспресс-диагностики иссекаемого материала, выступая в роли простой, быстрой и автоматизированной замены срочному гистологическому исследованию [13].

Разнообразные методы применяются в исследованиях онкологических заболеваний при проведении хирургических операций и биопсии. Метод REIMS (Rapid Evaporative Ionisation Mass Spectrometry) основан на анализе аэрозоля, получаемого при электрокоагуляции тканей в ходе операции – данная методика адаптирована в проекте “Онконож-iKnife” (intelligent scalpel) [14, 15]. Метод был использован в ходе шести операций при хирургическом лечении рака молочной железы [16]. Существенным недостатком метода является низкое пространственное разрешение (4 мм), что затрудняет его использование в хирургии молочной железы и делает практически неприменимым для нейроонкологии, где низкая точность позиционирования скальпеля создает риски повреждения функционально значимых структур мозга. Методы электроспрейной ионизации с использованием зондов различной конструкции (Probe ESI, Touch Spray) использовали для дифференцирования патологической и немодифицированной тканей при раке предстательной железы, колоректальном раке, а также для скрининга циркулирующих раковых клеток в крови [17–20]. Масс-спектрометрию с десорбционно-электроспрейной ионизацией (DESI, Desorption Electrospray Ionization) применяли в исследованиях рака молочной железы, оценке хирургических границ при раке поджелудочной железы, диагностике рака простаты, дифференциации здоровой и пораженной карциномой ткани языка [9, 10, 17, 21, 22].

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ В НЕЙРООНКОЛОГИИ

Применение методов прямой масс-спектрометрии в нейрохирургии

В нейрохирургии масс-спектрометрический анализ позволяет проводить дифференциацию и идентификацию злокачественных тканей по их липидным профилям и присутствию специфических метаболитов [17, 20, 23–26]. Методы DESI-MS и DESI-MS-визуализацию (DESI-MS I) ранее применяли и интраоперационно [27, 28]. При исследовании опухолей головного мозга различия в липидных профилях наблюдались не только при разных типах опухолей, но и при разных степенях их злокачественности и концентрации опухолевых клеток в образце ткани.

В ряде исследований кавитационный ультразвуковой хирургический аспиратор Cavitron (CUSA) использовали с различными источниками мягкой ионизации (Десорбционная электрораспылительная ионизация (DESI) и ионизация акустическим распылением с использованием эффекта Вентури для самоподкачки раствора (V-EASI)), что позволило проводить масс-спектрометрический анализ удаляемой ткани в реальном времени [29, 30]. Показано, что сочетание ультразвука с непрерывным потоком растворителя дает возможность разделять опухолевые ткани по типам опухоли. Методы, использующие зонд, основаны на высокоскоростном тепловом или механическом распылении водных растворов (например, тканей или биологических жидкостей), приводящим к образованию заряженных капель, которые, испаряясь, создают ионы в газовой фазе [18, 20, 31].

Разновидность электрораспылительной ионизации – метод распыления с ткани (“spray-from-tissue”), также называемый “needle electrospray ionization” – ионизация с иглы (NESI) [23, 24, 32], был успешно применен для дифференцирования различных опухолей, иссеченных в ходе нейрохирургического вмешательства. Для этого были разработаны подходы к автоматизированному анализу масс-спектрометрических данных, выявлению закономерностей на основе интегральной картины молекулярных профилей и построению классификаторов на основе этих данных [33, 34]. Построенные классификаторы позволили различить несколько типов тканей, полученных в ходе нейрохирургических операций по удалению астроцитом: некротическая ткань с примесью других тканей (несколько типов), опухоль, граничащая с опухолью ткань мозга, гиперплазия мозговой ткани.

