

ВЕСЦІ НАЦЫЯНАЛЬнай АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ ХІМІЧНЫХ НАВУК. 2017. № 3

ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ ХИМИЧЕСКИХ НАУК. 2017. № 3

Журнал основан в январе 1965 г.

Выходит четыре раза в год

Учредитель – Национальная академия наук Беларуси

Журнал зарегистрирован в Министерстве информации Республики Беларусь,
свидетельство о регистрации № 390 от 18.05.2009 г.

*Входит в Перечень научных изданий Республики Беларусь
для опубликования результатов диссертационных исследований,
включен в базу данных Российского индекса научного цитирования (РИНЦ)*

Главный редактор

Сергей Александрович Усанов – академик-секретарь Отделения химии и наук
о Земле Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

Редакционная коллегия:

- А. В. Бильдюкевич** – Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь (*заместитель главного редактора*)
- Н. П. Крутько** – государственное научно-производственное объединение «Химические продукты и технологии», Минск, Беларусь (*заместитель главного редактора*)
- Я. В. Рощина** – Издательский дом «Беларуская навука», Минск, Беларусь (*ведущий редактор*)
- В. Е. Агабеков** – Институт химии новых материалов Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
- А. А. Гилеп** – Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
- О. Б. Дормешкин** – Белорусский государственный технологический университет, Минск, Беларусь
- Е. Н. Калиниченко** – Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

А. К. Карабанов – Институт природопользования Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
В. Д. Кошевар – Институт общей и неорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
М. И. Кузьменков – Белорусский государственный технологический университет, Минск, Беларусь
А. И. Кулак – Институт общей и неорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
Ф. А. Лахвич – Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
В. Г. Левашкевич – Отделение химии и наук о Земле Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
И. И. Лиштван – Институт природопользования Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
В. И. Поткин – Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
Д. В. Свиридов – Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь
В. А. Хрипач – Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
О. И. Шадьро – Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь
В. В. Шманай – Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

Редакционный совет:

В. Балтрунас – Центр исследований природы Литвы Института геологии и географии, Вильнюс, Литва
П. Драшар – Пражский университет химии и технологии, Прага, Чехия
Л. Маркс – Варшавский университет, Варшава, Польша
В. Я. Прушак – Солигорский институт проблем ресурсосбережения с опытным производством, Солигорск, Беларусь
А. В. Рогачев – Научно-исследовательский институт физикохимии и технологии микро- и наноразмерных систем учреждения образования «Гомельский государственный университет имени Ф. Скорины», Гомель, Беларусь
Чжао Лян – Хэнаньская академия наук, Хэнань, Китай

Адрес редакции:

*ул. Академическая, 1, к. 119, 220072, г. Минск, Республика Беларусь.
Тел.: + 375 17 284-19-19; e-mail: himvesti@mail.ru
Сайт журнала: vestichem.belnauka.by*

ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ.

Серия химических наук. 2017. № 3.

Выходит на русском, белорусском и английском языках

Редактор *Я. В. Роцина*

Компьютерная вёрстка *О. А. Толстая*

Подписано в печать 18.08.2017. Выход в свет 29.08.2017. Формат 60×84¹/₈. Бумага офсетная.

Печать цифровая. Усл. печ. л. 14,88. Уч.-изд. л. 16,4. Тираж 66 экз. Заказ 149.

Цена: индивидуальная подписка – 10,34 руб., ведомственная подписка – 25,29 руб.

Издатель и полиграфическое исполнение:

Республиканское унитарное предприятие «Издательский дом «Беларуская навука».

Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя, распространителя печатных изданий № 1/18 от 02.08.2013. ЛП № 02330/455 от 30.12.2013. Ул. Ф. Скорины, 40, 220141, г. Минск, Республика Беларусь

© РУП «Издательский дом «Беларуская навука»,
Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя хімічных навук, 2017

PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

CHEMICAL SERIES, 2017, no. 3

The Journal was founded in January 1965

Periodicity is 4 issues per annum

Founder is the National Academy of Sciences of Belarus

The Journal is registered on May 18, 2009 by the Ministry of Information of the Republic of Belarus in the State Registry of Mass Media, reg. no. 390

The Journal is included in the List of Journals for Publication of the results of Dissertation Research in the Republic of Belarus and in the database of Russian Scientific Citation Index (RSCI)

Editor-in-Chief

Sergey A. Usanov – Academician-secretary of the Department of Chemistry and Earth Sciences of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Editorial board:

Alexandr V. Bilyukevich – Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus (*Associate Editor-in-Chief*)

Nikolai P. Krut'ko – State Research and Production Association «Chemical Products and Technologies», Minsk, Belarus (*Associate Editor-in-Chief*)

Yanina V. Roshchina – Publishing House “Belaruskaya Navuka”, Minsk, Belarus (*Lead Editor*)

Vladimir E. Agabekov – Institute of New Materials Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Andrey A. Gilep – Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Oleg B. Dormeshkin – Belarusian State University of Technology, Minsk, Belarus

Elena N. Kalinichenko – Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Alexandr K. Karabanov – Institute for Nature Management of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Vasily D. Koshevar – Institute of General and Inorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Mikhail I. Kuzmenkov – Belarusian State University of Technology, Minsk, Belarus

