

ПРОТЕОМІКА, МАС-СПЕКТРОМЕТРІЯ, РАК

Л. Ф. Суходуб, д-р фіз.-мат. наук, чл.-кор. НАН України,
Медичний інститут Сумського державного університету, м. Суми

Поштовхом до написання цієї статті став, до певної міри, подарунок від академіка НАН України Василя Федоровича Чехуна, який я отримав під час моєї, фактично, першої зустрічі з ним у кінці дуже неординарної і тому незабутньої розмови у 2008 році. Це була книжка Наталії Кавецької-Мазепи "О моем отце Р. Е. Кавецком и близких ему людях". Знаючи, що за фахом я біофізик, Василь Федорович як тонкий психолог інтуїтивно підозрював, і зовсім небезпідставно, що ця книжка не пройде для мене безслідно. Так воно й трапилося. Біофізичні аспекти пухлинних клітин з використанням лазера вперше були досліджені Ростиславом Євгеновичем і беззаперечно продемонстрували високу ефективність цих нових на той час підходів. Тому подальші мої розмови з Василем Федоровичем торкалися саме цих аспектів з акцентом на використання найсучасніших інструментальних аналітичних методів (особливо мас-спектрометрії – MALDI-TOF, FAB-MS), які почали з'являтися в інститутах НАН України, як для ранньої діагностики раку (виявлення відповідних протеїнових біомаркерів - молекулярних носіїв сигнальних каскадів у клітинах), так і для вирішення інших проблем сучасної молекулярної та наноонкології. У результаті з'явилася стаття, зміст якої наведено нижче.

Ключові слова: протеоміка, мас-спектрометрія, рак.

Толчком к написанию этой статьи явился, в определенной степени, подарок от академика НАН Украины Василия Федоровича Чехуна, который я получил во время моей, фактически, первой встречи с ним в конце очень неординарной и поэтому незабываемой беседы в 2008 году. Это была книга Натальи Кавецкой-Мазепы "О моем отце Р. Е. Кавецком и близких ему людях". Зная, что по специальности я биофизик, Василий Федорович как тонкий психолог интуитивно подозревал, и совсем не без оснований, что эта книга не пройдет для меня бесследно. Так оно и произошло. Биофизические аспекты опухолевых клеток с использованием лазера впервые были изучены Ростиславом Евгеньевичем Кавецким и бесспорно продемонстрировали высокую эффективность этих новых для того времени подходов. Поэтому дальнейшие мои беседы с Василием Федоровичем касались именно этих аспектов с акцентом на использование современных инструментальных аналитических методов (особенно масс-спектрометрии – MALDI-TOF, FAB-MS), которые начали появляться в институтах НАН Украины, как для ранней диагностики рака (поиск соответствующих протеиновых биомаркеров – молекулярных носителей сигнальных каскадов в клетках), так и для решения других проблем современной молекулярной и наноонкологии. В результате появилась статья, содержание которой приведено ниже.

Ключевые слова: протеоміка, мас-спектрометрія, рак.

Протеоміка (proteome) є терміном, який використовується, коли йдеться про сукупність всіх білків у клітині, тканині або організмі. Інший термін – протеомікс (proteomics) - означає вивчення цих білків (протеїнів): їх ідентифікацію, дослідження біохімічних властивостей та функцій, змін їх кількості, хімічного складу та структури як у процесі розвитку організму, так і у відповідь на внутрішні та зовнішні подразники. Бурхливий розвиток протеоміксу обумовлений значними успіхами в розробленні та впровадженні новітніх фізико-хімічних методів, перш за все мас-спектрометрії. Саме цей метод дозволив провести експресні і відносно недорогі аналізи протеїнів у великій

кількості біологічних зразків і тому названа технологія, на сьогодні, є найбільш потужною серед сучасних протеомних інструментів. Протеоміка людини, як і протеоміка інших організмів, не є сталою величиною, а, навпаки, постійно змінюється у відповідь на потреби організму та залежно від віку, статі, дієти, фізичних навантажень, сну та інших факторів. Протеоміка також змінюється при появі *раку* або інших захворювань, і тому саме протеомікс викликає значний інтерес, перш за все, у дослідників-онкологів. Відомо, наприклад, що ракові клітини досить часто виділяють специфічні протеїни або їх фрагменти, які потрапляють у кров та інші біорідини (слина, сеча), і можуть служити біомаркерами патологічного процесу. Дуже важливим є намагання вчених ідентифікувати ці структури (*протеїнові маркери*) в зазначених середовищах з метою отримання інформації про можливість виникнення, наявність або прогресування раку (чи іншої патології). Подібна інформація може бути корисною для діагностики раку ще до появи клінічних симптомів і тим самим може значно полегшити лікування пацієнтів.

Протеоміка організму значно складніша від його геноміки. Більшість генів здатні кодувати не один білок, а декілька. Крім того, білки можуть бути модифіковані в клітині (посттрансляційна модифікація), наприклад, шляхом приєднання певних хімічних груп (фосфатних, металевих або інших). Подібні модифікації забезпечують регуляцію основних функцій протеїнів, а також їх локацію всередині або зовні клітини. З урахуванням можливих хімічних змін структури в організмі людини функціонує більше ніж 1 000 000 різноманітних білкових структур, які кодуються 25 000 відповідних генів. Рівень складності стає ще вищим і тому, що протеїновий склад організму постійно змінюється (виникають нові білки, зникають старі або перетворюються в модифіковані у відповідь на подразники), тоді як геном залишається незмінним впродовж усього життя.

