

**НЕЦЕЛЕВОЙ МЕТАБОЛОМНЫЙ СКРИНИНГ ОБРАЗЦОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С
ДИАГНОЗОМ РАКА ЛЕГКОГО ДЛЯ ПОИСКА ЗНАЧИМЫХ МЕТАБОЛИТОВ С ПОМОЩЬЮ
МЕТОДА ВЭЖХ-МС**

Н.Б. Дементьева, А.А. Понаморева

Научный руководитель: профессор, д.ф-м.н. И.А. Курзина

Национальный исследовательский Томский государственный университет,

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

E-mail: dementevanatasha@mail.ru

**UNTARGETED METABOLOMIC PROFILING OF PLASMA SAMPLES OF PATIENTS WITH LUNG
CANCER FOR IDENTIFICATION OF SIGNIFICANT METABOLITES BY THE HPLC-MS METHOD**

N.B.Dementeva, A.A. Ponamoreva

Scientific Supervisor: Prof., Dr. I.A. Kurzina

Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050

E-mail: dementevanatasha@mail.ru

***Abstract.** In the present study, we present untargeted metabolomic profiling of plasma samples received from patients with lung cancer and healthy volunteers using the HPLC-MS method for definition of differences between profiles in the groups.*

Введение. Изучение изменений в организме онкологических больных путем анализа их биологических жидкостей может дать ценную информацию при изучении патогенных процессов происходящих в клетках. На сегодняшний день онкологические заболевания находятся в группе лидеров по количеству смертей, ведь диагностируются они, как правило, на поздних стадиях, когда терапия может оказаться бессильной [1]. В связи с этим нецелевое метаболомное профилирование и выявление различий между профилями здоровых и больных пациентов с помощью метода ВЭЖХ-МС может дать ценную информацию для поиска биомаркеров различных типов рака и приблизить медицину к созданию способов ранней диагностики онкологических заболеваний.

Материалы и методы исследования. В исследование были включены образцы плазмы крови 100 пациентов с диагнозом рака легкого и 100 здоровых добровольцев, полученные с использованием стандартных протоколов по сбору и подготовке биологического материала собранные в научно-исследовательском институте онкологии города Томска, которые хранились при -80°C до проведения анализа. Диагноз рака легкого у пациентов был подтвержден с помощью гистологического анализа биопсийного материала. Вместе с рандомизированными образцами плазмы крови в аналитический процесс были включены образцы контроля качества (QC) для оценки аналитической изменчивости методики анализа в процессе проведения исследования [2]. Эксперименты проводились с использованием ВЭЖХ-МС системы высокого разрешения на базе хроматографа Agilent 1260 (Agilent, США), и времяпролетного масс-анализатора Agilent 6550 iFunnel (Agilent, США) с использованием обращеннофазной колонки Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2,1x100 мм (Agilent, США) с размером частиц

2,7 микрон. Масс-спектрометр работал в режиме положительной электрораспылительной ионизации при скорости сбора данных 1 Гц в диапазоне сканирования m/z 50–1000.

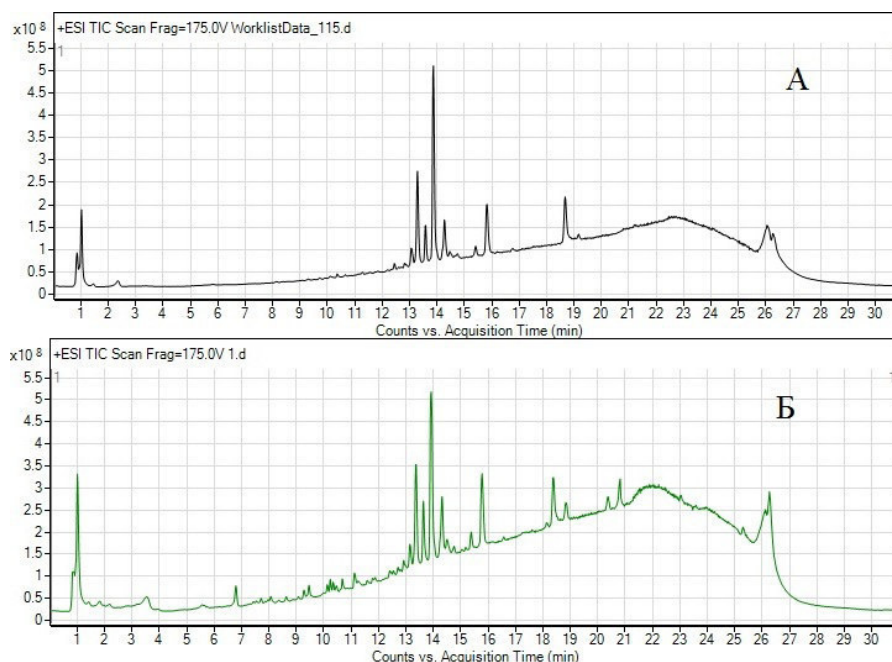


Рис. 1. Масс-спектр образца плазмы крови здорового добровольца (А) и пациента с диагнозом рак легкого (Б)

Файлы данных ВЭЖХ-МС были выровнены и подготовлены для проведения статистического анализа с использованием программного обеспечения R версии 3.1.3 и MZmine. Далее, для выявления метаболомных профилей и различий между образцами двух групп была проведена статистическая обработка данных с использованием программ SIMCA-P (Umetrics) и программного пакета R версии 3.1.3 [3-4].