Anatoly I. Kulak – Institute of General and Inorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Fyodor A. Lakhvich – Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
Vladimir G. Levashkevich – Department of Chemistry and Earth Sciences of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
Ivan I. Lishtvan – Institute for Nature Management of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
Vladimir I. Potkin – Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
Dmitry V. Sviridov – Belarusian State University, Minsk, Belarus
Vladimir A. Khripach – Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
Oleg I. Shadyro – Belarusian State University, Minsk, Belarus
Vadim V. Shmanai – Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Editorial Council:

Baltrunas Valentinas – Lithuanian Nature Research Center of the Institute of Geology and Geography, Vilnius, Lithuania
Pavel Drasar – Prague University of Chemistry and Technology, Prague, Czechia
Victor Ya. Prushak – Soligorsk Institute of Resource Saving Problems with the Pilot Plant, Soligorsk, Belarus
Alexander V. Rogachev – Institute of Physical chemistry and Technology of Micro- and Nanoscale Systems at the Educational Institution «Francisk Skorina Gomel State University», Gomel, Belarus
Leszek Marks – University of Warsaw, Warszawa, Poland
Zhao Liang – Henan Academy of Sciences, Henan, China

*Address of the Editorial Office:
1, Akademicheskaya Str., room 119, 220072, Minsk, Republic of Belarus.
Tel.: +375 17 284-19-19; e-mail: himvesti@mail.ru
vestchem.belnauka.by*

PROCEEDING OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS.

Chemical series, 2017, no. 3.

Printed in Russian, Belarusian and English languages

Editor *Ya. V. Roshchina*
Computer imposition *O. A. Tolstaya*

It is sent of the press 18.08.2017. Appearance 29.08.2017. Format 60×84¹/₈. Offset paper.
The press digital. Printed pages 14,88. Publisher's signatures 16,4. Circulation 66 copies. Order 149.
Price: individual subscription – 10,34 byn., departmental subscription – 25,29 byn.

Publisher and printing execution:

Republican unitary enterprise "Publishing House "Belaruskaya Navuka".
Certificate on the state registration of the publisher, manufacturer, distributor of printing editions
no. 1/18 dated August 2, 2013. License for the press no. 02330/455 dated December 30, 2013.
Address: F. Scorina Str., 40, 220141, Minsk, Republic of Belarus.

© RUE "Publishing House "Belaruskaya Navuka",
Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series, 2017

ЗМЕСТ**ФІЗИЧНАЯ ХІМІЯ**

Абакшонок А. В., Квасюк А. А., Еремін А. Н., Агабеков В. Е. Получение частиц диоксида церия и их антиоксидантная активность	7
Самойленко О. А., Солдатов В. С., Нестеронок П. В. Потенциометрическое титрование природных клиноптилолитов	17

НЕАРГАНІЧНАЯ ХІМІЯ

Борзых М. М., Акулич Н. Е., Матыс В. Г., Иванова Н. П., Кандидатова И. Н., Ашуйко В. А. Ингибиторная защита оцинкованной стали ванадатом натрия	22
--	----

КАЛОЇДНАЯ ХІМІЯ

Опанасенко О. Н., Яковец Н. В., Крутько Н. П. Поверхностные свойства анионно-ориентированных цвиттер-ионных ПАВ на основе аминов и карбоновых кислот.....	29
--	----

АНАЛІТЫЧНАЯ ХІМІЯ

Матвейко Н. П., Кулак А. И., Протасов С. К., Садовский В. В. Инверсионно-вольтамперометрическое определение тяжелых металлов в растительных маслах.....	38
Шиш С. Н., Шутова А. Г., Скаковский Е. Д., Тычинская Л. Ю. Состав водных экстрактов соцветий календулы методом ЯМР.....	45

АРГАНІЧНАЯ ХІМІЯ

Акаѳеу Яа. В. Synthesis of new highly lyophobic ethoxylated ionic liquids as promising active components for ion selective electrodes (Синтез высоколипофильных этоксилированных ионных жидкостей – перспективных активных компонентов мембран ионоселективных электродов)	53
Куваева З. И., Лопатик Д. В., Бондарева О. М., Сивчик В. В. Синтез фосфорилированных аминокислот..	58

БІЯАРГАНІЧНАЯ ХІМІЯ

Вашкевич И. И., Ястребова А. А., Куприенко О. С., Корнилович Г. С., Сухенко Л. Н., Шибко А. И., Свиридов О. В. Реагенты для иммуноферментного определения токсина Т-2 в кормах и пищевых продуктах	63
Мартыненко-Макаев Ю. В., Брылев В. А., Удодова В. В. Дублер-красители для усиления флуоресценции ДНК-зондов в молекулярной диагностике.....	72
Станишевский С. Б., Иванчик А. В., Шапиро М. А., Янцевич А. В., Сыса А. Г. Белковое профилирование клеток HerG2 с использованием «Shotgun» протеомики как метод, применимый для исследования биоптатов	79

ХІМІЯ ВЫСОКАМАЛЕКУЛЯРНЫХ ЗЛУЧЭННЯЎ

Горбачев А. А., Шейпак Т. М., Данильчик А. В., Луценко Е. В., Третинников О. Н. Фотоиндуцированная прививочная полимеризация на поверхности под действием высокоинтенсивного УФ-излучения.....	85
---	----