Методи вивчення протеоміки

На сьогодні розроблені дві стратегії в дослідженні протеоміки, які базуються на: а) ідентифікації протеїнів; і б) розпізнаванні зображень (pattern recognition). Для ідентифікації використовують декілька технологій. Наприклад, спираючись на те, що відомо про біологію конкретного типу раку, можна взяти *антитіла*, які зв'язуються з протеїнами, що є гіперекспресними для даного захворювання. Подібне зв'язування після промивання протеїнового чіпа з антитілами біорідиною (кров, сеча) детектується флуоресцентним мікроскопом. Гель-електрофорез також можна використовувати з метою ізоляції протеїнів з подальшою їх ідентифікацією, застосовуючи ферментзв'язаний імуносорбентний аналіз (enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA). Для розпізнавання зображень використовують сучасну мас-спектрометрію (MS), яка є високоінформативною при встановленні молекулярних мас та відносної кількості всіх протеїнів у зразку. Тобто MS дає змогу отримувати так звані *протеїнові профілі* біологічних зразків (наприклад, крові), які можуть бути типовими для пацієнтів, які мають подібне захворювання. Незважаючи на те, що за допомогою MS-аналізу не завжди можливо ідентифікувати окремі білкові молекули, порівняння білкових профілів хворих та здорових людей дає додаткові можливості в діагностиці та терапії. У разі необхідності виявлення окремих протеїнів у біологічних зразках використовують іншу технологію, а саме комбінацію хроматографії з тандемною (MS/MS) мас-спектрометрією. Обидві стратегії базуються на використанні потужної комп'ютерної техніки та біоінформатики для обробки величезного масиву даних у подібних дослідженнях. Слід зазначити, що ракові пухлини синтезують деякі

протеїни в дуже малих кількостях, навіть високочутлива MS не здатна їх зареєструвати. Тому у всьому світі продовжується робота в напрямку підвищення чутливості мас-спектрометричної технології з метою ідентифікації також рідкісних протеїнів. У цьому сенсі дуже перспективним є підхід з використанням *прискорювальної мас-спектрометрії (accelerated mass spectrometry) (AMS)* для ранньої діагностики раку та інших захворювань [1,2].

Прискорювальна мас-спектрометрія

Прискорювальна мас-спектрометрія є ядерно-фізичним методом реєстрації як довготривалих радіоізоотопів, так і стабільних ізоотопів. Обладнання для AMS виключно базується на електростатичних тандемних прискорювачах, за винятком останніх розробок з використанням дещо інших принципів [3]. В світі на цей час функціонує близько 100 AMS-лабораторій. З'явилася перша подібна лабораторія і в Україні. Згідно з програмою централізованого придбання імпортованих наукових приладів та обладнання НАН України Інститутом прикладної фізики НАН України проведено підготовчі роботи та запущено в експлуатацію прискорювальний мас-спектрометр Tandatron 1.0 MV моделі 4110Bo-AMS HVEE B.V. Комплекс пусконаладжувальних робіт з введення в експлуатацію мас-спектрометра 4110 Bo-AMS включав: випробування та перевірку функціональних характеристик усіх вузлів AMS, виконання серії тестових вимірювань ізоотопних співвідношень вуглецю на стандартних зразках, юстування і оптимізацію іонно-оптичних систем AMS, що дозволило у кінцевому підсумку отримати паспортні метрологічні характеристики (табл. 1).

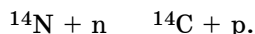
Таблиця 1 – Характеристики приладу (паспортні та отримані)

Відношення	Чутливість (у дужках – отримана з експерименту)	Похибка (у дужках – отримана з експерименту)
$^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$	3×10^{-15} (2,3x10 ⁻¹⁵)	0,5 % (0,384 %)
$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	1×10^{-14}	0,3 % (0,113 %)

На найближчі роки визначено можливі напрямки пріоритетних досліджень:

- ядерна енергетика і ядерна безпека (моніторинг навколишнього середовища – ^{14}C , ^{129}I);
- археологія і геологія (датування об'єктів - ^{14}C);
- радіаційна екологія (Чорнобильська аварія – виявлення пізніх радіаційних ефектів в - організмах, циркуляція води - ^{14}C , ^{10}Be , ^{129}I);
- біомедицина і фармація (моніторинг організму з розподілу внесеної кількості радіоізоотопів, метаболізм лікарських препаратів - ^{26}Al , ^{14}C).

