

О.Б. Дынник²В.Н. Залесский¹¹Национальный научный центр «Институт кардиологии им. Н.Д. Стражеско», Киев²Медицинское научно-практическое объединение «Медстрой», Киев**Ключевые слова:**

протеомный анализ, биоаналитические технологии, ревматические заболевания.

**СОВРЕМЕННЫЕ
БИОАНАЛИТИЧЕСКИЕ
(ПРОТЕОМНЫЕ) ТЕХНОЛОГИИ
В ЛАБОРАТОРНОЙ
ДИАГНОСТИКЕ
РЕВМАТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ****Резюме.** Проанализирована роль биоаналитических (протеомных) технологий в стратегии обеспечения процесса идентификации новых биомаркерных молекул и ранней диагностики ревматических заболеваний.

На протяжении последних десятилетий использование биоаналитических (клинико-химических по зарубежной терминологии) лабораторных тестов в ревматологической практике экспоненциально увеличивалось, и этот рост продолжается в настоящее время (Uchida T. et al., 2002; Ji-Yeon K. et al., 2003). Новые биотехнологические достижения на каждом этапе своего развития обуславливали замену старых лабораторных методик на более совершенные, более точные и чувствительные, а также введение дополнительных тестов, позволяющих диагностировать наличие ранних провоспалительных реакций, системные проявления ревматического процесса, а также определять его биологические маркеры (Uchida T. et al., 2002; Kantor A.B. et al., 2004).

В биохимических лабораториях крупных диагностических и медицинских центров для анализа биомаркерных молекул, являющихся индикаторами как физиологических состояний, так и динамики заболеваний, широко используют высокотехнологические автоматизированные биоанализаторы большой мощности, включающие блок термостатирования, проточную кювету, что позволяет измерять кинетику реакций, учитывать разность абсорбции на двух длинах волн. Однако эти приборы, принцип работы которых основан на классических биохимических методах определения аналитов, постепенно уступают место новым «революционным» (протеомным и др.) биотехнологиям (Xiang Y. et al., 2004).

Прорыв в молекулярно-генетических исследованиях (Возіанов О.Ф., 2003) способствовал внедрению в практику клинико-диагностических лабораторий методов ДНК-диагностики, среди которых лидируют полимеразная цепная реакция (ПЦР) и гибридизация ДНК (Lockhart D.J., Winzler E.A., 2000). Отмечается стремительный процесс внедрения новых систем ДНК-диагностики — биологических микрочипов (Маршалл В.Д., 2000; Залесский В.Н., Дынник О.Б., Великая Н.В. и соавт., 2005). Существенный прогресс отмечен в области сравнительного изучения клеточных протеомов, хотя определение моделей экспрессии протеинов оказалось более сложным в техниче-

ском отношении процессом, чем ДНК/РНК-профилирование (Porubleva L., Chituis P.R., 2000).

В настоящем аналитическом исследовании авторы сочли возможным остановиться лишь на основных биомедицинских технологиях, имеющих, на наш взгляд, наибольшие перспективы в изучении диагностических особенностей развития ревматических заболеваний, а также на отдельных вопросах истории их становления и развития.

Становление и развитие протеомных биотехнологий для контроля ревматического процесса. На рубеже XX–XXI вв. интенсивное изучение геномов разных видов организмов (а среди них в первую очередь генома человека) привело к накоплению новой, принципиально важной, информации для многих разделов общей биологии и медицины (Баев А.А., 1990). Наличие особых объектов исследования (геномов), специфичность решаемых задач, создание и использование целого комплекса специальных биомедицинских технологий — все это в совокупности позволило говорить о сложившейся новой области знаний о геномике или точнее о структурной геномике (Баев А.А., 1990; Возіанов О.Ф., 2003). Структурная геномика уже располагает обобщенными данными о геномах достаточно сложных организмов, относящихся как к прокариотам, так и эукариотам (Lockhart D.J., Winzler E.A., 2000). Кроме того, специалисты структурной геномики имеют базы данных о более 1000 сравнительно коротких геномах, относящихся к клеточным органеллам, вирусам и др. (Tuers M., Mann M., 2003). Несомненно, среди всех этих данных для медицины особенно важны полученные результаты практически полного секвенирования человеческого генома (Lander E.S. et al., 2001). В 2001 г. одно из ключевых сообщений представил международный консорциум, объединяющий примерно 20 исследовательских групп из США, Великобритании, Японии, Франции, Германии и Китая (IHGSC, 2001), другое опубликовала возглавляемая К. Вентером группа авторов из корпорации «Celera Genomics», создавшая свою собственную стратегию геномного анализа (Venter C.J. et al., 2001). Прове-

денный группой исследователей из компании «Celera Genomics» анализ 26 383 генов, выявленных в геноме человека, позволил сделать заключение о возможных функциях (~60%) генов (Venter C.J. et al., 2001).

Достижения структурной геномики стали основой для перехода к так называемой функциональной геномике (Saner S. et al., 2005). Предмет исследования функциональной геномики часто определяют как изучение генной экспрессии и ее результатов (Wilkins M.R., 1996). Главными объектами внимания функциональной геномики признаны генные функции и соответственно к сфере функциональной геномики относятся разнообразные исследования особенностей работы геномов, цель которых расширение теоретических представлений о формировании фенотипов в норме и при различных заболеваниях.

Четыре развивающихся направления исследований в области функциональной геномики включают: 1) изучение координированной работы генов по образованию первичных транскриптов с последующим сплайсингом и формированием наборов зрелых мРНК (транскриптомика); 2) изучение белковых продуктов генной экспрессии, включая их посттрансляционные модификации (протеомика); 3) изучение генетических механизмов формирования субклеточных структур, клеточной дифференцировки и гистогенеза (цитомика); 4) изучение механизмов контроля формирования различных фенотипов в норме и при патологии (Brownstein M.J., Khodursky A., 2003). Соответственно для протеомики постгеномного периода принципиально важное значение приобретает как выявление, так и сравнительная идентификация (с известными белками) новых белковых фракций, полученных из исследуемого объекта, которые обычно характеризуются определенными координатами на «белковых портретах». Это позволяет сопоставлять геномную, транскриптомную и протеомную информацию, что существенно повышает значимость создаваемых белковых банков данных. В целом роль протеомики может быть определена как интегративный анализ функционального состояния генома на уровне белковых продуктов генной экспрессии.

