

Received: 2014.03.17
Accepted: 2015.02.17
Published: 2015.05.04

Mikromacierze białkowe i tandemowa spektrometria mas w poszukiwaniu proteomicznych biomarkerów preeklampsji

Identification of proteomic biomarkers of preeclampsia using protein microarray and tandem mass spectrometry

Karol Charkiewicz^{1,2}, Elwira Jasinska¹, Piotr Laudanski¹

¹ Klinika Perinatologii, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Białystok

² Klinika Perinatologii, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Białystok

Streszczenie

Preeklampsja (PE) jest główną przyczyną śmierci płodu i matki. Dokładny patomechanizm stanu przedrzucawkowego nie został do tej pory poznany. Preeklampsja współistnieje z wieloma innymi chorobami, które często trudno ze sobą powiązać i znaleźć powody ich występowania. Istnieje wiele czynników predykcji PE, ale nie są one wysoce swoiste. Diagnoza stanu przedrzucawkowego wydaje się bardzo skomplikowana, co jest kolejnym argumentem za zgłębianiem wiedzy na temat tej choroby. Mimo iż dotychczas dokonano wiele odkryć na temat patomechanizmu PE z użyciem metod proteomicznych, ciągle nie ma jednego, swoistego biomarkera bądź klasyfikatora biomarkerów stanu przedrzucawkowego. Badania na poziomie genomu są ważne, ponieważ mogą pomóc nam zrozumieć genetyczne predyspozycje pacjentów dotkniętych tą chorobą. Niemniej jednak naukowcy ostatnimi czasy zaczęli interesować się patofizjologią PE i próbują znaleźć odpowiedź na pytanie: co jest prawdziwą, bezpośrednią przyczyną stanu przedrzucawkowego? A zatem, odkrycie białka, które byłoby dobrym predykcyjnym czynnikiem rozwoju PE, znacznie przyspieszyłoby opiekę medyczną nad kobietami w ciąży, a tym samym zmniejszyłoby ryzyko wystąpienia zespołu HELLP i śmierci płodu i matki. Oprócz funkcji diagnostycznej takiego odkrycia, pomogłoby lepiej zrozumieć patogenezę stanu przedrzucawkowego i być może znaleźć w przyszłości lek stosowany do zahamowania rozwoju tej choroby. Aby dokonać przełomu w tej dziedzinie, naukowcy zmuszeni są do korzystania z najnowocześniejszych metod proteomiki, które pozwalają na analizę niewielkich ilości materiału biologicznego, w możliwie najkrótszym czasie, dając tym samym wiele informacji na temat istniejących białek w próbce. Taką optymalizację umożliwiają dwie techniki, najczęściej wykorzystywane przez naukowców: tandemowa spektrometria mas i mikromacierze białkowe.

Słowa kluczowe: biomarkery • era postgenomowa • mikromacierze białkowe • preeklampsja • proteomika • tandemowa spektrometria mas

Summary

Preeclampsia (PE) is the leading cause of death of the fetus and the mother. The exact pathomechanism has not so far been clarified. PE coexists with many other diseases, but it is often difficult to explain the association between them and find a clear reason for their occurrence. There are many predictive factors, but none are highly specific in preeclampsia. The diagnosis of preeclampsia seems to be very complex, which is another argument for the exploration of knowledge on this subject. Although many of the discoveries have hitherto been made in the

Keywords:	field of proteomics, still no single specific biomarker of preeclampsia has been discovered. Research at the genome level is important because it can help us understand the genetic predisposition of patients affected by this disease. Nevertheless, researchers have recently become more interested in the pathophysiology of PE, and they are trying to answer the question: what is the real, direct cause of preeclampsia? Thus, the discovery of a protein that is a good predictor of preeclampsia development would significantly accelerate the medical care of pregnant women, and consequently reduce the risk of occurrence of HELLP syndrome and fetal death. Apart from the predictive and diagnostic function, such a discovery would help us to better understand the pathogenesis of preeclampsia and to find in the future a medical drug to suppress this disease. In order to make a breakthrough in this field, scientists need to use the most modern methods of proteomics, which allow for the analysis of small amounts of biological material in the shortest possible time, thereby giving a lot of information about existing proteins in the sample. Such optimization allows two methods, most commonly used by researchers: tandem mass spectrometry and protein microarray technique.
Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1151286
Word count:	6082
Tables:	0
Figures:	6
References:	47

Adres autora: mgr Karol Charkiewicz, Klinika Perinatologii, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, ul. Marii Skłodowskiej Curie 24a, 15-276 Białystok; e-mail: karol.charkiewicz@umb.edu.pl

Wykaz skrótów: **CBA** – cytometria oparta na magnetycznych/lateksowych kuleczkach (cytometric beads assay); **ECD** – rozpad z wychwytem elektronów (electron capture dissociation); **ESI** – elektrorozpylanie (electrospray ionization); **FPPM** – mikromacierze białkowe z fazą prostą (forward-phase protein microarray); **GC** – chromatografia gazowa (gas chromatography); **HELLP** – zespół HELLP (hemolytic anemia, elevated liver enzymes, low platelet count); **HPLC** – wysokosprawna chromatografia cieczowa (high-performance liquid chromatography); **MALDI** – desorpcja laserowa z udziałem matrycy (matrix-assisted laser desorption/ionization); **MS** – spektrometria mas (mass spectrometry); **MS/MS** – tandemowa spektrometria mas (tandem mass spectrometry); **m/z** – stosunek masy do ładunku jonu; **PE** – preeklampsja (preeclampsia); **RPPM** – mikromacierze białkowe z fazą odwróconą (reverse-phase protein microarray); **SELDI** – powierzchniowo wzmocniona laserowa desorpcja/ionizacja (surface-enhanced laser desorption/ionization); **TOF** – analizator czasu przelotu (time of flight); **UPLC** – ultrasprawna chromatografia cieczowa (ultrahigh-performance liquid chromatography).

