

Идентификация протеомных маркеров метастазирования рака яичников

В.Е. Шевченко¹, Д.Е. Макаров¹, С.В. Ковалев¹, Н.Е. Арноцкая¹, Н.Р. Погосян², К.И. Жордания²

¹Лаборатория онкопротеомики,

²гинекологическое отделение ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Контакты: Валерий Евгеньевич Шевченко vshev@nm.ru

Проведено картирование протеома асцитной (АЖ) и плевральной (ПЖ) жидкостей больных раком яичников (РЯ). В результате в АЖ с высокой степенью достоверности были идентифицированы 240, а в ПЖ — 190 белков. Значительную часть составляли внеклеточные и мембранные белки, на долю которых приходилось 45 и 49 % для АЖ и ПЖ соответственно. Анализ протеомных карт АЖ и ПЖ показал, что 82 белка для этих биологических жидкостей являются общими, тогда как 81 — уникален для АЖ и 49 — для ПЖ. Представлен список из 46 потенциальных маркеров метастазирования РЯ и потенциальных маркеров тропного метастазирования РЯ по перитонеальной (17 белков) и плевральной (11 белков) поверхностям.

Ключевые слова: рак яичников, асцитная жидкость, плевральная жидкость, протеомика, масс-спектрометрия, маркеры метастазирования

Identification of proteomic markers for metastasis of ovarian cancer

V.E. Shevchenko¹, D.E. Makarov¹, S.V. Kovalev¹, N.E. Arnotskaya¹, N.R. Pogosyan², K.I. Zhordania²

¹Oncoproteomics Laboratory,

²Gynecology Department N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

The proteome of ascites and pleural fluids (AF and PF) was mapped in patients with ovarian cancer (OC). 240 and 190 proteins were identified with a high degree of assurance in AF and PF, respectively. The major portion was extracellular and membrane proteins, which accounted for 45 and 49 % in AF and PF, respectively. Analysis of the proteomic maps of AF and PF indicated that 82 proteins were common to these biological fluids whereas 81 and 49 proteins were unique to AF and PF, respectively. A list of 46 potential markers for OC metastasis and potential markers for tropic OC metastasis over the peritoneal (17 proteins) and pleural (11 proteins) surfaces is given.

Key words: ovarian cancer, ascites fluid, pleural fluid, proteomics, mass spectrometry, biomarkers of metastasis

Введение

Молекулярные механизмы органной тропности, одной из главных особенностей метастазирования, все еще остаются неясными. Известно, что различные типы рака дают метастазы в определенные органы в зависимости от восприимчивости ткани к определенным метастатическим клеткам. Метастазы в кости часто ассоциированы со злокачественными опухолями молочной, предстательной желез или раком легкого, в то время как у больных раком толстой кишки они обнаруживаются редко [1]. Это предпочтительное развитие макрометастазов в отдаленных органах может быть объяснено кровоснабжением органов, но только отчасти. Доказано, что молекулярные взаимодействия между метастатическими клетками и стромой играют важную роль при формировании метастазов в органах-мишенях [1].

В последнее время при изучении молекулярных механизмов метастазирования особое внимание уделяют опухолевым серозитам (асцит, плеврит, перикардит). Опухолевый метастатический асцит и плеврит являются частыми осложнениями при раке яичников (РЯ), который занимает лидирующее место среди онкогинекологических заболеваний во всем мире [2, 3]. Смерть от РЯ в основном связана с распространением

метастазов по перитонеальным и/или плевральным поверхностям [4–6].

Накопление выпотов — результат ряда процессов, включающих обструкцию лимфатических сосудов, активацию нативных мезотелиальных клеток (МК) метастатическим процессом и увеличение сосудистой проницаемости, контролируемой продукцией и секрецией таких факторов, как сосудистый эндотелиальный фактор роста и интерлейкины 6 и 8 [7–11].

Злокачественные эпителиальные клетки и активированные МК — первичные компоненты опухолевых выпотов. Активация МК приводит к тому, что они могут стать фенотипически и функционально подобными злокачественным клеткам [12]. Эти оба типа клеток могут продуцировать цитокины, факторы роста и компоненты, стимулирующие и усиливающие инвазию за счет разрушения локального микроокружения [13].

