Л.В.Дубовская¹, Е.В.Колеснева¹, С.В.Федорович², Н.П.Денисевич³, И.Д.Волотовский¹

Протеомный анализ плазмы крови больных хроническим бронхитом

1 – ГНУ "Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси": 220072, Республика Беларусь, Минск, ул. Академическая, 27;

2 – ГУ "Республиканский научно-практический центр гигиены": 220072, Республика Беларусь, Минск, ул. Академическая, 7;

3 – спецполиклиника РУП "ПО "Беларуськалий": 223710, Республика Беларусь, Минская обл., Солигорск, ул. Коржа, 5

L.V.Dubovskaya, E.V.Kolesneva, S.V.Fedorovich, N.P.Denisevich, I.D.Volotovskiy

Analysis of plasma proteome for diagnosis of chronic bronchitis

Summary

An analysis of protein expression profile was performed using two-dimensional gel-electrophoresis. Diagnostic marker proteins were identified in plasma samples from donors with chronic bronchitis. Basing on the detection of protein biomarkers, a supplementary method for early diagnosis of chronic bronchitis was developed.

Key words: respiratory occupational diseases, chronic bronchitis, early diagnosis, protein markers, blood plasma.

Резюме

С применением метода 2-мерного гель-электрофореза проведен анализ профиля белковой экспрессии и выявлены диагностически значимые маркерные белки в плазме крови доноров, имеющих хронический бронхит. На основе детекции белковых биомаркеров разработан вспомогательный метод диагностики, с помощью которого можно проводить скрининг ранних форм развития хронического бронхита.

Ключевые слова: профессиональные заболевания органов дыхания, хронический бронхит, ранняя диагностика, белковые маркеры, плазма крови.

В структуре хронических обструктивных заболеваний легких ведущее место занимают профессиональные болезни, связанные с воздействием на дыхательные пути различных агрессивных факторов производственной среды. Как известно, шахтеры составляют специфическую группу риска, которая испытывает особенно высокую нагрузку. В структуре профессиональных заболеваний горняков пылевая патология занимает 1-е место, при этом особая тяжесть состояния и снижение профессиональной трудоспособности наблюдаются у больных хроническим пылевым бронхитом.

Используемые в настоящее время для выявления заболевания на начальных стадиях общеклинические, в основном морфологические, критерии диагностики пылевой патологии органов дыхания являются недостаточно информативными [1]. Чем раньше установлен диагноз, тем более своевременными будут реабилитационные мероприятия, что позволит снизить распространенность и степень тяжести выявленных заболеваний. Актуальным представляется изучение белкового состава (протеома) биологических жидкостей, изменения в котором являются индикатором физиологического и патологического состояния организма. Это одно из кардинальных направлений в диагностической медицине.

Исследование белков плазмы крови имеет большое значение в диагностике, прогнозировании и терапии ряда заболеваний. Кроме основных, плазма крови содержит динамически изменяющиеся белки: белки, проникающие из тканей ("маркеры утечки"), различные иммуноглобулины, а также минорные белки, имеющие клиническое значение. Таким обра-

зом, каждое заболевание характеризуется своим собственным набором белковых биомаркеров, которые потенциально могут детектироваться при обычном анализе крови / плазмы. В течение последнего 10-летия изучение белкового профиля плазмы крови человека эффективно используется для выявления маркеров определенных заболеваний, преимущественно сердечно-сосудистых и онкологических, и поиск диагностически значимых белков продолжается [2]. Первые работы по клинической протеомике, в которых были предложены способы диагностики злокачественных опухолей, обладающие высокой чувствительностью и специфичностью, не включали в себя идентификацию биомаркеров. Однако в последнее время все чаще предпринимаются попытки установить природу маркерных белков. Так, идентификация опухолевых биомаркеров показала, что все они относятся к неспецифическим белкам воспаления, а не являются продуктами опухолевых клеток [3]. Очевидно, что для выявления природы маркеров заболеваний и построения диагностических правил на основе протеомных карт необходимо использовать профилирование белков плазмы.

В настоящее время профилирование белков плазмы крови обычно выполняют методом 2-мерного гель-электрофореза с последующей идентификацией обнаруженных маркеров методом масс-спектрометрии. Скрининг диагностически значимых белков имеет большое значение при различных патологиях и позволяет получить информацию о начале развития заболевания и о предрасположенности к нему, позволяя своевременно начать лечение и профилактику.