ГЕАХІМІЯ

Михальчук Н. В. Подвижные формы тяжелых металлов и микроэлементов в почвах карбонатного ряда юго-запада Беларуси	90
---	----

ТЭХНІЧНАЯ ХІМІЯ І ХІМІЧНАЯ ТЭХНАЛОГІЯ

Гончарик И. И., Шевчук В. В., Кудина О. А., Можейко Ф. Ф. Получение сульфата калия взаимодействием хлорида калия и сульфата кальция.....	98
Клебеко П. А., Романовский В. И. Очистка подземных вод от железа модифицированными антрацитами	104
Латышев И. А., Прокочук Н. Р., Ключев А. Ю., Козлов Н. Г. Свойства лаковых покрытий на основе модифицированных терпеномалеиновых смол.....	110

АГЛЯДЫ

Литвинко Н. М. Прикладная энзимология фосфатацилгидролаз в изучении взаимосвязи «структура–функция» в ряду биополимеров и низкомолекулярных биорегуляторов	115
---	-----

ISSN 1561-8331(print.)

CONTENTS**PHYSICAL CHEMISTRY**

- Abakshonok A. V., Kvasyuk A. A., Eryomin A. N., Agabekov V. E.** Preparation of ceria particles and their antioxidant activity..... 7
- Samoilenko O. A., Soldatov V. S., Nesteronok P. V.** Potentiometric titration of natural clinoptilolites..... 17

INORGANIC CHEMISTRY

- Borzyh M. M., Akulich N. E., Matys V. G., Ivanova N. P., Kandidatova I.N., Ashuiko V. A.** Corrosion inhibition of Zn-plated steel by sodium vanadate..... 22

COLLOIDAL CHEMISTRY

- Opanasenko O. N., Yakavets N. V., Krut'ko N. P.** Surface properties of anionically-oriented zwitterionic surfactants based on amines and carboxylic acids..... 29

ANALYTICAL CHEMISTRY

- Matveiko N. P., Kulak A. I., Protasov S. K., Sadowski V. V.** Stripping voltammetric determination of heavy metals in vegetable oils..... 38
- Shysh S. N., Shutava H. G., Skakovski E. D., Tychinskaya L. Yu.** NMR investigation of the composition of aqueous extracts from pot marigold inflorescence..... 45

ORGANIC CHEMISTRY

- Akayeu Ya. B.** Synthesis of new highly lipophilic ethoxylated ionic liquids as promising active components for ion selective electrodes..... 53
- Kuvaeva Z. I., Lopatik D. V., Bondareva O. M., Sivchik V. V.** Synthesis of phosphorylated amino acids..... 58

BIOORGANIC CHEMISTRY

- Vashkevich I. I., Yastrebova A. A., Kuprienko O. S., Kornilovich G. S., Sukhenko L. N., Shibeko A. I., Sviridov O. V.** Reagents for an enzyme immunoassay of T-2 toxin in feeds and foods..... 63
- Martynenko-Makaev Y. V., Brylev V. A., Udodava V. V.** Enhancing the fluorescence of DNA-probes for molecular diagnostics..... 72
- Stanisheuski S. B., Ivanchyk A. V., Shapira M. A., Yantsevich A. V., Sysa A. G.** Shotgun proteomic profiling of HepG2 cell line as a method applicable for biopsy specimen analysis..... 79

POLYMER CHEMISTRY

- Gorbachev A. A., Sheipak T. M., Danilchuk A. V., Lutsenko E. V., Tretinnikov O. N.** UV-induced graft polymerization on surface under high-power UV irradiation and the properties of the surface-grafted polymer..... 85

GEOCHEMISTRY

- Mikhalechuk N. V.** Mobile forms of heavy metals and trace elements in carbonate range soils of the southwest part of Belarus..... 90

TECHNICAL CHEMISTRY AND CHEMICAL ENGINEERING

- Goncharik I. I., Shauchuk V. V., Kudzina O. A., Mozheyko F. F.** Preparation of potassium sulfate in a reaction of potassium chloride and calcium sulfate..... 98
- Klebko P. A., Romanovsky V. I.** Cleaning the ground water from iron using modified anthracite..... 104
- Latyshevich I. A., Prokopchuk N. R., Kliuyeu A. Yu., Kozlov N. G.** Properties of the laquer coatings based on modified terpenomaleinic resins..... 110

REVIEWS

- Litvinko N. M.** Applied enzymology of phosphatidacylhydrolases in a study of the structure-function relationship in the series of biopolymers and low-molecular bioregulators..... 115

ISSN 1561-8331(print.)

УДК 577.112.083

Поступила в редакцию 20.02.2017

Received 20.02.2017

С. Б. Станишевский, А. В. Иванчик, М. А. Шапиро, А. В. Янцевич, А. Г. Сыса*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь***БЕЛКОВОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ КЛЕТОК HepG2
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ «SHOTGUN» ПРОТЕОМИКИ КАК МЕТОД,
ПРИМЕНИМЫЙ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОПТАТОВ**

Аннотация: Описаны результаты применения «Shotgun» протеомного подхода в анализе микрограммовых количеств биологического материала с целью идентификации специфических белковых маркеров в клеточной линии высокодифференцированной гепатоцеллюлярной карциномы HepG2.

