

Картирование протеома плазмы крови человека в норме и при светлоклеточном раке почки

В.Е. Шевченко, С.В. Ковалев, В.А. Юрченко, В.Б. Матвеев, Д.Г. Заридзе

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Контакты: Сергей Васильевич Ковалев sergekov@mail.ru

Проведено масс-спектрометрическое картирование протеома плазмы крови больных почечно-клеточным раком (ПКР) и контрольной группы. Идентифицировано 247 белков, из них экспрессия 12 белков увеличивалась при переходе от данных контрольной группы к анализам больным с I–II и III–IV стадиями заболевания. Снижение экспрессии в этом ряду показывали 14 белков. Из 26 протеинов, показавших изменение экспрессии, 7 относятся к белкам острой фазы, 3 белка связаны с межклеточным матриксом. Данные белки могут быть потенциальными маркерами ПКР.

Ключевые слова: почечно-клеточный рак, масс-спектрометрия, протеомные маркеры

Human plasma proteome mapping in health and clear cell carcinoma of the kidney

V.E. Shevchenko, S.V. Kovalev, V.A. Yurchenko, V.B. Matveev, D.G. Zaridze

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

Plasma proteome from patients with renal cell carcinoma (RCC) and controls underwent mass spectrometric mapping. A total of 247 proteins were identified; the expression of 12 proteins of them increased on transition from the controls to patients with Stages I–II and III–IV RCC. There was decreased expression of 14 proteins in this series. Out of the 26 proteins showing a change in their expressions, 7 proteins belong to acute-phase ones, 3 proteins are associated with the intercellular matrix. These proteins can be potential markers for RCC.

Key words: renal cell carcinoma, mass spectrometry, proteomic markers

Введение

Рак почки (РП) составляет 3 % всех случаев злокачественных опухолей у взрослых. В год РП в мире заболевают около 300 тыс. человек. Особенно высока заболеваемость РП в некоторых странах Восточной Европы, например в Чехии (23 на 100 тыс. населения среди мужчин и 13 среди женщин). Кроме того, в большинстве стран мира отмечается рост заболеваемости этой формой рака [1, 2].

Более 95 % всех случаев РП составляет почечно-клеточный рак (ПКР). В свою очередь, доминирующей формой ПКР является светлоклеточный рак почки (сПКР), который составляет 80 % всех случаев ПКР. Остальные 20 % ПКР представляют собой папиллярный рак, хромофобный рак, а также другие формы ПКР [3].

ПКР в 2 раза чаще встречается у мужчин, чем у женщин, что, скорее всего, обусловлено повышенным риском РП в связи с курением. Другими факторами риска служат избыточный вес, гипертония, а также некоторые профессиональные факторы [3].

В России заболеваемость РП также высока и в некоторых регионах достигает 17 случаев на 100 тыс. населения среди мужчин и 10 среди женщин. В год в нашей стране РП заболевают 16 тыс. человек, а умирают 8 тыс. Пятилетняя выживаемость больных в большинстве стран мира, в том числе и в России, не превышает 50 %. Необходимость улучшения этого показателя тре-

бует разработки новых методов скрининга, ранней диагностики и лечения этого заболевания [4]. В связи с этим идентификация соответствующих опухолевых маркеров является актуальной задачей.

Существует 2 подхода к поиску биомаркеров: геномные и протеомные исследования. О важности геномных методов говорит тот факт, что 80 % случаев сПКР связано с мутациями или эпигенетическими нарушениями гена фон Хиппеля—Линдау [3, 5, 6]. Систематическое выявление таких нарушений может быть полезным для поиска новых биомаркеров ПКР.