Эта богатая среда способствует распространению и метастазированию злокачественных клеток, несмотря на недостаток матричного субстрата, и помогает им преодолевать апоптоз, так как клетки теряют связь с субстратом. Считается, что в злокачественных клетках и МК активированы сигнальные пути, позволяющие клеткам выжить в гипоксической, но богатой медиаторами жидкой среде.

Таким образом, опухолевые серозиты — локальная микросреда, состоящая из секретируемых и слущенных белков опухолевых клеток яичников, — перспективный объект для идентификации потенциальных биомаркеров РЯ [14]. Поскольку асцитная (АЖ) и плевральная (ПЖ) жидкости включают большое количество клеток опухолевого происхождения в дополнение к другим растворимым факторам роста, связанным с инвазией и метастазированием [15, 16], они содержат секретом клеток РЯ и другие факторы микроокружения злокачественного новообразования. С помощью современных протеомных технологий, используемых для анализа асцита и плеврита, можно обнаружить важные различия в передаче сигналов, которые способствуют метастазированию РЯ в различные ткани и органы и поддерживают выживание клеток в выпотах. Это позволит предсказывать направления метастазирования РЯ, управлять этим трудноизлечимым и плохо прогнозируемым процессом, улучшить состояние больного и эффективность лечения.

Масс-спектрометрия (МС) широко используется для идентификации протеомных маркеров в биологических жидкостях, опухолевой ткани, лизатах и секретах линий опухолевых клеток [17–23]. Для обнаружения потенциальных маркеров РЯ L. Gortzak-Uzan et al. [16] недавно исследовали протеом асцита, в том числе клеточные и жидкие его фракции, а C.G. Gunawardana et al. [24] изучили кондиционированные среды 4 клеточных линий РЯ (HTB75, T OV-112D, TOV-21G и RMUG-S).

Материалы и методы

В нашем исследовании представлены данные по МС-картированию протеома АЖ и ПЖ больных РЯ. В результате были идентифицированы белки, часть из которых уже описывали ранее [15], в том числе белки, предложенные в качестве потенциальных серологических биомаркеров РЯ. После применения нескольких критериев отбора данных к нашему списку белков мы сформировали группу протеинов, которые являются перспективными кандидатами для будущих исследований биомаркеров РЯ и, в частности, биомаркеров, предсказывающих различные направления метастазирования РЯ.

Реактивы и растворители

При проведении всех процедур использовали дистиллированную воду, пропущенную через систему очистки и обессоливания Millipore Simplicity (Millipore Corporation, США), ацетонитрил (ACN) для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) isocratic grade (Prolabo, США), 98–100 % муравьиную кислоту (FA) (Merck, США), 99,7 % уксусную кислоту (Sigma-Aldrich, США), гидрокарбонат аммония NH_4HCO_3 ultra (Fluka, США), мочевины для молекуляр-

ной биологии (Fluka, США), 99,5 % 2,2,2-трифторэтанол — TFE (Sigma-Aldrich, США), дитиотреитол (ДТТ) для молекулярной биологии (Fluka, США), иодацетамид (Sigma-Aldrich, США), трипсин, метилированный по лизинам, для протеомики (Sigma-Aldrich, США).

Сбор и предварительная обработка образцов

Образцы АЖ и ПЖ получали от больных с III стадией серозного РЯ. Далее образцы аликвотировали по 1 мл и центрифугировали при 16 000 g в течение 30 мин при температуре 4 °C 3 раза для отделения жидкости от липидных и клеточных компонентов. Супернатант отбирали и хранили при температуре 80 °C.

Измерение концентрации белка

Измерение осуществляли на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Вилмингтон, DE, США) с помощью программы NanoDrop ND-1000 по методу Бредфорд, следуя инструкциям программы. Для калибровки использовали сывороточный человеческий альбумин. Суммарный белок в каждой пробе измеряли в 5 повторах.

