

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

НАПРАВЛЕННЫЙ КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ СКРИНИНГ МАРКЕРОВ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЁГКОГО МЕТОДОМ МОНИТОРИНГА ВЫБРАННЫХ РЕАКЦИЙ

*А.Т. Копылов¹, О.В. Тихонова¹, Т.Е. Фарафонова¹, С.Е. Новикова¹, Н.А. Шушкова¹,
В.Е. Шевченко², Пао-чи Ляо³, А.И. Арчаков¹, В.Г. Згода^{1*}*

¹НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,

119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр.8; эл. почта: victor.zgoda@gmail.com

²Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

³National Cheng-Kung University, 1 Dasyue Rd., East District, Tainan City, 701 Тайвань

Методом мониторинга выбранных реакций (МВР) проведён таргетный количественный анализ белков, для которых ранее сообщалось об их связи с развитием рака лёгкого (Новикова С.Е. и др. (2017) Биомедицинская химия, **63**, 181-210. [1]). Измерения проводили в пробах плазмы крови 25 образцов здоровых доноров и 34 пациентов с диагнозом немелкоклеточный рак лёгких (23 образца с диагнозом аденокарциномы лёгкого (LAC), 11 – плоскоклеточная карцинома лёгких (SqCC)). Анализ полученных значений концентрации белков показал, что из 52 зарегистрированных методом МВР в плазме крови белков статистически значимо различаются концентрации 8 белков: для 5-и наблюдается повышение уровня экспрессии (P00738, P26639, P21926, P08603, P51149) у больных, а для 3 белков снижение концентрации (P51884, O15162, Q8N2K0) по сравнению с контролем. Сравнение значений концентраций белков образцов плазмы LAC и SqCC не выявило достоверных различий в концентрации белков при этих заболеваниях. Обнаруженные потенциальные биомаркеры могут служить для разработки подходов ранней диагностики.

Ключевые слова: рак лёгкого; аденокарцинома лёгкого; масс-спектрометрия; мониторинг выбранных реакций

DOI: 10.18097/PBMC20186404368

ВВЕДЕНИЕ

Рак лёгкого является самым распространенным онкологическим заболеванием и занимает первое место по смертности в онкологии. Основной причиной высокой смертности является поздняя диагностика данного онкозаболевания. Бессимптомное течение или симптомы общего недомогания/простуды часто маскируют заболевание. Рутинные лабораторные и инструментальные подходы часто не эффективны для ранней диагностики. С другой стороны, при своевременном выявлении болезни и соответствующем лечении уровень выживаемости пациентов в течение 5-ти лет составляет более 70% [2].

Необходимым условием для ранней диагностики любого онкологического заболевания является профилактика наблюдения маркеров онкологических заболеваний. Биологические жидкости (кровь, плевральный выпот и т.д.), которые контактируют с опухолями, могут насыщаться белками, секретируемыми из раковых клеток. Такие белки поступают в систему кровообращения и их можно обнаружить в плазме/сыворотке крови. В современной клинической лабораторной практике основными диагностическими и прогностическими маркерами рака лёгкого являются раковоэмбриональный антиген (англ.: CEA), нейрон-специфическая енолаза (NSE) и фрагмент цитокератина 19 (CYFRA 21-1) [3]. Однако, данные белковые маркеры не обладают достаточной специфичностью и чувствительностью, которая позволила бы лечащему врачу определить текущее состояние пациента и назначить соответствующее лечение.

Основным современным подходом для регистрации биомаркеров является использование иммунологических методов для измерения биомаркеров, таких как ELISA. Хромато-масс-спектрометрия плазмы является одним из альтернативных и перспективных подходов для поиска и валидации биомаркеров в плазме крови. Методы направленной протеомики – мониторинг выбранных реакций (МВР), позволяют отслеживать изменение концентрации определённых исследователем белков через регистрацию масс-спектрометрического сигнала пептидов. Кроме возможности проведения высокоспецифичных и количественных измерений МВР-технология позволяет работать в мультиплексном режиме, обеспечивая определение содержания сразу нескольких десятков клинически значимых белков плазмы крови [4].

В настоящей работе разработан и применён количественный подход, в котором проводится направленный анализ репрезентативных (протеотипических) пептидов белков, ассоциированных с раком лёгкого, с помощью масс-спектрометрического метода МВР.

МЕТОДИКА

Описание образцов

Образцы цельной плазмы крови были получены от 34 пациентов с немелкоклеточным раком лёгких (24 мужчины и 10 женщин) в возрасте от 46 до 77 лет (средний возраст $61 \pm 8,02$ лет). У 13 пациентов заболевание было диагностировано на стадии I (включая 1, 1A, 1B), 7 пациентов имели заболевание

на стадии 2 (включая, 2, 2A, 2B), 10 пациентов находились на стадии 3 заболевания (включая 3, 3A, 3B), и 4 пациента были на стадии 4 заболевания. По международной классификации рака лёгких, основанной на системе TNM, 18 пациентов имели метастазы в регионарные лимфатические узлы (N1-N3), в то время как у 4 пациентов были обнаружены отдалённые метастазы (M1). Как показало гистологическое исследование образцов ткани лёгкого, у 23 пациентов диагностировали аденокарциному лёгких (LAC): среди них 15 мужчин и 8 женщин в возрасте от 46 до 77 лет (средний возраст составил $60 \pm 8,16$ лет). В то же время, для 11 пациентов была диагностирована плоскоклеточная карцинома лёгких (SqCC): среди них 9 мужчин и 2 женщины в возрасте от 46 до 73 лет (средний возраст $61,7 \pm 8,06$ лет).