Современные стратегии поиска биомаркерных молекул ревматических заболеваний, нацеленные на анализ экспрессированных белков, в настоящее время считают более предпочтительными, поскольку протеомные технологии позволяют осуществлять контроль над обратимой трансляционной модификацией белков (Mann M., Jensen O.N., 2003) специфическими ферментами, вовлеченными в процессы развития заболеваний суставов, мышцы сердца и стенки сосудов (Robinson W.H. et al., 2002; Loscalzo J., 2003; Xiang Y. et al., 2004; Залесский В.Н., Дынник О.Б., 2005). Поэтому целесообразно рассмотреть подробнее характерные особенности протеомных технологий, применяемых в ревматологии.

Биомедицинские технологии протеомного анализа. В последние годы наметилась тенденция к использованию биотехнологии лазерной микродиссекции в постгеномных исследованиях, в частности в протеомике, для выделения высоко-

гомогенной по составу клеточной популяции непосредственно из биоптатов.

Лазерная захватывающая микродиссекция («Laser Capture Microdissection», LCM) — метод позволяет выделять (без повреждения) клетки единого морфологического типа, представленные в исследуемом образце, в минимальном количестве (менее 5%) независимо от внеклеточного матрикса. Технология разработана в 1996 г. Эммарт-Баком и соавторами (цит. по R.F. Bonner, 1997) и стандартизирована с последующей реализацией в виде коммерческой автоматизированной системы фирмой «Arcturus Engineering Inc» (США) в 1997 г. Аппаратное обеспечение для LCM представляет собой проекционный светооптический микроскоп, совмещенный с источником лазерного излучения, и компьютер с программным обеспечением для управления этапами микродиссекционного анализа и последующей обработки полученных данных. Принцип лазерной микродиссекции заключается в активации лучом лазера участков специальной пленки для переноса, располагающейся непосредственно над исследуемым образцом; прикреплении клеточного материала к пленке с последующим переносом его на пленку для использования на дальнейших этапах работы. В коммерческих системах, реализуемых фирмой «Arcturus Engineering Inc», пленка для переноса вмонтирована в нижний край сменных прозрачных капсул, что существенно облегчает позиционирование пленки и дальнейший перенос образца. В настоящее время возможности таких устройств ограничены особенностями процедуры микродиссекции, что позволяет получить пул из 25 000–100 000 клеток (Bonner R.F., 1997), а это влияет на тактический выбор программы протеомного анализа.

В протеомном анализе также применяют комбинацию двух методов — двумерного (2D) электрофореза и масс-спектрометрии белков (масс-спектрометрия) результатов методом биоинформатики (Арчаков А.И., 2000). Одной из наиболее перспективных модификаций протеомной технологии является комбинация методов MALDI-tof («Matrix Assistent Laser Desorb Ionization time-of flight») (Lottspeich F., 1999). Принцип этого подхода заключается в том, что белки из неокрашенного LD-геля электроблоттингом переносят на мембрану с иммобилизованным трипсином, в котором они расщепляются до белковых фрагментов. Полученные белковые фракции улавливаются второй мембраной, которая считывается в MALDI-tof тандемном масс-спектрометре и позволяет прочесть последовательность пептидов со скоростью сотен образцов в час. Используется обратная фаза (LS) для разделения пептидов из чрезвычайно сложных смесей с целью определения аминокислотных остатков в белковых молекулах.

Белок-микрочиповые технологии. Перспективным с точки зрения протеомной технологии анализа ревматических заболеваний являются белковые микрочипы, создаваемые на основе технологии SELDI («Surface-Enhanced Laser Desorbition Ionization») (Isag H.J., 2002; Schweitzer B., Kingsmore S.F., 2002). Этот метод имеет определенные преимущества перед другими технологиями (LC-MS, жидкостная

хромато-масс-спектрометрия; 2D — электрофорез в геле; HPLC, обратно-фазовая высокоразрешающая жидкостная хроматография; ELISA и др.) из-за его высокой чувствительности (фемтомолекулярный диапазон) и легкой адаптации к диагностическому формату (Issag H.J., 2002). Для удобства интерпретации результатов компания «CIPHERGEN» предоставляет специальный пакет программ, который представляет результаты масс-спектрометрического определения, зафиксированного на хроматографическом носителе биоматериала в виде денситограмм с указанием «интенсивности» каждой полосы масс-спектрометрического пика ионов анализируемых белков. Следует отметить, что существенно расширена граница оценки масс-спектров, анализируемых с применением технологии SELDI (до 250 кДа). Это позволяет использовать SELDI в медицинских учреждениях без специальной подготовки персонала в области масс-спектрометрии. В литературе уже появились первые сообщения об успешном применении разработок компании «CIPHERGEN» для выявления новых маркеров патологических процессов, а также для эффективного отбора патологически измененных синовиоцитов и альтернативно измененных комплексов синовиальной жидкости на основе выявления их специфических маркерных белков (Uschida T. et al., 2002).