Удаление высокопредставленных белков и разделение на фракции

Для удаления высокопредставленных белков (ВПБ) АЖ и ПЖ применяли аффинную хроматографию на спин-картридже MARS Hu-14 (Agilent, США). За счет взаимодействия антиген–антитело удаляли 14 ВПБ: альбумин, иммуноглобулины G, A и M, трансферрин, фибриноген, гаптоглобин, α 1-антитрипсин, α 2-гликопротеин, аполипопротеины A1 и A2, α 1-кислотный гликопротеин, компонент комплемента C3 и транстиретин. Брали по 10 мкл жидкости и пропускали ее через спин-картридж по методике производителя [25]. Процедуру повторяли 3 раза для каждого образца, фракции низкопредставленных белков (НПБ) каждой группы объединяли и упаривали до 1 мл. Добавляли по 0,48 г мочевины и 13 мкл ледяной уксусной кислоты для денатурации белков и разделяли на фракции с помощью ВЭЖХ на полупрепаративном хроматографе Agilent 1200 (Agilent, США) с макропористой обращеннофазовой колонкой mRP-C18 — 5 мкм, 4,6 мм × 50 мм (Agilent, США). Объем инжестируемой пробы составлял 900 мкл, скорость потока растворителя — 0,75 мл/мин, температура колонки — 80 °C, детекция по ультрафиолетовому поглощению осуществлялась при длине волны 280 нм. Условия хроматографирования: фаза А — 99,9 % вода/0,1 %FA; фаза В — 99,9 % CAN/0,1 %FA, скорость потока — 0,75 мл/мин. Градиент: 0–1 мин — 3 % В, 1–6 мин — 3–30 % В, 6–39 мин — 30–55 % В, 39–49 мин — 55–100 % В, 49–53 мин — 100 % В, 53–58 мин — от 100 до 3 % В. Время анализа — 80 мин. Собирали 24 фракции с 6-й по 54-ю минуту через равные промежутки времени. Полученные фракции упаривали

досуха при температуре 60 °С на центрифужном испарителе Eppendorf Concentrator 5301 (Eppendorf, Hauppauge, Нью-Йорк, США).

Трипсинолиз образцов

Трипсинолиз каждой фракции проводили по методике с TFE. К высушенным фракциям белков добавляли по 25 мкл TFE, по 25 мкл 100 мМ водного раствора NH_4HCO_3 и по 1 мкл свежеприготовленного 200 мМ водного раствора DTT. Реакционную смесь выдерживали 1 ч при температуре 60 °С, 40 мин при температуре 70 °С, охлаждали до 25 °С, добавляли по 4 мкл свежеприготовленного 200 мМ водного раствора иоацетамида и выдерживали 1 ч при температуре 25 °С. Далее смешивали с 1 мкл раствора DTT и выдерживали реакционную смесь еще 1 ч при температуре 25 °С, после чего добавляли по 100 мкл 100 мМ раствора NH_4HCO_3 , 300 мкл воды и 3 мкл раствора трипсина в 1 мМ соляной кислоте (концентрация трипсина — 100 нг/мкл) и выдерживали 18 ч при температуре 37 °С. По окончании реакции содержимое пробирок упаривали досуха при температуре 60 °С на центрифужном испарителе, растворяли продукты трипсинолиза каждой фракции в 25 мкл мобильной фазы А (98 % вода / 2 % ACN/0, 1 % FA), центрифугировали 15 мин при 13 400 об/мин, отбирали по 20 мкл супернатанта и переносили в чистые вials на 250 мкл (Agilent, США).

Хроматографическое разделение триптических пептидов

Хроматографическое разделение триптических пептидов осуществляли на нанопроточном хроматографе UltiMate 3000 (Dionex), оснащенном обращеннофазовой колонкой NAN75-15-03-C18 PerMap 100 (75 мкм × 15 см). Объем инжестируемой пробы составлял 2 мкл. Образцы загружали на предколонку мобильной фазой, состоящей из 99 % воды / 1 % ACN / 0,1 % FA, в течение 3 мин при скорости потока 20 мкл/мин. Затем образец элюировали с предколонки в градиенте при скорости потока 0,3 мкл/мин. Состав мобильных фаз: фаза А — 98 % воды, 2 % ACN, 0,1 % FA; фаза В — 20 % воды, 80 % ACN, 0,08 % FA. Градиент: с 0 по 120 мин от 0 до 50 % фазы В, со 120 по 150 мин от 50 до 100 % фазы В, 150–160 мин — 100 % В, 150–155 мин — от 100 до 0 % В, 155–180 мин — 0 % В. Общее время анализа — 180 мин.