WPROWADZENIE

Preeklampsja (stan przedrzucawkowy) jest chorobą występującą w 3-5% ciąży w Europie Zachodniej i Ameryce Północnej [9]. Odnotowuje się prawie 8,5 mln przypadków rocznie na całym świecie [1]; jest najczęstszą przyczyną śmiertelności kobiet w ciąży. Klinicznie schorzenie to wiąże się z nadciśnieniem $\geq 140/90$ mmHg i białkomoczem $\geq 0,3$ g/24 godz., występującymi po 20 tygodniu ciąży, u kobiet z wcześniej stwierdzonym prawidłowym ciśnieniem i brakiem białka w moczu [19]. Ocenia się, że u niemal 35% kobiet z nadciśnieniem ciążowym przed 34 tyg. ciąży rozwinię się preeklampsja. Przebieg stanu przedrzucawkowego jest osobniczo

zmienny, może przebiegać z różnym stopniem nasilenia nadciśnienia tętniczego i białkomoczem lub może być powikłany zespołem HELLP (hemolytic anemia, elevated liver enzymes, low platelet count) oraz rzucawką [43]. Do objawów towarzyszących należą uogólnione obrzęki, ból głowy oraz zaburzenia widzenia, a w cięższych przypadkach może wystąpić niewydolność wątroby i nerek, zaburzenia krzepnięcia, zespół niewydolności oddechowej oraz wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrastania płodu [9,19].

Mimo wielu hipotez, patogeneza stanu przedrzucawkowego nie została jednoznacznie ustalona, a najsukuczniejszym „lekarstwem” jest poród [5]. Istnieje wiele

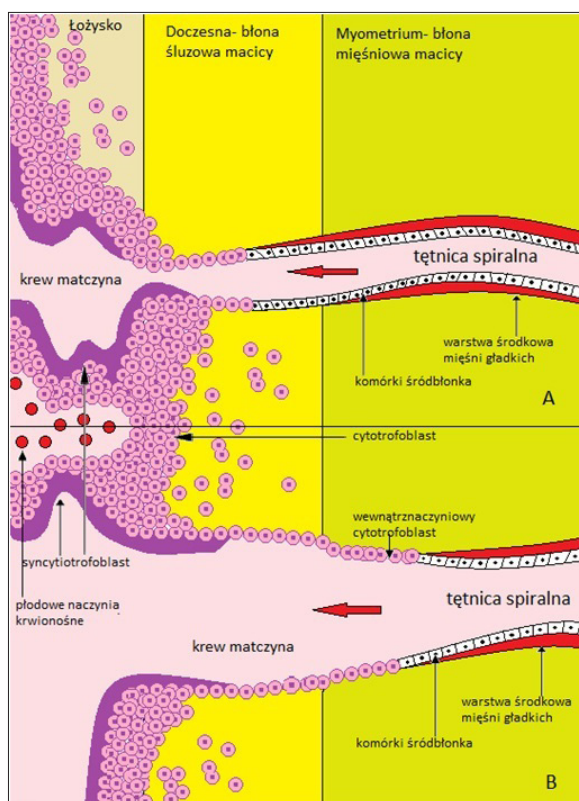
czynników ryzyka wystąpienia preeklampsji, do których należą m.in.: otyłość, nieprawidłowy profil lipidowy, cukrzyca typu 2, insulinooporność, cukrzyca ciążowa, wiek matki poniżej 20 r.ż. i powyżej 35 r.ż., ciąża mnoga, pierwsza ciąża, płeć męska płodu, zespół antyfosfolipidowy, infekcje dróg moczowych, preeklampsja w wywiadzie rodzinnym, choroby sercowo-naczyniowe występujące przed zajściem w ciążę [7,9,34].

PATOGENEZA

Do prawidłowego wzrostu i rozwoju płodu jest niezbędna przebudowa tętnic spiralnych w ścianie macicy między 10-16 tygodniem ciąży. Proces dzieli się według kryteriów strukturalnych na trzy główne etapy: 1) zmiany naczyniowe niezależne od inwazji komórek cytotrofoblastu, 2) przebudowa naczyń indukowana cytotrofoblastem położonym okołonaczyniowo, 3) infiltracja cytotrofoblastu w głąb tętnic spiralnych [18]. W wyniku tych przekształceń tętnice spiralne zmieniają się z naczyń o wolnym przepływie i dużym oporze w naczynia o szybkim przepływie i małym oporze, czyli takie, które zapewniają odpowiedni przepływ krwi przez łożysko i tym samym prawidłowy rozwój płodu [5,22] (ryc. 1B). W stanie przedrzucawkowym inwazja ścian naczyń przez komórki trofoblastu jest upośledzona, co powoduje, że tętnice spiralne pozostają wąskie, a płód nie otrzymuje wystarczającej ilości tlenu i substancji odżywczych do prawidłowego rozwoju [5] (ryc. 1A). Łożyskowe niedokrwienie powoduje uwolnienie przez łożysko czynniki białkowe i zaburza równowagę wśród czynników angiogennych, co wywołuje dysfunkcję śródbłonna tętnic spiralnych [26].

