

ПРОТЕОМНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ДЕГЕНЕРАТИВНО-ДИСТРОФИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ СУСТАВОВ (ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ)

PROTEOMIC RESEARCH OF JOINT DISEASES (REVIEW)

M. Yezhov
I. Yezhov
E. Malyshev
A. Malov

Summary. The article describes the current state of proteomic studies in degenerative-dystrophic diseases of the joints. The goals and objectives of proteomics are presented, the main methods are listed, data on changes in the concentration of certain proteins in diseases such as osteoarthritis, aseptic necrosis of the femoral head, and Legge-Calve-Perthes disease are presented. Unresolved issues and possible prospects for the development of this area of science are shown.

Keywords: proteome, proteins, biomarkers, cartilage, synovial fluid, degenerative-dystrophic diseases of the joints.

Ежов Михаил Юрьевич

*Д.м.н., профессор, ФГБОУ ВО «Приволжский
исследовательский медицинский университет»
Минздрава России, Нижний Новгород*

Ежов Игорь Юрьевич

*Д.м.н., профессор, ФГБОУ ВО «Приволжский
исследовательский медицинский университет»
Минздрава России, Нижний Новгород; ФБУЗ «Приволжский
окружной медицинский центр» ФМБА России. г. Нижний
Новгород*

Малышев Евгений Степанович

*Д.м.н., профессор, ФГБОУ ВО «Приволжский
исследовательский медицинский университет»
Минздрава России, Нижний Новгород*

Малов Александр Александрович

*К.м.н., доцент, ФГБОУ ВО «Приволжский
исследовательский медицинский университет»
Минздрава России, Нижний Новгород; ФБУЗ «Нижегородская
областная клиническая больница им. Н. А. Семашко».
г. Нижний Новгород*

Аннотация. В статье описано современное состояние протеомных исследований при дегенеративно-дистрофических заболеваниях суставов. Представлены цели и задачи протеомики, перечислены основные методы, приведены данные об изменении концентрации определенных белков при таких заболеваниях, как остеоартроз, асептический некроз головки бедренной кости, болезнь Легг-Кальве-Пертеса. Показаны нерешенные вопросы и возможные перспективы развития этого направления науки.

Ключевые слова: протеом, белки, биомаркеры, хрящ, синовиальная жидкость, дегенеративно-дистрофические заболевания суставов.

Введение

Протеомика — направление молекулярной биологии, занимающееся сравнительным изучением клеточных протеомов, т.е. всех белков, которые могут быть экспрессированы геномом данной клетки в определенный момент. Ее основной задачей является выяснение функциональной роли отдельных белков путем сопоставления их качественного и количественного составов в разных клетках, а также установление взаимосвязи структуры белка и его функций [1; 2].

Большие возможности для структурной протеомики предоставляет трехмерное строение некоторых белков, которое способствует как формированию выводов

о функциональных структурах белков [3], так и пониманию их лигандовой специфичности, а также разработке новых лекарственных средств — ингибиторов активных центров белка [4].

Каждое заболевание характеризуется собственным набором биомаркеров, по которым можно судить о рецидиве заболевания до клинической манифестации и об эффективности лечения [5]. Исследователи считают протеомную диагностику методом будущего, который позволит создать принципиально новые лекарственные средства и индивидуальный подход к лечению пациентов [6]. Для врача протеомная карта — это ключ к точному диагнозу, прогнозу и целенаправленному лечению, основа для новых открытий [7].

Современное состояние протеомики

В России создана государственная программа «Развитие науки и технологий», подпрограмма «Протеомика», целью которой является осуществление российской части международного проекта «Протеом человека». Задачи проводимых исследований — это идентификация белковых продуктов 285 генов 18-й хромосомы человека, определение новых биологических маркеров социально-значимых заболеваний, выявление с использованием постгеномных технологий новых фармакологических мишеней, создание новых лекарственных средств, расчет риска возникновения социально-значимых заболеваний на основе постгеномных данных, создание технологий для диагностики заболеваний, определение пределов вариабельности протеома здорового человека [6].