Поиск и идентификация протеомных маркеров ПКР также представляется перспективным направлением научных исследований. На основании гипотезы о том, что опухолевые маркеры могут секретироваться в кровотоки самой опухолью или различными органами и тканями в ответ на возникновение неоплазии, протеом плазмы/сыворотки крови служит важным объектом для поиска потенциальных опухолевых маркеров. Поиск маркеров ПКР в плазме крови человека осуществлялся методом усиленной поверхностью лазерной десорбции/ионизации [7] и методом двумерного гель-электрофореза [8]. Известные биологические маркеры ПКР (Ki-67, карбоангидраза IX, ферритин, NMP-22, неоптерин, HIF-2, IMP3 и др. [9]) не обладают достаточной чувствительностью и специфичностью. До сих пор ни один из потенциальных маркеров не прошел все ста-

дии валидации. Маркеры, идентифицированные протеомными методами (виментин, аннексин IV, Mn-SOD, бета-энолаза и т. д.), также обладают низкой специфичностью и чувствительностью [10].

Цель исследования — сопоставление протеомных карт плазмы крови больных ПКР I–II и III–IV стадий с контролем и выявление потенциальных диагностических и прогностических протеомных маркеров.

Материалы и методы

Пациенты и забор крови. Работа проводилась в рамках международного исследования молекулярной эпидемиологии РП. В исследование были включены все больные первичным РП, госпитализированные в хирургическое отделение онкоурологии РОНЦ им. Н.Н. Блохина и «контрольные» неонкологические больные, госпитализированные в больницы общего профиля г. Москвы. Дополнительным условием включения в контрольную группу было отсутствие острой воспалительной патологии, а также заболеваний, вызванных курением. Больные РП и «контрольные» лица опрашивались опытными, прошедшими соответствующую подготовку интервьюерами по стандартной анкете, в которой содержались вопросы о факторах образа жизни, профессионального маршрута, семейного и медицинского анамнеза. У больных и «контрольных» лиц забор крови проводили натощак на 2–3-й день после госпитализации, до хирургического вмешательства и до начала применения противоопухолевой терапии. Для забора крови использовали специальные пробирки, содержащие калиевую соль ЭДТА, кровь центрифугировали при комнатной температуре в течение 10 мин при 3000 об/мин (1600 g). Полученную плазму алиquotировали по 100 мкл в пробирки с емкостью 200 мкл, маркировали и хранили при –80 °C. Готовили суммарную фракцию образцов плазмы крови контрольной группы и больных с I–II и III–IV стадиями путем смешивания равных алиquot плазмы каждого пациента группы.

Удаление высокопредставленных белков и разделение на фракции. Для удаления высокопредставленных белков плазмы крови использовали аффинную хроматографию на спин-картридже MARS Hu-14 (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA, USA) по методике производителя [11]. Проводили 3 последовательных прогона 10 мкл плазмы через спин-картридж. Фракцию низкопредставленных белков разделяли на хроматографе Agilent 1200 Semipreparative с колонкой mRP-C18. Собирали 12 фракций с 6-й по 54-ю минуту через равные промежутки времени. Полученные фракции упаривали досуха при 60 °C на центрифужном испарителе Eppendorf Concentrator 5301. Трипсинолиз каждой фракции проводили по методике с трифторэтанолом [12].

Масс-спектрометрический анализ. Анализ каждой фракции проводили на нанопроточном хроматографе Agilent 1200 в сочетании с масс-спектрометром Agilent

6340 Ion Trap с чипом HCT ChipCube для хроматографирования и ионизации образца. Объем инжестируемой пробы 2 мкл. Соблюдали условия хроматографирования, описанные в работе J. Martosella и соавт. [13].

Обработку результатов проводили с помощью программного пакета Spectrum Mills версии A.03.03 (Agilent). После поиска проводили автовалидацию белков со скором больше 20, после чего продолжали дополнительный поиск по следующим возможным модификациям: деамидирование NQ, пироглутаминовая кислота, окисленный метионин и фосфорилирование STY. Затем просматривали спектры пептидов со скором больше 5 и проводили ручную валидацию хороших спектров.

Для количественного сравнения использовался алгоритм protein-protein comparison columns для белков, прошедших валидацию. Для сравнения уровней использовали суммарные интенсивности всех пептидов белка. Принимали во внимание изменения уровней белков в 2 и более раз.