Таблица 1
Характеристика участников исследования

Группа	n	Возраст, лет	Работа под землей	Стаж работы, лет	Хронический бронхит
1-я группа	20	37,0 ± 6,3	–	0	–
2-я группа	5	38,0 ± 5,8	–	13,0 ± 3,8	–
3-я группа	5	36,0 ± 7,8	+	12,0 ± 4,1	–
4-я группа	6	43,0 ± 7,2	+	14,0 ± 5,3	+

Целью настоящего исследования является разработка метода ранней диагностики хронического бронхита путем анализа профиля белковой экспрессии в плазме крови и выявление набора маркерных белков для данного заболевания.

Материалы и методы

В исследовании участвовали 36 доноров мужского пола в возрасте от 26 до 54 лет, которые были распределены по 4 группам. В 1-ю группу вошли 20 здоровых мужчин, не занятых в горнорудной промышленности, во 2-ю – 5 здоровых сотрудников соледобывающего предприятия "ПО "Беларуськалий", не работающих в подземных условиях, 3-ю и 4-ю группу составили соответственно 5 здоровых и 6 больных хроническим бронхитом работников калийных шахт. Описание исследуемых групп приведено в табл. 1.

Материалом для исследования служили образцы плазмы венозной крови. Концентрацию белка в образцах измеряли согласно стандартному методу, разработанному М.М. Bradford [4], с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта.

Процедуру 2-мерного гель-электрофореза проводили в соответствии со стандартной методикой [5]. Разделение белков в 1-м направлении 2-мерного гель-электрофореза осуществляли с использованием прибора для изоэлектрофокусирования белков *Protean IEF Cell* (Bio-Rad, США). Изоэлектрофокусирование выполняли на иммобилизованном градиенте (IPG-стрипы, 7 см, pH 4–7) (Bio-Rad, США). Разделение во 2-м направлении проводили в электрофоретической камере *Mini-PROTEAN 3 Cell* (Bio-Rad, США) с использованием 10%-ных и 15%-ных вертикальных полиакриламидных гелей толщиной 1 мм. Белковые пятна в гелях после завершения 2-го направления электрофореза визуализировали методом окрашивания нитратом серебра с тиосульфатом натрия [6]. Для анализа окрашенные серебром гели сканировали при помощи калибровочного денситометра GS-800, карты от 4 биологических повторов статистически анализировали с использованием программного обеспечения *PDQuest* (Bio-Rad, США).

Приготовление образцов для MALDI-TOF-MS, а именно расщепление белков на пептиды трипсином непосредственно в геле, экстракцию пептидов из геля, их очистку по технологии *ZipTip* (Millipore, США) и элюирование на планшет для MALDI-TOF-MS, проводили с использованием роботизированной станции *Xcise* (Shimadzu Biotech, Япония) соглас-

но протоколу производителя. Все масс-спектры были получены при помощи MALDI-TOF-масс-спектрометра *Axima-CFR plus*, оборудованного азотным лазером ($\lambda = 337$ нм) (*Kratos Analytical*, Великобритания) в рефлектронном позитивном режиме в диапазоне масс 800–3 500 Да. Предварительно прибор был откалиброван с использованием набора *ProteoMass Peptide and Protein Maldi-MS Calibration Kit* (Sigma, США) или стандартной пептидной смеси для пептидного масс-фингерпринтинга, состоящей из 8 пептидов. С использованием программного обеспечения *Kompact* (Schimadzu, Япония) проводили автоматическую детекцию моноизотопных пиков. Полученный список моноизотопных масс для каждого образца сопоставлялся с известными массами в базах данных *Mascot* (www.matrixscience.com) с чувствительностью $\pm 0,5$ Да и ошибкой расщепления 1–2. Идентификацию белков считали успешной, если количество вероятностных баллов, рассчитанное с помощью *Mascot Mowse*, было достоверно выше значения вероятности случайного события при совпадении не менее 7 пептидов, покрывающих не менее 25 % аминокислотной последовательности.

Результаты и обсуждение

В ходе исследования было обнаружено, что в образцах плазмы крови всех сотрудников РУП "ПО "Беларуськалий" (2, 3, 4-я группы) количество общего белка достоверно отличалось от показателей здоровых доноров, не имеющих отношения к горнорудной промышленности (рис. 1). У доноров, работающих в подземных условиях и страдающих хроническим бронхитом (4-я группа), содержание общего белка в плазме крови было достоверно ниже, чем у лиц, не работающих в подземных условиях (2-я группа), а также отличалось от показателей в 3-й группе. Это может быть обусловлено изменением как количественного, так и качественного состава белков и имеет важное клинико-диагностическое значение.