ERA POSTGENOMOWA

W przeciągu ostatniej dekady charakter badań istotnie się zmienił - coraz większy nacisk kładzie się na analizowanie genomu, proteomu czy metabolomu człowieka, w konkretnych chorobach. Okres intensywnego rozwoju proteomiki i metabolomiki zaczęto nazywać erą postgenomową [3]. Genotyp komórki traktuje się jako odzwierciedlenie jej potencjału, natomiast fenotyp określa konkretne funkcje, jakie pełnią poszczególne molekuly w organizmie, oddając aktualny i dynamiczny obraz jego stanu fizjologicznego/patofizjologicznego [46]. Najlepszym rozwiązaniem w poznaniu patomechanizmu danej choroby są badania prowadzone na poziomie zarówno genomu, transkryptomu, proteomu, jak i metabolomu. Należy jednak pamiętać, że związek między genotypem, a fenotypem jest często niezrozumiały. Zdarza się, iż ekspresja genu nie przekłada się na ekspresję konkretnych białek [35]. Analiza proteomiczna i metabolomiczna jest bardziej złożona niż analiza genomu. Wynika to między innymi z tego, iż jest on strukturą bardziej stabilną niż proteom i metabolom. Zmiany obecne w genomie, pod wpływem różnych czynników środowiskowych mogą zachodzić w ciągu godzin i minut, natomiast w proteomie i metabolomie w ciągu sekund i milisekund [40]. Ponadto proteom jest o wiele



Ryc. 1. Przebudowa tętnic spiralnych: w stanie przedrzucawkowym, gdzie nie następuje inwazja komórek cytotrofoblastu do tętnic spiralnych, a co za tym idzie nie powstają naczynia o niskim oporze i szybkim przepływie (A); w niepowikłanej ciąży naczynia wykazują prawidłowe poszerzenie w wyniku zastąpienia śródbłonna komórkami trofoblastu i utraty warstwy środkowej naczynia (mięśnie gładkie) (B) [22]

bardziej złożony i zróżnicowany niż genom. Szacuje się, że w organizmie człowieka może istnieć ponad milion białek niezmodyfikowanych oraz ponad dziesięć milionów białek zmodyfikowanych [10]. Przy takiej liczbie protein, suma metabolitów wydawać się może niska (1,5 tysiąca), jednak należy pamiętać, że to właśnie na poziomie metabolomu zachodzą wszelkie interakcje biochemiczne mogące być bezpośrednimi przyczynami stanów chorobowych. Genom i transkryptom mogą wyznaczyć jedynie potencjalną przyczynę procesów patofizjologicznych, ale nie mogą wskazać, jakie rzeczywiste zmiany wystąpią na etapie proteomu i metabolomu [10,11,28,35].

BIOMARKERY

W czasopiśmie medycznych pojawia się coraz więcej artykułów poświęconych badaniom nad poszukiwaniem nowych biologicznych cząsteczek, tzw. biomarkerów, które mogłyby w przyszłości odegrać istotną rolę we wczesnej nieinwazyjnej diagnostyce stanu przedrzucawkowego. Najlepszym byłoby opracowanie klastra białek swoistych dla preeklampsji, co wpłynęłoby w znacznym stopniu na bardziej systemowe zrozumienie patomechanizmu tego schorzenia. Takie eksperymenty są

bardzo skomplikowane, ze względu na małą homogenność grupy badanej. Istnieje wiele czynników ryzyka wystąpienia stanu przedrzucawkowego. Współistnienie innych stanów chorobowych u kobiet ciężarnych z wcześniej rozpoznaną preeklampsją, utrudnia znalezienie bardzo swoistej dla tej konkretnej choroby cząsteczki. Wykluczenie pacjentek ze schorzeniami towarzyszącymi preeklampsji tworzy grupę badaną bardziej jednorodną i zwiększa szanse na znalezienie wiarygodnego biomarkera.

W pracy omówiono najnowsze odkrycia z zakresu preeklampsji, wykorzystujące najnowocześniejsze techniki proteomiczne, takie jak mikromacierze białkowe i tandemowa spektrometria masowa.

Mikromacierze białkowe

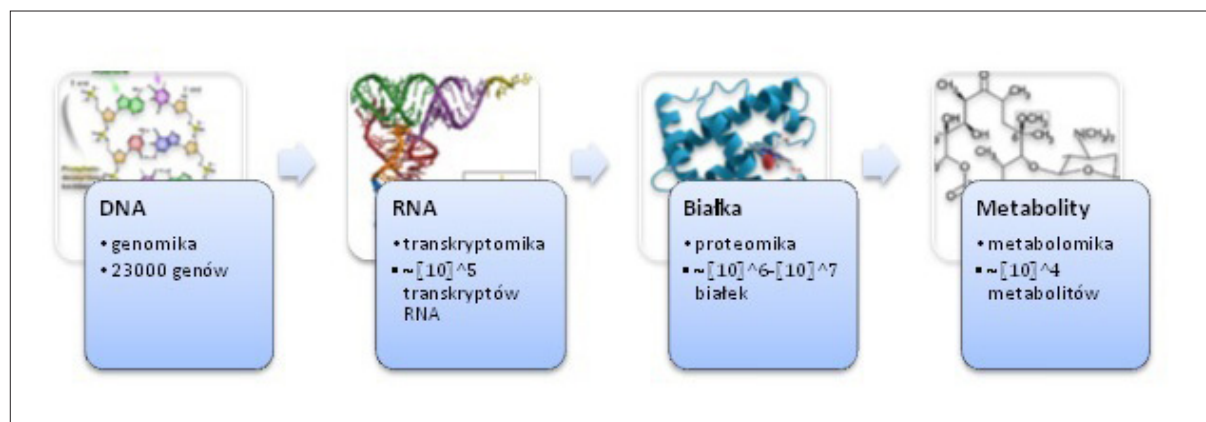
Technologie mikromacierzy białkowych mogą zostać wykorzystane w diagnostyce *in vitro*. W dziedzinie patologii ciąży, oprócz preeklampsji, mikromacierze białkowe wykorzystuje się również często w badaniach nad porodem przedwczesnym [23,24,25].