В качестве контроля использовали образцы цельной плазмы крови от 15 здоровых добровольцев в возрасте от 24 до 47 лет (средний возраст 34 ± 8 лет).

От каждого здорового донора и пациентов с немелкоклеточным раком лёгких получено

информированное добровольное согласие на забор крови и проведение исследований. Образцы крови собирали в одноразовые пластиковые пробирки с антикоагулянтом K3-EDTA объёмом 10 мл с последующим центрифугированием на центрифуге Armed CH80-2S (Германия) при скорости 3000 об/мин [$g = ??$] в течение 10 мин для осаждения форменных элементов крови и получения плазмы. Полученную плазму разделили на аликвоты; до выполнения протеомного анализа пробы хранили при температуре -80°C . Данные по образцам суммированы в таблице 1.

Пробоподготовку, гидролиз белков плазмы крови трипсином проводили согласно методике [5].

Стандарты протеотипических пептидов получали твёрдофазным пептидным синтезом на приборе Overture ("Protein Technologies", Великобритания) согласно методике, опубликованной ранее [6]. При синтезе изотопно-меченых пептидов вместо обычного лизина или аргинина использовали изотопно-меченые аминокислоты (Fmoc-Lys-OH- $^{13}\text{C}_6$, ^{15}N или Fmoc-Arg-OH- $^{13}\text{C}_6$, ^{15}N).

Таблица 1. Клинические показатели пациентов, от которых получены образцы плазмы крови для протеомного анализа

Образец ID	Пол	Возраст	Стадия	Классификация TNM	Тип рака
1	F	73	1	T1N0M0	LAC
2	M	46	1	T1N0M0	LAC
3	M	66	1	T2N0M0	LAC
4	F	69	1	T1N0M0	LAC
5	M	64	1	T2N0M0	LAC
6	M	51	3	T3N2M0	LAC
7	M	49	4	T3NXM1	LAC
8	M	50	4	T2N2M1	LAC
9	M	62	1	T2N0M0	LAC
10	M	53	3	T3N2M0	LAC
11	F	59	2	T2N1M0	LAC
12	M	62	1	T2N0M0	LAC
1218	F	70	1B	T2N0M0	LAC
1238	F	63	3A	T2N2N0	LAC
1256	M	57	2A	T2N0M0	LAC
1266	M	57	4	T4N1M1	LAC
1278	M	77	1	T1N0M0	LAC
1334	F	61	3A	T2N2M0	LAC
1341	F	58	3A	T2N2M0	LAC
1352	M	60	3A	T2N2M0	LAC
1518	M	59	2B	T2N1M0	LAC
1519	M	58	2B	T2N0M0	LAC
1527	F	74	1A	T1N0M0	LAC
323	M	71	1	T1N0M0	SqCC
334	M	46	1	T1N0M0	SqCC
335	F	51	1	T1N0M0	SqCC
354	F	58	2	T1N1M0	SqCC
360	M	62	4	T3M3N1	SqCC
361	M	63	3B	T4N2MX	SqCC
366	M	64	3A	T2N1M0	SqCC
367	M	61	3A	T2M1N0	SqCC
368	M	69	3A	T3N2M0	SqCC
371	M	61	2	T1N1M0	SqCC
372	M	73	2	T1N1M0	SqCC

Количественный анализ протеотипических пептидов осуществляли на масс-спектрометрическом детекторе “Agilent G6495” QQQ (США) в режиме MBP. Хроматографическое разделение проводили при помощи ВЭЖХ “Agilent 1200 как описано ранее [7].

Обработку масс-спектрометрических данных проводили в программном обеспечении Skyline (64 bit) 4.1.0.18169, <https://skyline.ms>.

РЕЗУЛЬТАТЫ

MBP измерения белков в пулированной плазме здоровых добровольцев и больных раком лёгкого

В отличие от обзорных измерительных методов протеомики, таргетные масс-спектрометрические подходы ориентированы на регистрацию соединений (пептидов), заранее определенных исследователем. Для формирования списка белков-мишеней, которые ассоциированы с раком лёгкого, ранее нами был проведён анализ литературы [1]. В ходе этого предварительного этапа было отобрано более сотни белков, для которых ранее сообщалось об их связи с развитием рака лёгкого [8]. Для каждого из белков были выбраны протеотипические (однозначно характеризующие белок) пептиды и подобраны условия их регистрации в биологической пробе. Для проведения идентификации и количественных измерений выбранных белков были синтезированы пептиды, которые полностью соответствуют первичной структуре протеотипического пептида белка, но содержат в своём составе аминокислоту с включением стабильных изотопов (Lys или Arg $^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_4$). Данные синтетические пептиды, молекулярная масса которых больше природных на 8 Да или 10 Да и концентрация которых известна, использовали в качестве внутренних стандартов. Так, с использованием 109 синтетических пептидов с включением стабильных изотопов были проведены измерения соответствующих эндогенных пептидов в триптических гидролизатах плазмы крови с использованием MBP метода, разработанного по схеме, описанной ранее [8]. Аминокислотные последовательности пептидов, а также основные характеристики разработанных для них масс-спектрометрических методов представлены в таблице приложения (см. Приложение).