Развитие методов прямой масс-спектрометрии идет по пути ускорения и упрощения процесса получения масс-спектрометрических профилей тканей. Однако методы экспресс-анализа, включающие использование хроматографического

разделения, имеют ряд недостатков, вызывающих сложности в интерпретации спектров, а именно требуются дорогостоящие масс-анализаторы высокого разрешения. Между тем, для применения в условиях клиники наиболее коммерчески доступными являются масс-спектрометры низкого разрешения. В связи с этим был разработан подход, позволяющий использовать классификаторы, “обученные” в лабораторных условиях на спектрах высокого разрешения, для рутинного анализа спектров низкого разрешения [35].

Для оценки влияния экспрессии маркеров на состав ткани опухоли требуется получение достаточно подробной информации о молекулярном составе ткани. При использовании подходов молекулярного профилирования встает вопрос полноты детектирования компонент в профиле. Особенно заметной может оказаться потеря информации при использовании методов прямой масс-спектрометрии, поскольку они не всегда обеспечивают полноту экстракции молекул аналитов из ткани. Преодолеть эту проблему можно путем повышения стабильности процесса экстракции и ионизации, что позволяет получать статистически достоверный сигнал за минимальное время анализа. Однако оценка стабильности и репрезентативности масс-спектра является сложной задачей, так как и значение относительной интенсивности, и наличие большого числа характеристических пиков в профиле может меняться в процессе анализа одного образца методами прямой масс-спектрометрии. Так, было предложено использовать корреляционные матрицы для оценки стабильности и достоверности сигнала. Для построения такой матрицы могут быть использованы несколько степеней похожести масс-спектров, которые математически характеризуются метрикой похожести, основанной на величине косинуса угла между векторами, образованными после интерпретации каждого масс-спектра в виде N -мерного вектора [36].

Разработанный ранее метод прямой ионизации специально предназначен для анализа образцов тканей, полученных в ходе хирургических операций [32]. Метод не требует длительного и трудоемкого процесса пробоподготовки, а его главными достоинствами являются простота и оперативность, позволяющие получать масс-спектры образцов тканей в экспресс-режиме. Кроме того, он может быть легко модифицирован и адаптирован под различные типы масс-спектрометров. Для повышения стабильности и эффективности экстракции была проведена интеграция процесса экстракции непосредственно в линию, подающую растворитель в электроспрейный ионный источник. В этом случае метод позволил проанализировать более 100 образцов, предоставленных НМИЦН им. акад. Н.Н. Бурденко в течение трех месяцев. Все образцы получены в рамках плано-

вых операций по резекции патологической ткани головного мозга, их использование одобрено этическим комитетом НМИЦН им. акад. Н.Н. Бурденко и подтверждено информированным согласием пациентов. Предварительно гистологически охарактеризованный образец мозговой ткани омывался метанольным раствором, содержащим 10% деионизованной воды и 0.1% уксусной кислоты. Полученные экстракты анализировали с использованием масс-спектрометра высокого разрешения LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, USA) в режиме генерации как положительных, так и отрицательных ионов.

Параллельно с прямым масс-спектрометрическим профилированием для серии образцов тканей опухолей головного мозга проводили экстракцию липидов из ткани в аналогичном растворителе. Механически гомогенизированная мозговая ткань смешивалась с растворителем и подвергалась воздействию ультразвука для повышения полноты экстракции. Масс-спектрометрический анализ полученных экстрактов при помощи метода ESI-MS позволяет оценить эффективность экстракции образца в методе прямой ионизации. Для этого молекулярный профиль экстракта сравнивали с молекулярным профилем, полученным при помощи методов прямой ионизации ткани. Было обнаружено, что все основные пики присутствуют в спектрах, полученных как с применением методов прямой ионизации, так и при анализе экстрактов. Молекулярные профили полученных таким образом экстрактов показали высокую корреляцию (более 0.95 для метрики похожести, основанной на величине косинуса угла между компонентами которых являются интенсивности пиков в соответствующих спектрах векторами) с данными, полученными с использованием методов прямой масс-спектрометрии, что доказывает возможность эффективного получения молекулярных профилей без использования времязатратных процедур экстракции.