Zminiaturyzowane, równoległe testy immunologiczne są przygotowane w taki sposób, aby ze stosunkowo niewielkiej ilości materiału biologicznego, z użyciem jak najmniejszej liczby odczynników, uzyskać jak najwięcej informacji o białkach obecnych w próbce [13]. Bazując na technologii mikromacierzy DNA, pierwotnie stworzono tzw. tablice białkowe (szklane slajdy), gdzie w mikrosplotach, o średnicy mniejszej niż 250 μm , trwale umieszczono, w zależności od wykorzystywanej metody, białka bądź pierwszorzędowe przeciwciała [2,47]. W zależności od tego, co chcemy zbadać w materiale biologicznym, możemy wybrać odpowiedni zmultipleksowany format mikromacierzy białkowych. Wszystkie metody dzielą się na dwie grupy: mikromacierze białkowe z fazą normalną (FPPM - Forward-Phase Protein Microarray) i mikromacierze białkowe z fazą odwróconą (RPPM - Reverse-Phase Protein Microarray) [45]. FPPM są to najczęściej wyko-

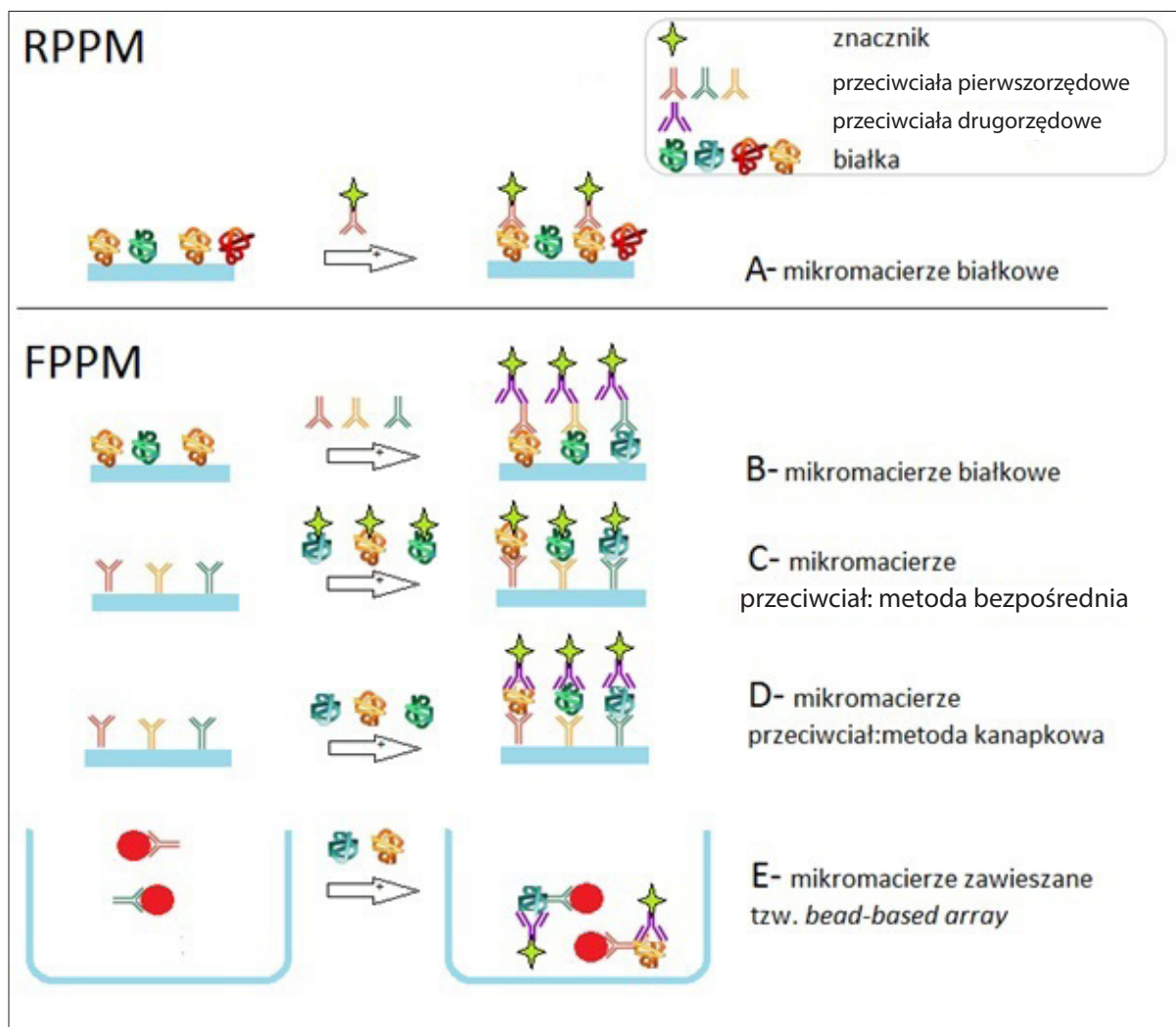
rzystywane testy, w których na powierzchni spotów opłaszczonych jest wiele określonych molekuł. Mogą to być slajdy z przeciwciałami skierowanymi przeciw konkretnym białkom, bardzo przydatne w poszukiwaniu biomarkerów (ryc. 3C i D), bądź slajdy z proteinami w ilości nawet kilku tysięcy, służące do określenia interakcji białko-białko (ryc. 3B) [12,44]. Testy oparte na mikromacierzach płaskich (związanych z powierzchnią stałą) nadają się do oznaczenia wielu czynników podczas trwania jednego eksperymentu. Alternatywę dla tego typu testów są formaty oparte na lateksowych kuleczkach (ryc. 3E), szczególnie gdy liczba analizowanych molekuł ma być porównywalnie mniejsza niż w mikromacierzach płaskich. Użycie tej metody umożliwia oznaczenie setek próbek jednocześnie [20,47]. W mikromacierzach białkowych z odwróconą fazą (RPPM) można wykorzystać bardzo zróżnicowane próbki, takie jak lizaty tkankowe. Każdy mikrosplot na slajdzie zawiera cały proteom tkanki bądź komórki. Platformy tego typu wykorzystuje się najczęściej w badaniach nad nowotworami, kiedy poszukiwane są konkretne białka w komórce nowotworowej (ryc. 3A) [38].