На первом этапе эксперименты по детекции и количественной оценке белков проводили на объединённых препаратах плазмы пациентов с аденокарциномой лёгкого и плазмы здоровых добровольцев. Полученные хромато-масс-спектрометрические данные анализировали с использованием качественных критериев, определённых для MBP метода: во-первых, совпадение хроматографических профилей эндогенного пептида и стандарта со стабильными изотопами; во-вторых, присутствие сигналов о всех трёх фрагментарных переходах и, в третьих, измеренные значения концентраций в ряду из трёх технических повторов не должны отклоняться более чем на 20% [9].

На примерах, приведённых ниже, показаны MBP профили пептидов, принятых или исключённых

из рассмотрения на основании описанных критериев. На рисунке 1А показаны MBP хроматограммы положительной идентификации белка Gelsolin (P06396), для которого все параметры экстрагированных хроматограмм природного и изотопномеченного аналога полностью совпадают. На рисунке 1Б показаны хроматограммы пептида белка Putative cTAGE (Q8IX95), который не прошёл все качественные критерии, необходимые для подтверждения идентичности: наблюдалось незначительное изменение во времени удержания нативного пептида по сравнению с синтетическим стандартом, при этом относительные интенсивности хроматограмм фрагментарных ионов совпадали. И, наконец, пример белка, не прошедшего качественного контроля, когда наблюдалось изменение относительных интенсивностей хроматограмм фрагментарных ионов при полном совпадении времён удерживания синтетического стандарта и пептида белка (Translation initiation factor (Q9N2K0)), полученного в ходе ферментативного гидролиза образца плазмы (рис. 1В).

В результате качественного контроля были отобраны положительные, отвечающие описанным выше критериям, сигналы для 50, 36, 34 белков в пулированных препаратах плазмы больных LAC, больных SqCC и здоровых добровольцев, соответственно. Как видно из представленной диаграммы (рис. 2), на уровне идентификаций 26 белков были общими для всех видов образцов. При этом 10 белков были уникальными в случае анализа образцов аденокарциномы лёгкого, 14 белков отличали контрольные образцы от проб плоскоклеточного рака. Суммарно, в результате анализа были получены сигналы для пептидов, представляющих 52 белка, которые использовались в дальнейших исследованиях по измерению концентрации в индивидуальных образцах.

MBP измерения зарегистрированных белков в каждом отдельном образце плазмы крови

Как отмечено выше, в ходе анализа белков плазмы пациентов с аденокарциномой лёгкого, плоскоклеточной карциномой лёгкого и здоровых добровольцев было зарегистрировано 50, 36, 34 белков, соответственно. При этом, всего было зарегистрировано 52 белка. Общими для трёх видов образцов были 26 белка. Методом MBP был проведён количественный анализ для всех 52 зарегистрированных в работе белков в 49 индивидуальных образцах плазмы. Количественная оценка содержания белков в вышеуказанных образцах представлена в таблице 2. Наибольшая концентрация среди измеренных белков наблюдалась для гаптоглобина – 27 мкМ, 52 мкМ, 15 мкМ в плазме пациентов с аденокарциномой лёгкого, плоскоклеточной карциномой лёгкого и здоровых добровольцев, соответственно. Белок экзосом GOSR2 (O14653) был обнаружен в контрольных образцах здоровых добровольцев в наименьшей концентрации мкМ – 7 нМ.

Полученные значения концентрации белков в индивидуальных пробах использовали для поиска