Ключевые слова: «Shotgun» протеомика, HepG2, белковое профилирование биомаркеры, белки-мишени

Для цитирования: Белковое профилирование клеток HepG2 с использованием «Shotgun» протеомики как метод, применимый для исследования биоптатов / С. Б. Станишевский [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2017. – № 3. – С. 79–84.

S. B. Stanisheuski, A. V. Ivanchyk, M. A. Shapira, A. V. Yantsevich, A. G. Sysa*Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus***SHOTGUN PROTEOMIC PROFILING OF HepG2 CELL LINE AS A METHOD APPLICABLE
FOR BIOPSY SPECIMEN ANALYSIS**

Abstract: The results of shotgun proteomic analysis of microgram quantities of hepatocellular carcinoma cells (HepG2) are described. Identified is a number of proteins which have been reported to be biomarkers and therapy targets.

Keywords: shotgun proteomics, HepG2, proteomic profiling, biomarkers, therapy targets

For citation: Stanisheuski S. B., Ivanchyk A. B., Shapira M. A., Yantsevich A. B., Sysa A. G. Shotgun proteomic profiling of HepG2 cell line as a method applicable for biopsy specimen analysis. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk.* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, chemical series], 2017, no. 3, pp. 79–84 (In Russian).

Введение. Протеомный анализ образцов, полученных при биопсии злокачественных опухолей – перспективный и высокотехнологичный подход, используемый для определения типа опухоли и ее резистентности к предполагаемому виду терапии. Возможность таких исследований появлялась еще в 1980-х годах после разработки «мягких» методов ионизации: «электрораспыления» (ESI) и «лазерной десорбции-ионизации при содействии матрицы» (MALDI). В настоящее время такие исследования стали возможны исключительно в результате самых последних достижений в области протеомных технологий и в первую очередь в тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения. Новейшие подходы позволили исследовать биохимические процессы в раковых клеточных линиях и в организме животных. Также был достигнут прогресс в анализе посттрансляционных модификаций, таких как фосфорилирование и убиквитинирование. Доступность различных видов изотопных методов открыла возможность количественного анализа протеома [1].

Однако еще много препятствий необходимо преодолеть, чтобы применять масс-спектрометрическое профилирование в медицине, в частности, для исследования образцов, полученных при биопсии злокачественных опухолей. Основные затруднения в работе с биоптатами связаны с несколькими причинами. Во-первых, в микроокружении опухоли почти всегда присутствуют клетки различных типов тканей, например сосудистой, нервной, соединительной, а также клетки иммунной системы. Во-вторых, в результате клональной эволюции часто наблюдается генетическое разнообразие внутри одной опухоли, что приводит к появлению клеточных субпопуляций с различающимися протеомами и соответственно со своими характерными свойствами и функциональностью. В-третьих, один из самых важных вопросов трансляционной медицины – стандартизация используемых процедур, имеющих существенное значение в использовании масс-спектрометрии. Даже при четком однообразном выполнении всех процедур конечные ре-

зультаты могут отличаться, например, по причине не поддающихся регулировке незначительных отклонений в работе приборов. В связи с этим далеко не всегда можно гарантировать, что анализ одной единственной пробы материала, отобранного у пациента, будет достоверным. В-четвертых, большинство методов протеомики, использующих масс-спектрометрическое определение, для разделения белков используют электрофорез в полиакриламидном геле, что приводит к значительным потерям материала в результате адсорбции белков на поверхности геля. Работа с образцами, полученными при биопсии (≈ 100 мкг), требует специальных подходов, не допускающих потери материала и при этом обеспечивающих качественное определение необходимых биомаркеров и белков-мишеней [2].

В качестве биологического материала, аналогичного биоптатам реальных пациентов, удобно использовать раковые клеточные линии. В ходе их наработки есть возможность выбрать требуемый объем материала и подходящие для отработки дальнейшей пробоподготовки условия культивирования. С учетом всего вышесказанного цель данного исследования – установление белкового состава раковой клеточной линии HepG2, определение протеома раковой клеточной линии HepG2 с использованием только негелевого (хроматографического) разделения. При этом все этапы пробоподготовки выбирались с учетом упомянутых выше параметров так, чтобы они были применимыми для пробоподготовки образцов биологического материала, отобранных в ходе биопсии [3].

Использованные материалы. NaOH, HCl, NaCl, этилендиаминотетрауксусная кислота, K_2HPO_4 , NH_4HCO_3 , этанол, трихлоруксусная кислота, диметилсульфоксид («Реахим», Россия); дитиотрейтол (ДТТ) («Serva», Германия); сыворотка крупного рогатого скота (ООО «БиолоТ», Россия); трипсин, среда для культур клеток EMEM, HEPES, трифторуксусная кислота, ацетонитрил, метанол, хлороформ, ацетон, йодацетамид, ацетонитрил (АЦН), мочевины, тиомочевина, гептафтормасляная кислота (ГФМК), Трис, муравьиная кислота («Sigma», США).

Для твердофазной экстракции использовали ТФЭ-картриджи C18-Hydra, содержащие 100 мг сорбента (Agilent, США) (100 мг). В работе применяли клеточную линию HepG2 – клетки высококодифференцированной гепатоцеллюлярной карциномы.

Культивирование клеточной линии HepG2. В работе монослойную клеточную культуру HepG2 культивировали по модифицированному протоколу [4] в среде EMEM, содержащей 20 мМ HEPES, 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, при 37 °С во влажной атмосфере с 5% CO_2 . Клеточную культуру поддерживали на стадии логарифмического роста путем рутинного субкультивирования трижды в неделю.