К 2013 г. были идентифицированы около 250 основных (около 85%) (немодифицированных) белков, кодируемых на 18-й хромосоме.

Определенная часть белков плазмы может носить прогностический характер, что позволяет им быть примененными в диагностике различных патологических состояний [4].

Достижения структурной геномики стали основой для перехода к так называемой функциональной геномике [4], изучающей формирование фенотипов в норме и при различных заболеваниях, в том числе при дегенеративно-дистрофических заболеваниях суставов [8; 9; 10].

Методы протеомного исследования

В настоящее время в протеомном анализе можно выделить три этапа с основными методами исследований.

1. Подготовка проб (LCM).
2. Фракционирование белков (двумерный электрофорез и многомерная хроматография).
3. Идентификация белков (масс-спектрометрический анализ — матричная лазерная десорбционная ионизация (MALDI), метод ионизации в электроспрее) [11].

Одним из основных методов протеомики является метод двумерного гель-электрофореза в сочетании с масс-спектрометрией молекулярной массы разделенных электрофорезом белков биологического материала [4]

Протеомный анализ основных дегенеративно-дистрофических заболеваний суставов

Основные дегенеративно-дистрофические заболевания суставов человека — это остеоартроз, асептический некроз головки бедренной кости, болезнь Пертеса и др.

В 2005 г. С. Ruiz-Romero et al. были получены первые данные о протеоме хондроцитов в норме. Было определено около 200 белковых пятен, включающих в себя 93 белка, проанализированных с помощью MALDI-TOF или MALDI-TOF/TOF MS методов. Было отмечено, что из всех идентифицированных белков в хрящевой ткани преобладают аннексин, виментин, трансгелин, декстрин, катепсин D и митохондриальная супероксиддисмутаза. Эти данные, по мнению исследователей, могут стать основой для дальнейшего изучения метаболизма хряща [12]

В настоящее время активно ведутся исследования по определению биомаркеров для ранней диагностики **остеоартроза**. В исследованиях при дегенеративно-дистрофических заболеваниях суставов протеомный профиль изучается в синовиальной жидкости [16], суставном хряще [13] и в крови [14; 15].

По данным W Liao et al. [16], которые исследовали протеом синовиальной жидкости коленного сустава при остеоартрозе в сравнении со здоровыми суставами, уровень гаптоглобина коррелирует с тяжестью остеоартроза. Средняя концентрация белков в синовиальной жидкости составляла 23,6 мкг/мкл. Было отмечено 6 белковых пятен, интенсивность которых статистически достоверно отличалась от таковой в синовиальной жидкости нормального сустава: гаптоглобин, проаполипептопротеин, D-фрагмент фибриногена (цепь В), цитоскелетный белок, ретинол-связывающий белок плазмы (цепь А), домен 3 сывороточного альбумина человека в комплексе с апоптотическим лигандом. Авторами было показано, что из отмеченных белков уровень гаптоглобина статистически достоверно зависит от стадии остеоартроза и превышает таковой в нормальной ткани в 3 (2 стадия артроза) — 9 раз (3 стадия). Средний уровень гаптоглобина при артрозе составлял 22,6 мкг/мл, тогда как в нормальной ткани — 2,5 мкг/мл. Этот белок исследователи рассматривают как маркер развития остеоартроза. Однако авторы отмечают, что нет доказательств, является ли он причиной заболевания или его следствием [16]. Исследования, проведенные Sinz A. et al. в 2002 г., также указывают на возможность использования гаптоглобина в качестве биомаркера остеоартроза.