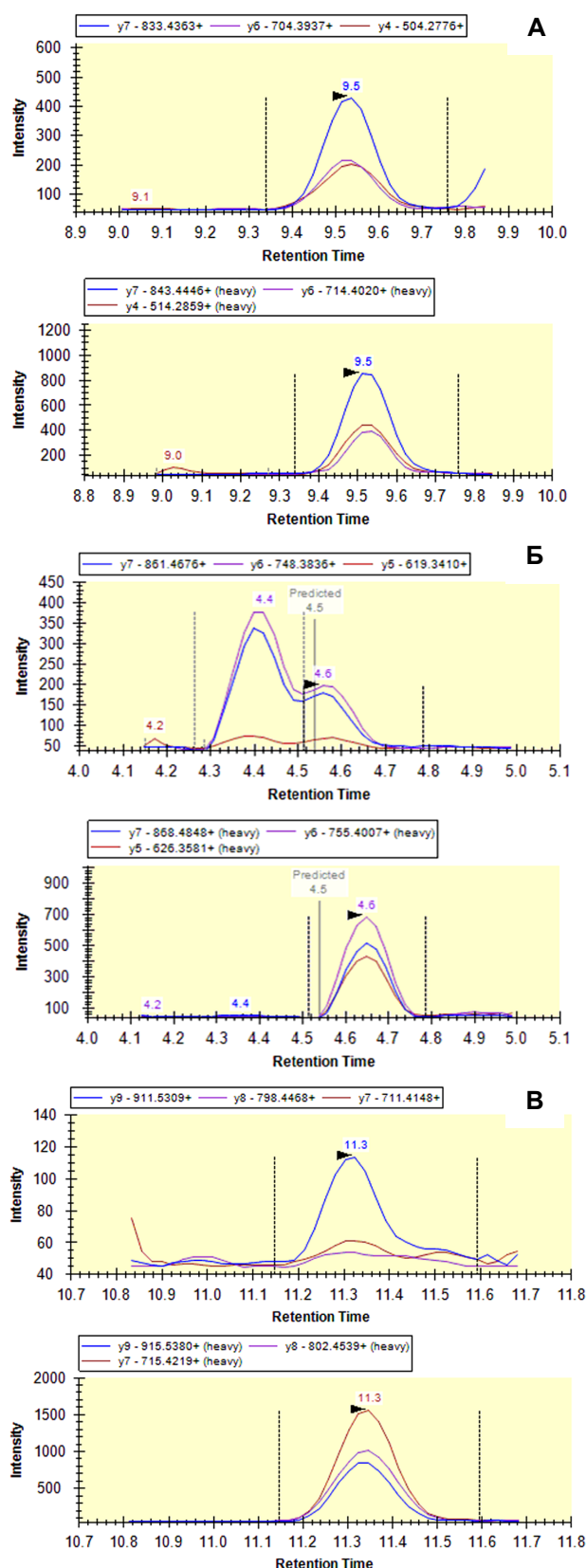


Рисунок 1. МВР профили пептидов, принятых (А) или исключенных для рассмотрения на основании критериев качественного контроля (Б, В) Верхние хроматограммы соответствуют сигналу природных пептидов, полученным в ходе ферментативного гидролиза, нижние хроматограммы получены от изотопномеченных синтетических стандартов, добавленных в образец.

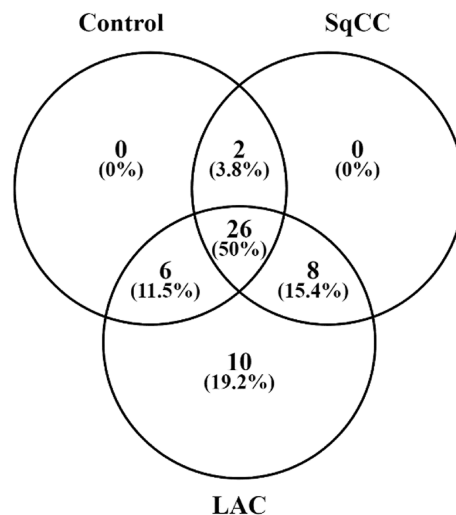


Рисунок 2. Диаграмма Венна, представляющая пересечение количества зарегистрированных белков между пулированными контрольными образцами и белков пулированных образцов плазмы больных аденокарциномы легкого (LAC) и плоскоклеточного рака (SqCC).

статистически значимых различий между образцами контрольной и LAC с использованием теста ANOVA (рис. 3). Как видно из представленных на рисунке 3 данных, при проведении иерархической кластеризации наблюдается четкое разделение образцов на группы больных LAC и контрольной группы, за исключением одного образца LAC (007MT3NXM1), попавшего в кластер здоровых добровольцев. В ходе статистического анализа показано, что из 52 измеренных белков, для этих групп образцов статистически значимо различаются значения концентраций 8 белков, причем для 5 белков (P00738, P26639, P21926, P08603, P51149) у больных LAC наблюдается повышенный уровень концентрации, а для 3 белков – снижение концентрации (P51884, O15162, Q8N2K0) (рис. 3).

Сравнение данных кластеризации образцов SqCC и контроля представлено на рисунке 4. При сравнении данных полученных при анализе образцов SqCC (рис. 4) также наблюдается четкое разделение образцов на отдельные кластеры, причем часть образцов в результате кластеризации расположилась левее от контроля (повышенная по сравнению с контролем концентрация белков) и часть образцов SqCC расположилась справа от контроля (пониженная по сравнению с контролем концентрация белков).

Таким образом, измеренные концентрации в контрольных образцах таких белков как: P26639, Q8WY22, P08962, P00738, P08603, P35247, P21926, P51149 является верхней и нижней: P08670, P16422, Q8N2K0, O15551, O15162, P31946, P62851, P09104, Q9HC84, Q9UBM7, O14653, O75368, Q92485, Q9UJS0 границей нормы, соответственно, отклонение от которой может свидетельствовать о развитии заболевания.

Сравнение значений концентраций белков образцов плазмы LAC и SqCC не выявило достоверных различий в концентрации белков при этих заболеваниях (данные не показаны).