Полученные с помощью метода прямой ионизации профили анализировали при использовании алгоритмов машинного обучения, основанных на логистической регрессии и линейном дискриминантном анализе. Таким образом, были выделены основные классифицирующие признаки в молекулярных профилях, позволяющие с высокой точностью (более 0.99 при высоком разрешении и более 0.97 при низком разрешении) и специфичностью (более 0.93 при высоком разрешении и более 0.92 при низком разрешении) дифференцировать глиобластомы и астроцитомы от немодифицированной мозговой ткани (рис. 1). Валидацию основных компонент профиля проводили, применяя ВЭЖХ-МС/МС-анализ хлороформ-метанольных экстрактов отдельных образцов [37].

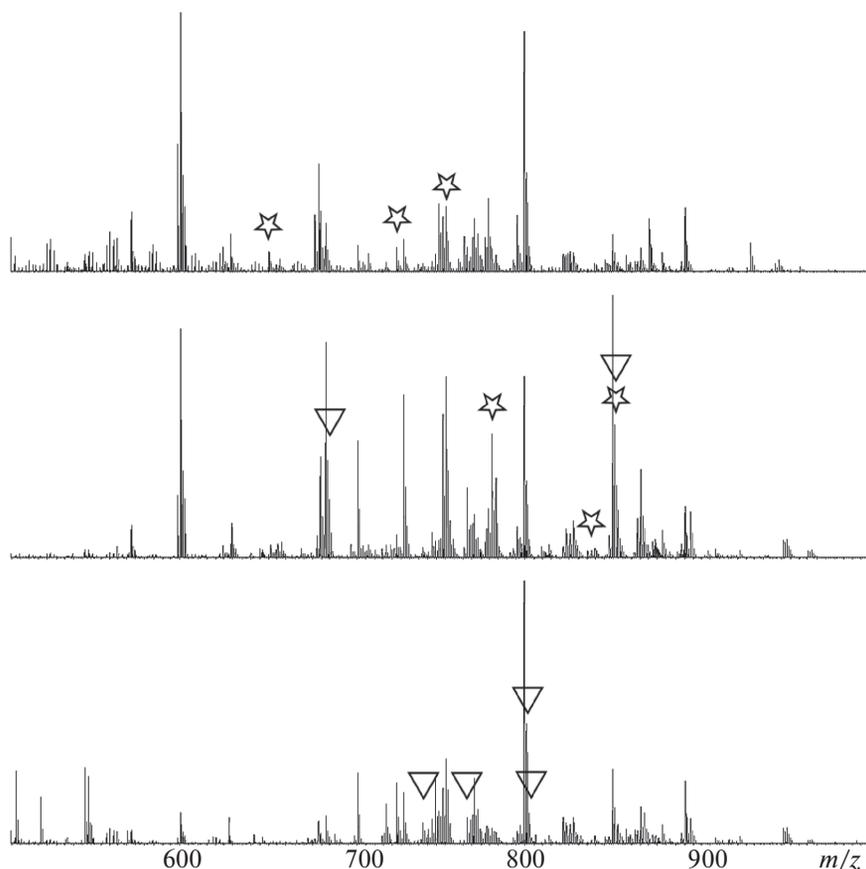


Рис. 1. Масс-спектры отрицательно заряженных ионов (сверху—вниз): глиобластомы, немодифицированной патологической ткани мозга и астроцитомы. Пики, классифицирующие глиобластому, отмечены звездой, астроцитому — треугольником.

Масс-спектрометрическая визуализация в нейрохирургии

Экстрактивные методы молекулярного профилирования всегда зависят от гетерогенности исследуемого образца. Любая экстракция производится из некоторого объема или с некоторого участка образца, что приводит к утрате информации о пространственной локализации отдельных молекул в образце. С диагностической точки зрения это не является проблемой, поскольку масс-спектр экстракта дает возможность не только дифференцировать различные виды патологий между собой, но и, при помощи построения регрессоров, определить относительное количество патологических (злокачественных) клеток в образце ткани. Однако для достоверного построения регрессоров необходимо получить как информацию о пространственном распределении злокачественных клеток в образце, так и молекулярные профили, соответствующие участкам с различным соотношением клеток разных типов.