В основному AMS - дослідження проводяться з використанням радіоізоотопу ^{14}C . Ізотоп ^{14}C має відносно невеликий період напіврозпаду, $t_{1/2} = 5730$ років, тому його наявність обумовлена лише постійним утворенням в атмосфері під дією космічних променів. Народження радіоактивного ізоотопу ^{14}C відбувається при зіткненні нейтрона (n) з ядром атома ^{14}N , при цьому нейтрон виштовхує з ядра протон (p). Маса ядра не змінюється, а заряд зменшується на одиницю – елемент зміщується за таблицею Менделєєва вліво на одну клітинку:



Розпад ^{14}C відбувається відповідно до закону радіоактивного розпаду з утворенням електрона та нейтрино:



Завдяки процесам обміну та живлення об'єктів живої природи (фотосинтезу та ін.) підтримується постійна рівновага концентрації радіоактивного ізотопу ^{14}C між навколишнім середовищем та живими тканинами рослин і тварин. Після смерті біологічного об'єкта цей обмін припиняється, і концентрація ^{14}C буде зменшуватись експоненціально відповідно до закону радіоактивного розпаду. Знаючи початкову кількість $^{14}\text{C}_0$ та вимірюючи величину ^{14}C в момент часу t , ($^{14}\text{C}_t$), можна знайти t , тобто вік зразка за формулою

$$t = - (t_{1/2}) / (\ln 2) \cdot \ln(^{14}\text{C}_t / ^{14}\text{C}_0).$$

Детальніше про радіоізотопний метод та особливості вимірювання ^{14}C з використанням AMS-технології йдеться в недавньому огляді [2]. Дослідження довгоіснуючих ізотопів сьогодні успішно реалізується за допомогою методу прискорювальної мас-спектрометрії. Технологія AMS дозволяє безпосередньо реєструвати (рахувати) окремі ізотопи після їх сепарації відповідно до співвідношення маси до заряду, тоді як традиційні методи забезпечують виміри концентрацій радіоізотопів за їх радіоактивним розпадом і реєструють α -частинки, які виходять із зразка. Сам прилад вміщує вторинно-іонне (як правило, цезієве) джерело, інжектор, низькоенергетичний магніт, тандемний прискорювач зі стриперною камерою, високоенергетичний магніт і систему реєстрації, що має спеціальний детектор [2]. Встановлений перший в Україні та налагоджений у ІПФ НАН України прискорювальний мас-спектрометр – прилад нового покоління, що дозволяє отримувати точну інформацію про ізотопний склад зразків міліграмової та субміліграмової ваги. Метод AMS дозволяє проводити кількісні визначення як радіоактивних, так і стабільних (довгоіснуючих) ізотопів з рекордно високою абсолютною (10^{-12} або ppt) і відносною чутливістю (10^{-14} - 10^{-15}). Надзвичайно висока роздільна здатність при реєстрації ізотопів значно перевищує відповідні параметри мас-спектрометрів з усіма традиційними схемами сепарації іонів. Згідно з даними публікацій закордонних наукових центрів, які використовують прискорювальний мас-спектрометр 4110Bo-AMS HVEE B.V. з іонним прискорювачем Tandetron, можливості цього приладу не обмежуються визначенням співвідношень ізотопів, зазначених у специфікації (^{14}C , ^3H , ^{10}Be , ^{26}Al , ^{129}I). Наводяться приклади визначення відносної та абсолютної концентрації таких ізотопів, як: ^{41}Ca , ^{239}Pu , ^{240}Pu та ін. Межі чутливості визначення цих ізотопів на приладі Tandetron 1.0 MV моделі 4110Bo-AMS HVEE B.V. на кілька порядків вищі, ніж при використанні вторинної іонної мас-спектрометрії, нейтронно-активаційного аналізу і мас-спектрометрії з джерелом іонів на принципі індуктивнов'язаної плазми. Конструкція гібридного джерела іонів приладу 4110Bo-AMS дозволяє досліджувати як тверді, так і газові проби. Наприклад, у випадку вуглецю це може бути пресований графіт або ж CO_2 , що значно спрощує підготовку проби та зменшує кількість витраченого матеріалу. Наведені дані відкривають можливість проведення унікальних досліджень у різноманітних галузях матеріалознавства, зокрема дослідження напівпровідникових матеріалів, екологічні та медико-біологічні дослідження, дослідження у галузі нанofізики і нанотехнологій, генетики і протеоміки, археології і геології [2,3]. Серед медико-біологічних напрямків слід виділити ретроспективне датування клітин організму людини [4]. Багато клітин організму людини (наприклад, шкіри або шлунка) мають набагато коротший вік порівняно з організмом і тому постійно оновлюються. Для багатьох клітин взагалі мало що відомо про їх кругообіг. Утворення клітин, як правило, вивчається шляхом аналізу так званих молекулярних маркерів

проліферації. Цей підхід дає важливу інформацію про кількість клітин у певному циклі за певний час, але не проливає світла на кількість зрілих клітин, які утворилися в тканинах. Використання мічених нуклеотидів (^3H -Thymidine) дає можливість отримувати мічені нові клітини і тим самим відстежувати утворення та інтеграцію зрілих клітин в організмі. Але при цьому виникає проблема реєстрації відносно рідких подій, неможливість ретроспективного визначення клітинного кругообігу, а також певна токсичність мічених нуклеотидів, що обмежує їх використання для людей. Одним із фундаментальних питань клітинного кругообігу є питання обміну специфічних клітин як в нормі, так і патології. Зміни в клітинному кругообігу є ключовим фактором для деяких хвороб (зниження рівня еритроцитів при апластичній анемії або підвищення кератиноцитного кругообігу при псоріазі). Значним поштовхом у дослідженні стовбурних клітин та регенеративній медицині є перспектива активації клітинного заміщення. Стимуляція утворення клітин крові erythropoietin або G-CSF є досить успішною терапією, і тому подібний підхід може бути розвинений для інших органів. Але без знання того, чи оновлюються специфічні клітини в нормальних та патологічних станах, залишається взагалі невідомим, чи може це (стимуляція) бути реалізовано взагалі. Відсутність методів дослідження клітинного обміну в організмі людини стимулювала авторів [4] розвинути новітню стратегію в цьому напрямку. Успіхи з ^{14}C -датування в археології підштовхнули дослідників розвинути методика ретроспективного визначення віку клітин без необхідності введення якихось хімічних сполук в організм людини до проведення аналізу. Рівні ^{14}C на Землі були відносно сталими впродовж багатьох років, і радіоактивний розпад цього ізотопу використовували для ретроспективного датування в археології. У той самий час ядерні випробування в атмосфері в 50-х і 60-х роках ХХ ст. призвели до генерації значної кількості ^{14}C , яка швидко розподілилася навкруги планети. Як тільки випробування були заборонені (1963), рівень ^{14}C експоненціально почав знижуватися (не за рахунок розпадів, в результаті дифузії) із встановленням рівноваги з океанами та біосферою. Саме ця особливість зміни концентрації ^{14}C в атмосфері була покладена в основу розвитку стратегії ретроспективного датування клітин у людському організмі.