СКРИНИНГ МАРКЕРОВ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЁГКОГО

Таблица 2. Средние значения содержания белков в плазме пациентов с диагнозом LAC, SqCC и здоровых добровольцев

№	Номер белка	Пептидная последовательность	LAC		SqCC		Контроль	
			среднее. мкМ	откл.	среднее. мкМ	откл.	среднее. мкМ	откл.
1	O00194	LLALGDSGVGK	0,82	0,77	0,49	0,22	0,23	0,10
2	O14594	TGFPSPAER	1,40	3,41	2,82	5,52	1,31	1,96
3	O14653	ILDIANMLGLSNTVMR	0,04	0,21	0,00	0,00	0,01	0,03
4	O15162	HWTGILR	0,05	0,17	0,03	0,09	1,69	1,03
5	O15162	EAFTDADNFGIQFPLDLVK	0,03	0,13	0,04	0,14	0,00	0,00
6	O15551	DFYNPVVPEAQK	0,00	0,00	0,02	0,06	0,01	0,04
7	O43490	TLLNETPEQIK	0,00	0,00	0,05	0,07	0,01	0,03
8	O75368	VYIASSSGSTAIK	0,18	0,36	0,04	0,12	0,00	0,00
9	O95171	YIQTVYSTSDR	0,17	0,25	0,25	0,35	0,00	0,00
10	P00738	VVLHPNYSQVD	3,42	0,53	3,22	0,37	3,35	0,26
11	P00738	VVLHPNYSQVDIGLIK	26,94	12,54	52,64	27,96	15,18	5,71
12	P06396	AGALNSNDAFVLK	12,09	4,04	10,58	1,46	11,25	4,66
13	P06733	YISPDQLADLYK	0,61	0,70	0,83	0,52	0,37	0,63
14	P08473	FIMDLVSSLSR	0,25	0,28	0,27	0,32	1,47	5,68
15	P08603	SSNLILIEEHLK	19,01	5,35	19,41	4,33	3,35	2,85
16	P08670	SLYASSPGGVYATR	0,24	0,16	0,23	0,21	0,72	0,41
17	P08727	AALEDTLAETEAR	0,04	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00
18	P08962	NNHTASILDR	3,90	1,71	4,59	1,48	1,85	0,79
19	P09104	LGAEVYHTLK	0,07	0,13	0,00	0,00	0,20	0,22
20	P09382	SFVLNLGK	0,34	0,39	0,38	0,21	0,19	0,10
21	P11142	DAGTIAGLNVLRL	1,51	1,47	2,24	3,44	0,43	0,21
22	P12830	NTGVISVVTGLDR	0,63	0,5	0,77	0,89	0,00	0,00
23	P15291	LLNVGFQEALK	0,01	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00
24	P16070	YGFIEGHVVIPR	0,37	0,11	0,37	0,06	0,45	0,39
25	P16422	APEFSMQGLK	0,02	0,08	0,03	0,11	0,00	0,00
26	P21926	DVLETFTVK	0,72	0,45	0,48	0,28	0,02	0,08
27	P26639	AELNPWPEYIYTR	0,17	0,10	0,15	0,06	0,00	0,00
28	P30101	YGVSGYPTLK	0,38	0,77	0,18	0,31	0,00	0,00
29	P31946	YLSEVASGDNK	0,39	0,65	0,13	0,29	0,37	0,66
30	P35247	SAAENAALQQLVAK	2,69	0,71	2,45	0,43	0,19	0,08
31	P46976	GALVLGSSLK	0,18	0,23	0,07	0,12	0,03	0,06
32	P51149	DPENFPFVVLGNK	5,24	2,93	5,28	2,06	0,67	0,50
33	P51884	FNALQYLR	6,35	2,21	6,46	1,33	14,62	12,61
34	P54289	FVVTDDGGITR	0,64	0,17	0,75	0,13	0,30	0,20
35	P60842	ATQALVLAPTR	0,08	0,31	0,00	0,00	0,00	0,00
36	P62851	AALQELLSK	0,01	0,03	0,00	0,00	0,00	0,01
37	P98088	SVVGDVLEFGNSWK	0,02	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00
38	Q14974	VLANPGNSQVAR	0,05	0,17	0,00	0,00	0,00	0,00
39	Q8N2K0	ETPPDALILESPFTNIR	0,04	0,11	0,00	0,00	2,34	1,41
40	Q8WX17	NIEDALNQLFR	0,02	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00
41	Q8WY22	VLESLDR	1,83	0,88	1,51	0,64	0,84	0,55
42	Q92485	LGEAAVLEIVER	0,02	0,07	0,00	0,00	0,05	0,21
43	Q9BUN8	YPMDLGGR	0,88	0,12	0,88	0,25	0,80	0,34
44	Q9BUN8	NFLSTPQFLYR	0,24	0,12	0,25	0,10	0,08	0,07
45	Q9HC84	AAYEDFNVQLR	0,01	0,03	0,01	0,02	0,00	0,00
46	Q9NRZ7	VSMEVAAAK	0,07	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00
47	Q9UBM7	GYFFPTSAR	0,01	0,03	0,00	0,00	0,01	0,03
48	Q9UJS0	STGSFVGELMYK	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
49	Q9UJS0	GEVTFEDVK	0,03	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00
50	Q9UJS0	YLNIFGESQPNPK	0,01	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00
51	Q9UNW1	LASLFPALFSR	2,13	0,76	1,86	0,43	2,09	0,64
52	Q9Y2S2	HVLQTFGPIEFGR	0,01	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00