МС-анализ

Анализ триптических пептидов каждой фракции проводили на нанопроточном хроматографе UltiMate 3000 (Dionex), соединенном с источником ионов NanoESI масс-спектрометра высокого разрешения LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific) [26]. Параметры источника ионов: температура капилляра — 200 °С, напряжение на капилляре — 42,9 В, напряжение на

Tube Lens — 165 В. Для внутренней калибровки шкалы масс ионов использовались пики полидиметилсилоксанов. Регистрация масс-спектров осуществлялась в режиме FTMS с разрешением 60 000, диапазон масс 300–2000 Да, 1 микроскан, Max Inject Time 100 мс, AGC Scan Target 2×10^5 . Для фрагментации MSMS брали 10 самых интенсивных ионов-предшественников, каждый ион фрагментировали 3 раза, после чего включали в список динамического исключения на 3 мин. Параметры MSMS: режим FTMS с разрешением 30 000, 1 микроскан, Max Inject Time — 100 мс, AGC Scan Target 1×10^5 , фрагментация путем активации, индуцированной соударениями (CID), нормализованная энергия столкновений — 35 %.

Обработка данных и идентификация белков

Полученные данные анализировали с помощью программы Thermo Proteome Discoverer 1.0 Build 43 (Thermo Scientific). Критерии отбора масс-спектров для поиска: время выхода — с 0 до 180 мин, m/z иона-предшественника — от 300 до 5000 Да, минимальное соотношение сигнал / шум для пика — 3, минимальная интенсивность — 0, минимальное количество спектров — 1; пики с одинаковым m/z в пределах 20 ppm по массе и с разницей времени выхода до 5 мин группировались в 1 спектр. Для идентификации белков применяли поисковую программу Mascot Server 2.2.06 (Matrix Science) с базой NCBI nr release 20100121. Параметры поиска: вид — Homo Sapiens, энзим — трипсин, missed cleavages — 2, фиксированная модификация — карбамидометилирование, переменные модификации — ацетилирование N-конца белка, деаминация глутамина и аспарагина, пироглутаминовая кислота и пироглутамин. Точность масс MS — 10 ppm, точность масс MS/MS — 0,05 Да. Критерием идентификации белка считали Mascot Score > 24.

Сравнение уровней белков

Количественное сравнение уровней белков выполняли с использованием метода label-free. С помощью программы Qual Browser 2.0.7 SP1 (Thermo Scientific) вычисляли отношение площадей пиков ионов пептидов на хроматограммах. Для белков, идентифицированных более чем по 3 пептидам, сравнивали интенсивности 3 пептидов с максимальным скором, после чего результаты усредняли. Для белков, идентифицированных по 3 пептидам и менее, рассчитывали отношение площадей для всех пептидов.

Результаты и обсуждение

Сложные биологические жидкости, такие как АЖ и ПЖ, содержат тысячи белков, уровни которых могут отличаться на 9 порядков величины. После удаления 14 ВПБ, дополнительного фракционирования на mRP C18, трипсинолиза высушенные 24 фракции растворяли

в мобильной фазе А и инжестировали в хроматограф, соединенный с масс-спектрометром (ESI-MS/MS). В результате были получены файлы тысяч масс-спектров, которые содержали сигналы от пептидов, представляющих сотни белков АЖ и ПЖ.

Картирование протеома АЖ и ПЖ

АЖ. В результате картирования протеома АЖ программный пакет Mascot идентифицировал 762 белка. После их просмотра были отобраны и идентифицированы с высокой достоверностью 240 белков с молекулярной массой от 4604 до 2 359 682 Да, из них:

- 1) белков с массой < 30 кДа — 59;
- 2) от 30 до 100 кДа — 119;
- 3) от 100 до 300 кДа — 45;
- 4) от 300 до 500 кДа — 9;
- 5) > 500 кДа — 8.

Часть идентифицированных белков совпала с протеинами, обнаруженными ранее в сыворотке крови и АЖ [27].