Кроме описанного выше варианта **белковых чипов**, являющегося по существу примером удачного применения многомерной хроматографии, существуют многочисленные разработки, направленные на замену дорогостоящей многоэтапной процедуры анализа белков на высокопроизводительные и сравнительно недорогие системы для клинического применения. Первая группа разработок касается создания миниатюризированных устройств по аналогии с **ДНК-чипами** (Мирзабеков А.Д. и соавт., 2002), которые используют **моноклональные антитела** (МКАТы) или их аналоги (**аптамеры** («Affibody»), **одноцепочечные антитела**) для построения микроплатформ на известных маркерах, определяемые в настоящее время традиционными методами лабораторной диагностики. Одной из лидеров в этой области является нидерландская фирма «Glancus Proteomics», известная производством широкого пула МКАТов практически для всех экспрессируемых белков человека с последующим нанесением их на твердую фазу и анализом в формате микро-ИФА. В продаже имеются белковые микрочипы для определения цитокинов фосфатаз, белков воспалительного стресса. Предположительно к 2007 г. планируют выпуск **панелей белковых чипов**, позволяющих количественно определить набор из нескольких сотен белков, имеющих клиническое значение (Petricoin E.F., 2002).

Биосенсорные технологии. Биосенсоры представляют собой инновацию на стыке биологии и электроники, новый класс аналитических устройств, использующих иммобилизованные биологические материалы для «узнавания» молекул (Варфоломеев С.Д. и соавт., 2000; Turner A.P., 2000). Впервые идею создания биосенсорного устройства выдвинули около 30 лет назад L.C. Clarck и C. Lyonns (цит. по С.Д. Варфоломеев, 1997). Эта идея состояла

в использовании ферментного электрода — электрохимического датчика с иммобилизованным на его поверхности ферментом. За прошедшие десятилетия были реализованы многочисленные разработки по различным аспектам электрохимии белков на поверхности электрода, что привело к созданию ряда биосенсоров на основе ферментных электродов, часть из которых получила промышленную реализацию. Основные типы биосенсоров подразделяют в зависимости от биочувствительного элемента на ферментные, иммунологические, микробные и от типа детектора — на электрохимические, оптоэлектрические, оптические, акустические (Беленький Б.Г., 2001; Chi Xiw-Fei et al., 2001).

Основное преимущество этой технологии заключается в том, что определенный аналит можно исследовать в сложной смеси, не прибегая к дополнительным манипуляциям, не связанным с использованием химических реагентов (безреагентные методы анализа) (Варфоломеев С.Д. и соавт., 2000). Кроме того, измерение происходит практически мгновенно. Так, например, время отклика разработанного P.A. Pottger и соавторами (2004) амперометрического ферментного биосенсора для определения в биопробах глюкозы, гормонов и лекарственных веществ составляет 10 с. Из биосенсорных технологий, получивших коммерческую реализацию, наиболее перспективными (наряду с амперометрическими ферментными электродами с повышенной чувствительностью) являются аффинные биосенсоры с оптическим, парамагнитным и электрохимическим детектированием и биосенсоры на основе синтетических рецепторов (Turner A.P., 2000).

Функционально современные биосенсоры сопоставимы с биорецепторами клеток, способными воспринимать все типы сигналов, поступающих из окружающей среды. R.B. Lennox и соавторы (2004) разработали высокочувствительный, быстрый планарный микробиосенсор и методику его применения для определения лигандрецепторных взаимодействий. Поверхность рабочего электрода биосенсора модифицирована монослоем длинноцепочного углевода. В монослой включены молекулы пептида, состоящие из двух субъединиц, одна из которых связана с подложкой биосенсора, другая — с молекулой лиганда. При связывании последнего со специфическим рецептором происходит изменение электрической проводимости монослоя. Разработан волоконно-оптический флуориметрический мультиклеточный биосенсор для одновременного экспресс-анализа множества биологических компонентов в одной пробе с целью осуществления их мониторинга. Прибор включает пучок оптических волокон, на торце которых в микрополостях иммобилизованы различные типы клеток, специфически откликающихся изменением флуоресценции на воздействие аналитов в образце (Walt D.R. et al., 2003). Вероятно, в обозримом будущем можно будет использовать идею этой разработки для прижизненной визуализации процессов клеточного метаболизма в полых органах (в т.ч. в полостях крупных суставов) методом

оптической биопсии (Seppa N., 2001) на основе использования новых биосенсор-ассоциированных эндоскопических систем.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ПРОТЕОМНОГО АНАЛИЗА БИОМАРКЕРНЫХ МОЛЕКУЛ ПРИ РЕВМАТИЧЕСКОМ АРТРИТЕ И ОСТЕОАРТРИТЕ

Исследования различий белкового профиля сыворотки крови у больных остеоартритом (ОА), ревматоидным артритом (РА) и у добровольцев (в контроле) Y. Xiang и соавторы (2004) осуществили методом двухмерного (2D) электрофореза. Антигенные участки белков определяли иммуноблоттингом и в последующем идентифицировали методом масс-спектрометрии. Антигенные свойства белков подтверждали и уточняли с помощью аутоантител, выявляемых с применением рекомбинантных белковых молекул в группах пациентов с ОА, РА и другими воспалительными заболеваниями суставов. В результате почти 90 белковых субъединиц было идентифицировано в сыворотке крови у больных с РА, но не в сыворотке пациентов с ОА. Одна из этих белковых фракций была зарегистрирована под названием «триосефосфат изомеразы» (TPI). IgG-тип антиTPI-аутоантител был выявлен в 25% обработанных образцах сыворотки крови и в 24% — синовиальной жидкости больных с ОА, тогда как менее чем 6% сыворотки крови больных с РА и системной красной волчанкой пробы отличались антиTPI-позитивностью. Исследуемый аутоиммунный профиль больных с ОА оказался более обширным, чем у пациентов с РА, что, по мнению авторов, могло отображать при этом ОА-специфическую роль аутоиммунных реакций. В этой связи аутоантитела к TPI, выявляемые преимущественно в образцах у больных с ОА, использовали в качестве диагностических биомаркеров прогрессирования ОА. Аналогичным образом такой энзим, как глюкозо-6-фосфат изомеразы (GPI), использовали в качестве аутоантигена биомаркерассоциированной диагностики РА (Y. Xiang et al., 2004).