We wszystkich testach, wiązane białka wizualizuje się przez ich wcześniejsze wyznakowanie bądź dodanie wyznakowanego, drugorzędowego przeciwciała, a emitowany przez znacznik sygnał jest odczytywany przez skanery do rejestracji fluorescencji, chemiluminescencji lub kolorymetrii [20,31,45]. W przypadku mikromacierzy białkowych opartych na lateksowych kuleczkach, rejestracja odbywa się dzięki technice cytometrii przepływowej (ryc. 4).

Wadą metody macierzy jest wysoka cena gotowych zestawów, jednak w przeciwieństwie do spektrometru masowego, sprzęt do analizy jest stosunkowo tani. Koszt slajdów rekompensowany jest możliwością różnego rodzaju analiz, jakie można wykonać, począwszy od pomiaru zawartości danych białek w materiale biologicznym, kończąc na badaniu interakcji między cząsteczkami. Zaletą tego typu metody jest duży wybór



Ryc. 2. Konceptyjny związek i złożoność: genomu, transkryptomu, proteomu i metabolomu. Metabolomika wyróżnia się tym, że dostarcza informacji o rzeczywistym obrazie fenotypu człowieka, który jest determinowany przez sumę: ekspresji i regulacji genów, interakcji i ilości białka, wpływu czynników środowiskowych [10,11,27,34]



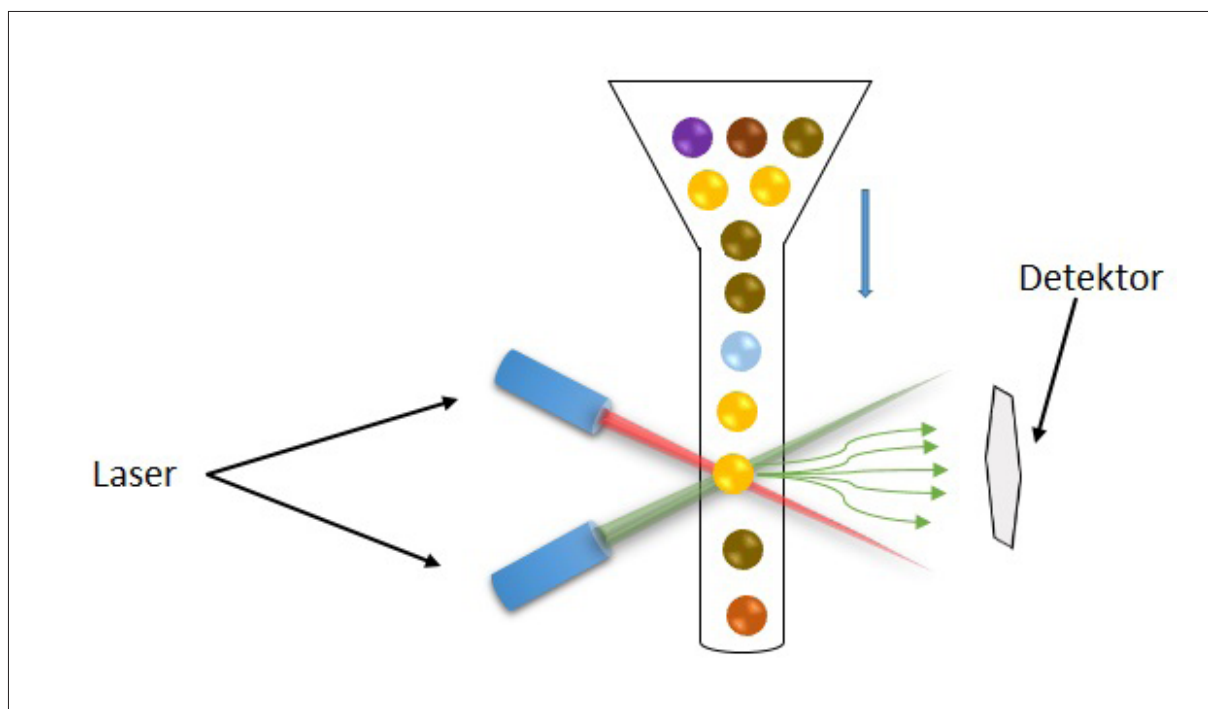
Ryc. 3. Podział mikromacierzy białkowych na dwie główne grupy: RPPM - Reverse-Phase Protein Microarray, FPPM - Forward-Phase Protein Microarray [44]

gotowych paneli białkowych oraz możliwość stworzenia własnych kompozycji protein, które chce się przeanalizować.