Для получения информации о пространственной локализации соединений в образцах масс-спектро-

метрическими методами следует применять десорбционные методы ионизации. Они позволяют проводить ионизацию образца с участка малого размера — до 1 мкм^2 . Наиболее распространенными в мировой практике являются десорбционная электрораспылительная ионизация (DESI) и матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (MALDI), при помощи которых возможно измерение масс-спектрометрических профилей в режиме пространственного сканирования [10, 38, 39]. Информацию об интенсивностях отдельных ионов либо групп ионов можно впоследствии картировать на оптический снимок образца, получая при этом своеобразный аналог “молекулярного микроскопа”. Для обработки полученной информации об интенсивностях сразу множества ионов могут быть применены различные методы современного дискриминационного, кластеризационного и регрессионного анализа данных. Впоследствии на их основе возможно создать автоматизированную систему идентификации участков тканей, применимую в клинической практике. В частности, при помощи такого подхода удобно проводить идентификацию участков гетерогенности в образцах опу-

холей головного мозга. Использование масс-спектрометрической визуализации позволяет проводить идентификацию образцов диффузных глиом разной степени злокачественности и выявлять внутри этих образцов некротические зоны и зоны вставания опухолей [28].

Большой интерес с точки зрения клинического применения представляет собой анализ пространственной гетерогенности в стереотаксических биопсийных образцах анапластической астроцитомы. Эта опухоль часто содержит в своем составе большое количество участков некроза и участков пространственной гетерогенности в зоне роста и вставания опухоли в немодифицированную ткань головного мозга. Автоматизация и упрощение анализа таких опухолей при помощи масс-спектрометрической визуализации позволят значительно расширить возможности интраоперационной патоморфологической характеристики образцов.

Образцы стереотаксической биопсии анапластической астроцитомы также были предоставлены НМИЦН им. акад. Н.Н. Бурденко. Все образцы получены в рамках плановых операций по резекции патологической ткани головного мозга, их использование одобрено этическим комитетом НМИЦН им. акад. Н.Н. Бурденко и подтверждено информированным согласием пациентов. Образцы ткани были криосекционированы, и срезы толщиной 15 мкм помещались на стекла, покрытые прозрачным слоем оксидов индия и олова. После сублимационного нанесения матрицы (2,5-дигидроксibenзойной кислоты) срезы анализировали при помощи масс-спектрометра UltrafleXtreme (Bruker Daltonics, Германия), оснащенного Smartbeam-II Nd: YAG-лазером с длиной волны 355 нм и максимальной частотой импульсов – 1 кГц. Масс-спектры положительно заряженных ионов получены с пространственным разрешением 50 мкм. После проведения анализа матрицу смыли с образцов, и они были подвергнуты патоморфологическому исследованию при помощи окраски гематоксилин–эозином.

Выделение пространственных областей на изображениях проведено при помощи кластеризационного анализа методом *k*-средних в пространстве сниженной размерности, получающемся при применении метода t-SNE к полному набору масс-спектрометрических данных. Распределив таким образом каждый спектр на три основных класса, каждая точка на изображении была покрашена согласно тому, к какому кластеру принадлежит спектр в данной точке (рис. 2).