В работе A. Sinz и соавторов (2002) методику двухмерного гель-электрофореза в сочетании с MALDI-tof-MS использовали с целью анализа протеинов плазмы крови и синовиальной жидкости у пациентов с различными формами артрита. По данным анализа белкового профиля исследуемых жидких сред организма выявили: 1) продукты деградации бета-цепи фибриногена в синовиальной жидкости у всех пациентов; 2) белки кальгранулина В (MRP 14) и кальгранулин С исключительно в синовиальной жидкости пациентов с РА; 3) фракцию амилоидного А-протеина в плазме крови и синовиальной жидкости больных с РА, но не у больных с ОА. В ближайшие годы предполагают выявление многих новых биомаркерных молекул пептидов, связанных с болезньюассоциированными состояниями в ревматологии (Randolph T.W. et al., 2005).

Сравнительно недавно протеиновый профиль синовиальной жидкости больных с РА и ОА при использовании сочетанной платформы (SELDI-MS) протеомного анализа был получен T. Uchida и соавторами (2002) с предварительным проведением

2D-электрофореза для уточнения уровня экспрессии специфических протеинов. Перспективным методом в ревматологии оказалась процедура белкового микрочипирования, созданная на основе технологии SELDI, которая позволила выявить и идентифицировать биомаркеры прогрессирования РА на основании анализа специфической экспрессии протеинов синовиальной жидкости. Одной из «кандидатных» биомаркерных молекул оказался 10850 D-протеин, полученный после очистки от балластных соединений в так называемой серой зоне на колонке с помощью гель-электрофореза и в последующем идентифицированный путем сравнения с банком данных картированных ранее пептидов, а также профилированный с применением методов биоинформатики в миелоидсвязанный протеин-8 (MRP-8). Данная биотехнология весьма перспективна, поскольку позволяет свести количественные данные обо всех белковых фракциях, различающихся по представленности на несколько порядков в одно синтетическое компьютерное изображение, и ограничить процесс обнаружения биомаркерных молекул в пределах 1 ч (Zucht H.D. et al., 2005).

Масс-спектрометрический анализ, проводимый в рамках протеомных исследований, хорошо зарекомендовал себя в оценке посттрансляционных модификаций белковых молекул. Сравнительно недавно A.V. Kantor и соавторы (2004) сообщили об успешном использовании биоаналитической платформы, включающей тандемную масс-спектрометрию в сочетании с лазерной сканирующей цитофлуориметрией в потоке, а также жидкостной хроматографией и газовой хромато-масс-спектроскопией с целью фенотипирования белков сыворотки крови пациентов с РА. Подготовка образцов сыворотки и плазмы крови включала уменьшение количества белковых комплексов методами сепарации на низко- и высокомолекулярные фракции. Фракции с низкой молекулярной массой анализировались методами газовой хромато-масс-спектрометрии и HPLC-electro spray ионизационной масс-спектрометрии. Фракции с высокой молекулярной массой подвергались процедуре разделения иммуноглобулинов и альбумина методом аффинной хроматографии в процессе мониторинга высокомолекулярных пептидов и их комплексов. При этой процедуре трипсинизации подвергались крупные фрагменты пептидных комплексов с последующим разделением фрагментов на хроматографической колонке, соединенной с масс-спектрометром. Применение этой технологии позволило выявить в сыворотке крови больных с РА по сравнению с контролем (здоровые добровольцы) значительное количество новых биомаркерных молекул, связанных с хронической стадией суставного провоспалительного процесса. Среди них: альфа-1-антитрипсин, альфа-1-гликопротеин, альфа-2-гликопротеин, альфа-1-антихимотрипсин, церулоплазмин и гаптоглобин. Повышенное содержание отдельных биомаркерных молекул оказалось низкодостоверным (в т.ч. сывороточный трансферин и ретинолсвязанный протеин). Углубленный анализ около 2500 белковых фрагментов выявил порядка

70 характерных пиков, позволивших объединить все белковые фракции в две большие группы (с достоверностью различий $p < 0,001$) и около 500 характерных пиков (с достоверностью межгрупповых различий $p < 0,05$). Хотя полученные результаты исследований авторы расценивают как предварительные, они могут иметь существенный потенциал при использовании биоаналитической платформы в будущем с целью идентификации болезньюассоциированных биомаркерных молекул (Rantor A.B. et al., 2004).

Другой общепризнанной областью применения аналитических платформ в медицине и, в частности в ревматологии, является биомаркерная система двух белковых микрочипов (Petricoin E. et al., 2004). Функционируя в формате (tof) масс-спектрометрии, она позволяет проводить анализ образцов с помощью SELDI-масс-спектрометрического анализа белковых микрочипов.

Наиболее эффективно используемой диагностической биотехнологией выявления пространственной структуры белковых молекул, находящихся в состоянии, близком к физиологической норме, является протонная (^1H) ядерная магнитно-резонансная спектроскопия (^1H NMRS) (Rehm T. et al., 2002). NMRS — технология высокого разрешения, позволяющая выявлять активные каталитические участки молекул ферментов и анализировать надмолекулярные структуры белок-белкового взаимодействия в растворах. NMRS также уникальный метод спектроскопической оценки отдельных атомных структур в составе биологических молекул на основе использования методики меченых изотопов, позволяющей изучать процессы внутриклеточного метаболизма неинвазивным путем (Clore G.M., Gronenborn A.M., 1998). Образцами жидких сред организма, используемыми в NMRS-исследованиях, являются синовиальная и спинномозговая жидкости, моча и плазма крови. С помощью этой технологии проводят анализ продуктов распада белков (метаболический профиль) при ревматических заболеваниях сердца и суставов. В синовиальной жидкости среди таких метаболитов выявлены гиалуронан; липопротеинассоциированные жирные кислоты (триацил-глицерол, хиломикроны); глицерол; кетоны (3D-гидрокси-бутиран, ацетоацетат, ацетон); пируват; N-ацетил гликопротеины; глюкоза; лактат; аминокислоты (аланин, валин).