^{14}C в геномній ДНК відображає вік клітини. ^{14}C в атмосфері реагує з киснем і утворює CO_2 , який через фотосинтез входить в біотоп. Більшість молекул клітин постійно змінюється, за винятком геномної ДНК, яка не оновлюється після останнього поділу клітини. Таким чином, рівень ^{14}C у геномній ДНК повинен віддзеркалювати рівень радіоізотопу в атмосфері в час утворення в організмі нової клітини і тому може бути використаним для ретроспективного знаходження її віку. Автори [4] атмосферні рівні ^{14}C визначали в декількох регіонах Швеції, місцях проживання досліджуваних пацієнтів, з використанням річних кілець ялинок у період з 1962 до цього часу (рис. 1).

Чутливість сучасної прискорювальної мас-спектрометрії весь час підвищується і на сьогодні рівні ^{14}C можуть бути зафіксовані в зразках, які містять близько 30 мкг вуглецю, що відповідає ДНК із 15 млн клітин. Головним у вимірюваннях є недопустимість забруднення зразка не ДНК-вуглецем, що потребує спеціального протоколу екстракції ДНК. Стратегія визначення віку популяції клітин із співвідношення концентрації ^{14}C в геномній ДНК і атмосферних рівнів схематично наведена на рис. 2. Було показано, що рівні ^{14}C в лейкоцитній ДНК відповідають сучасному атмосферному рівню (рис. 2С, 2Д).

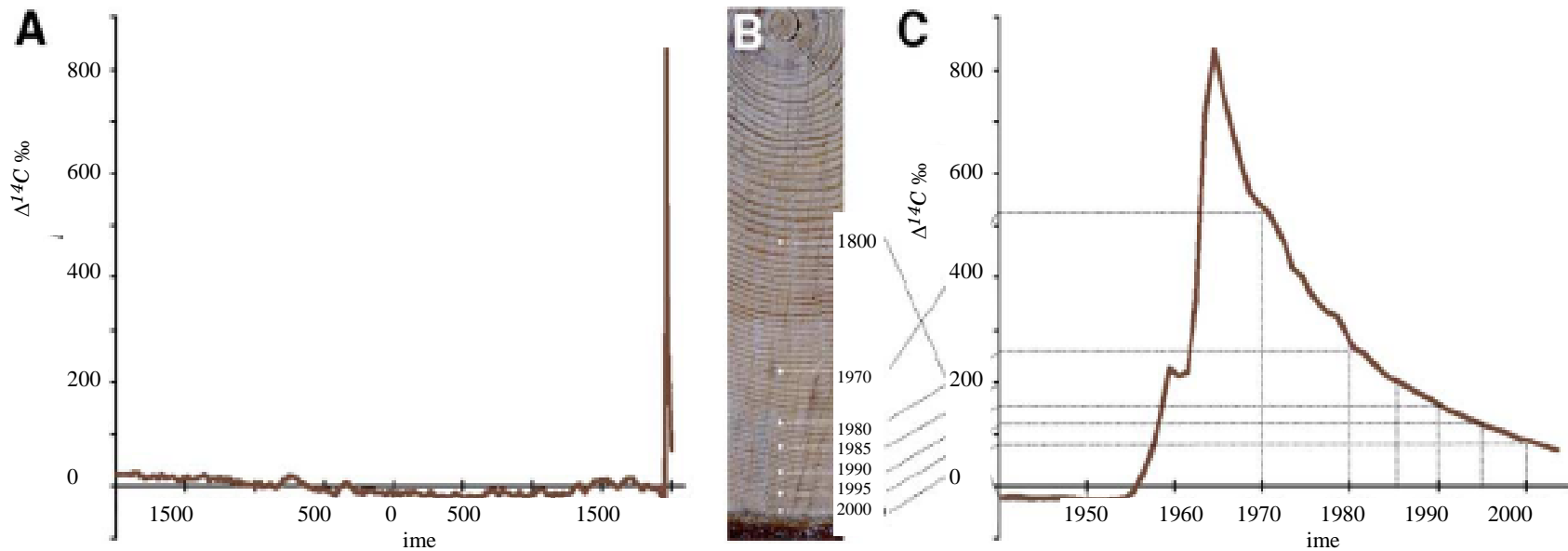


Рисунок 1 - Рівні ^{14}C у біотопі. Рівні ^{14}C в атмосфері були стабільні впродовж багатьох років, за винятком суттєвого підвищення рівня ^{14}C у 1956-1963 рр. в результаті ядерних бомбових випробувань (A. Lewin and Kromer, 2004). Рівні ^{14}C впродовж останніх декад у досліджуваній географічній зоні (Швеція) були вивчені в целюлозі річних кілець місцевих сосен (B) з використанням AMS, які відповідають рівням ^{14}C середньої широти північної півсфери (C). Рівні ^{14}C у сучасних зразках, що відповідають прийнятій конвенції про універсальний стандарт із поправкою на радіоактивний розпад, позначені як величина ^{14}C