Для получения характерных масс-спектров каждого кластера можно просуммировать ряд спектров внутри кластера. Дальнейший анализ профилей разных кластеров позволит с большей точностью выделить липиды, являющиеся харак-

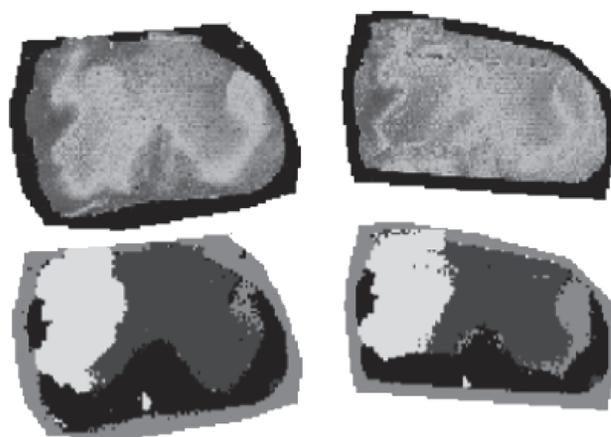


Рис. 2. Масс-спектрометрические изображения срезов образцов анапластической астроцитомы по массе пика с m/z , равным 796.5 Да (вверху), и соответствующие срезам результаты кластеризации. Согласно гистологическим данным, черный кластер соответствует зоне вставания, темно-серый – солидной зоне опухоли, белый – некротическому участку.

теристическими для каждого кластера. В будущем подобный анализ позволит с большой точностью автоматически дифференцировать различные типы тканей в образце, а также получать информацию о процентном содержании патологических клеток в различных участках ткани при помощи регрессионного анализа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение масс-спектрометрии в клинической практике позволяет создавать методы молекулярного анализа, помогающие врачу принимать важные решения при диагностике и лечении различных заболеваний. Применение прямого профилирования в нейрохирургии дает возможность, в сочетании с другими методами, обеспечивать полноту удаления опухоли, минимизируя объем иссекаемого материала. Комбинирование прямой масс-спектрометрии и визуализации способствует получению синергетического эффекта, автоматизируя и упрощая анализ, повышая степень его достоверности, что необходимо для создания востребованной в нейроонкологии навигационной системы, основанной на масс-спектрометрии. Несмотря на прогресс, демонстрируемый различными исследовательскими группами, успех применения масс-спектрометрии в нейрохирургии будет зависеть от дальнейшего развития физико-химических методов ионизации и детектирования биологических анализов.

Работы по развитию и оптимизации методов прямой масс-спектрометрии в нейрохирургии поддержаны грантом РФФИ 18-29-01065; работы по масс-спектрометрической визуализации –