Результаты

Всего было исследовано образцов плазмы от 58 больных ПКР и 17 «контрольных» лиц. Из 58 больных ПКР у 45 был поставлен гистологический диагноз сПКР, у 4 — папиллярного рака. У 9 больных ввиду того, что им по разным причинам не проводилось хирургического лечения, нет гистологической верификации подтипа ПКР. Диагностированы I–II стадия заболевания у 26 больных, III–IV стадия — у 32 пациентов.

В результате картирования протеомов плазмы крови в контрольной группе идентифицировали 409 уникальных пептидов, соответствующих 140 белкам. В группе больных ПКР с I–II стадией заболевания обнаружили 407 уникальных пептидов, соответствующих 136 белкам. В группе пациентов с III–IV стадией ПКР идентифицировали 419 пептидов и 117 белков соответственно. Всего в 3 группах идентифицировали 247 белков. Уровни 12 (4,9 %) белков последовательно увеличивались при переходе от данных контрольной группы к результатам больных с I–II, а затем пациентов с III–IV стадией ПКР (табл. 1). Уровни 14 (5,7 %) белков уменьшались в этом ряду (табл. 2). Также мы обнаружили 17 (6,9 %) белков, уровни которых изменяются только в плазме больных с III–IV стадией ПКР.

Обсуждение

При картировании протеома плазмы крови человека в норме и при ПКР мы идентифицировали 247 белков. Из них 169 (68 %) белков имеются в списке протеинов, обнаруженных проектом протеома плазмы крови человека HPPP (подразделение проекта протеома человека HUPO) [14], что говорит о достоверности полученных нами результатов. Следует отметить, что эта база составлена для плазмы крови здоровых людей, что может объяснять отсутствие в базе остальных белков, воз-

Таблица 1. Белки, уровни которых возрастают при прогрессировании ПКР

Белок	Суммарная интенсивность пиков пептидов белка, ·10 ⁶		
	Контроль	I–II стадия	III–IV стадия
Гаптоглобин	210	813	939
Альфа-1В-гликопротеин	698	1010	1520
Богатый лейцином альфа-2-гликопротеин	261	538	665
Препро-С3В/С4В-инактиватор	52,6	248	312
Сывороточный амилоид альфа	30,3	106	153
Белок, связывающий компонент комплемента С4	50,1	124	259
Компонент комплемента С3	н. д.	45,6	71,2
С-реактивный белок	н. д.	30,5	96,9
Тромбоцитарный фактор 4	н. д.	49,9	58,0
Связывающий фосфодиэстеразу 4D белок	н. д.	57,5	71,7
Компонент комплемента С1, субъединица s	н. д.	13,2	131
CDK5-ассоциированный белок	н. д.	38,7	55,4

Примечание. Здесь и в табл. 2: показатели интенсивности даны в абсолютных единицах счета; н. д. — концентрация белка ниже предела детектирования масс-спектрометра.

можно, связанных с наличием патологии, в частности злокачественной опухоли. Из 78 таких белков, идентифицированных нами, 45 выявлены у больных ПКР, следовательно, они могут быть связаны с опухолевым ростом. Особенно следует отметить С-реактивный белок (СРБ), не обнаруженный у лиц контрольной группы, уровень которого растет при переходе от I–II к III–IV стадиям (см. табл. 2). Этот белок острой фазы является потенциальным прогностическим маркером рака почки [15]. Однако нужно учесть, что этот белок обнаруживается при других формах рака и, кроме того, у больных с различными воспалительными процессами.

Белки, уровни которых повышаются при РП. Большая часть белков данной группы (7 из 12) относится к белкам острой фазы (БОФ). Известно, что хроническое воспаление может стимулировать рост опухолевых клеток при некоторых формах рака. В воспалительных очагах образуются свободные радикалы (активные формы кислорода и азота) и ингибируются антиоксидантные механизмы, что приводит к повреждению ДНК [16]. Однако острое воспаление может давать противоположный эффект: быстро растущие опухоли, некротизируясь, выделяют сигналы, вызывающие инфильтрацию лейкоцитами и иммунный ответ, что может приводить к замедлению опухолевого роста [16].