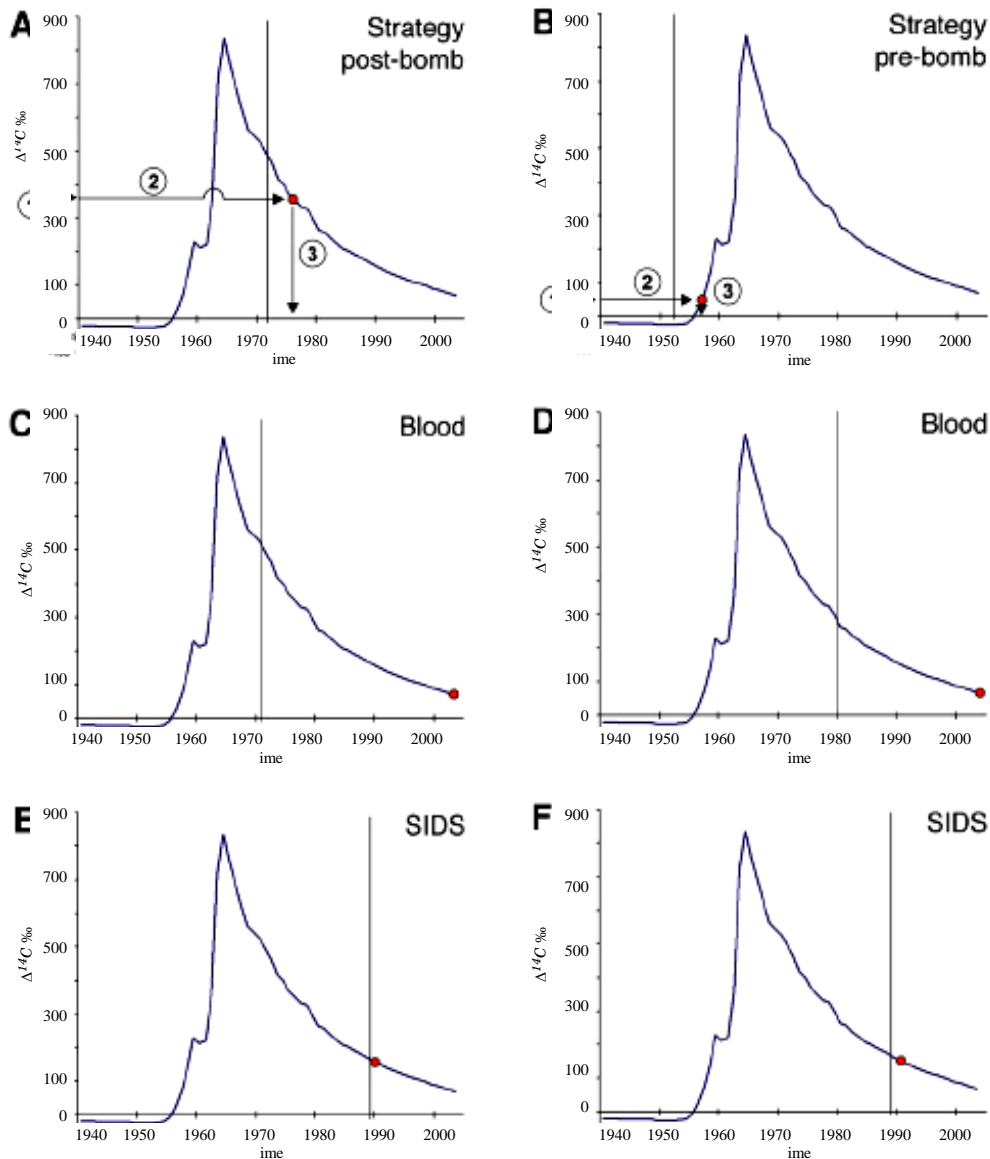


Рисунок 2 – Рівні ^{14}C в геномній ДНК, які відображають дати народження клітин. (A і B) у схематичне зображення стратегії датування клітин. Індивідуум в (A) народився після ядерних випробувань, а індивідуум в (B) – до. Час народження позначено вертикаллю. По-перше, встановлюється з використанням технології AMS концентрація ^{14}C у геномній ДНК клітинної популяції. По-друге, отримана величина ^{14}C співвідноситься з атмосферним рівнем для визначення періоду часу, якому вона належить (червона крапка). По-третє, визначається рік на осі x, який відповідає даті народження даної популяції клітин. (C і D) – рівні ^{14}C у геномній ДНК клітин крові, які мають значний кругообіг, відповідають сучасним атмосферним рівням у рік проведення досліджень (2004). (E і F) - рівні ^{14}C у геномній ДНК набагато старіших клітин (клітини мозку архівних зразків – sudden infant death syndrome (SIDS)) відповідають тому періоду часу, коли вони утворилися

А чи можуть бути точно датовані клітини, які утворилися раніше? Для відповіді на подібне питання були проаналізовані ДНК архівних зразків тканин мозку (sudden infant death syndrome – SIDS) (рис. 2E, 2F).

