

личении в 1000 раз. Статистическую обработку материала осуществляли при помощи статистического пакета Statistica 6.0.

Результаты проведенного исследования показали, что независимо от изученных клинико-морфологических факторов разброс средней ПВИ в пяти полях зрения составил от 1 до 87 клеток. Среднее значение ПВИ в опухоли составило $19,4 \pm 0,7$ клеток, медиана – 14 клеток.

В целом ПВИ в опухоли была невысокой и в процентном отношении преобладали новообразования с небольшой воспалительной инфильтрацией (количество клеток воспалительного инфильтрата от 1 до 41 отмечено в 92,9 % случаев).

ПВИ у мужчин составила $21,6 \pm 1$, клеток, у женщин – $17,0 \pm 1,0$ клеток ($p = 0,02$). При анализе ПВИ в опухоли в зависимости от возраста пациентов выявили, что у больных в возрасте от 30 до 39 лет ПВИ составила $19,2 \pm 3,3$ клеток; от 40 до 49 лет – $13,1 \pm 1,3$ клеток; от 50 до 59 лет – $20,1 \pm 1,2$ клеток; от 60 до 69 лет – $21,6 \pm 1,5$ клеток и от 70 до 79 лет – $17,2 \pm 1,8$ клеток ($p_{1-2} = 0,03$; $p_{2-3} = 0,002$; $p_{2-4} = 0,002$). Таким образом, ПВИ оказалась более высокой у мужчин и у больных в возрастной группе 50–59 лет.

При исследовании ПВИ в зависимости от клинической стадии показано: при стадии I она составила $18,0 \pm 1,0$ клеток, при стадии II – $19,5 \pm 1,6$ клеток, при стадии III – $23,9 \pm 2,0$ клеток и при стадии IV – $15,4 \pm 2,3$ клеток (данные достоверны для I и III стадий; $p = 0,002$ и III и IV стадий; $p = 0,04$).

В зависимости от степени анаплазии по Fuhrman отмечали возрастание ПВИ в новообразованиях степени злокачественности GIII – GIV ($25 \pm 1,6$ клеток) по сравнению со степенями GI – GII ($17,8 \pm 0,9$ клеток) ($p = 0,00004$).

При исследовании ПВИ в зависимости от гистологического варианта опухоли обнаружено, что наиболее высокие значения инфильтрата были при папиллярном раке ($24,15 \pm 3,4$ клеток), а наименьшие при нейроэндокринном раке ($1,3 \pm 0,3$ клеток) ($p = 0,000003$).

При изучении ПВИ в зависимости от размера опухолевого узла выявлена тенденция к увеличению ПВИ в более крупных опухолях. При размере опухоли $< 7,0$ см. ПВИ составила $18,6 \pm 0,95$ клеток, а при размере $\geq 7,0$ см она возрастала до $20,2 \pm 1,25$ клеток ($p = 0,3$).

У больных без наличия метастазов ПВИ составила $18,3 \pm 0,8$ клеток, а у больных ПКР с метастазами она достоверно увеличивалась до $24,7 \pm 2,1$ клеток ($p = 0,002$).

При оценке 5-летней выживаемости больных по Каплану–Мейеру было показано: когда ПВИ в опухоли была < 14 клеток, то к 1800-му дню после операции кумулятивная доля выживших составила 0,87, а когда ПВИ в опухоли была > 14 клеток, то кумулятивная доля выживших к 1800-му дню составила 0,74, но различия кривых выживаемости не были достоверны (log-rank; $p = 0,3$).

Заключение.

Таким образом, ПВИ в опухоли была взаимосвязана с рядом важных факторов прогноза, но нами не обнаружено влияния возрастания ПВИ в опухоли на послеоперационную выживаемость больных при ПКР.

Шайдулов А.А.

ПОСТРОЕНИЕ КЛАССИФИКАЦИОННОЙ МОДЕЛИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ НА ОСНОВЕ ТЕХНОЛОГИИ IMMUNOSIGNATURE

ФГБОУ ВПО «Алтайский государственный университет», г. Барнаул, Россия

Суть метода иммуносигнатур заключается в отслеживании иммунных реакций. Каждое заболевание вызывает ответ иммунной системы, по которому можно узнать, болен ли человек и чем именно.

Для получения иммуносигнатуры капля крови обследуемого, содержащая в себе клетки иммунной системы, наносится на биочип, разделенный на сектора, в каждом из которых находится уникальная аминокислотная последовательность. В зависимости от того, с какой интенсивностью в конкретных ячейках проявится иммунная реакция, формируется профиль (сигнатура) для конкретного человека.

Таким образом, иммуносигнатура показывает, какие последовательности аминокислот активируют иммунную систему пациента, к чему у него выработано больше антител, т. е. с чем организм борется в данный момент. Зная это, можно понять, чем человек болен.

В ходе экспериментов были получены результаты исследования двух групп людей: контрольной группы (25 человек) и группы с диагнозом C50 «Злокачественное новообразование молочной железы» (10 человек). Для получения наиболее достоверных данных для каждого пациента было проведено 3 исследования через различные промежутки времени.

По результатам исследований было выявлено, что светимости пептидов в трех измерениях, проводимых для одного пациента отличаются друг от друга. Причем значения светимостей могут отличаться в несколько раз. Проведенный корреляционный анализ показал, что коэффициент корреляции для трех экспериментов для каждого пациента имеет значение в диапазоне от 0,62 до 0,97.