грантом РФФИ 18-29-01026. В работе использовалось оборудование и ресурсы ЦКП ИБХФ РАН “Новые материалы и технологии”, ИНЭПХФ РАН, МФТИ и Сколтеха.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jannetto P.J., Fitzgerald R.L. // Clin. Chem. 2015. V. 62. № 1. P. 92.
2. Aksenov A.A., da Silva R., Knight R. et al. // Nat. Rev. Chem. 2017. V. 1. P. 0054.
3. Костюкевич Ю.И., Кононихин А.С., Попов И.А., Никололаев Е.Н. // Хим. физика. 2018. Т. 37. № 8. С. 8.
4. Тарасова И.А., Горшков М.В. // Хим. физика. 2004. Т. 23. № 7. С. 62.
5. Pekov S.I., Ivanov D.G., Bugrova A.E. et al. // J. Amer. Soc. Mass Spectrom. 2019. V. 30. № 7. P. 1325–1329.
6. Горшков М.В., Харыбин О.Н., Вилков А.Н. и др. // Хим. физика. 2002. Т. 21. № 4. С. 32.
7. Капустин В.И., Нагорнов К.О., Харыбин О.Н., Никололаев Е.Н. // Хим. физика. 2011. Т. 30. № 7. С. 81.
8. Jarmusch A.K., Pirro V., Baird Z. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2016. V. 113. № 6. P. 1486.
9. Porcari A.M., Zhang J., Garza K.Y. et al. // Anal. Chem. 2018. V. 90. № 19. P. 11324.
10. Eberlin L.S., Margulis K., Planell-Mendez I. et al. // PLOS Med. 2016. V. 13. № 8. P. 1.
11. Orringer D.A., Golby A., Jolesz F. // Expert Rev. Med. Devices. 2012. V. 9. № 5. P. 491.
12. Dammers R., Schouten J.W., Haitsma I.K. et al. // Acta Neurochir. (Wien). 2010. V. 152. № 11. P. 1915.
13. Ifa D.R., Eberlin L.S. // Clin. Chem. 2016. V. 62. № 1. P. 111.
14. Balog J., Sasi-Szabó L., Kinross J. et al. // Sci. Transl. Med. 2013. V. 5. № 194. P. 194ra93.
15. Alexander J., Gildea L., Balog J. et al. // Surg. Endosc. 2017. V. 31. № 3. P. 1361.
16. St John E.R., Balog J., McKenzie J.S. et al. // Breast Cancer Res. 2017. V. 19. № 1. P. 59.
17. Kerian K.S., Jarmusch A.K., Pirro V. et al. // Analyst. 2015. V. 140. № 4. P. 1090.
18. Mandal M.K., Saha S., Yoshimura K. et al. // Ibid. 2013. V. 138. № 6. P. 1682.
19. Sakamoto K., Fujita Y., Chikamatsu K. et al. // Transl. Cancer Res. 2018. V. 7. № 3. P. 758.
20. Pirro V., Llor R.S., Jarmusch A.K. et al. // Analyst. 2017. V. 142. № 21. P. 4058.
21. D’Hue C., M. Moore, Summerlin D.-J. et al. // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2018. V. 32. № 2. P. 133.
22. Banerjee S., Zare R.N., Tibshirani R.J. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2017. V. 114. № 13. P. 3334.
23. Adamyan L., Starodubtseva N., Borisova A. et al. // J. Minim. Invasive Gynecol. 2017. V. 25. P. 426.
24. Chagovets V., Wang Z., Kononikhin A. et al. // J. Amer. Soc. Mass Spectrom. 2017. V. 29. P. 6.
25. Eberlin L.S., Norton I., Orringer D. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. № 5. P. 1611.
26. Sorokin A., Shurkhay V., Pekov S. et al. // Curr. Top. Med. Chem. 2019. V. 19. № 17. P. 1521.
27. Eberlin L.S., Dill A.L., Golby A.J. et al. // Angew. Chemie. Int. Ed. 2010. V. 49. № 34. P. 5953.
28. Jarmusch A.K., Alfaro C.M., Pirro V. et al. // PLOS One. 2016. V. 11. № 9. P. e0163180.
29. Tata A., Zheng J., Ginsberg H.J. et al. // Anal. Chem. 2015. V. 87. № 15. P. 7683.
30. Schäfer K.C., Balog J., Szaniszló T. et al. // Ibid. 2011. V. 83. № 20. P. 7729.
31. Zhang J., Rector J., Lin J.Q. et al. // Sci. Transl. Med. 2017. V. 9. № 406.
32. Kononikhin A., Zhvansky E., Shurkhay V. et al. // Anal. Bioanal. Chem. 2015. V. 407. № 25. P. 7797.
33. Sorokin A., Zhvansky E., Shurkhay V. et al. // Eur. J. Mass Spectrom. 2017. V. 23. № 4. P. 1.
34. Zhvansky E.S., Sorokin A.A., Popov I.A. et al. // Ibid. P. 213.
35. Zhvansky E.S., Sorokin A.A., Pekov S.I. et al. // Clin. Mass Spectrom. 2019. V. 12. P. 37.
36. Zhvansky E.S., Pekov S.I., Sorokin A.A. et al. // Sci. Rep. 2019. V. 9. № 1. P. 1.
37. Danne-Rasche N., Coman C., Ahrends R. // Anal. Chem. 2018. V. 90. № 13. P. 8093.
38. Clark A.R., Calligaris D., Regan M.S. et al. // J. Neurooncol. 2018. V. 140. Issue 2. P. 269.
39. Rohner T.C., Staab D., Stoeckli M. // Mech. Ageing Dev. 2005. V. 126. № 1. P. 177.