ПЖ. Для ПЖ пакетом Mascot секвенировано 506 белков, из них ручным методом были отобраны и идентифицированы с высокой достоверностью 190

белков с молекулярной массой от 10 230 до 775 749 Да, среди которых:

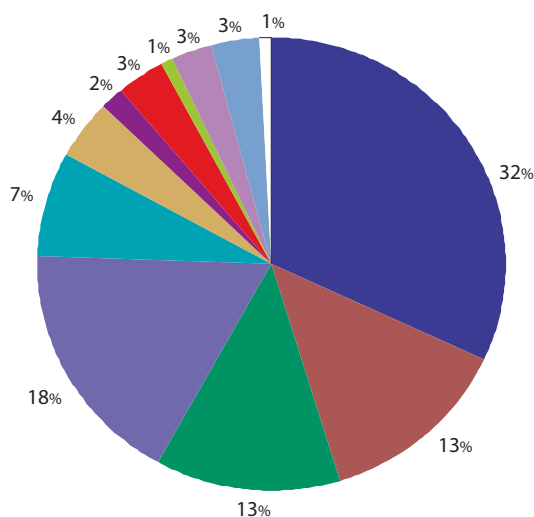
- 1) белков с массой < 30 кДа — 46;
- 2) от 30 до 100 кДа — 93;
- 3) от 100 до 300 кДа — 34;
- 4) от 300 до 500 кДа — 10;
- 5) > 500 кДа — 7.

Клеточная локализация идентифицированных протеинов

Каждый идентифицированный протеин классифицировали в соответствии с его клеточной локализацией на основании информации, доступной в базах данных Swiss-Prot, Gene Ontology и др. Случаи, когда один белок находился в более чем одном клеточном компартменте, также учитывались.

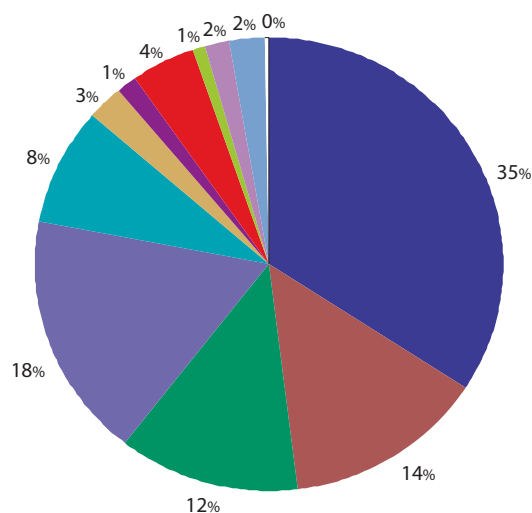
АЖ. На рис. 1 показано распределение 240 протеинов АЖ с известной локализацией. Большинство классифицируемых белков были внеклеточными (32 %), остальные — цитоплазматическими (18 %), связанными с цитоплазматической мембраной (13 %) и ядерными (13 %).

ПЖ. На рис. 2 продемонстрировано распределение 190 протеинов ПЖ с известной локализацией.



- внеклеточная — 32 %
- цитоплазматическая мембрана — 13 %
- ядро — 13 %
- цитоплазма — 18 %
- цитоскелет — 7 %
- эндоплазматический ретикулум — 4 %
- эндосомы — 2 %
- аппарат Гольджи — 3 %
- лизосомы — 1 %
- митохондрии — 3 %
- другая — 3 %
- неклассифицирована — 1 %

Рис. 1. Клеточная локализация 240 белков АЖ



- внеклеточная — 35 %
- цитоплазматическая мембрана — 14 %
- ядро — 12 %
- цитоплазма — 18 %
- цитоскелет — 8 %
- эндоплазматический ретикулум — 3 %
- эндосомы — 1 %
- аппарат Гольджи — 4 %
- лизосомы — 1 %
- митохондрии — 2 %
- другая — 2 %
- неклассифицирована — 0 %

Рис. 2. Клеточная локализация 190 белков ПЖ

Таблица 1. Потенциальные маркеры метастазирования РЯ по перитонеальной и плевральной полостям