M. Hermansson et al. [13] проанализировали около 100 белковых пятен, выделенных из суставного хряща.

Было выявлено, что при остеоартрозе повышался уровень экспрессии YKL-40 (хрящевой гликопротеин 39 и хитиназа-3-подобный белок 1), в то же время белок YKL 39 присутствовал в образцах как здорового, так и артрозно измененного хряща. Также было определено, что при остеоартрозе в хрящевой ткани вырабатываются два потенциально регуляторных вида молекул — активин А и фактора роста соединительной ткани. Для уточнения специфичности активина А и фактора роста соединительной ткани, как считают авторы, необходимы дальнейшие исследования, в том числе гибридикация *in situ* и иммуноцитохимическое исследование [13].

По данным Y. Xiang et al. [15], которые исследовали образцы сыворотки крови и синовиальной жидкости при остеоартрозе, было идентифицировано 19 белковых субъединиц. Авторами впервые были показаны изменения триоцефосфат изомеразы (TPI). IgG-тип антиTPI-аутоантител был выявлен в 25% обработанных образцах сыворотки крови и в 24% — синовиальной жидкости. Исследование проводилось в сравнении данных с образцами при ревматоидном артрите и системной волчанке. Было доказано статистически достоверное преобладание титров анти-TPI антител при остеоартрозе, причем уровень антител был выше в синовиальной жидкости, чем в крови. Это может отражать важность роли анти-TPI аутоантител в патологии суставов. TPI является гликолитическим ферментом, преобразующим D-глицеральдегид-3-фосфат и дигидроксиацетонфосфат. Исследователями было высказано предположение об участии аутоиммунных процессов в развитии остеоартроза в случае, если анти-TPI аутоантитела ингибируют ферментативную активность TPI, что требует дальнейших исследований [15].

E. J. Blain et al. в 2006 г. было установлено, что виментин цитоскелета обеспечивает поддержание целостности суставного хряща. При сравнении материала здорового и артрозно измененного хряща S. Lambrecht et al. в 2008 г. определили, что одним из характерных маркеров дегенеративно-дистрофического процесса при остеоартрозе является виментин, концентрация продуктов распада которого в хондроцитах была значительно повышена по сравнению со здоровой тканью.

В 2006 г. S. Grau et al. провели изучение диагностического значения сериновой протеазы (HtrA1) при развитии остеоартроза. Было выявлено, что ее уровень при остеоартрозе был повышен в 7 раз (38 нг/мл) по сравнению с нормой (5 нг/мл). Как указывают авторы, HtrA1 может приводить к разрушению компонентов внеклеточного матрикса, таких как фибронектин, агрекан, бигликан, декорин. Исследователи предположили, что специфическое ингибирование продукции или активности сериновой протеазы может стать новой стратегией лечения пациентов с остеоартрозом [18].

A. Chamberland et al. [19] также подтвердили роль HtrA1 в деградации хряща. Авторы выявили снижение уровня протеогликанов и повышение расщепления агрекана вследствие ее воздействия.

Болезнь Легг-Кальве-Пертеса — это асептический некроз головки бедренной кости в детском возрасте. В формировании болезни предполагается роль различных факторов. Это коагуляционные аномалии [20], нарушения иммунной системы [21], липидного обмена [22], увеличение костного морфогенетического белка BMP2 [23].

Исследователями было дифференцировано 26 белков, статистически достоверно выраженными из которых были белок комплемента C4-B, фактор комплемента H, субъединица α изоцитратдегидрогеназы. Экспрессия этих белков была повышена. Преобладание фактора комплемента C авторами интерпретировано как влияние на развитие этого заболевания воспалительных, некротических и апоптотических реакций. Как отмечают авторы, выраженная роль фактора комплемента H остается неясной в патогенезе заболевания. В тоже время количество белков, связанных с метаболизмом хряща S100-A8/S100-A9 (белки с низкой массой), было снижено. Эти белки имеют связь с восстановлением хряща или с деградацией, индуцированной воспалением [24]. Роль липидного обмена была подтверждена повышением уровня апополипротеина. Это исследование стало первым шагом в выяснении протеомного статуса таких пациентов.