Перед снятием клеток их дважды промывали раствором Версена, снятие клеток проводили с использованием трипсина 0,25%. Для нейтрализации трипсина добавляли девятикратный избыток ростовой среды. Клетки осаждали путем центрифугирования, супернатант отбирали, а затем промывали осадок с использованием калий-фосфатного буфера. Процедуру повторяли дважды.

Хлороформ-метанольное осаждение белков. К водной взвеси клеток объемом 300 мкл добавляли 400 мкл метанола и 200 мкл хлороформа, тщательно перемешивали (5 мин на шейкере при максимальных оборотах) и помещали на час в морозильную камеру при температуре на -24 °С, для увеличения выхода белка.

После указанного инкубирования смесь извлекали из морозильной камеры, повторно перемешивали (5 мин на шейкере при максимальных оборотах) и центрифугировали в течение 15 мин при 4 °С на скорости 13 400 об./мин. После этого верхний слой извлекали, а к оставшейся двухфазной смеси добавляли 600 мкл метанола. Образец аккуратно встряхивали и центрифугировали 15 мин при 4 °С на скорости 13400 об./мин. После чего супернатант удаляли, а осадок (состоящий преимущественно из белка) подсушивали на фильтровальной бумаге в течение 10 мин. При необходимости доочистить белковую фракцию процедуру выделения повторяли.

Трипсинолиз смеси белков. Белковый осадок, полученный согласно описанной выше методике, перерастворяли в 150 мкл 9 М мочевины и инкубировали на шейкере при 30 °С на скорости 550 об./мин. Далее к раствору добавляли 20 мкл 50 мМ раствора ДТТ и инкубирование повторяли. После этого к смеси добавляли 20 мкл 150 мМ йодацетамида и оставляли на час при комнат-

ной температуре в темноте. Затем в раствор добавляли 800 мкл 0,1 М раствора гидрокарбоната аммония (рН 8,0) и 10 мкл раствора трипсина (1 мг/мл в 0,1 М растворе гидрокарбоната аммония (рН 8,0)). Полученную смесь инкубировали в течение ночи (16 ч) при комнатной температуре в темноте.

По прошествии необходимого времени в образец вносили 12 мкл 10% ГФМК, затем центрифугировали и подвергали твердофазной экстракции (ТФЭ).

Пробоподготовка образца для хроматографии. Колонки для ТФЭ уравнивали последовательным нанесением 2 мл АЦН, 2 мл воды и 0,5 мл 10 мМ раствора ГФМК. После этого на колонку наносили подкисленный, отцентрифугированный образец (супернатант после центрифугирования – 15 мин при 4 °С на скорости 13400 об./мин). После прохождения образца, колонку промывали 0,5 мл 0,7%-ным раствором муравьиной кислоты и 0,5 мл воды. После чего колонку просушивали током воздуха в течение 10–15 мин (использовали вакуумный насос с величиной вакуума в сосуде 2,5–3 атм.). Элюирование образцов производили 60%-ным раствором АЦН, содержащим 0,1 М FABS-буфер (рН 2,0).

Полученный элюат фильтровали через 0,2 мкм политетрафторэтиленовый фильтр и закладывали (5 мкл) в хроматограф.

Разделение и анализ пептидной смеси. Для протеомного анализа использовали высокоэффективный хроматограф (Agilent-1290, США) с тандемным квадрупольно-времяпролетным масс-спектрометрическим детектором (Agilent, США). Разделение проводили на колонке ZORBAX Extend-C18 (длина – 50 мм, внутренний диаметр – 2,1 мм, диаметр пор – 1,8 мкм). Разделение проводили в градиенте АЦН/MeOH/вода. Данные обрабатывали с использованием программного обеспечения Spectrum Mills.

Результаты и их обсуждение. В результате проведенных исследований были идентифицированы более 70 белков (таблица) в образцах раковой клеточной линии HepG2, содержащих $1,5 \times 10^7$ клеток. По приблизительным оценкам такой объем материала (около 60 мкг) соответствует отбираемому при биопсии. Многие из обнаруженных белков являются установленными ранее биомаркерами злокачественных образований.