Виявилося, що рівні ^{14}C у ДНК із ранньої постнатальної тканини мозку, які відповідають моменту народження організму (рис. 2E, 2F), відповідають рівням ^{14}C як у клітинах-нейронах, утворених пренатально, так і в клітинах, утворених в післяродовий період (glial-клітини). Цей аналіз клітин, утворених у фіксовані періоди часу, підтверджує те, що рівні ^{14}C у ДНК можна використовувати для визначення дати народження клітини.

Взагалі напрямки застосування AMS охоплюють 7 найбільших доменів навколишнього середовища: атмосферу, біосферу, гідросферу, кріосферу, літосферу, космосферу і техносферу. За словами Кароліни Холівей (керівник національної AMS-лабораторії в Ліверморі, США), майбутнє цієї технології буде пов'язано з медико-біологічними дослідженнями. Ще одним із прикладів подібного застосування AMS є дослідження протипухлинного потенціалу антрациклінових антибіотиків, а саме рівня відповідних аддуктів із ДНК. Недостатня чутливість існуючих аналізів не дає відповіді, чи є такі, наприклад, аддукти, як Адріаміцин-ДНК, показником одного із механізмів протипухлинної дії адріаміцину? Існуюча чутливість для наведеної системи лежить на рівні декілька аддуктів на 10^4 бр ДНК при використанні *надклінічних* концентрацій препарату. У той самий час застосування AMS відкриває можливість реєстрації Адріаміцин-ДНК аддуктів на рівні 4.4 на 10^7 бр ДНК у MCF-7 ракових клітинах при *клінічно-допустимій концентрації* препарату [5].

Технологія MALDI-зображень

На сьогодні практично більшість аналітичних методів спроможні на візуалізацію досліджуваного об'єкта [6], тобто отримувати комплементарну інформацію як за розподілом молекул у просторі, так і про їх склад та молекулярну структуру. Для MALDI-TOF - мас-спектрометрії, як і для інших методів (FTIR, Raman-спектроскопії) візуалізація об'єкта досягається шляхом сканування області лазерного збудження вздовж площини зразка. Очевидно, що роздільна здатність методу, головним чином, залежить від довжини хвилі лазерного опромінення, яка складає в даних методах декілька мікрометрів. Як вже відмічалось вище, мас-спектрометрія взагалі, а MALDI-TOF, зокрема, є ефективною технологією для ідентифікації та дослідження первинної структури протеїнів у біологічних структурах, включаючи і ракові пухлини. Після двомірного електрофорезу розділені точки переміщують на мішень MALDI-TOF. Після лазерного опромінення зразка, який знаходиться в інертній матриці, протеїни з масами до 100 000 дальтон іонізуються як цілі молекули, практично, без фрагментації. Скануючи лазерний промінь, можна отримати спектри різних точок зразка і, таким чином, використовуючи окрему масу в спектрі як параметр зображення, отримати карту розподілу окремих протеїнів у зразку. Найбільш відповідальним та складним у отриманні MALDI-зображень є процедура приготування зразка [6]. Із організму вирізається тканина, з якої після замороження готується кризріз товщиною декілька мікрометрів. Далі цей зріз покривають інертною матрицею методом вібраційного розпилювання, контролюючи процес спеціальними приладами на основі світлорозсіювання. У результаті цієї дуже довготривалої процедури підготовки проби як нагорода відкривається можливість для отримання унікальної інформації із MALDI-зображень, які далі можна використовувати для пошуку біомаркерів різних захворювань, у тому числі й ракових (рис. 3), тобто використовувати MS як високочутливий інструмент для ранньої діагностики дуже небезпечних захворювань.

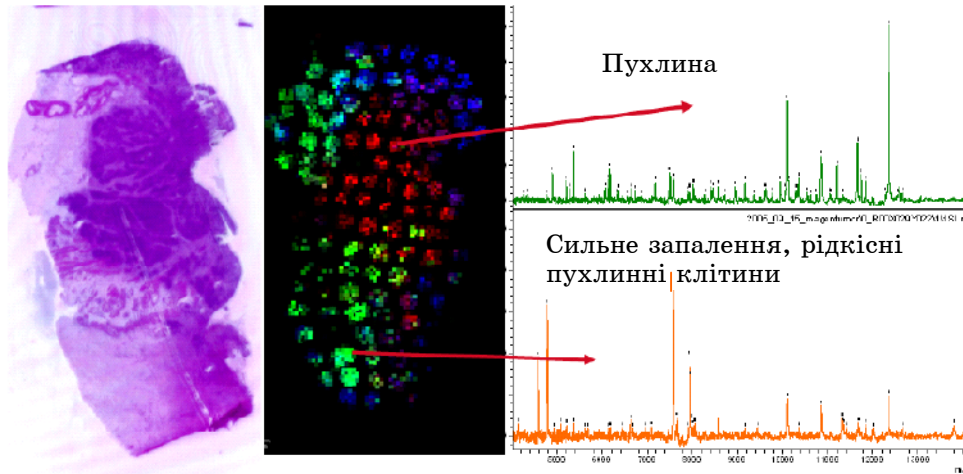


Рисунок 3 – Тканини пухлини шлунка. Зліва - оптичне зображення, всередині - MALDI-зображення, праворуч – спектри. Видно, що MALDI-TOF-спектри пухлинних тканин значно відрізняються від мукозних та епітеліальних тканин. Картина, складена із характерних для цих компонентів масових чисел, дозволяє визначити граничні розміри пухлини [6]