Mikromacierze białkowe w preeklampsji

W 2012 r. Hou i wsp., używając płaskich macierzy białkowych, dokonali analizy surowicy pochodzącej od pięciu kobiet z preeklampsją. Spośród 120 wybranych cytokin, pięć okazało się przydatne statystycznie: w grupie badanej poziom TNF-R1, Axl, TIMP-2, ICAM-3 był wyższy, natomiast poziom TGF- β 3 był niższy w stosunku do grupy kontrolnej. Zwiększoną zawartość TNF-R1, Axl i TIMP-2 u kobiet z preeklampsją potwierdzono testami ELISA [15]. Dużo większą, bo aż sześćdziesięciosobową grupę ciężarnych z wczesnym stanem przedrzucawkowym, poddano badaniom eksperymentalnym na Uniwersytecie w Budapeszcie, w 2010 r. W surowicy krwi tych kobiet zmierzono poziom 17 czynników białkowych używając multipleksowych, zawieszanych macierzy białkowych (ryc.3E). Stwierdzono, że stężenia IL-1 β , -1, -1ra, -2, -4, -6, -8, -10, -12p40, -12p70, -18, IFN- γ , TNF-

α , IP-10, MCP-1, ICAM-1 i VCAM-1 są istotnie większe w surowicy pacjentek z preeklampsją w porównaniu do kobiet z ciążą niepowikłaną. Warto zaznaczyć, iż duże stężenia IP-10, MCP-1, ICAM-1 i VCAM-1 korelowały pozytywnie z podwyższonymi biochemicznymi parametrami oznaczanymi w krwi pełnej, takimi jak czynnik von Willebranda, fibronektyna czy białko CRP [37]. Wykorzystując tę samą technikę, Davila i wsp. przeanalizowali osocze 33 ciężarnych kobiet z Boliwii (6 z wczesną postacią PE, 12 z późną postacią PE i 15 kobiet z niepowikłaną ciążą) pod względem sześciu cytokin. Uzyskano wyniki, mówiące o zwiększonym stężeniu prozapalnej IL-6 i IL-8 oraz antagonisty receptora interleukiny 1 (IL-1ra) w osoczu pacjentek z preeklampsją w porównaniu z grupą kontrolną [8]. Podobne rezultaty uzyskali Pinheiro i wsp. analizując panel 9 czynników zapalnych w osoczu aż 219 kobiet, w tym 69 z PE, 69 z prawidłowym ciśnieniem w okresie ciąży i 81 niebędących w ciąży. Naukowcy stwierdzili zwiększone stężenie IL-6, IL-8 oraz INF- γ w osoczu kobiet z ciężkim stanem przedrzucawkowym, w stosunku do zdrowych ciężarnych jak i kobiet niebędących w ciąży. W tym eksperymencie cytokiny



Ryc. 4. W mikromacierzach białkowych „bead-based array”, jako czytnik wykorzystuje się technikę cytometrii przepływowej. Każda zawieszona w ciekłym środowisku kulka ma charakterystyczny kolor i jest opłaszczona przez jeden rodzaj przeciwciał skierowany przeciwko konkretnemu białku. Cytometr ustawia wszystkie kuleczki w jednej linii tak, aby stały laser czerwony (635 nm) mógł sklasyfikować kolor kulki, a zielony laser (532 nm) mógł wzbudzić barwnik do świecenia [20]

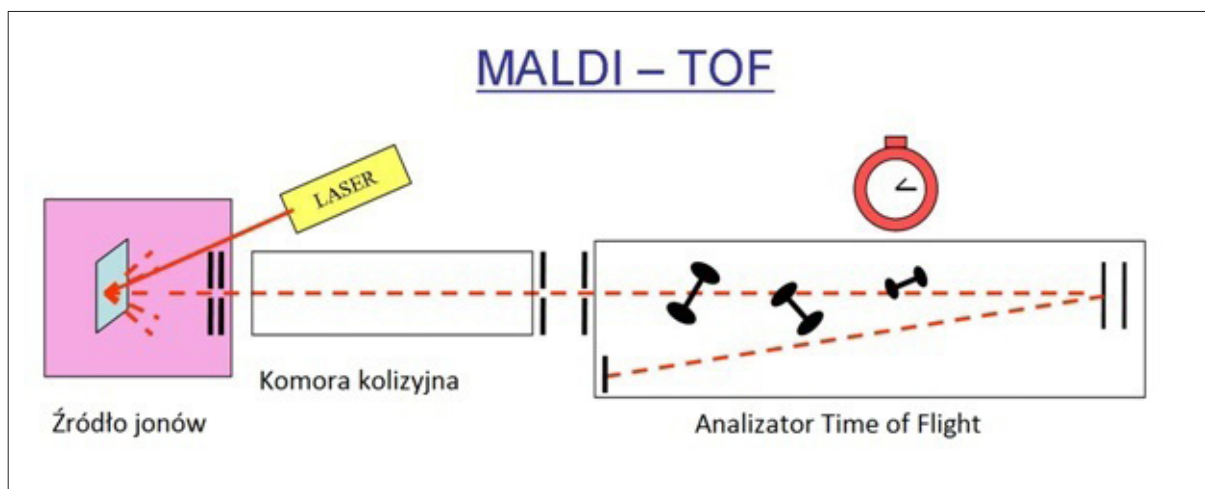
oznaczano techniką cytometric beads assay (CBA) opartej na tej samej zasadzie, co wcześniej omawiana metoda bead-based multiplex array wykorzystująca cytometrię przepływową [32]. Istotnie podwyższone stężenia IL-6 i IL-8 we krwi kobiet z preeklampsją potwierdzają również badania prowadzone w Uniwersyteckim Szpitalu w Linköping. Wykorzystując metodę bead-based array, przebadano surowice 30 pacjentek, z których połowa znajdowała się we wczesnym stanie przedrzucawkowym [16]. Naukowcy z Randers County Hospital, w grupie 32 kobiet z PE i 67 kobiet z niepowikłaną ciążą, analizowali co tydzień, począwszy od 18 tyg. ciąży do porodu, panel tych samych białek używając metody bead-based array. Uzyskano wynik mówiący o podwyższonym stężeniu: TNF- α we krwi pacjentek z PE, między 26 a 29 tyg. ciąży oraz IL-6 powyżej 36 tyg. ciąży [21].