№	Название белка	Клеточная локализация	№	Название белка	Клеточная локализация
1	Beta-2 microglobulin	Внеклеточная, эндосомы, цитоплазматическая мембрана, аппарат Гольджи	24	Apolipoprotein A-I preproprotein	Эндоплазматический ретикулум, цитоплазма, внеклеточная, цитоплазматическая мембрана
2	Serum amyloid A4, constitutive precursor	Внеклеточная	25	Apolipoprotein D	Внеклеточная
3	Prepro-alpha-1 collagen	Внеклеточная, цитоплазма, цитоплазматическая мембрана	26	Insulin-like growth factor binding protein 3	Внеклеточная, ядро
4	Protein, alpha 1	Внеклеточная	27	Zn-alpha-2-glycoprotein	Цитоплазматическая мембрана, внеклеточная
5	Complement component 8, gamma polypeptide	Внеклеточная	28	Complement factor H-related protein 1 precursor	Внеклеточная
6	Retinol binding protein 4	Внеклеточная	29	Alpha-1-microglobulin preproprotein	Внеклеточная
7	Tissue inhibitor of metalloproteinases 1	Внеклеточная, другая	30	Alpha-2-HS-glycoprotein	Внеклеточная
8	Orosomucoid 2 precursor	Внеклеточная	31	Monocyte differentiation antigen CD14 precursor	Цитоплазматическая мембрана, внеклеточная
9	Pre-serum amyloid P component	Внеклеточная	32	Sex hormone-binding globulin	Внеклеточная
10	Insulin-like growth factor binding protein 6	Внеклеточная	33	Kininogen 1 isoform 2	Цитоплазматическая мембрана, внеклеточная
11	Vitronectin	Внеклеточная	34	Clusterin precursor	Внеклеточная, цитоплазма, митохондрии
12	Lumican	Внеклеточная	35	Fibrinogen gamma chain	Цитоплазматическая мембрана, внеклеточная
13	Complement component 9 precursor	Цитоплазматическая мембрана, внеклеточная	36	Properdin	Внеклеточная
14	Complement factor I	Цитоплазматическая мембрана, внеклеточная	37	Angiotensinogen	Внеклеточная
15	Afamin precursor	Внеклеточная	38	Alpha-2-antiplasmin precursor	Внеклеточная
16	Fibulin-1 isoform D precursor	Внеклеточная	39	S100 calcium-binding protein A6	Цитоплазма, ядро, цитоплазматическая мембрана
17	Plasminogen	Цитоплазматическая мембрана, внеклеточная	40	S100 calcium-binding protein A8	Цитоскелет, цитоплазма, внеклеточная, цитоплазматическая мембрана
18	Complement component 7	Внеклеточная	41	S100 calcium-binding protein A7	Внеклеточная, эндоплазматический ретикулум, цитоплазма, ядро
19	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	Внеклеточная	42	Dermcidin preproprotein	Внеклеточная
20	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	Внеклеточная	43	S100 calcium-binding protein A9	Цитоскелет, цитоплазма, ядро, внеклеточная, цитоплазматическая мембрана
21	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	Внеклеточная	44	Cystatin C	Внеклеточная, цитоплазма
22	Complement component 6	Внеклеточная	45	Glutathione peroxidase 3	Внеклеточная
23	Complement component 5	Внеклеточная	46	Extracellular-superoxide dismutase [Cu-Zn]	Внеклеточная, цитоплазма, митохондрии, ядро

Таблица 2. Потенциальные маркеры метастазирования РЯ по перитонеальной полости

№	Название белка	Клеточная локализация
1	Apolipoprotein A-II	Эндоплазматический ретикулум, внеклеточная
2	Tetranectin precursor	Внеклеточная
3	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1 precursor	Цитоплазматическая мембрана, внеклеточная
4	Haptoglobin-related protein	Внеклеточная
5	Antithrombin III	Внеклеточная
6	Extracellular matrix protein 1	Внеклеточная
7	Insulin-like growth factor binding protein complex acid labile subunit isoform 2 precursor	Внеклеточная, цитоплазма
8	Fibronectin 1	Аппарат Гольджи, внеклеточная
9	Thymosin beta 4, X chromosome	Внеклеточная, цитоскелет, цитоплазма, ядро
10	Tumor susceptibility gene 101 protein (fragment)	Цитоплазма, эндосомы, цитоплазматическая мембрана, ядро
11	Serum amyloid A precursor	Внеклеточная
12	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	Внеклеточная, цитоплазма
13	Kallikrein-6 preprotein	Цитоплазма, эндоплазматический ретикулум, внеклеточная, митохондрии, ядро
14	Insulin-like growth factor binding protein 2 precursor	Цитоплазматическая мембрана, внеклеточная, цитоплазма
15	Angiopoietin-related protein 4	Внеклеточная
16	Coiled-coil domain containing 88A isoform 2 (Girdin)	Цитоплазма, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, цитоплазматическая мембрана
17	Mucin-16 (CA125)	Цитоплазматическая мембрана, внеклеточная