D.P. Naughton и соавторы (1993) применяли метод ^1H NMRS-анализа для оценки профиля метаболитов синовиальной жидкости у добровольцев и сравнивали полученные данные с результатами анализа синовиальных белков у больных с РА. Состояние здоровых суставов определяли по их умеренно выраженному гипоксическому статусу (повышенный уровень лактата). У больных с РА в синовиальной жидкости выявлены повышенные количества NMR-ассоциированных липопротеинсвязанных жирных кислот и гликопротеинов «острой фазы», а также следы глюкозы и кетоны — продукты анаэробного метаболизма — в высоких концентрациях.

Известно, что протеоглики стабилизируют процесс метаболизма в хрящевой ткани суставной поверхности, а снижение их содержания в суставном хряще характеризует начальные этапы развития ОА. Поэтому изучение протеогликанов и их фрагментов крайне важно для определения степени прогрессирования процесса внутрисуставной деструкции. E. Insko и соавторы (1999) отметили высокую эффективность применения метода ^1H NMRS для оценки степени повреждения хрящевой ткани и показали, что отрицательно заряженные протеоглики матрикса способствуют стабилизации уровня ионов Na^+ (~300 мкмоль и выше) у здоровых добровольцев и поддерживают нормальное функционирование хрящевой ткани. В то же время установлено, что появление одноквантовых сигналов на ^1H NMRS-гистограммах, связанное со снижением содержания протеогликанов матрикса, свидетельствовало о прогрессировании деструктивных процессов в хрящевой ткани.

Уникальные возможности метода NMRS также обусловлены проведением полуколичественной оценки слабоструктурированных участков отдельных белковых комплексов и идентификацией их гетерогенной структуры, связанной с конформационными изменениями (Rehm T. et al., 2002). Это было подтверждено в исследованиях Y. Tokano и соавторов (1997), которым удалось идентифицировать «маскирующийся» иммуноглобулин G2 методом NMRS у пациентов с РА. Семейство молекул иммуноглобулина G (IgG), представленное антигеном ревматоидного фактора (RF), включает 4 подкласса (IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4). Эти подклассы отличаются различными биологическими функциями (Tokano Y. et al., 1997). В серии исследований (Somerville L. et al., 1990; Hood D. et al., 1991) авторы применили CPMG-опцию спин-эхо последовательности ^1H NMRS (T_2 -взвешенный режим) спектроскопического анализа для исследования конформационных изменений белков и идентификации их региональной подвижности. Эта спектроскопическая методика отчетливо подтверждает, что уровни содержания IgG 2 у больных с РА оказались более высокими по сравнению с контролем. В то же время отсутствие достоверных различий между этими группами было отмечено методом ELISA. Возникшие расхождения в результатах исследований авторы связывали с наличием конформационных изменений в структуре IgG 2-белков у пациентов с РА.

В последнее десятилетие получила развитие новая биотехнология протеомного анализа — поверхностно-плазменная резонансная («Surface-Plasmon Resonance», SPR) спектроскопия (Morsolits H. et al., 2002), которая позволила осуществлять исследования на уровне белок-белкового взаимодействия. Эта технология предусматривает получение данных о тканевой специфичности экспрессии белков и их идентификации путем сравнения с ранее картированными белковыми молекулами методами биоинформации, а также об их аффинности и кинетике межбелкового взаимодействия. SPR является оптическим феноменом,

позволяющим использовать изменение концентрации растворимых молекул в пределах биоспецифической поверхности (на границе раздела сред). Диагностический сигнал возникает на поверхности тонкой металлической пленки в условиях полного внутреннего светотражения и зависит от коэффициента рефракции растворов, находящихся в контакте с поверхностью подложки. Молекулы белка в исследуемом образце вносят изменения в его рефрактивный индекс, что приводит к подъему изучаемого SPR-сигнала биоспецифической поверхности в области белок-белкового взаимодействия (Mozsolits H. et al., 2002). Белок-белковые взаимодействия в пределах биоспецифической поверхности позволяют оценить их кинетику в участках связывания, и этот процесс может быть зарегистрирован в режиме реального времени. Методика является примером удачного продолжения развития биосенсорных технологий и успешной реализации разработок по различным аспектам электрохимии белков, олигонуклеотидов и мембраносвязанных рецепторов (Bender V. et al., 2004).

Известно, что гликозилирование белков является важнейшим биологическим процессом, интенсивно протекающим в условиях системного воспаления при ревматических заболеваниях (Turner G.A., 1992). Реакции гликозилирования ассоциированы с заболеваниями, при которых проводимый мониторинг лектинов или специфических антител прямо зависит от структуры специфических олигосахаридов (Kim Y.J. et al., 1997). Используемые методы выявления и идентификации этих сахаров включают аффинную хроматографию, перекрестный аффинноиммуноэлектрофорез, капиллярный 2D-электрофорез, дот-иммуноблоттинг, обратнотазовую высокоразрешающую жидкостную хроматографию и метод ELISA (Mozsolits H. et al., 2002). На получаемых сенсограммах подробно регистрируется кинетика и оценивается аффинность аналитлигандного взаимодействия благодаря выявлению индекса рефракции в условиях ассоциации или диссоциации аналитов от иммобилизованного лиганда (Johnson U. et al., 1991; Fagerstam L.G. et al., 1992; Liedberg B. et al., 1993). Технология аффинных биосенсоров позволяет выявлять участки присоединения без использования радиоактивной метки или методики образования «вторичных» антител.