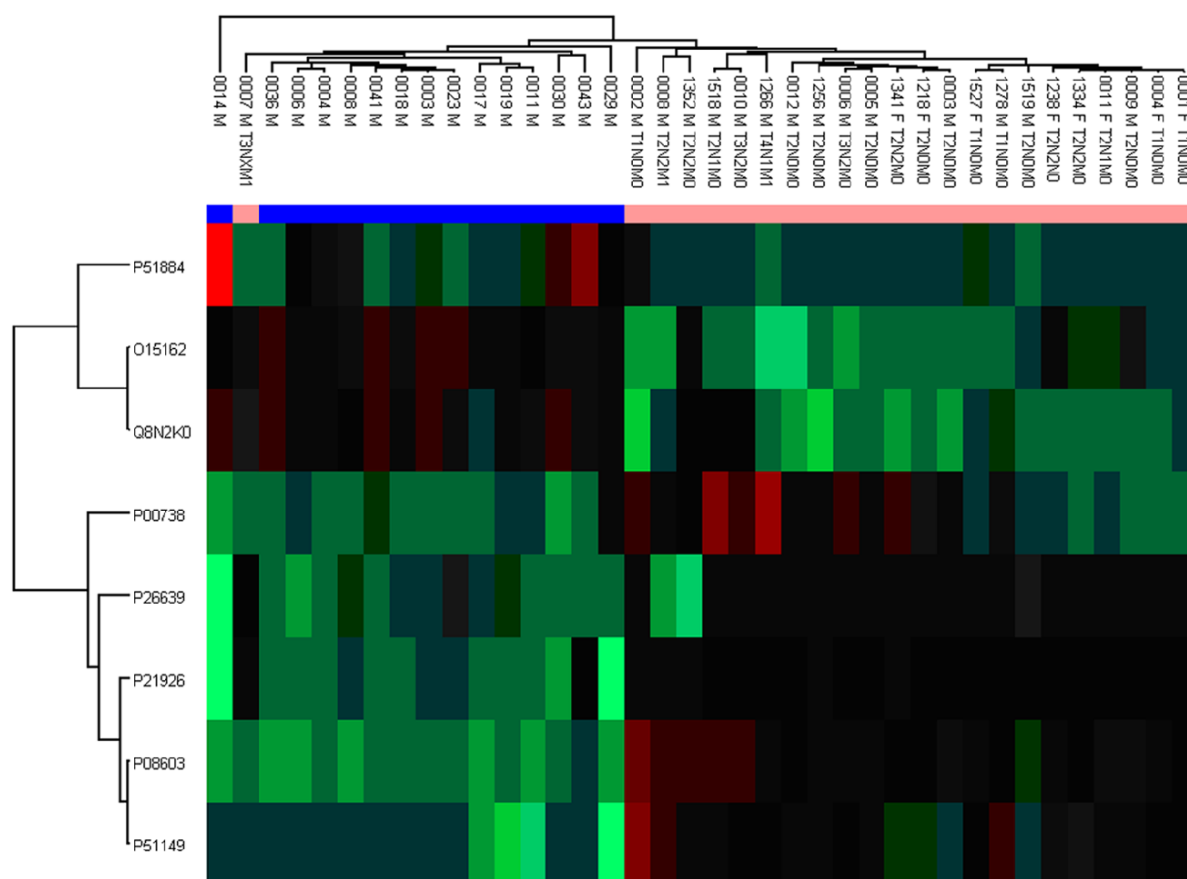


Рисунок 3. Иерархическая кластеризация образцов плазмы крови больных ЛАС и контроля по статистически значимыми различиями в концентрации белков. Значимые различия в уровне экспрессии белков вычисляли с использованием мультипараметрического теста ANOVA (ANOVA model, FDR=0,05, SO=0,1). Образцы плазмы пациентов с диагнозом аденокарцинома лёгкого и контроля расположены в столбцах, белки, концентрация которых значимо отличалась между группами - в строках. Красным обозначены белки с увеличенной экспрессией, зелёным - с уменьшенной.

ОБСУЖДЕНИЕ

Применение геномных и протеомных технологий позволяет проводить быстрый и полный анализ транскриптов и белков. Протеомные методы представляют собой совершенный инструмент для расширения знаний о биомаркерах ранней диагностики рака лёгкого, а также прогностических биомаркерах, и биомаркерах предсказания ответа на применяемую терапию. С использованием этих высокопроизводительных подходов удалось установить ряд белков, вовлечённых в развитие онкологических процессов [4]. Большая часть белков, зарегистрированных в плазме или сыворотке крови, относится к секретируемым белкам или входящим в состав экзосом. Так, обнаруженный нами в крови больных повышенный уровень CD9 (P21926) указывает на повышенное содержание экзосом, универсальным маркером которых он является [10]. По данным литературы, CD9 вовлечён в развитие патологических процессов при немелкоклеточном раке лёгких [11]. К числу экзосомных белков также относятся Ras-related protein (P51149) и Threonine-tRNA ligase (P26639), для которых отмечено увеличение и снижение содержания Phospholipid scramblase (O15162), Monoacylglycerol lipase (Q8N2K0) у больных по сравнению

с контролем, соответственно. Среди секретируемых, также как и в наших экспериментах, ранее было определено повышенное содержание Haptoglobin и Complement factor H (P08603) в образцах сыворотки пациентов с немелкоклеточным раком лёгких по сравнению со здоровыми индивидуумами [12], в то время как экспрессия Lumican (P51884) была снижена [13].