Таблица 2. Белки, уровни которых снижаются при прогрессировании РП

Белок	Суммарная интенсивность пиков пептидов белка, ·10 ⁶		
	Контроль	I–II стадия	III–IV стадия
Аполипопротеин А-I	4950	2760	1230
Аполипопротеин А-IV	1180	900	448
Фактор дифференцировки эпителия (PEDF)	65,4	39,1	16,8
Тимозин бета 4	55,3	29,2	н. д.
Цитокератин 9	52,5	30,8	н. д.
Кератин 10	24,2	20,5	н. д.
Люмикан	40,3	26,9	16,5
Кератин 75	54,4	43,0	н. д.
Компонент комплемента С7	44,4	36,8	н. д.
Ингибитор сывороточной протеазы С1	73,8	22,0	н. д.
Аполипопротеин Е	63,6	7,0	н. д.
IGF-связывающий белок, лабильная кислотная субъединица	10,7	7,0	н. д.
S100-кальцийсвязывающий белок А9	99,8	68,3	н. д.
Пре-мРНК-расщепляющий комплекс II	312	156	н. д.

Гаптоглобин относится к сывороточным сиало-гликопротеинам и обладает большим сродством к гемоглобину. Основная его функция — связывание гемоглобина для его деградации. Гаптоглобин также относится к БОФ, обладает антибактериальной активностью, играет роль в модуляции иммунного ответа и может выступать в качестве антиоксиданта (связываясь с гемоглобином и выводя его из циркуляции, он снижает концентрацию активных форм кислорода, образующихся под действием железа, входящего в состав гема) [17]. Показано изменение экспрессии гаптоглобина при некоторых видах рака, в частности при РП его уровень повышается в плазме крови [18]. В нашем исследовании уровень гаптоглобина был повышен по сравнению с контролем в 3,9 раза у больных с I–II стадией ПКР, и в 4,2 раза у больных с III–IV стадией ПКР.

Сывороточный амилоид альфа (САА) является широко известным БОФ с разнообразными биологическими функциями. При воспалении уровень САА может возрасти на несколько порядков [19]. Концентрация САА увеличивается при раке легкого, предстательной железы, толстой кишки. В результате применения масс-спектрометрических методов показано изменение экспрессии САА при раке легкого, яичников, носоглотки и почки [18]. В работе [20] обнаружено, что САА служит

маркером метастазирования при ПКР. Его концентрация у больных с регионарными метастазами увеличивалась в 2,8 раза, а с отдаленными метастазами в 12 раз. Наши данные указывали на повышение уровня САА у больных с III–IV стадиями ПКР по сравнению с контрольной группой более чем в 5 раз, что согласуется с данными вышеприведенной работы.

Компонент комплемента C3 проявляет противовоспалительные свойства при связывании с G-протеин-связывающим белком. Он вызывает сокращение мышц, увеличивает проницаемость кровеносных сосудов, привлекает моноциты и нейтрофилы к месту воспаления, а также запускает генерацию активных форм кислорода макрофагами. Компонент комплемента C3 был идентифицирован масс-спектрометрическими методами как возможный маркер рака толстой кишки, молочной железы, гепатоцеллюлярного рака [18]. Показано, что экспрессия соответствующего гена C3 в опухолевой ткани почки возрастает в 7–13 раз [21]. В нашем исследовании компонент комплемента C3 не был обнаружен в контрольной группе, а при переходе от I–II к III–IV стадиям заболевания его концентрация возросла в 1,6 раза. Отсутствие этого белка в плазме лиц контрольной группы, скорее всего, говорит о том, что его концентрация находилась ниже предела обнаружения масс-спектрометра.