Результаты. При помощи различных статистических методов была изучена структура метаболомных данных и выявлены основные компоненты, отвечающие за различия между классами здоровых добровольцев и пациентов с диагнозом рака легкого[3].

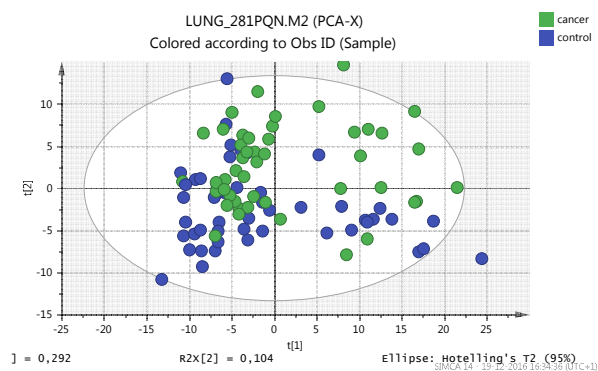


Рис. 2. Модель, основанная на методе главных компонент (зеленый – наличие диагноза рак легкого, синий – отсутствие рака легкого)

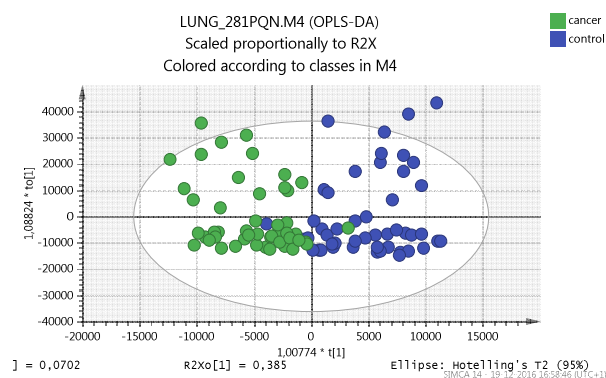


Рис. 3. Ортогональный дискриминантный анализ скейлинговых данных при помощи проекции на латентные структуры (зеленый – наличие диагноза рак легкого, синий – отсутствие рака легкого)

Далее, при помощи р-значения скорректированного по методу Бонферрони были определены наиболее весомые переменные, которые вносят основной вклад в модели. Далее проведена их первичная идентификация по точным массам с помощью программного обеспечения масс-спектрометра MassHunter (Agilent, США) и электронной базы данных HMDB для поиска метаболитов найденных в организме человека (<http://www.hmdb.ca>).

Таблица 1

Наиболее весомые переменные, отвечающие за различия между двумя классами образцов

Значимый компонент	Молекулярная масса	Идентифицированное соединение
M302T717	302, 2879	Сфинганин
M520T795	520, 3402	LysoPC (18: 2 (9Z, 12Z))
M281T1154	281, 2482	Линолевая кислота
M144T59	144, 0811	Винилацетилглицин
M335T1154	335, 1669	Липоиллизин
M521T796	521, 3436	рац-4-гидрокси-4-О- (бета-D-глюкуронид)- транс-ретирилацетат
M352T1111	352, 1781	N-Ацетил-4-О-ацетилнеураминовой кислоты

Выводы. С помощью метода ВЭЖХ-МС проведен нецелевой скрининг метаболитов в образцах плазмы крови пациентов с диагнозом рак легкого и группы здоровых добровольцев. Образцы были подготовлены в соответствии с протоколами, применяемыми для метаболомных исследований в ведущих европейских центрах. С помощью методов статистического анализа были выявлены метаболиты, отвечающие за различия между группами, и проведена их первичная идентификация.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Etzioni R., Urban N., Ramsey S., McIntosh M., Schwartz S., Reid B. The case for early detection // Nature Reviews Cancer. – 2003. – Т.3. – С. 243–252.
2. Wei Z., Jianwen S., Tolstikov V. A. Comprehensive Workflow of Mass Spectrometry-Based Untargeted Metabolomics in Cancer Metabolic Biomarker Discovery Using Human Plasma and Urine Metabolites // Metabolomics. – 2013. – Т. 3. – С. 787–819.
3. Wishart D. Advances in metabolite identification // Bioanalysis. – 2011. – Т. 3. – С. 1769–1782.
4. Westerhuis J., Hoefsloot H., Smit S., Vis D., Smilde A., van Velzen E., van Duijnhoven Ferdi A., van Dorsten J. Assessment of PLS-DA cross validation // Metabolomics. – 2008. – Т. 4. – № 1. – С. 81–89.