В ряде публикаций (Tsuchiya N. et al., 1993; Liljebland M. et al., 2000) отмечено, что IgG у пациентов с РА содержат большую порцию олигосахаридов (без галактозы), сравниваемую с повышенным содержанием IgG в сыворотке крови у добровольцев. Данные о повышении уровня IgG оказались сопоставимыми с результатами оценки активности лектиноассоциированного терминального N-ацетилгликозамина. Специфичность лектинов по включению в структуру терминальных олигосахаридов была использована для успешного осуществления анализа агалакто-IgG в образцах биологических сред методом ELISA (Tsuchiya N. et al., 1993). M. Liljebland и соавторы (2000) приме-

няли SPR-ассоциированный аффинный биосенсор в сочетании с иммобилизованным лектином (из *Psathyrella velutina*) для анализа агалакто-IgG у больных с РА. Эта технология позволила установить различия между IgG в группах больных с РА и здоровых добровольцев. С момента использования галактозодефицитных форм IgG, преимущественно представленных в патологических IgG-агрегатах синовиальной жидкости больных с РА (Van Zeben D. et al., 1994; Parekh R.B. et al., 1998), установлено, что данные галактозодефицитные формы IgG являются самоагрегируемыми (Leader K.A. et al., 1996).

Метод поверхностно-плазмонной резонансной спектроскопии позволил оценить взаимосвязи между содержанием IgG-ревматоидный фактор (RF) (IgG RF)-иммунных комплексов и активностью ревматического процесса у больных с РА, а также изучить особенности взаимодействия между IgGRF и IgG. Так, A. Matsumoto и соавторы (2000), анализируя кинетику изменений параметров, характеризующих взаимодействие между IgGRF и иммобилизованным IgG, а также сравнивая их с другими классами RF (IgM, IgA), обосновали полученные данные активным образованием IgGRF-иммунных комплексов. Авторы также установили, что IgGRF-IgG-взаимодействие является температурозависимым процессом и что процесс присоединения IgGRF к иммобилизованному IgG происходит при температуре 6 °C, а не 30 °C. Эти данные подтвердили, что IgGRF-иммунные комплексы проявляют повышенную активность при более низких температурах по сравнению с IgARF и IgMRF, имеющими широкий диапазон температурозависимой активации. Предварительные результаты по образованию аутоантител против глюкозо-6 фосфат изомеразы (GPI) и их скрининга были получены у пациентов с РА и на модели экспериментального артрита у животных (Maudik-Nayak L. et al., 2002). Последующий SPR-спектроскопический анализ этих антител позволил получить ряд новых данных у больных с ОА и РА (Ji-Yeon K. et al., 2003). Полученный рекомбинантный человеческий GPI-белок в комплексе с/без Nus A-протеина был экспрессирован на *Escherichia coli*, а затем прошел стадию очистки и иммобилизации в подвижной ячейке биосенсорного устройства. Результаты проведенного анализа синовиальной жидкости, взятой у пациентов с РА, свидетельствовали о более высоком уровне белкового взаимодействия с рекомбинантными GPI-белками, чем в образцах, взятых у больных с ОА. По мнению авторов, полученные результаты подтверждали возможность применения этой биотехнологии с целью выявления специфических аутоантител на этапе обострения у пациентов ревматического процесса, что подчеркивает преимущества этого метода по сравнению с методиками ELISA и иммунофлюоресценции.

И, наконец, появились новые данные о возможностях SPR-анализа особенностей пептид-мембранного взаимодействия. Так, V. Bender и соавторы (2004) выявили положительные свойства нового класса иммуномодулирующих пептидов, произ-

водных трансмембранных участков рецепторов Т-клеточных антигенов, взаимодействовать с биологическими мембранами (в модельной системе) с помощью SPR-спектроскопии. Полученные результаты хорошо согласовывались с данными по Т-клеточной стимуляции *in vitro*, а также на модели адьювантного артрита (*in vivo*) и свидетельствовали о том, что конформационные изменения аминокислотного состава белков могут отражать уровень структурной организации мембранных пептидов.

Заключение. Методы протеомного анализа сегодня являются надежным инструментом разделения и идентификации, а также изучения конформационных изменений белковых молекул и молекулярных механизмов их взаимодействия. Разработка и совершенствование новых биоаналитических методик помогает расширить наши знания о молекулярных звеньях патогенеза ревматических процессов; осуществлять молекулярное тестирование с целью идентификации болезньюассоциированных биомаркерных молекул для оптимизации лечебных и диагностических процедур в ревматологической клинике. Многие из этих биотехнологий могут стать рутинными диагностическими и прогностическими инструментами молекулярной медицины будущего. Данные технологии обладают уникальным потенциалом в изучении белковых молекул в их нативном состоянии.

ЛИТЕРАТУРА

Арчаков А.И. (2000) Биоинформатика, геномика и протеомика — наука о жизни XXI столетия. *Вопр. мед. химии*, 46 (1): 3–7.

Баев А.А. (1990) Программа «геном человека»: ее возникновение, содержание и развитие. *Итоги науки и техники. Сер. геном человека*, Т. 1: 4–33.

Возианов О.Ф. (2003) Медицинская генетика, геномика, генетическая медицина — прогноз на ближайшее будущее. *Мистецтво лікування*, 6: 6–9.

Залесский В.Н., Дынник О.Б. (2005) Молекулярная медицина: протеомные диагностические технологии и методы молекулярной терапии. *Врач. дело*, 1–2: 3–10.

Залесский В.Н., Дынник О.Б., Великая Н.В., Гуслицер Л.Н. (2005). Молекулярная эпидемиология: ДНК-аддукты и другие биомаркеры оценки генотоксических влияний и риска возникновения экотоксикантобусловленных сердечно-сосудистых и опухолевых заболеваний. *Журн. АМНУ*, 11(3): 464–479.

Маршалл В.Д. (2000) Клиническая биохимия. Пер. с англ. *Невский диалект*, М. — СПб., 367 с.

Мирзабеков А.Д., Прокопенко Д.М., Чечеткин В.Р. (2002) Применение матричных биочипов с иммобилизованной ДНК в биологии и в медицине // Информационные медико-биологические технологии / Под ред. В.А. Княжева и К.В. Судакова. — ГОЭТАР-МЕД, М., 166–198.