В 2006 году T. Xiaoyun et al. были получены данные протеомных исследований сыворотки крови при **асептическом некрозе головки бедренной кости**. В сыворотке крови были снижены уровни экспрессии активатора плазминогена тканевого типа, костно-карбокситглутамат белка, C-сис, в то время как активатор ингибитора плазминогена типа 1 (PAI-1), crosslaps и анти-p53 антител были повышены. Было обнаружено, что уровни активатора плазминогена тканевого типа, активатора ингибитора плазминогена типа 1, crosslaps и антител анти-p53 всегда значительно отличались от таковых у пациентов с остеоартрозом, ревматоидным артритом и переломами. Эти результаты свидетельствуют о том, что сывороточные уровни этих четырех белков могут быть использованы в качестве диагностических биомаркеров асептического некроза головки бедренной кости [8].

При протеомном исследовании [25] стероид-индуцированного асептического некроза головки бедренной кости было обнаружено 1600 белковых пятен, из которых было дифференцировано 4 белка: ингибитор α -трипсина тяжелой цепи H4 (ITIH4), компоненты комплемента C3, C4 и A2MG белок, связывающий сосудистый эндотелиаль-

ный фактор роста. Уровни этих белков были значительно ниже у больных с асептическим некрозом головки бедренной кости, чем у здоровых. В отличие от сыворотки, в некротической костной ткани не было обнаружено С4 и IPIN4. Как указывают исследователи, все четыре белка тесно связаны с апоптозом, и, следовательно, по мнению авторов, результаты исследования указывают на важную роль апоптоза в развитии асептического некроза головки бедренной кости. Кроме того, A2MG-комплекс ингибирует активность гепарина, что приводит к повышенной коагуляции, а также влияет на гиперлипидемию, на наличие свободных радикалов и факторов деградации, что позволяет предположить прогностическую значимость белка и делает его терапевтической мишенью при асептическом некрозе головки бедренной кости [25].

Проблемы и перспективы протеомики

Многие исследователи убеждены, что необходимо продолжать поиск новых специфических биомаркеров для изучения деградации хряща [33], ранней диагностики артроза, оценки прогрессирования заболевания, уточнения прогноза [30; 31; 23; 16]. Диагностика артроза на ранних стадиях обеспечит разработку новых альтернативных методов лечения, объективизирование прогноза заболевания [32; 27]. Протеомные исследования являются перспективным подходом к диагностике и лечению остеоартроза и, по мнению исследователей, должны широко использоваться в клинической практике [28; 29].

Однако на сегодняшний день остается нерешенным вопрос — является ли маркер причиной заболевания, вызывает ли этот белок патологические явления в клетках или он является следствием неизвестных молекулярных патологических процессов, вызывающих нарушения в работе генов [13; 16].

Таким образом, протеомика может стать ключом к медицине будущего, поскольку она может помочь достичь следующие основополагающие цели медицины:

- ◆ ранняя диагностика заболеваний,
- ◆ прогнозирование течения заболеваний,
- ◆ разработка принципиально новых методов лечения,
- ◆ индивидуальное лечение на основе фактических данных,
- ◆ объективная оценка эффективности лечения.

Для достижения этих целей необходимо решить следующие задачи.

1. Завершить работу по определению нормы протеома человека.
2. Создать протеомные карты при дегенеративно-дистрофических заболеваниях суставов на основании выявления белков-маркеров.
3. Выявить механизм развития заболевания.
4. Решить вопрос о способах воздействия на гены, экспрессирующие белки-маркеры, соответственно разработать принципиально новые лекарственные средства.
5. Провести широкие протеомные исследования в клинических условиях.
6. Осуществить применение протеомных маркеров для объективного определения эффективности различных видов лечения, в том числе фармакологического.