Для анализа качественного состава белков плазмы крови были получены 2-мерные карты белков плазмы крови здоровых доноров методом 2-мерного гель-электрофореза. В ходе работы были подобраны условия для разделения высокомолекулярных и низкомолекулярных белков плазмы крови, что позволило получить синтетическую протеомную карту образцов плазмы крови здоровых доноров 1-й группы (рис. 2а). Полученная синтетическая карта была сопоставима со стандартной картой плазмы SWISS-2D PAGE, представленной на сайте <http://www.expasy.ch/ch2d>,

Рис. 1. Содержание общего белка в плазме крови доноров различных групп

Примечание: 1-я группа — здоровые доноры, не работающие на комбинате; 2-я — сотрудники комбината, не работающие в подземных условиях и не имеющие хронического бронхита; 3-я — сотрудники калийного комбината, работающие в подземных условиях и не имеющие хронического бронхита; 4-я — сотрудники комбината, работающие в подземных условиях и имеющие хронический бронхит.

Полученные результаты представлены в виде среднего арифметического значения и стандартного отклонения 4 независимых измерений.

и выступала в качестве контроля, с которым проводилось сравнение. Аналогичные карты были получены на основе образцов плазмы крови сотрудников РУП "ПО "Беларуськалий", не работающих в подземных условиях и не имеющих хронического бронхита (2-я группа), что подтверждает корректность использованного контроля.

При сравнительном анализе 2-мерных гелеэлектрофореграмм пациентов с хроническим бронхитом и здоровых лиц были обнаружены отличия в 3 областях (рис. 2). Было установлено, что в образцах всех доноров 4-й группы, независимо от стажа работы, имеются 2 дополнительных неизвестных низкомолекулярных белка с массой около 14 кДа и pI 5,4 и 6,1 (пятно 1 и 2), как показано на рис. 2б. Эти бел-

ки не присутствуют в плазме крови в норме и потенциально могут выступать в качестве маркеров изучаемой патологии. Кроме того, на геле область 3 в норме (рис. 2а) и при изучаемой патологии (рис. 2б) проявлялась различным образом.

Путем сопоставления с референсной картой плазмы крови SWISS-2D PAGE область 3 была идентифицирована как белок транстиретин, который является транспортером / перехватчиком и признанным маркером острой фазы заболеваний [7]. На 2-мерных картах транстиретин визуализируется в виде 1 или 3 пятен в зависимости от его содержания. Как видно из рис. 2а, в контрольных образцах присутствует 1 пятно, в то время как при бронхите содержание данного белка в плазме повышается, и в результате все 3 пятна хорошо видны (рис. 2б).

Было обнаружено, что в некоторых образцах плазмы крови здоровых доноров, работающих в калийных шахтах, на карте слабо визуализировался белок пятна 2, характерный для карт пациентов с бронхитом, что свидетельствует о появлении данного белка в плазме крови при работе во вредных подземных условиях, хотя и в незначительных количествах. Кроме того, в этих образцах наблюдалась картина визуализации транстиретина, характерная для бронхита, что может свидетельствовать о начальной стадии развития данной патологии, несмотря на отсутствие установленного диагноза.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что у сотрудников калийных шахт, работающих во вредных подземных условиях, изменяется белковый состав плазмы, и белки областей 1, 2 и 3 могут выступать в качестве маркеров ранней диагностики хронического бронхита.

Как указано выше, белок области 3, визуализируемый на геле в виде 1 или 3 пятен, является транстиретином. Белки пятен 1 и 2 на референсной карте отсутствовали, поэтому на следующем этапе работы

Рис. 2. Типичные экспериментальные 2-мерные гелеэлектрофореграммы образцов плазмы крови: а — здоровых доноров; б — больных хроническим бронхитом

Примечание: красным обведены диагностические белковые профили, по которым наблюдаются отличия: 1 — тканевый активатор пламиногена; 2 — белок AF288161; 3 — транстиретин.

Таблица 2
Результаты масс-спектрометрической идентификации белков пятен 1 и 2
с помощью поисковой базы данных Mascot

№ белкового пятна	Название идентифицированного белка	Количество вероятностных баллов	Совпадение аминокислотной последовательности, %	Молекулярная масса, кДа	pI
1	Тканевый активатор плазминогена – <i>Ното sapiens</i> (человек)	82	25	30,813	8,54
2	Белок AF288161 – <i>Ното sapiens</i> (человек)	101	35	19,362	9,6

пятна 1 и 2 были вырезаны из геля и идентифицированы. Данные по масс-спектрометрической идентификации белков приведены в табл. 2.