Список белков, идентифицированных в клетках HepG2

List of proteins identified in the HepG2 cells

Название белка	Идентификационный номер в базе данных SwissProt	Интенсивность сигнала, отн. ед.	Количество обнаруженных пептидов	Степень покрытия аминокислотной последовательности, %
Белок теплового шока с молекулярной массой 60 кДа, митохондриальный	P10809	8.35e+006	9	25.4
Актин, цитоплазматический	P63261	5.66e+006	10	36.5
Предполагаемый 1-альфа подобный фактор элонгации	Q5VTE0	2.88e+006	7	24.2
Бета субъединица тубулина	P07437	2.55e+006	6	20
Глицераль-3-фосфат дегидрогеназа	P04406	2.10e+006	5	22
Альфа-1С субъединица тубулина	F5H5D3	3.32e+006	5	14.8
Синтаза жирных кислот	P49327	1.74e+006	5	4
Фактор элонгации 2	P13639	1.31e+006	4	9.3
Альфа-енолаза	P06733	1.78e+006	4	18.2
Кератин, тип II, цитоскелетный	P05787	1.58e+006	4	15.3
Гистон H2A тип 1-B/E	P04908	6.65e+006	3	43.8
Гистон H2A тип 2-A	Q6F113	4.78e+006	3	43.8
Кератин, тип I, цитоскелетный	P05783	8.57e+005	2	11.1
Белок регулятор метаболизма глюкозы с молекулярной массой 78 кДа	P11021	1.25e+006	3	7.3
Протеиндисульфид-изомераза A6	Q15084	1.28e+006	3	9
Бета субъединица белка теплового шока с молекулярной массой 90 кДа	P08238	9.17e+005	3	7.3
Триозофосфатизомераза	P60174	8.18e+005	2	15.3
Гистон H2B	U3KQK0	6.49e+006	2	14.4
Протеиндисульфид-изомераза	P07237	1.12e+006	2	8.8
Альфа субъединица L-лактатдегидрогеназы	P00338	1.81e+006	3	9.6
Кофиллин-1	E9PK25	8.45e+005	2	20.5
Бета субъединица АТФ-синтазы, митохондриальный	P06576	1.41e+006	2	10
Эукариотический фактор инициации трансляции 4A-II	Q14240	6.61e+005	2	5.6
Альдокеторедуктаза 1C1	Q04828	8.69e+005	2	8.3
Нуклеозиддифосфаткиназа	Q32Q12	2.98e+005	2	9.9
Белок 14-3-3 эпсилон	P62258	5.20e+005	2	10.5
Тяжелая субъединица клатрина	A0A087WVQ6	3.97e+005	2	1.5

Название белка	Идентификационный номер в базе данных SwissProt	Интенсивность сигнала, отн. ед.	Количество обнаруженных пептидов	Степень покрытия аминокислотной последовательности, %
Белок теплового шока с молекулярной массой 40кДа	P62081	2.33e+005	2	17.5
Гистон H4	P62805	1.58e+006	2	19.4
Белок 14-3-3 дзета/дельта	E7EX29	4.30e+005	2	10.9
Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин K	P61978	5.17e+005	2	5.8
Пероксиредоксин	Q06830	4.01e+005	2	10
Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин A2/B1	P22626	4.63e+005	1	4.5
Гистон H3.3	K7ES00	2.64e+006	2	10.5
Белок 1 Т-комплекса, субъединица η	Q99832	5.16e+005	1	2.9
Калретикулин	P27797	4.12e+005	1	6.9
Предположительно фосфоглицерат мутаза класс 4	Q8N0Y7	1.11e+006	1	7
Белок 14-3-3 дзета	P27348	4.46e+005	2	11
Гипоксия-индуцируемый белок 1	Q9Y4L1	5.66e+005	1	1.9
Нуклеолин	P19338	3.13e+005	1	3
Глюкоза-6-фосфат изомераза	A0A0A0MTS2	3.74e+005	1	2.6
Кератин, тип I, цитоскелетный	P08727	1.44e+006	1	5.7
Белок ассоциированный с белками теплового шока с молекулярной массой 71кДа	P11142	3.23e+005	1	4.1
Рибозо-фосфат пиррофосфокиназа 1	P60891	1.53e+005	1	4.7
Профилин-1	P07737	4.65e+005	1	10
Альдегиддегидрогеназа X, митохондриальная	P30837	1.61e+005	1	2.7
Сульфотрансфераза	A0A0A6YYL2	1.92e+005	1	6.9
Альфа-актинин-3	A0A087WSZ2	4.92e+005	1	1.2
Белок HSPЕ1-МОВ4	S4R3N1	1.02e+006	1	5.3
Аденилил циклаза ассоциированный белок 1	Q01518	2.29e+005	1	3.7
Полиаденилат-связывающий белок 4	Q13310	2.85e+005	1	3.7
Субъединица C1q белка системы комплемента	Q07021	3.74e+005	1	10.6
Трехфункциональный фермент, субъединица альфа, митохондриальный	P40939	2.40e+005	1	1.9
Малый ядерный рибонуклеопротеин	P62314	3.83e+005	1	16.8
Ретинальдегидрогеназа 1 Sm D1	P00352	6.41e+005	1	2.5
40 S Рибосомальный белок	A0A0C4DG17	1.96e+005	1	4.3
Катепсин Д	P07339	3.24e+005	1	2.4
Пептидил-пролили цис-транс изомераза А-подобный белок 4А/В/С	Q9Y536	1.80e+005	1	8.5
60 S рибосомальный белок L13	P26373	2.16e+005	1	6.1
40 S рибосомальный белок S2	P15880	1.40e+005	1	6.4
ТЕР АТФаза	P55072	1.67e+005	1	2.1
Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин C1/C2	P07910	2.59e+005	1	3.9
НАД(Ф)Н дегидрогеназа	P15559	2.03e+005	1	3.6
Пируваткиназа	P14618	6.35e+005	1	1.5
4-аминобутираттрансфераза, митохондриальная	H3BRN4	1.85e+005	1	2.3
Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин A1	P09651	5.31e+005	1	4.3
Альдегиддегидрогеназа, митохондриальная	P05091	2.26e+005	1	2.7
Нуклеофосмин	P06748	2.51e+005	1	7.1
Ингибитор миграции макрофагов	P14174	2.50e+005	1	7.8
Карбоксилэстераза печени	P23141	4.04e+005	1	2.9
Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин A3	P51991	1.59e+005	1	4.2
Хинооксиредуктаза	Q08257	1.00e+005	1	4.8