Протеомные исследования при дегенеративно-дистрофических заболеваниях суставов, направленные на создание протеомной карты пациентов, могут позволить объективизировать эффективность лечения, создать принципиально новые стратегические подходы по воздействию на патологический процесс и стать основой молекулярной медицины будущего

ЛИТЕРАТУРА

1. Н.В. Китаева, Н. В. Фриго, С. В. Ротанов, Р. Ф. Хайрулин. Перспективы использования протеомных технологий в диагностике ИППП и заболеваний кожи / Вестник дерматологии и венерологии. 2010. № 4. с. 20–23
2. Humphery-Smith I., Cordwell S. J., Blackstock W. P.; Proteome research: complementarity and limitations with respect to the RNA and DNA worlds. Electrophoresis; 1997; 18 (8); 1217–1242.
3. Fiser A. Protein structure modeling in proteomics era// Expert Rev. Proteomics. 2004. Vol. 1. № 1. pp. 97–110.
4. Сорокина И.А., Вечканов Е. М. Современная геномика и протеомика / учебное пособие. Ростов-на-Дону, 2010
5. Волотковский И., Дубовская Л., Колеснева Е. Протеомика в повседневной жизни // В мире науки. № 4 (110). 2012
6. Государственная программа «Развитие науки и технологий, подпрограмма «Протеомика». 2010
7. Арчаков А. И. Что за геномикой? — протеомика. // Вопр. мед. химии. 2000. № 1. С. 19–24.
8. Xiaoyun T., Daozhang C., Yaoliang W. et al. Comparative analysis of serum proteomes: discovery of proteins associated with osteonecrosis of the femoral head. The journal of laboratory and clinical medicine. 2006. Volume 148, Issue 3, P. 114–119
9. Lambrecht S., Verbruggen G., Verdonk P. C. M., Elewaut D., Deforce D., Differential proteome analysis of normal and osteoarthritic chondrocytes reveals distortion of vimentin network in osteoarthritis Osteoarthritis and Cartilage Volume 16, Issue 2, February 2008, P. 163–173