Оказалось, что белковое пятно 1 соответствует фрагменту тканевого активатора плазминогена (ТАП). ТАП представляет собой синтезируемый в эндотелиальных клетках белок, способный разрушать образующиеся тромбы путем активации неактивного профермента плазминогена в плазмин. Известно, что в свободной форме ТАП содержится в плазме в весьма низкой концентрации (3–5 нг/мл). Однако различные стимулы, такие как венозная окклюзия, физическая нагрузка, введение десмопрессина, катехоламины, вызывают быстрое увеличение концентрации ТАП. Оно происходит как за счет выброса из неидентифицированных до настоящего времени клеточных депо, так и за счет быстрого увеличения синтеза [8].

Было обнаружено, что ближайшим гомологом белка пятна 2 является белок, имеющий в базе данных идентификационный номер AF288161. Известно лишь, что этот белок кодируется геном Jem-1 (JEM-1, HGMW-символ BLZF1), экспрессия которого изменяется при острой промиелоцитарной лейкемии [9]. Таким образом, в роли диагностически значимых белков при развитии хронического бронхита могут выступать транстиретин, ТАП и белок AF288161. Для установления диагноза необходим анализ протеомного профиля плазмы крови донора на наличие совокупности вышеописанных маркерных белков.

Заключение

Показано, что скрининг ранних форм развития хронического бронхита можно проводить путем анализа диагностического профиля белковой экспрессии в плазме крови, представленного совокупностью транстиретина, ТАП и белка AF288161. Для изучения белкового профиля белки плазмы крови необходимо разделить методом 2-мерного гель-электрофореза и сравнить полученную протеомную карту с референсной (контрольной) картой на предмет наличия набора маркерных белков. Данная минимально инвазивная технология может быть использована как вспомогательный метод ранней диагностики хронического бронхита, что позволит решить проблему определения безопасного стажа работы в горнорудной промышленности и сроков рационального трудоустройства, а также снижения степени тяжести выявленного заболевания и уровня заболеваемости в целом. Мониторинг протеома плазмы крови может

быть использован при проведении профессионального осмотра и с целью профотбора, а также при проведении предварительных и периодических медосмотров и в актах заключительной комиссии.

Литература

1. Разумов В.В., Еселевич С.А. К доказательствам раннего начала самоподдерживающегося хронического воспаления при пылевой патологии органов дыхания. Медицина в Кузбассе 2006; 5 (спецвып.): 97–101.
2. Anderson N.L., Anderson N.G. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. Mol. Cell. Proteomics 2002; 1: 845–867.
3. Diamandis E.P. Proteomic patterns in biological fluids: do they represent the future of cancer diagnostics? Clin. Chem. 2003; 49: 1272–1275.
4. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analyt. Biochem. 1976; 72: 248–254.
5. Goerg A., Weiss W. 2-D proteome analysis protocols. Meth. Mol. Biol. 1999; 112: 235–244.
6. Blum H., Beier H., Gross H.J. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. Electrophoresis 1987; 8: 93–99.
7. Chen J.-H., Chang Y.-W., Yao Ch.-W. Plasma proteome of severe acute respiratory syndrome analyzed by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. Proc. Natl. Acad. Sci. 2004; 101: 17039–17044.
8. Oliver J.J., Webb D.J., Newby D.E. Function in humans stimulated tissue plasminogen activator release as a marker of endothelial function in humans. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2005; 25: 2470–2479.
9. Tong J.H., Fant X., Benoit G. et al. Genomic organization of the JEM-1 (BLZF1) gene on human chromosome 1q24: molecular cloning and analysis of its promoter region. Genomics 2000; 69: 380–390.

Информация об авторах

Дубовская Людмила Вячеславовна – к. б. н., зам. директора по научной и научно-инновационной работе ГНУ "Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси"; тел.: +375-172-84-16-61; dubovsk@biobel.bas-net.by

Колеснева Екатерина Владимировна – младший научный сотрудник ГНУ "Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси"; тел.: +375-172-84-16-61; e-mail: kolosneva_kate@mail.ru

Федорович Сергей Владимирович – д. м. н., проф., зав. клиническим отделом профпатологии и аллергологии ГУ "Республиканский научно-практический центр гигиены"; тел.: +375-172-40-21-44

Денисевич Николай Петрович – зав. спецполиклиники РУП "ПО "Беларускалий"; тел.: +375-1742-3-14-02

Волотовский Игорь Дмитриевич – д. б. н., проф., акад. НАНБ, директор ГНУ "Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси"; тел.: +375-172-84-15-68; volot@biobel.bas-net.by

Поступила 17.12.08

© Коллектив авторов, 2009

УДК 616.233-002.2-07:616.153.96-074