На основании полученных данных было выдвинуто предположение, что на результат эксперимента оказывают влияние микрочастицы пыли, находящиеся в окружающем воздухе. Пылинки, попадая на сектора с аминокислотными последовательностями, вызывают сильное свечение соответствующих ячеек. Этот эффект может сильно влиять на конечный результат. Таким образом, на начальном этапе исследований, необходимо было выявить, как сильно внешнее воздействие пыли может влиять на конечный результат исследований.

Так как артефакт (например, пылинка) очень ярко светится и зачастую затрагивает только часть пептидного пикселя, то наличие артефактов можно определить, рассчитав логарифм отношения средней

к медианной светимости пептида. Ведь наличие яркого пятна сильно увеличивает среднюю светимость и мало увеличивает медианную светимость. При этом пептидный пиксель без артефакта обладает одинаковой средней и медианной светимостью. Соответственно логарифм отношения средней к медианной светимости равен нулю.

Экспериментально было получено, что при фильтрации пептидов с уровнем шума (логарифм отношения средней к медианной светимости) менее 0,01 коэффициенты корреляции приблизились к единице. Таким образом, путем избавления от 5% записей уровень информативности эксперимента был улучшен.

Используемый нами метод иммуносигнатур выдает светимость 10 000 пептидных последовательностей, на основе которых должно приниматься решение об отнесении пациента к той или иной группе. Соответственно анализ такого большого количества параметров затруднен. Следовательно, необходимо существенно сократить выборку входных параметров на несколько порядков без существенного уменьшения информативности.

Для достижения поставленной задачи был выбран метод доверительных интервалов. То есть, целью численного эксперимента стало выявление наиболее значимых пептидных последовательностей. Выявление таких последовательностей должно позволить осуществить классифицирование между разными группами пациентов.

Анализ данных показал, что разные эксперименты для одного и того же пациента показывают разную среднюю светимость пептидных последовательностей. В качестве маркеры были использованы пиксели ЕМРТУ. Данные пиксели не содержат пептидов и соответственно должны при сканировании выдавать минимальное значение светимости, близкое к нулю. Естественно, что при разных экспериментах ЕМРТУ должны обладать одинаковой светимостью. Также светимости пептидных последовательностей должны быть больше светимостей ЕМРТУ.

В соответствии с изложенными выше условиями исходные данные подверглись нормализации. В соответствии с разработанной формулой определялась разность между медианной светимостью пептида и медианной светимостью фонового свечения около пептидной последовательности. Затем определялось отношение полученной разности к средней светимости ЕМРТУ. На основании полученных нормализованных данных рассчитывались средние значения светимости пептидов и стандартное отклонение.

В результате проведенных исследований были выявлены пептиды, которые для всех пациентов в пределах одной группы имеют стабильное значение светимости с малым отклонением. Таким образом, для группы пациентов с диагнозом С50 «Злокачественное новообразование молочной железы» было выявлено 20 характерных пептидов, однозначно относящихся пациента к данной группе.

В дальнейшем построение классификационной модели на основе полученных характерных пептидов не представляет сложности.

Шановал А.И.^{1,2}, Подлесных С.В.¹, Колосова Е.А.¹, Требухов А.В.¹, Щербаков Д.Н.¹, Джонстон С.А.², Петрова В.Д.³, Шойхет Я.Н.⁴, Лазарев А.Ф.^{3,4}

АНАЛИЗ РЕПЕРТУАРА АНТИТЕЛ (ИММУНОСИГНАТУР) С ПОМОЩЬЮ ПЕПТИДНЫХ МИКРОЧИПОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

¹Российско-Американский противораковый центр; ФГБОУ ВПО «Алтайский государственный университет», г. Барнаул, Россия; ²Институт Биодизайна, Центр инноваций в медицине, университет штата Аризона, США; ³Алтайский филиал ФГБНУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина», г. Барнаул, Россия; ⁴ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Барнаул, Россия

Ранняя диагностика может значительно снизить заболеваемость и смертность от рака. К сожалению, современные методы диагностики, которые включают визуализацию опухоли и тестирование отдельных биомаркеров, не могут обеспечить определения заболевания на достаточно ранней стадии, когда существующие методы лечения наиболее эффективны. В настоящее время много ресурсов направляется на обнаружение новых биомаркеров и формирование на их основе панелей биомаркеров, которые могут обеспечить постановку диагноза на ранней стадии, выбор оптимального лечения и мониторинг рецидивов заболевания. Однако из-за гетерогенности опухолей трудно представить, что один или несколько специфических маркеров-молекул могут обеспечить надежную диагностику. Альтернативой общепринятой парадигмы определения биомаркеров является анализ изменения репертуара антител. Наличие антител в сыворотке онкологических больных, распознающих опухолеассоциированные антигены (tumor associated antigens – ТАА) было описано многими исследовательскими группами. Обнаружение специфических антител, продуцируемых в ответ на молекулярные изменения, сопровождающие развитие злокачественных новообразований, может обеспечить эффективный подход к их ранней диагностике. Технология, разработанная в институте Биодизайна университета штата Аризона, обеспечивает мультиплексный подход к тестированию разнообразия гуморального иммунного ответа (иммуносигнатур) за счет применения массива 10 тыс. пептидов со случайными аминокислотными последовательностями, расположенными на поверхности микрочипа. Для теста требуется меньше одного микролитра сыворотки. Использование микрочиповой технологии обеспечивает простой, воспроизводимый и информативный метод для анализа репертуара антител в клинических лабораториях, который может быть применен для диагностики онкологических заболе-