10. Ruiyu L., Lihong F., Longbin Y. et al. Comparative study of serum proteomes in Legg-Calvé-Perthes disease BMC Musculoskelet Disord. 2015; 16: 281.
11. Дынник О.Б., Залесский В. Н. Современные биоаналитические (протеомные) технологии в лабораторной диагностике ревматических заболеваний. Украинський ревматологічний журнал. № 2 (24). 2006. с. 17–24.
12. Ruiz-Romero C., López-Armada M.J., Blanco F.J. Proteomic characterization of human normal articular chondrocytes: a novel tool for the study of osteoarthritis and other rheumatic diseases. Proteomics. 2005 Aug;5(12):3048–59.
13. Hermansson M., Sawaji Y., Bolton M. et al. Proteomic analysis of articular cartilage shows increased type II collagen synthesis in osteoarthritis and expression of inhibin betaA (activin A), a regulatory molecule for chondrocytes J Biol Chem, 279 (2004), p. 43514–43521
14. Sinz A., Bantscheff M., Mikkat S. et al. Mass spectrometric proteome analyses of synovial fluids and plasmas from patients suffering from rheumatoid arthritis and comparison to reactive arthritis or osteoarthritis. Electrophoresis; 2002; 23 (19); 3445–3456.
15. Xiang Y., Sekine T., Nakamura H. et al. Proteomic surveillance of autoimmunity in osteoarthritis: Identification of triosephosphate isomerase as an autoantigen in patients with osteoarthritis. Arthritis & Rheumatism; 2004; 50 (5); 1511–1521.
16. Liao W., Li Z., Zhang H., Li J., Wang K., Yang Y. Proteomic analysis of synovial fluid as an analytical tool to detect candidate biomarkers for knee osteoarthritis. Int J Clin Exp Pathol. 2015 Sep 1; 8(9):9975–89
17. Blain E.J., Gilbert S. J., Hayes A. J. et al. Disassembly of the vimentin cytoskeleton disrupts articular cartilage chondrocyte homeostasis. Matrix Biol 2006;25:398–408
18. Grau S., Richards P.J., Kerr B. et al. The role of human HtrA1 in arthritic disease. J Biol Chem 2006;281:6124–9
19. Chamberland A., Wang E., Jones A. R. et al. Identification of a novel HtrA1-susceptible cleavage site in human aggrecan: evidence for the involvement of HtrA1 in aggrecan proteolysis in vivo. J Biol Chem 2009;284:27352–9
20. Vosmaer A., Pereira R. R., Koenderman J. S., Rosendaal F. R., Cannegieter S. C. Coagulation abnormalities in Legg-Calvé-Perthes disease. J Bone Joint Surg Am. 2010;92(1):121–8
21. Gaiko G.V., Goncharova L. D., Zolotukhin S. E., Donchenko L. I. Mechanism of early metabolism disorders and immunological reactivity in children with Perthes disease/ Lik Sprava. 2001;1:56–61
22. Lee J.H., Zhou L., Kwon K. S., Lee D., Park B. H., Kim J. R. Role of leptin in legg-calvé-perthes disease. J Orthop Res. 2013;31(10):1605–10
23. Kamiya N., Shafer S., Oxendine I., Mortlock D. P., Chandler R. L., Oxburgh L. et al. Acute BMP2 upregulation following induction of ischemic osteonecrosis in immature femoral head. Bone. 2013;53(1):239–47
24. Barksby H.E., Hui W., Wappler I., Peters H. H., Milner J. M., Richards C. D. et al. Interleukin-1 in combination with oncostatin M up-regulates multiple genes in chondrocytes: implications for cartilage destruction and repair. Arthritis Rheum. 2006;54:540–550
25. Chen Y.,* Zeng C., Zeng H. et al. Comparative serum proteome expression of the steroid-induced femoral head osteonecrosis in adults Exp Ther Med. 2015 Jan; 9 (1): 77–83.
26. Gao W. L., Wu L. S., Zi J. H., Wu B., Li Y. Z., Song Y. C., Cai D. Z. Measurement of serum estrogen and estrogen metabolites in pre- and postmenopausal women with osteoarthritis using high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. Braz J Med Biol Res. 2015 Feb;48(2):146–53
27. Mickiewicz B., Kelly J. J., Ludwig T. E., Weljie A. M., Wiley J. P., Schmidt T. A., Vogel H. J. Metabolic analysis of knee synovial fluid as a potential diagnostic approach for osteoarthritis. J Orthop Res. 2015 Nov;33(11):1631–8
28. Blanco F.J. Osteoarthritis year in review 2014: we need more biochemical biomarkers in qualification phase. Osteoarthritis Cartilage. 2014 Dec;22(12):2025–32
29. Tsolis K. C., Bei E. S., Papathanasiou I., Kostopoulou F., Gkretsi V., Kalantzaki K., Malizos K., Zervakis M., Tsezou A., Economou A. Comparative proteomic analysis of hypertrophic chondrocytes in osteoarthritis. Clin Proteomics. 2015 Apr 25;12(1):12
30. Ahmed U., Anwar A., Savage R. S. et al. Biomarkers of early stage osteoarthritis, rheumatoid arthritis and musculoskeletal health. Sci Rep. 2015 Mar 19;5:9259
31. Cillero-Pastor B., Eijkel G. B., Blanco F. J., Heeren R. M. Protein classification and distribution in osteoarthritic human synovial tissue by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry imaging. Anal Bioanal Chem. 2015 Mar;407(8):2213–22
32. Lourido L., Calamia V., Mateos J., Fernández-Puente P., Fernández-Tajes J., Blanco F. J., Ruiz-Romero C. Quantitative proteomic profiling of human articular cartilage degradation in osteoarthritis. J Proteome Res. 2014 Dec 5;13(12):6096–106
33. Hayashi J., Kihara M., Kato H., Nishimura T. A proteomic profile of synoviocyte lesions microdissected from formalin-fixed paraffin-embedded synovial tissues of rheumatoid arthritis. Clin Proteomics. 2015 Aug 6;12(1):20

© Ежов Михаил Юрьевич, Ежов Игорь Юрьевич,
Мальшев Евгений Степанович, Малов Александр Александрович.
Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»