СРБ является маркером системного воспаления. Он продуцируется печенью под действием цитокинов: интерлейкина (ИЛ) 1, фактора некроза опухоли и особенно ИЛ-6. Исследования клеточных линий ПКР и образцов опухолевой ткани показало, что при некоторых видах ПКР клетки секретируют ИЛ-6, т. е. ПКР может индуцировать системный воспалительный ответ, что подтверждают наши данные о повышении уровней 7 БОФ. Повышение уровня СРБ в крови говорит о плохом прогнозе как в случае локализованного, так и метастатического ПКР. СРБ служит потенциальным маркером эффективности лечения, снижение его уровня после нефрэктомии у пациентов с метастазами сопровождается увеличением продолжительности жизни пациентов [22].

Что касается остальных 8 белков, уровни которых в нашем исследовании возрастают по мере прогрессирования заболевания, нет данных об их связи с ПКР. Однако показано, что альфа-1В-гликопротеин повышается при раке молочной железы [23], мочевого пузыря [24] и толстой кишки [25]. Этот белок — наиболее значимый маркер рака мочевого пузыря. Он обнаруживается в моче всех больных раком мочевого пузыря, но отсутствует в моче лиц контрольной группы [24]. К сожалению, его функция в организме пока неизвестна. Тромбоцитарный фактор 4 принадлежит к семейству хемокинов, секретируется тромбоцитами для связывания гепарина, играет роль в воспалительных процессах и при заживлении ран [26]. Его уровень повышается при прогрессии рака предстательной [26] и поджелудочной железы [27]. Он является возможным маркером началь-

ных стадий некоторых видов рака в ткани, но не в плазме крови [28]. Циклинзависимая киназа CDK5 участвует в передаче болевых сигналов, а также в процессах созревания и миграции нейронов. Ингибирование CDK5 приводит к торможению роста клеток рака поджелудочной [29] и молочной железы [30].

Белки, уровни которых снижаются при ПКР. Экспрессия аполипопротеина А-IV значительно снижается в плазме крови при ПКР. В нашем исследовании его уровень уменьшился в 1,8 раза при I–II и в 4 раза при III–IV стадиях заболевания по сравнению с контролем. Этот белок играет важную роль в процессах переноса жиров и липопротеинов в организме и связан с развитием атеросклероза. Его уровень в плазме крови снижается при раке яичника [31], однако причины таких изменений неизвестны.

Тимозин-бета 4 описан в литературе как возможный маркер ПКР [32] (вместе с родственным бетатимозином 10), но в цитируемой работе было выявлено повышение его уровня в опухолевой ткани, тогда как в нашем исследовании его уровень в плазме крови снижался. Тимозин бета-4 присутствует во всех клетках организма, его основная биологическая роль заключается в связывании с глобулярным актином при образовании и разрушении микрофиламентов.

Относительно остальных белков нет данных литературы об их связи с ПКР, но есть сведения об изменениях их уровней при других онкологических заболеваниях. Так, уровень S100-кальцийсвязывающего белка A9 (S100A9) повышен при раке легкого и коррелирует с метастазированием [33]. В клеточных линиях рака молочной железы понижена экспрессия таких секретируемых белков, как PEDF, ингибитор сысороточной протеазы C1 [34]. По мнению авторов, такие изменения приводят к увеличению инвазивности раковых клеток за счет ремоделирования межклеточного матрикса. Снижение уровня стромального белка люмикана в нашем исследовании (в 2,5 раза на поздних стадиях РП) подтверждает эту гипотезу.