Таблица 3. Потенциальные маркеры метастазирования РЯ по плевральной полости

№	Название белка	Клеточная локализация
1	Insulin-like growth factor II	Внеклеточная
2	Serum amyloid A	Внеклеточная
3	Ribonuclease pancreatic	Внеклеточная
4	Tetranectin	Внеклеточная
5	C-reactive protein	Внеклеточная
6	Intercellular adhesion molecule 2 precursor variant	Внеклеточная
7	Collagen alpha-1(XI) chain	Внеклеточная
8	Insulin-like growth factor-binding protein 4	Внеклеточная
9	Insulin-like growth factor binding protein 2	Цитоплазматическая мембрана, внеклеточная, цитоплазма
10	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1	Цитоплазматическая мембрана, внеклеточная
11	Extracellular matrix protein 1	Внеклеточная

Основная часть классифицируемых белков относились к внеклеточным (35 %), также были выделены цитоплазматические (18 %), мембранные (14 %) и ядерные (12 %) белки.

Таким образом, клеточное распределение белков в секретах РЯ при метастазировании по перитонеальной и плевральной поверхностям было практически идентичным. Значительную часть в них составляли внеклеточные и мембранные белки, на долю которых приходилось 45 и 49 % для АЖ и ПЖ соответственно. Присутствие внутриклеточных белков вероятнее всего обусловлено лизисом клеток, входящих в состав асцита и плеврита. Наши данные указывают на то, что многие из идентифицированных белков секретируются опухолевыми клетками или их микроокружением.

Присутствие в плазме крови белков, идентифицированных в АЖ и ПЖ

Из 240 белков, идентифицированных в АЖ, 223, а из 190, идентифицированных в ПЖ, 176 — были обнаружены в идентифицированном нами протеоме плазмы крови больных РЯ и в Plasma Proteome Database. Это не означает, что оставшиеся 17 белков относятся исключительно к АЖ, а 14 — к ПЖ, так как протеом плазмы крови человека еще не полностью картирован.

Идентификация потенциальных маркеров метастазирования РЯ

Для идентификации потенциальных биомаркеров метастазирования РЯ из списка были удалены белки, которые не являются внеклеточными или мембранными.

Из 240 белков АЖ мы исключили 77, получив в результате сокращенный список, состоящий из 163 внеклеточных и мембранных белков. После удаления 59 из 190 белков ПЖ остался 131 белок, представляющий интерес. Таким образом, основное внимание уделяли белкам, которые с большой вероятностью могли появиться в циркуляции и, следовательно, могли быть обнаружены неинвазивными серологическими тестами.

Идентификация потенциальных маркеров тропного метастазирования РЯ

Анализ протеомных карт АЖ и ПЖ показал, что 82 белка являются общими для этих биологических жидкостей, тогда как 81 — уникален для АЖ и 49 — для ПЖ. В табл. 1 представлен список из 46 потенциальных маркеров метастазирования РЯ, полученный на основании анализа данных литературы по участию в процессах метастазирования белков, общих для АЖ и ПЖ. Подобный анализ проводился и для уникальных белков, обнаруженных только в АЖ или ПЖ. Как видно из табл. 2, в АЖ представлено 17, а в ПЖ — 11 белков (табл. 3), для большинства из которых впервые доказано участие в молекулярных механизмах метастазирования РЯ.

Выводы

Проведенное исследование продемонстрировало, что современные протеомные технологии могут с успехом использоваться при изучении молекулярных механизмов, лежащих в основе развития и распространения опухолевого процесса при РЯ, что приведет к улучшению диагностики и терапевтических подходов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lu X., Kang Y. Discovery of bone metastasis genes by functional genomics. *PharmDD* 2005;5:32–5.
2. Jemal A., Murray T., Ward E. et al. Cancer statistics 2005. *CA Cancer J Clin* 2005;55:10–30.
3. Шевченко В.Е., Арноцкая Н.Е., Макаров Д.Е. и др. Протеомика в диагностике рака яичников. *ОЖР* 2011;2:56–64.
4. Curtin J.P., Malik R., Venkatraman E.S. et al. Stage IV ovarian cancer: impact of surgical debulking. *Gynecol Oncol* 1997;64:9–12.
5. Bonnefoi H., A'Hern R.P., Fisher C. et al. Natural history of stage IV epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 1999;17:767–75.
6. Griffiths C.T., Parker L.M., Fuller A. Jr. Role of cytoreductive surgical treatment in the management of advanced ovarian cancer. *Cancer Treat Rep* 1979;63:235–40.
7. Zebrowski B.K., Yano S., Liu W. et al. Vascular endothelial growth factor levels and induction of permeability in malignant pleural effusions. *Clin Cancer Res* 1999;5:3364–8.