Spektrometria mas

Spektrometria mas (MS) jest jedną z głównych wielkoskalowych technik stosowanych obecnie w proteomice i metabolomice. Analiza związków chemicznych tą metodą polega na jonizacji cząsteczek w stanie gazowym, a następnie ich rozdzieleniu w zależności od stosunku ich masy do ładunków (m/z), co powoduje powstanie widma masowego, będącego podstawą do identyfikacji molekuł. Każdy spektrometr jest zbudowany na podstawie tego samego schematu: jonizator \rightarrow analizator m/z \rightarrow detektor. Istnieje wiele rodzajów spektrometrów mas, w zależności od tego jaki jonizator, analizator czy detektor jest wyko-

rzystywany. W metabolomice i proteomice najczęściej są używane jonizatory MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization) - desorpcja laserowa z udziałem matrycy, SELDI (surface-enhanced laser desorption/ionization) - powierzchniowo wzmocniona laserowa desorpcja/ionizacja oraz ESI (electrospray ionization) - elektrosprężanie. Natomiast najpopularniejszym analizatorem od niedawna jest TOF (time of flight) - analizator czasu przelotu, gdzie mierzony jest czas, jaki zajmuje jonom przebycie drogi od jonizatora do detektora. Jego wartość zależy od stosunku m/z badanych jonów [17]. Spektrometr MALDI-TOF, którego część stanowi analizator TOF, jest często stosowany w analizie proteomu w płynach biologicznych (ryc. 5) [14,29].

W ostatnich latach zaczęto łączyć ze sobą dwa analizatory, tworząc w ten sposób tandemową spektrometrię mas (MS/MS): w pierwszym z nich są przepuszczane jony matczyne, które w komorze kolizyjnej są fragmentowane na jony potomne, badane kolejno w drugim analizatorze. W czasie analiz proteomu, komora pozwala na fragmentację wcześniej wyselekcjonowanych peptydów i obserwację mas poszczególnych aminokwasów, a przez to ich identyfikację. Do najnowszych technik fragmentacji peptydów należą: ECD (electron capture dissociation) - rozpad z wychwytem elektronów oraz ETD (electron transport dissociation) - rozpad z transportem elektronów [38]. Tandemowy spektrometr mas mogą tworzyć również połączone ze sobą dwa różne analizatory, jak w spektrometrze do analizy metabolitów - Q-TOF (ryc.



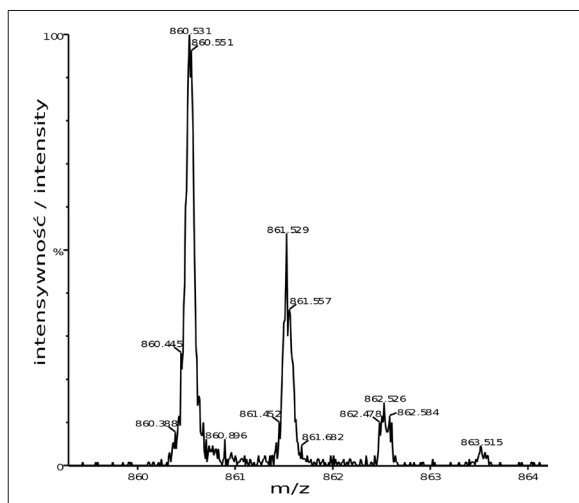
Ryc. 5. Schemat budowy spektrometru MALDI-TOF [29]

6). Źródłem jonów jest tu elektrorozpylanie, pierwszym analizatorem kwadrupol (Q – quadropol, cztery symetrycznie ułożone pręty, wytwarzające w danym momencie określone pole magnetyczne, przez środek którego są w stanie przelecieć jony o określonym stosunku m/z), za nim komora kolizyjna, a następnie drugi analizator TOF [42]. Oprócz TOF równie często jako analizatory są wykorzystywane kwadrupole, stosowane tandemowo (potrójny kwadrupol) czy pułapki jonowe (IT – ion trap bądź orbitrap). Poddawany analizie materiał biologiczny to złożona mieszanina związków chemicznych. Naukowcy chcąc ułatwić rozdział, wybierają spektrometry połączone z chromatografami, tj. HPLC (wysokosprawna chromatografia cieczowa), UPLC (ultrasprawna chromatografia cieczowa) bądź GC (chromatografia gazowa). Jest bardzo wiele rodzajów spektrometrów i wybór zależy jedynie od tego, co i w jaki sposób chce się oznaczyć. Wadą takiego sprzętu jest niewątpliwie jego wysoka cena, jednak samo oznaczanie jest już stosunkowo tanie. Ważną zaletą tandemowej spektrometrii masowej jest możliwość oznaczenia w małej objętości badanego materiału biologicznego, nawet do tysiąca białek bądź metabolitów z dokładnością do dwunastego miejsca po przecinku.

Spektrometria mas w preeklampsji

Naukowcy z Narodowego Uniwersytetu w Seulu przeanalizowali za pomocą spektrometru SELDI-TOF płyn owodniowy, pochodzący od 10 kobiet będących na początku drugiego trymestru ciąży, u których w późniejszych tygodniach rozwinęła się preeklampsja. Zidentyfikowano cztery białka o następujących stosunkach m/z : 9080, 14 040, 14 345, 28 087, których poziom był istotnie wyższy w płynie owodniowym oraz jedno białko o stosunku m/z 4679, które miało mniejszą zawartość w płynie owodniowym kobiet z później rozwiniętą rzucawką, w stosunku do pacjentek w podobnym wieku ciąży bez preeklampsji. Niestety nie rozpoznano poszczególnych białek [30]. Corty i wsp. wykorzystując kapilarną elektroforezę połączoną z tandemowym spektrometrem