Bender V., Ali M., Amon M. et al. (2004) T-cell antigen receptor peptid-lipid membrane interaction using surface plasmon resonance spectroscopy. *J. Biol. Chem.*, 279: 54002–54017.

Boguski M.S., Mcintosh M.W. (2003) Biomedical informatics for proteomics. *Nature*, 422: 233–237.

Bonner R.F. (1997) Laser capture microdissection: molecular analysis of tissue. *Science*, 278: 1481–1482.

Brownstein M.J., Khodursky A. (2003) *Functional Genomics*. Humana Press. Totowa, 272 p.

Clore G.M., Gronenborn A.M. (1998) Determining the structures of large proteins and protein complexes by NMR. *TIBTECH*, 16: 22–34.

Fagerstam L.G., Frostell-Karlsson A., Karlsson R. et al. (1992) Biospecific interaction analysis using surface resonance detection applied to kinetic, binding and concentration analysis. *J. Chromatogr.*, 597: 397–410.

Hood D.B., Getting P.A. (1991) A ¹H NMR probe for mobility in the reactive center loops of serpins: spin-echo studies of native and modified forms of ovalbumin and a 1-proteinase inhibitor. *Biochemistry*, 30: 9054–9060.

Ji-Yeon K., Mi-Hong L., Kyung J. et al. (2003) Detection of antibodies against glucose 6-phosphate isomerase in synovial fluid of rheumatoid arthritis using surface plasmon resonance spectroscopy. *Exp. Mol. Med.*, 25 (4): 310–316.

Jonsson U., Fagerstam L., Ivarsson B. et al. (2004) Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology. *Biotechniques*, 11 (5): 620–627.

IHGSC — International Human Genome Sequencing Consortium. (2001). *Nature*, 409: 860–921.

Insko E., Kaufman J., Leight J.S. et al. (1999) Sodium NMR evaluation of articular cartilage degradation. *Magn. Reson. Med.*, 41: 30–34.

Issaq H.J. (2002) The SELDI-TOF MS approach to proteomics: protein profiling and biomarker identification. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 292: 587–592.

Kantor A.B., Wang W., Ling H. et al. (2004) Biomarker discovery by comprehensive phenotyping for autoimmune diseases. *Clin. Immunol.*, 111: 186–195.

Kim Y.J., Varki A. (2003) Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Glycoconj. Journal*, 14: 569–576.

Lander E.S., Linton L.M., Birren B. et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409: 860–921.

Leader K.A., Lastra G.C., Kirwan J.R. et al. (1996) Agalactosyl IgG in aggregates from the rheumatoid joint. *Br. J. Rheumatol.*, 35: 335–341.

Liedberg B., Lundstrom I., Stenberg E. (1993) Principles of biosensing with an extended coupling matrix and surface plasmon resonance. *Sensors Actuat. B*, 11: 63–72.

Liljeblad M., Landstrom A., Pahlsson P. (2000) Analysis of agalacto-IgG in rheumatoid arthritis using surface plasmon resonance. *Glycoconj. Journal*, 17: 323–329.

Lockhart D.J., Winzler E.A. (2000) Genomic, gene expression and DNA arrays. *Nature*, 405: 827–836.

Lottspeich P. (1999) Proteome analysis: a pathway to functional analysis of proteins. *Angew. Chem. Int. J.*, 38: 2476–2492.

Loscalzo J. (2003) Proteomics in cardiovascular medicine. *Circulation*, 108: 380–383.

Mann M., Jensen O.N. (2003) Proteomic analysis of posttranslational modifications. *Nat. Biotechnol.*, 21: 255–261.

Maudik-Nayak L., Wipke B.T., Shin F.F. et al. (2002) Despite ubiquitous autoantigen expression, arthritogenic autoantibody response initiated in the local lymph node. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 14368–14373.

Matsumoto A., Kojima N., Takeuchi F. et al. (2000) Kinetic analysis of interaction of different types of rheumatoid factors with immobilized IgG using surface plasmon resonance spectroscopy. *J. Biochem.*, 128: 1009–1016.

Mozsolits H., Aguilar M.I. (2002) Surface plasmon resonance spectroscopy: an emerging tool for the study of peptide-membrane interactions. *Biopolym (Pept. Sci)*, 66: 3–18.

Naughton D.P., Haywood B., Blake D.R. et al. (1993) A comparative evaluation of the metabolic profiles of normal and inflammatory knee-joint synovial fluids by high resolution proton NMR spectroscopy. *FEBS Lett.*, 332 (3): 221–225.

Parekh R.B., Roitt I.M., Isenberg D.A. et al. (1998) Galactosylation of IgG associated oligosaccharides: reduction in patients in patients with adult and juvenile onset rheumatoid arthritis and relation to disease activity. *Lancet*, 217: 966–969.

Petricoin E.F. (2002) Clinical proteomics. *Nat. Rev. Drug Discovery*, 1: 683–695.

Petricoin E., Wulfkuhle J., Espina V. et al. (2004) Clinical proteomics: revolutionizing disease detection and patient tailoring therapy. *J. Proteome Res.*, 3 (2): 209–217.

Porubleva L., Chitnis P.R. (2000) Proteomics: a powerful tool in the post-genomic era. *Ind. J. Biochem&Biophys*, 37: 60–368.

Randolph T.W., Mitchell B.L., Mc Lerran D.F. et al. (2005) Quantifying peptide signal in MALDI-tof mass spectrometry data. *Molecular&Cellular Proteom.*, 4 (12): 1990–2000.

Rehm T., Huber R., Holak T.A. Application of NMR in structural proteomics: screening for proteins amenable to structural analysis. *Structure*, 10: 1613–1618.

Robinson W.H., Steinman L., Utz P.J. (2002) Proteomic technologies for the study of autoimmune disease. *Arthritis Rheum.*, 46 (4): 885–893.

Tokano Y., Endo S., Hayashi F. et al. (1997) A hidden immunoglobulin G2 in patients with rheumatoid arthritis detected by nuclear magnetic resonance. *J. Rheumatol.*, 24: 275–281.