При рассмотрении таблицы можно отметить повышенную выработку в клетках HepG2 белков-шаперонов семейств HSP 60 и HSP 90. Эти белки являются биомаркерами для многих типов рака. Причем в некоторых типах рака мочевого пузыря было показано, что степень дифференциации ткани опухоли коррелирует с количеством вырабатываемых белков HSP 60 и HSP 90 и при этом именно с пониженной выработкой этих белков. Также существует корреляция уровня выработки HSP 60 и HSP 90 с тем, насколько будет благоприятен прогноз при лечении конкретных пациентов [5]. В случае же клеток печени, биомаркером является в свою очередь повышенная выработка HSP 60 и HSP 90, которая также определяет и степень дифференциации ткани [6]. Важность этих биомаркеров была показана и в других исследованиях. На данный момент уровень и локализация в клетке их выработки в совокупности с определенным типом рака позволяет выбрать правильное лечение и предсказать наиболее вероятный результат такого лечения.

Еще один белок-шаперон HSC 70 положительно влияет на скорость роста и пролиферации клеток рака молочной железы, экспрессирующих Катепсин Д в больших количествах. Вследствие этого HSC 70 является целью для препаратов химиотерапии нового поколения [7].

В связи с тем что исследуемые клетки HepG2 являются клетками печени, нельзя не отметить, что многие из обнаруженных белков в профиле этих клеток – ферменты фазы II метаболизма.

Белки фазы II метаболизма являются определяющими для метаболизма многих антинеопластических препаратов, принцип действия которых основан на наличии или отсутствии конкретных ферментов в конкретном типе клеток [8]. Так, повышенное содержание альдегиддегидрогеназы (таблица) отвечает за резистентность опухоли к целому ряду неопластических препаратов производных оксазафосфорина [9]. Знание о том, что исследуемый тип клеток способен вырабатывать такие белки, дает возможность предсказать эффективность лекарств и побочные эффекты от их применения.

Иногда механизм влияния наличия или отсутствия некоторых белков на здоровье пациента не выявлен, но существует статистически значимая закономерность между наличием белка и результатом терапии. Так, обнаруженный нами белок 14-3-3 ζ является биомаркером, позволяющим уточнить прогноз по лечению мультиформной глиобластомы. Как показали авторы работы [10], при сравнении группы пациентов, у которых этот белок не экспрессировался, и группы пациентов, у которых он экспрессировался, прожили в среднем на полгода дольше после операции, при этом шанс пережить первые два года отличался между группами почти вдвое (8,6 и 16,3% для каждой из групп соответственно).

В данной работе в протеоме клеточной линии HepG2 идентифицированы такие белковые онкомаркеры, как белки семейства HSP, белок 14-3-3 ζ , а также белки-мишени для химиотерапии: белок-шаперон HSC 70 и катепсин Д. Для идентификации использовали метод панорамного протеомного анализа. Основными достоинствами использованного подхода являются: возможность одновременного определения в сжатые сроки множества целевых белков, отсутствие ограничений по форме исследуемого материала, возможность работы с микрограммовыми количествами. Этот подход может быть использован при работе с биоптатами любого типа ткани, отобранными у пациентов, и может применяться как один из методов ранней диагностики или прогнозирования лечения онкологических заболеваний.

Благодарности. Статья подготовлена по материалам доклада, представленного на конференции «Молодежь в науке – 2016», 22–25 ноября 2016 г.

Acknowledgements. This article is based on the materials presented at the conference «Youth in science – 2016», November 22–25th, 2016.

Список использованных источников

1. Quantitative Mass Spectrometric Profiling of Cancer-cell Proteomes Derived From Liquid and Solid Tumors / H. Bohnenberger [et al.] // *J. of Visualized Experiments*. – 2015. – Vol. 96. – P. 52435.
2. Feist, P. Proteomic Challenges: Sample Preparation Techniques for Microgram-Quantity Protein Analysis from Biological Samples / P. Feist, A. B. Hummon // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2015. – Vol. 16(2). – P. 3537–3563.
3. Оптимизация проведения отдельных стадий пробоподготовки в протеомном анализе / А.В. Иванчик [и др.] // Сб. науч. ст. Первого Белорусского биохимического конгресса. – Гродно: ЮрСаПринт, 2016. – Ч. 2. – С. 169–174.
4. HepG2 (liver hepatocellular carcinoma): cell culture and transfection protocol // [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.hepg2.com>. Дата доступа: 10.11.16.
5. Heat shock proteins HSP27, HSP60, HSP70, and HSP90 expression in bladder carcinoma / T. Leuret [et al.] // *Cancer*. – 2003. – Vol. 98(5). – P. 970–977.
6. Proteomic Characterization of Annexin I (ANX1) and Heat Shock Protein 27 (HSP27) as Biomarkers for Invasive Hepatocellular Carcinoma Cells / Ruo-Chiau Wang [et al.] // *Journal of Proteomics*. – 2015. – Vol. 10. – P. 2–10.
7. Heat shock cognate 70 protein secretion as a new growth arrest signal for cancer cells. / P. Nirdé [et al.] // *Oncogene*. – 2010. – Vol. 29. – P. 117–127.
8. Prodrugs from serendipity to rational design / K. M. Huttunen [et al.] // *Pharmacological Reviews*. – 2011. – Vol. 63 (3). – P. 750–761.
9. Pinto, N. Drug focus: Pharmacogenetic studies related to cyclophosphamide-based therapy / N. Pinto // *Pharmacogenomics*. – 2009. – Vol. 10. – P. 1897–1903.
10. 14-3-3 ζ positive expression is associated with a poor prognosis in patients with glioblastoma. / X. Yang [et al.] // *Neurosurgery*. – 2011. – Vol. 68(4). – P. 932–938.