Важную роль при возникновении и прогрессии некоторых онкологических заболеваний играет семейство белков инсулиноподобного ростового фактора (IGF). Эти белки являются частью сложной системы коммуникации клетки с ее физиологическим окружением. IGF-I обладает эффектом, схожим с инсулином, играет важную роль в клеточной пролиферации и ингибировании апоптоза, биосинтезе ДНК, а также при эмбриональном развитии различных тканей. IGF-II обладает схожими функциями, с той лишь разницей, что он преимущественно является эмбриональным белком. Однако и во взрослом организме он играет важную роль и экспрессируется главным образом в мозге, поджелудочной железе и почках. Оба этих протеина регулируются семейством IGF-связывающих белков, модулирующих эффекты IGF различными пу-

тами: связывая IGF вместо рецепторов и, наоборот, селективно перенося IGF к рецепторам. В нашей работе было обнаружено снижение уровня кислотной лабильной субъединицы IGF-связывающего белка (IGFBP) (в 1,5 раза при I–II стадии РП, на поздних стадиях концентрация оказалась ниже предела обнаружения). Это согласуется с данными литературы о том, что снижение уровня IGFBP в плазме крови связано с повышенным риском и плохим прогнозом рака толстой кишки, предстательной железы, легкого и поджелудочной железы [35].

Заключение

Таким образом, в нашем исследовании при сравнении протеомов плазмы крови человека в норме и при