8. Feldman G.B., Knapp R.C., Order S.E. et al. The role of lymphatic obstruction in the formation of ascites in a murine ovarian carcinoma. *Cancer Res* 1972;32:1663–6.
9. Abramov Y., Anteby S.O., Fasouliotis S.J. et al. The role of inflammatory cytokines in Meigs' syndrome. *Obstet Gynecol* 2002;99:917–9.
10. Davidson B., Reich R., Kopolovic J. et al. Interleukin-8 and vascular endothelial growth factor mRNA and protein levels are down-regulated in ovarian carcinoma cells in serous effusions. *Clin Exp Metastasis* 2002;19:135–44.
11. Fang X., Yu S., Bast R.C. et al. Mechanisms for lysophosphatidic acid-induced cytokine production in ovarian cancer cells. *J Biol Chem* 2004;279:9653–61.
12. Bedrossian C.W. Diagnostic problems in serous effusions. *Diagn Cytopathol* 1998;19:131–7.
13. Liotta L.A., Kohn E.C. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 2001;411:375–9.

14. Hu L., Hofmann J., Zaloudek C. et al. Vascular endothelial growth factor immunoneutralization plus Paclitaxel markedly reduces tumor burden and ascites in athymic mouse model of ovarian cancer. *Am J Pathol* 2002;161(5):1917–24.
15. Berchuck A., Carney M. Human ovarian cancer of the surface epithelium. *Biochem Pharmacol* 1997;54(5):541–4.
16. Gortzak-Uzan L., Ignatchenko A., Evangelou A.I. et al. A proteome resource of ovarian cancer ascites: integrated proteomic and bioinformatic analyses to identify putative biomarkers. *J Proteome Res* 2008;7:339–51.
17. Шевченко В.Е. Современные масс-спектрометрические методы в ранней диагностике рака. *Масс-спектрометрия* 2004;1(2):103–26.
18. Шевченко В.Е., Арноцкая Н.Е., Трифонова О.П. и др. Профилирование низкомолекулярного протеома плазмы крови для обнаружения потенциальных

маркеров рака легкого. Масс-спектрометрия 2007;4(4):245–54.

19. Пятницкий М.А., Лисица А.В., Шевченко В.Е. и др. Выявление дифференциальных признаков плоскоклеточного рака легкого с помощью масс-спектрометрического профилирования плазмы крови. Масс-спектрометрия 2011; 8(2):99–105.

20. Cho C.K., Shan S.J., Winsor E.J. et al. Proteomic analysis of human amniotic fluid. Mol Cell Proteom 2007;6:1406–15.

21. Shaw J.L., Smith C.R., Diamandis E.P. Proteomic analysis of human cervico-vaginal fluid. J Proteome Res 2007;6:2859–65.

22. Shevchenko V.E., Arnotskaya N.E., Zaridze D.G. Detection of lung cancer using plasma protein profiling by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. Eur J Mass Spectrom 2010;16(4):539–49.

23. Pilch B., Mann M. Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma. Genome Biol 2006;7:40.

24. Gunawardana C.G., Kuk C., Smith C.R. et al. Comprehensive analysis of conditioned media from ovarian cancer cell lines identifies novel candidate markers of epithelial ovarian cancer. J. Proteom Res 2009;8:4705–13.

25. Hu L., Hofmann J., Zaloudek C. et al. Vascular endothelial growth factor

immunoneutralization plus Paclitaxel markedly reduces tumor burden and ascites in athymic mouse model of ovarian cancer. Am J Pathol 2002;161(5):1917–24.

26. Шевченко В.Е., Ковалев С.В., Юрченко В.А. и др. Картирование протеома плазмы крови человека в норме и при светлоклеточном раке почки. Онкоурология 2011;3:65–9.

27. Williams T.I., Toups K.L., Saggese D.A. et al. Epithelial ovarian cancer: disease etiology, treatment, detection, and investigational gene, metabolite, and protein biomarkers. J Proteom Res 2007; 6:2936–62.