Таким образом, комбинация обнаруженных белков с изменённой экспрессией позволяет достаточно уверенно диагностировать онкологические заболевания лёгких. Дальнейшие исследования и валидация обнаруженных потенциальных биомаркеров могут быть полезными для разработки подходов ранней диагностики и более рациональных и эффективных стратегий лечения аденокарциномы лёгкого.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана грантом РФФ № 16-44-03007. Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП "Протеом человека" (ИБМХ), поддержанного Минобрнауки РФ (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0017).

Приложение доступно в электронной версии статьи на сайте журнала (pbmc.ibmc.msk.ru).

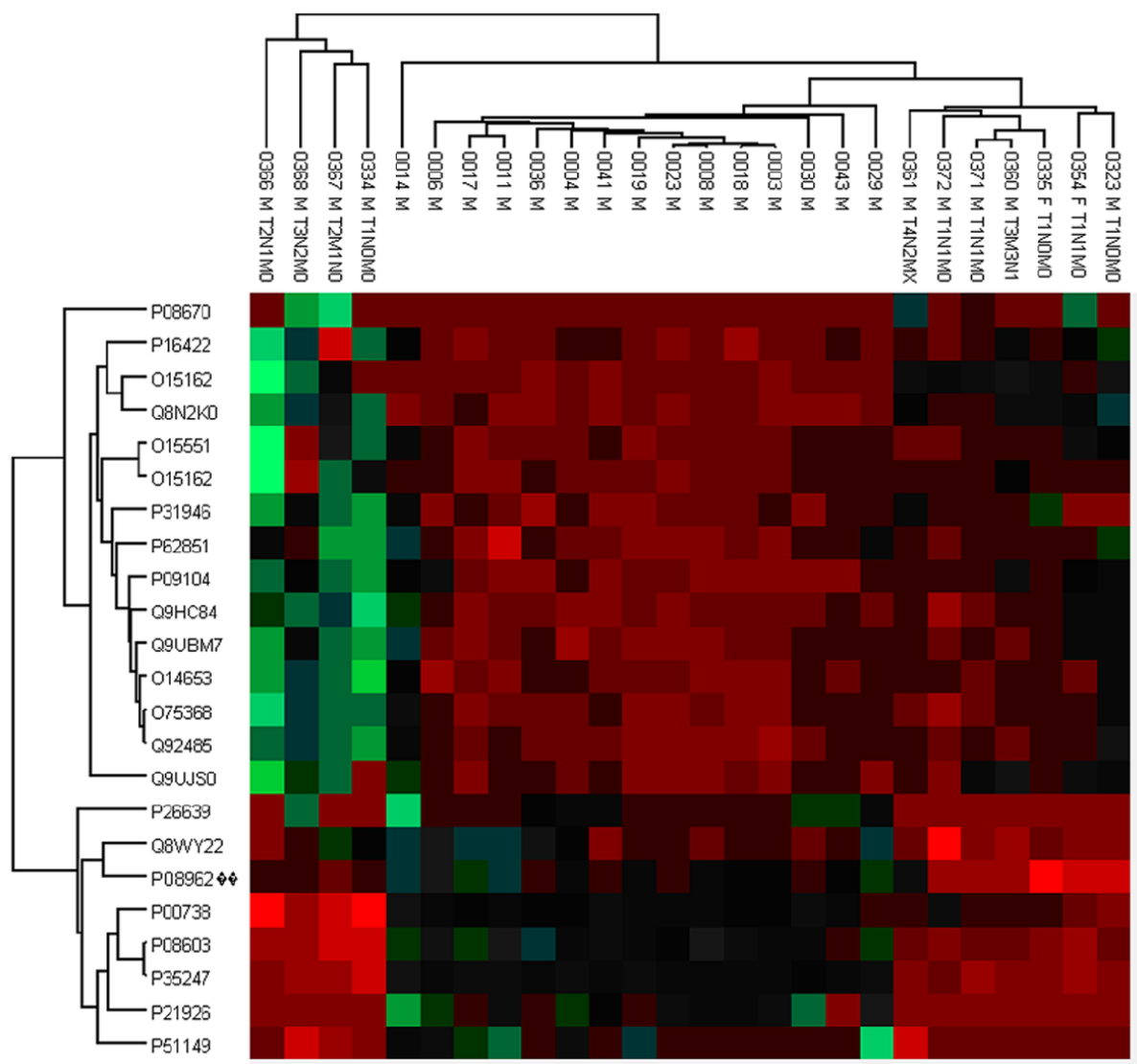


Рисунок 4. Иерархическая кластеризация образцов плазмы крови больных SqCC и контроля по статистически значимыми различиями в концентрации белков. Значимые различия в уровне экспрессии белков вычисляли с использованием мультипараметрического теста ANOVA (ANOVA model, FDR=0,05, S0=0,1). Образцы плазмы пациентов с диагнозом SqCC лёгкого и контроля расположены в столбцах, белки, концентрация которых значимо отличалась между группами - в строках. Красным обозначены белки с увеличенной экспрессией, зелёным - с уменьшенной.