ПКР выявлены закономерные изменения уровней 2 семейств белков: протеинов острой фазы и белков, отвечающих за устойчивость и ремоделирование межклеточного матрикса. Уровни 7 белков острой фазы повышаются, что можно объяснить как воспалительной реакцией организма на опухоль, так и секрецией воспалительных цитокинов раковыми клетками. Уровни 3 белков, отвечающих за поддержание стабильности межклеточного матрикса и его ремоделирование, наоборот, снижаются по мере прогрессии заболевания, что, скорее всего, способствует увеличению инвазивного и метастатического потенциала. Выявленные белки являются потенциальными маркерами ПКР, однако для их валидации требуются исследования на больших выборках больных ПКР и «контрольных» лиц.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ljungberg B., Cowan N.C., Hanbury D.C. et al. EAU guidelines on renal cell carcinoma: the 2010 update. *Eur Urol* 2010;58:398–406.
2. Chow W.H., Dong L.M., Devesa S.S. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nature Reviews Urology* 2010;7:245–57.
3. Nickerson M.L., Jaeger E., Shi Y. et al. Improved identification of von Hippel-Lindau gene alternations in clear cell renal tumors. *Clin Cancer Res* 2008;14:4726–34.
4. Заридзе Д.Г. Профилактика рака. М.: ИМА-ПРЕСС, 2009.
5. Perroud B., Lee J., Valkova N. et al. Pathway analysis of kidney cancer using proteomics and metabolic profiling. *Mol Cancer* 2006;5:64–81.
6. Craven R.A., Stanley A.J., Hanrahan S. et al. Proteomic analysis of primary cell lines identifies protein changes present in renal cell carcinoma. *Proteomics* 2006;6:2853–64.
7. Banks R.E., Craven R.A., Harnden P. et al. Key clinical issues in renal cancer: a challenge for proteomics. *World J Urol* 2007;25:537–56.
8. Opatrná S., Chiangjong W., Korabecná M. et al. Plasma proteome profiling of von Hippel-Lindau disease after total and subtotal nephrectomy: a preliminary study. *Clin Biochem* 2010;43:142–9.
9. Eichelberg C., Junker K., Ljungberg B. et al. Diagnostic and prognostic molecular markers for renal cell carcinoma: a critical appraisal of the current state of research and clinical applicability. *Eur Urol* 2009;55:851–63.
10. Janech M.G., Raymond J.R., Arthur J.M. Proteomics in renal research. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;292:F501–F512.
11. <http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/5969-1597.pdf>
12. http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G2458-90003_SamplePrepGuide_online.pdf P. 67–77.
13. Martosella J., Zolotarjova N., Liu H. et al. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic prefractionation of immunodepleted human serum proteins to enhance mass spectrometry identification of lower-abundant proteins. *J Proteome Res* 2005;4:1522–37.
14. www.hppp.org
15. Saito K., Tatokoro M., Fujii Y. et al. Impact of C-reactive protein kinetics on survival of patients with metastatic renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2009;55:1145–54.
16. Markiewski M.M., Lambris J.D. Is complement good or bad for cancer patients? A new perspective on an old dilemma. *Trends Immunol* 2009;30:286–92.
17. Sadrzadeh S.M., Bozorgmehr J. Haptoglobin phenotypes in health and disorders. *Am J Clin Pathol* 2004;121(Suppl):97–104.
18. Karpova M.A., Moshkovskii S.A., Toropygin I.Y. et al. Cancer-specific MALDI-TOF profiles of blood serum and plasma: biological meaning and perspectives. *J Proteomics* 2010;73:537–51.
19. Tolson J., Bogumil R., Brunst E. et al. Serum protein profiling by SELDI mass spectrometry: detection of multiple variants of serum amyloid alpha in renal cancer patients. *Lab Invest* 2004;84:1220–1.
20. Ramankulov A., Lein M., Johannsen M. et al. Serum amyloid A as indicator of distant metastases but not as early tumor marker in patients with renal cell carcinoma. *Cancer Lett* 2008;269:85–92.
21. Meyer H.A., Tulle A., Jung M. et al. Identification of stanniocalcin 2 as prognostic marker in renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2009;55:669–78.
22. Reichle A., Grassinger J., Bross K. et al. C-reactive protein in patients with metastatic clear cell renal carcinoma: an important biomarker for tumor-associated inflammation. *Biomark Insights* 2007;1:87–98.
23. Zeng Z., Hincapie M., Haab B.B. et al. The development of an integrated platform to identify breast cancer glycoproteome changes in human serum. *J Chromatogr A* 2010;1217:3307–15.
24. Kreunin P., Zhao J., Rosser C. et al. Bladder cancer associated glycoprotein signatures revealed by urinary proteomic profiling. *J Proteome Res* 2007;6:2631–9.
25. Alvarez-Chaver P., Rodriguez-Piceiro A.M., Rodriguez-Berrolcal F.J. et al. Identification of hydrophobic proteins as biomarker candidates for colorectal cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:529–40.
26. Cervi D., Pak B., Venier H.L. et al. Micronutrients attenuate progression of prostate cancer by elevating the endogenous inhibitor of angiogenesis, platelet factor-4. *BMC Cancer* 2010;10:258–258.
27. Fiedler G.M., Leichtle A.B., Kase J. et al. Serum peptidome profiling revealed platelet factor 4 as a potential discriminating Peptide associated with pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:3812–9.
28. Cervi D., Yip T.-T., Bhattacharya N. et al. Platelet-associated PF-4 as a biomarker of early tumor growth. *Blood* 2008;111:1201–7.
29. Feldmann G., Mishra A., Hong S.M. et al. Inhibiting the cyclin-dependent kinase CDK5 blocks pancreatic cancer formation and progression through the suppression of Ras-Ral signaling. *Cancer Res* 2010;70:4460–9.
30. Upadhyay A.K., Ajay A.K., Singh S. et al. Cell cycle regulatory protein 5 (Cdk5) is a novel downstream target of ERK in carboplatin induced death of breast cancer cells. *Curr Cancer Drug Targets* 2008;8:741–52.
31. Haiman M., Salvenmoser W., Scheiber K. et al. Immunohistochemical localization of apolipoprotein A-IV in human kidney tissue. *Kidney Int* 2005;68:1130–6.
32. Hall A.K. Amplification-independent overexpression of thymosin beta-10 mRNA in human renal cell carcinoma. *Ren Fail* 1994;16:243–54.
33. Sparvero L.J., Asafu-Adjei D., Kang R. et al. RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts), RAGE ligands, and their role in cancer and inflammation. *J Transl Med* 2009;7:7–17.
34. Liang X., Huuskonen J., Hajivandi M. et al. Identification and quantification of proteins differentially secreted by a pair of normal and malignant breast-cancer cell lines. *Proteomics* 2009;9:182–93.
35. Forstenberger G., Senn E., Morant R. et al. Serum levels of IGF-1 and IGFBP-3 during adjuvant chemotherapy for primary breast cancer. *Breast* 2006;15:64–8.