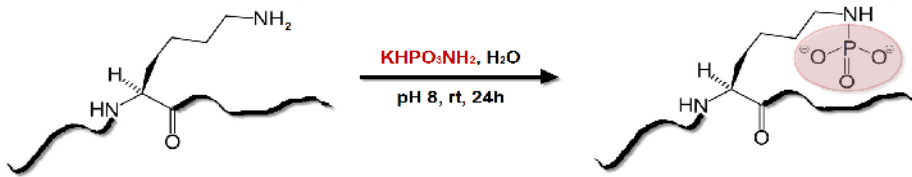


Рисунок 4 – Схема пептидного фосфорилування з участю -аміногрупи лізинової амінокислоти [8]

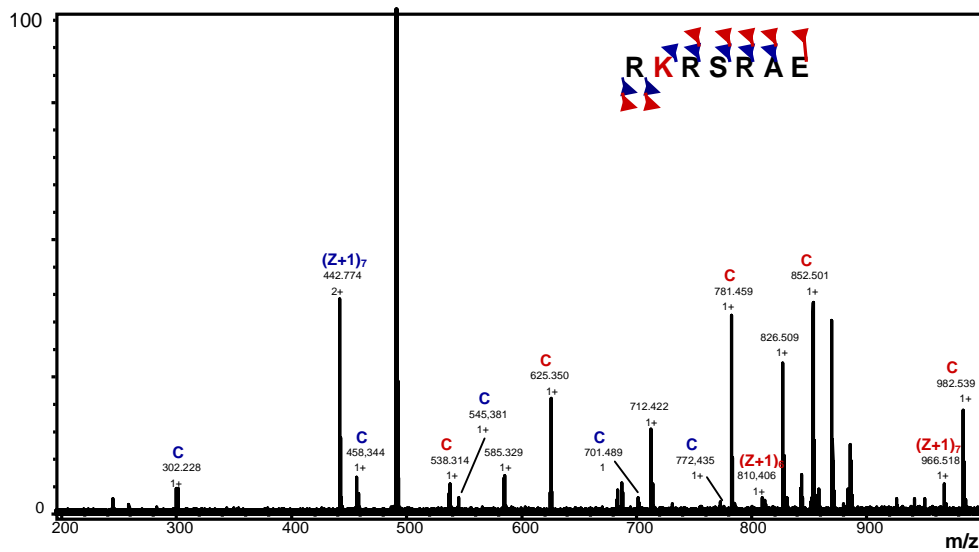


Рисунок 5 – ECD-спектр фрагментації (прекурсорний іон m/z 491,7). C, Z (червоні) являють собою фосфорильовані фрагменти досліджуваного в роботі [8] пептиду

Мас-спектрометрія біомаркерів раку

Як відомо, існує декілька загальноприйнятих біомаркерів для масового скринінгу, діагнозу того чи іншого захворювання, моніторингу терапії, але всі вони характеризуються недостатньою специфічністю. Навіть у випадку пухлинно-асоційованого антигену СА-125, який є більш-менше специфічним біомаркером, його кількість у сироватці крові хворих раком яєчника першої стадії є таким самим, як і у здорових людей. Тому, впродовж останніх років для пошуку у сироватці крові більш специфічних (нових) біомаркерів онкохворих людей все частіше використовують так звані постгеномні методи аналізу, серед яких мас-спектрометрія є однією з пріоритетних. Одним із варіантів методів сучасної MS для подібних цілей є SELDI-TOF MS (surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry) [7]. Суттю методики є використання за мас-спектрометричну мішень поверхні, що селективно зв'язує певні протеїни на основі адсорбційних, електростатичних та специфічних афінних взаємодій. Тобто розділення складної суміші біологічних молекул має місце прямо на мішені, що сприяє більш надійному пошуку протеїнових біомаркерів. Мас-спектри зразків групи хворих з підтвердженим діагнозом того чи іншого захворювання разом з контрольною групою людей порівнюють з використанням спеціального програмного забезпечення та методів математичної статистики. У результаті отримані успішні результати щодо виявлення відмінностей між сироваткою крові пацієнтів з раком шлунка, прямої кишки, простати та інших онкозахворювань. Але при цьому слід зазначити, що вся робота з пошуку нових біомаркерів в онкології з використанням протеомних підходів поки що не вийшла за рамки експериментальних досліджень. Впровадження цих підходів у практичну медицину потребує ще значної діяльності з валідації нових біомаркерів на великій кількості клінічних зразків, виявленні їх специфічності стосовно конкретної форми раку та їх ідентифікації.