Tsuchiya N., Eudo T., Matsuta K. et al. (1993) Detection of glycosylation abnormality in rheumatoid IgG using N-acetylglucosamine-specific Psathyrella velutina lectin. *J. Immunol.*, 151: 1137–1146.

Turner G.A. (1992) N-glycosylation of serum proteins in disease and its investigation using lectin. *Clin. Chim. Acta*, 208: 149–171.

Tyers M., Mann M. (2003) From genomics to proteomics. *Nature*, 422: 193–197.

Saner S., Konthur Z., Lehrach H. (2005) Genome projects and the functional-genomic era. *Comb. Chem&High Throng. Screening*, 8 (8): 659–669.

Schweitzer B., Kingsmore S.F. (2002) Measuring proteins on microarrays. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13: 14–19.

Somerville L.E., Henry C.D., Sykes B.D. et al. (1990) Spin-echo ¹H NMR studies of differential mobility in gizzard myosin and its subfragments. *Biochemistry*, 29: 10855–10864.

Xiang Y., Sekine T., Nakamura H. et al. (2004) Proteomic surveillance of autoimmunity osteoarthritis. *Arthritis Rheum.*, 50 (5): 1511–1521.

van Zeben D., Rook G.A., Hazes J.M. et al. (1994) Early agalantossylation of IgG is associated with a more progressive disease course in patients with rheumatoid arthritis: results of a follow-up study. *Br. J. Rheumatol.*, 33: 36–43.

Venter C.J., Adams M.D., Myers E.W. et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science*, 291: 1304–1351.

Uchida T., Fukawa A., Uchida M. et al. (2002) Application of a novel protein biochip technology for detection and identification of rheumatoid arthritis biomarkers in synovial fluid. *J. Proteome Res.*, 1 (1): 495–499.

Wilkins M.R. (1996) Progress with proteome projects why all proteins expressed by a genome should be identified. *Biotechnol. Genet. Eng.*, 13: 19–50.

Zucht H.D., Lamers J., Khamemia V. et al. (2005) Datamining methodology for LC-MALDI-MS based peptide profiling. *Combin. Chem. High Throughput Screen.*, 8 (8): 717–726.

СУЧАСНІ БІОАНАЛІТИЧНІ (ПРОТЕОМНІ) ТЕХНОЛОГІЇ В ЛАБОРАТОРНІЙ ДІАГНОСТИЦІ РЕВМАТИЧНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

О.Б. Динник, В.М. Залеський

Резюме. Проаналізована роль біоаналітичних (протеомних) технологій у стратегії забезпечення процесу ідентифікації нових біомаркерних молекул і ранньої діагностики ревматичних захворювань.

Ключові слова: протеомний аналіз, біоаналітичні технології, ревматичні захворювання.

MODERN OF THE BIOANALYTICAL (PROTEOMICS) TECHNOLOGY IN THE SCIENTIFIC DIAGNOSTICS OF RHEUMATOID DISEASE

O.B. Dynnyk, V.N. Zalesky

Summary. There was analyzed in this article the bioanalytical (proteomics) technology role in the strategy of new biomarkers' identifying and early diagnostics of rheumatic diseases.

Key words: proteomic analysis, bioanalytical technology, rheumatic diseases.

Адрес для переписки:

Залесский Вячеслав Николаевич
03680, Киев, ул. Народного ополчения, 5
Национальный научный центр
«Институт кардиологии им. Н.Д. Стражеско»

РЕФЕРАТИВНА ІНФОРМАЦІЯ

Остеоартроз кистей та колінних суглобів, пов'язаний з низьким рівнем вітаміну К

Tuhina Neogi, Sarah L. Booth, Yu Qing Zhang, Paul F. Jacques, Robert Terkeltaub, Piran Aliabi, David T. Felson (2006)

Hand and knee osteoarthritis associated with low vitamin K levels Arthritis Rheumatism, 54 (1): 47–53.

Недостатність вітаміну К може призвести до аномальної хрящової та кісткової мінералізації. Крім того, підвищення рівня остеофітів, характерне для остеоартрозу (ОА), може бути вітамін К-залежним процесом. Мета дослідження — визначення можливості зв'язку між дефіцитом вітаміну К та рентгенологічними ознаками ОА.

Методи. Дослідження проводили за участю 672 пацієнтів (358 жінок, 314 чоловіків, середній вік — 65,6 року). Попередньо у всіх учасників визначали рівень сироваткового філокінону (первинної форми вітаміну К), проводили білатеральну рентгенографію кистей та колінних суглобів. Основні висновки: 1) поширення рівнів ОА, остеофітів і звуження суглобової щілини на рівень філокінону плазми крові для кожного суглоба, з перерахунком

для корелюючих суглобів із використанням загального оцінювального рівняння, 2) перерахунок середньої кількості суглобів із кожною ознакою на рівень філокінону плазми крові. Аналіз проводили для кистей та колінних суглобів окремо з урахуванням віку, статі, індексу маси тіла, сироваткового рівня вітаміну D та мінеральної щільності кісткової тканини шийки стегна.

Результати. Рівень поширення ОА, остеофітів, звуження суглобової щілини та перерахунок середньої кількості суглобів з усіма трьома ознаками достовірно знижувався при зростанні рівня філокінону плазми крові ($p \leq 0,03$ для всіх). Наприклад, рівень поширення ОА кистей знижувався з 1,0 до 0,7 ($p=0,05$). Для колінних суглобів лише рівень поширення остеофітів та середня кількість колінних суглобів з остеофітами достовірно знижувалися з підвищенням рівня філокінону плазми крові (рівень поширення знижувався з 1,0 до 0,6; $p=0,001$).

Висновок. Отримані дані підтверджують гіпотезу про зв'язок між низьким рівнем вітаміну К плазми крові та зростаючим поширенням маніфестації ОА кистей та колінних суглобів.