ЛИТЕРАТУРА

1. Новикова С.Е., Курбатов Л.К., Завьялова М.Г., Згода В.Г., Арчаков А.И. (2017) Биомед. химия, **63**, 181-210. DOI: 10.18097/PBMC20176303181
2. Travis W.D., Brambilla E., Burke A.P., Marx A., Nicholson A.G. (2015) J. Thorac. Oncol., **10**(9), 1240-1242.
3. Molina R., Filella X., Augé J.M., Fuentes R., Bover I., Rifa J., Moreno V., Canals E., Viñolas N., Marquez A., Barreiro E., Borrás J., Viladiu P. (2003) Tumour Biol., **24**(4), 209-218.
4. Kopylov A.T., Ilgisonis E.V., Moysa A.A., Tikhonova O.V., Zavalova M.G., Novikova S.E., Lisitsa A.V., Ponomarenko E.A., Moshkovskii S.A., Markin A.A., Grigoriev A.I., Zgoda V.G., Archakov A.I. (2016) J. Proteome Res., **15**(11), 4039-4046.
5. Anselm V., Novikova S., Zgoda V. (2017) Int. J. Mol. Sci., **18**(8), 1763.
6. Hood C.A., Fuentes G., Patel H., Page K., Menakuru M., Park J.H. (2008) J. Pept. Sci., **14**(1), 97-101.
7. Ponomarenko E.A., Kopylov A.T., Lisitsa A.V., Radko S.P., Kiseleva Y.Y., Kurbatov L.K., Ptitsyn K.G., Tikhonova O.V., Moysa A.A., Novikova S.E., Poverennaya E.V., Ilgisonis E.V., Filimonov A.D., Bogolubova N.A., Averchuk V.V., Karalkin P.A., Vakhruшев I.V., Yarygin K.N., Moshkovskii S.A., Zgoda V.G., Sokolov A.S., Mazur A.M., Prokhortchouck E.B., Skryabin K.G., Ilina E.N., Kostjukova E.S., Alexeev D.G., Tyakht A.V., Gorbachev A.Y., Govorun V.M., Archakov A.I. (2014) J. Proteome Res., **13**(1), 183-190.
8. Kopylov A.T., Lisitsa A.V., Zgoda V.G. (2018) Biomed. Chem. Res. Methods, **1**(1), 1-9.
9. Carr S.A., Abbatiello S.E., Ackermann B.L., Borchers C., Domon B., Deutsch E.W., Grant R.P., Hoofnagle A.N., Huttenhain R., Koomen J.M. et al. (2014) Mol. Cell. Proteomics, **13**(3), 907-917.
10. Peng Q., Zhang J., Zhou G. (2018) Clin. Lab., **64**(6), 991-998.
11. Park J.O., Choi D.-Y., Choi D.-S., Kim H.J., Kang J.W., Jung J.H., Lee J.H., Kim J., Freeman M.R., Lee K.Y., Gho Y.S., Kim K.P. (2013) Proteomics, **13**(14), 2125-2134.

12. Pastor M.D., Nogal A., Molina-Pinelo S., Meléndez R., Salinas A., González De la Peña M., Martín-Juan J., Corral J., García-Carbonero R., Carnero A., Paz-Ares L. (2013) J. Proteomics, **89**, 227-237.

13. Zhou X., Xue L., Hao L., Liu S., Zhou F., Xiong H., Qi X., Lin D., Shao S. (2013) Biomed. Pharmacother., **67**(7), 621-627.

Поступила: 20. 12. 2017.
Принята к печати: 12. 07. 2018.

QUANTITATIVE TARGETED SCREENING OF PROTEINS ASSOCIATED WITH LUNG ADENOCARCINOMA CANCER BY THE METHOD OF SELECTED REACTION MONITORING

A.T. Kopylov¹, O.V. Tikhonova¹, T.E. Farafonova¹, S.E. Novikova¹, N.A. Shushkova¹, V.E. Shevchenko², Pao-Chi Liao³, A.I. Archakov¹, V.G. Zgoda¹

¹Institute of Biomedical Chemistry,

10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; e-mail: victor.zgoda@gmail.com

²Blokhin Russian Cancer Research Center, 24 Kashirskoe shosse, Moscow, 115478 Russia

³National Cheng-Kung University, 1 Dasyue Rd., East District, Tainan City, 701 Taiwan

In the present study, we applied selected reaction monitoring (SRM) to a group of proteins that were previously reported to be associated with lung cancer (Novikova S.E. et al. (2017) Biomeditsinskaya khimiya, **63**, 181-210. [1]). Measurements were performed on 59 plasma samples. These samples included: 23 samples of plasma of patients diagnosed with lung adenocarcinoma (LAC), 11 samples of plasma of patients diagnosed with squamous cell lung carcinoma (SqCC), 25 samples of donors with no previous history of oncological diseases, and one pooled sample from each of the above group. As a result of the SRM measurements 52 proteins were detected at least in one individual plasma sample. Statistical analysis showed that there were two groups confidently differentiated by the concentration value of 8 proteins wherein 5 proteins displayed increased level (P00738, P26639, P21926, P08603, P51149) in LAC group and 3 proteins (P51884, O15162, Q8N2K0) indicated diminishing the concentration level towards the control level. Data on protein concentrations obtained for LAC and SqCC did not distinguish the samples by statistical clustering analysis. These potential biomarkers can be used for further development of methods for early diagnostics of lung cancer.

Key words: lung cancer; lung adenocarcinoma; mass-spectrometry; selected reaction monitoring