References

1. Bohnenberger H., Ströbel P., Mohr S., Corso J., Berg T., Urlaub H., Lenz C., Serve H., Oellerich T., “Quantitative Mass Spectrometric Profiling of Cancer-cell Proteomes Derived From Liquid and Solid Tumors”, *Journal of Visualized Experiments*, 2015, vol. 96, p. 52435.
2. Feist P., Hummon A. B., “Proteomic Challenges: Sample Preparation Techniques for Microgram-Quantity Protein Analysis from Biological Samples”, *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, vol. 16(2), pp. 3537–3563.

3. Ivanchyk A. V., Shapira M. A., Shchur V. V., Iantsevich A. V., “Optimization of separate stages of sample preparation in proteomic analysis”, *Sovremennye problemy biokhimii : sbornik nauchnykh statei I Belorusskogo biokhimicheskogo kongressa, Grodno, 5–6 iulia 2016 g. : v 2 chastiakh, Nadol'nik L. I. (gl. red.), Grodno, 2016* [Modern problems of biochemistry: a collection of scientific articles of the I Belorussian Biochemical Congress, Grodno, July 5–6, 2016: in 2 parts, Nadolnik L. I. (ed.), Grodno, 2016], IurSaPrint, Grodno, BY, 2016, part 2, pp. 169–174.

4. “HepG2 (liver hepatocellular carcinoma): cell culture and transfection protocol”, Available at: <http://www.hepg2.com>, (accessed 10.11.16).

5. Le Bret T., Watson R. W., Molinié V., O'Neill A., Gabriel C., Fitzpatrick J. M., Botto H., “Heat shock proteins HSP27, HSP60, HSP70, and HSP90 expression in bladder carcinoma”, *Cancer*, 2003, vol. 98(5), pp. 970–977.

6. Wang R. C., Huang C. Y., Pan T. L., Chen W. Y., Ho C. T., Liu T. Z., Chang Y. J., “Proteomic Characterization of Annexin 1 (ANX1) and Heat Shock Protein 27 (HSP27) as Biomarkers for Invasive Hepatocellular Carcinoma Cells”, *PLoS One*, 2015, vol. 10, pp. 2–10.

7. Nirde P., Derocq D., Maynadier M., Chambon M., Basile I., Gary-Bobo M., Garcial M., “Heat shock cognate 70 protein secretion as a new growth arrest signal for cancer cells”, *Oncogene*, 2010, vol. 29, pp. 117–127.

8. Huttunen K. M., Raunio H., Rautio J., “Prodrugs from serendipity to rational design”, *Pharmacological Reviews*, 2011, vol. 63 (3), pp. 750–761.

9. Pinto N., “Drug focus: Pharmacogenetic studies related to cyclophosphamide-based therapy”, *Pharmacogenomics*, 2009, vol. 10, pp. 1897–1903.

10. Yang X., Cao W., Zhou J., Zhang W., Zhang X., Lin W., Fei Z., Lin H., Wang B., “14-3-3 zeta positive expression is associated with a poor prognosis in patients with glioblastoma”, *Neurosurgery*, 2011, vol. 68 (4), pp. 932–938.

Информация об авторах

Станишевский Станислав Борисович – магистр хим. наук, мл. науч. сотрудник, Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В. Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: Stanislau.Stanisheuski@gmail.com.

Иванчик Александр Викторович – аспирант, мл. науч. сотрудник, Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В.Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: AlexIvan4ik@gmail.com.

Шапиро Михаил Анатольевич – магистр биол. наук, мл. науч. сотрудник, Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В.Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: MShapira2016@gmail.com.

Янцевич Алексей Викторович – канд. хим. наук, зав. лаб., Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В.Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: Al.Yantsevich@gmail.com.

Сыса Алексей Григорьевич – канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник, Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В.Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: Aliaksei.Sysa@gmail.com.

Information about the authors

Stanislau B. Stanisheuski – M. Sc. (Chemistry), Junior researcher, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician V. F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Stanislau.Stanisheuski@gmail.com.

Aliaksandr V. Ivanchyk – Ph. D. student, Junior researcher, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician V. F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: AlexIvan4ik@gmail.com.

Michail A. Shapira – M. Sc. (Biology), Junior researcher, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician V. F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: MShapira2016@gmail.com.

Aliaksey V. Yantsevich – Ph. D. (Chemistry), Head of Laboratory, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician V. F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Al.Yantsevich@gmail.com.

Aliaksei G. Sysa – Ph. D. (Chemistry), Senior researcher, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician V. F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Aliaksei.Sysa@gmail.com.