Мас-спектрометрія посттрансляційно модифікованих протеїнів

Як уже відмічалось вище, посттрансляційна модифікація білків є необхідним для підтримки нормальної функції клітини. Однією з найважливіших серед подібних модифікацій є фосфорилування протеїнів. Цей процес є ключовим у регуляції багатьох сигнальних каскадів (інформаційного метаболізму) як в еукаріотних, так і прокаріотних клітинах (Fischer, Krebs, Нобелівська премія з медицини, 1992 р.). Метод MS, а точніше ESI-MS (electrospray/ionization mass spectrometry) є найбільш ефективним альтернативним методом для аналізу фосфорильованих протеїнів, який порівняно з іншими підходами (ЯМР, 2D-електрофорез) потребує мізерну кількість (на рівні декількох пікомолів) зразка в досліджуваній суміші протеїнів. Більше того, аналіз фрагментів, отриманих у мас-спектрометрії (тандемна MS), дає інформацію про сайти фосфорилування окремих амінокислот. Для фрагментації, в даному випадку, замість звичного методу CID (collision-induced dissociation) краще застосовувати ECD (electron-capture dissociation), який більше підходить для аналізу лабільних посттрансляційних протеїнових модифікацій [8]. Для прикладу наведемо фрагмент мас-спектрометричного дослідження фосфорильованого пептиду (рис. 4, 5), виконаного недавно в лабораторії проф. Шевчука (Вроцлавський університет, Польща) з використанням найновішого MS-інструмента Apex-Qe Ultra7T (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) [8].

Пік (m/z 491,7), який відповідає молекулярному іону $[M + 2H]^{2+}$, був вибраний як прекурсор для вивчення фрагментації двома методами: CID і ECD. CID-спектр, як показали дослідження, давав недостатню кількість фрагментів для визначення сайту фосфорилування даного пептиду. На

відміну від CID-спектра ECD-спектр (рис. 5) демонстрував фрагменти з фосфорною групою, до яких входить Lys² (K). З іншого боку, як видно із с_n- та z_n-серій фрагментів, навіть у випадку ECD-фрагментації, в мас-спектрі були наявні як фосфорильовані, так і нефосфорильовані фрагменти (наприклад, пік С із масою 852,501 проти піку С із масою 772,435 з різницею 80 Da, що відповідає HPO₃). Таким чином, ESI-MS у комбінації з ECD-фрагментацією є дуже ефективною технологією для реєстрації досить лабільних лізин-фосфорильованих пептидів та ідентифікації відповідних сайтів фосфорильовання.

ВИСНОВКИ

Із короткого аналізу наведених досліджень випливає, що сучасні мас-спектрометричні технології (AMS, ESI-MS, MALDI-TOF) є дуже необхідними і перспективними для прискореного вирішення актуальних проблем раку. Певні недоліки (проблеми з реєстрацією дуже малих концентрацій компонентів, включаючи високомолекулярні протеїни) все ще мають місце, і тому в ряді лабораторій світу проводяться інтенсивні дослідження в цьому напрямку з метою пошуку шляхів для практичного використання отриманих результатів у клініках.

SUMMARY

PROTEOMICS, MASS-SPECTROMETRY, CANCER

L. F. Sukhodub,

Medical Institute of Sumy State University, Sumy

The present from academician Chechun Vasyl Fedorovich – the book of Natalia Kavetsky-Masepa “About my farther R.E.Kavetsky and his friends” during our unforgettable talk in 2008 was a big stimulus in writing this paper. Biophysical aspects of tumor cells with using laser technology have been performed by Rostyslaw Evgenovich for the first time. That is why our further talk with Vasyl Fedorovich was connected mainly these aspects with a focus on using modern instrumental analytical tools (especially mass spectrometry – MALDI-TOF, FAB-MS) which present at the Institutes of the NAS of Ukraine in the early diagnostic of cancer (to identify some specific protein biomarkers), molecular carriers of signal cascades in cells and some other problems of modern molecular and nano-oncology. As a result a following paper has appeared.

Key words: proteomics, mass-spectrometry, cancer.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Kutschera W. Progress in isotope analysis at ultra-trace level by AMS / W. Kutschera // International Journal of Mass Spectrometry. – 2005. – Vol. 242. – P. 145-160.
2. Суходуб Л.Ф. Применение ускорительной масс-спектрометрии в экологических и медико-биологических исследованиях / Л.Ф. Суходуб // Наука та інновації. – 2010. – № 6. – С. 17-36.
3. Hellborg R. Accelerator mass spectrometry / R. Hellborg, G. Skog // Mass Spectrometry Reviews. – 2008. – Vol. 27. – С. 398-427.
4. Spalding K.L. Retrospective birth dating of cells in humans / K.L. Spalding, R.D. Dhardwaj et al. // Cell. – 2005. – Vol. 122. – С. 133-143.
5. Coldwell K.E. Detection of Adriamycin-DNA adducts by accelerator mass spectrometry at clinically relevant Adriamycin concentration / K.E. Coldwell, S.M. Cutts, T.J. Ognibene et al. // Nucleic Acids Research. – 2008. – Vol. 36, Issue16. – P. 1-10.
6. Eichhoff U. От спектров к спектральным изображениям / U. Eichhoff // Методы и объекты химического анализа. – 2010. – Т. 5, № 1. – С. 4-13.
7. Merchant M. Electrophoresis // M. Merchant, S.R. Weinberger. – 2000. – № 21. – С. 1164-1177.
8. Kowalewska K. Electron capture dissociation mass spectrometry analysis of lysine-phosphorylated peptides / K. Kowalewska, P. Stefanowicz, T. Rumanin et al. [Електронний ресурс]. - - Режим доступу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20144148>

Надійшла до редакції 20 вересня 2011 р.