mas (mikro-TOF), przeanalizowali moczu 18 pacjentek w 28 tyg. ciąży, u których rozwinęła się preeklampsja i 17 pacjentek ciężarnych bez preeklampsji. Analiza statystyczna otrzymanych pików wykazała, że w grupie badanej występuje zwiększona zawartość aż 50 cząsteczek białkowych w stosunku do grupy kontrolnej. Dowiedziono, że wszystkie istotne statystycznie białka są fragmentami uromoduliny, łańcucha α fibrynogenu i łańcucha α kolagenu [6]. Watanabe i wsp. wykazali, na niezbyt licznej grupie 6 ciężarnych z wczesną preeklampsją, z użyciem spektrometru MALDI-TOF, zwiększone stężenie klusteryny w surowicy, w porównaniu do ciężarnych z niepowikłaną ciążą. Przypuszcza się, że zwiększone stężenie tego białka w stanie przedrzucawkowym ma związek z jego działaniem hamującym przebudowę błon komórkowych [41]. Na Uniwersytecie Yale Buhimschi i wsp., za pomocą dwóch spektrometrów: Q-TOF i SELDI-TOF, przeanalizowali moczu 39 ciężarnych z preeklampsją wczesną i 21 ciężarnych zdrowych. Uzyskano kilka różnicujących obie grupy pików pochodzących z fragmentów białkowych, których zawartość była istotnie większa w moczu kobiet ze stanem przedrzucawkowym. Jak się okazało, analizowane molekuly są fragmentami albuminy i serpiny 1 [4]. Sun i wsp. w 2007 r. w homogenacie tkankowym trofoblastu 5-ciu pacjentek z preeklampsją, wykazali w stosunku do kontroli, zwiększoną zawartość 4 peptydów: prekursor disulfidoizomerazy, białko obecne w retikulum endoplazmatycznym, dehydrogenaza dihydroliipoamidowa i TIM21 like-protein oraz zmniejszoną zawartość 3 peptydów: peroxinredoxin 2, disulfidoizomeraza ER-60 i $\Delta 3,5$ - $\Delta 2,4$ -dienoyl-CoA isomeraza [36]. W tak samo licznej grupie badanej ($n=5$) Liu i wsp. dokonali analizy proteomicznej surowicy spektrometrem masowym LTQ-orbitrap. Uzyskane wyniki wskazują na zwiększone stężenie w surowicy kobiet z preeklampsją białek: ApoE, ApoA2, APOL1, ApoH, ApoJ, SAA4, somatomammotropiny oraz fibuliny 1, w porównaniu do surowicy ciężarnych, zdrowych kobiet [27]. Wszystkie te białka są zaangażowane w metabolizm lipidów, co może świadczyć, iż proces ten jest ściśle związany z patogenezą preeklampsji [27,33].



Ryc. 6. Przykładowy wykres widma Q-TOF-MS mas białek obecnych w moczu kobiet z preeklampsją [4]

PODSUMOWANIE

Preeklampsja jest najczęstszą przyczyną śmierci płodu i matki. Nie poznano jeszcze dokładnie patomechanizmu tej choroby, tym bardziej że współistnieje ona z wieloma innymi schorzeniami, które często trudno ze sobą powiązać i znaleźć pewną przyczynę ich wystąpienia. Czynniki predykcyjnych preeklampsji istnieje bardzo wiele, ale żaden nie jest wysoce swoisty. Sama diagnostyka rozwiniętej już preeklampsji też wydaje się bardzo złożona i skomplikowana, co jest kolejnym argumentem za zgłębianiem wiedzy na ten temat. Mimo wielu dokonanych odkryć w dziedzinie proteomiki, nadal nie znaleziono jednego, swoistego biomarkera preeklampsji. Badania naukowe na szczeblu genomu są ważne, ponieważ mogą pomóc zrozumieć uwarunkowania genetyczne pacjentek dotkniętych tym schorzeniem. Jednak bardziej interesujący wydaje się aktualny stan patofizjologiczny i to,

co jest realną, bezpośrednią przyczyną stanu przedrzucawkowego, tym bardziej że ekspresja na poziomie genu nie zawsze przekłada się na ekspresję na poziomie proteomu. Zatem odkrycie białka bądź pewnego klastra białek, które byłoby dobrym czynnikiem przewidującym rozwój preeklampsji, znacznie przyspieszyłoby opiekę lekarską nad ciężarnymi kobietami, a dzięki temu zmniejszyłoby ryzyko wystąpienia zespołu HELLP oraz śmierci płodu. Poza funkcją predykcyjną i diagnostyczną takie odkrycie pomogłoby być może, w sposób bardziej systemowy zrozumieć patomechanizm preeklampsji, a w przyszłości opracować lek hamujący jej wystąpienie. Jednak, żeby dokonać przełomu w tej dziedzinie, naukowcy są zmuszeni do wykorzystywania jak najnowocześniejszych metod proteomicznych, które pozwalają na analizę niewielkiej ilości materiału biologicznego, w jak najkrótszym czasie, dając tym samym potencjalnie dużo informacji. Taką optymalizację badań umożliwiają dwie metody najczęściej wykorzystywane przez naukowców: tandemowa spektrometria mas i technika mikromacierzy białkowych. W obu używa się podobną ilość materiału ($\pm 100 \mu\text{l}$), jednak różni je koszt wykonanych analiz. W spektrometrii mas najdroższym elementem jest spektrometr, natomiast oznaczenia są stosunkowo tanie, co potencjalnie umożliwi wykonywanie diagnostyki za pomocą tej techniki. Skaner do mikromacierzy jest kilkakrotnie tańszy od spektrometru, ale zestawy do analiz są drogie (nawet po kilka tysięcy złotych/słajd). Obie metody dają też inne możliwości badania i mają szerokie zastosowania, dlatego nie wykluczają się wzajemnie. Każdy zespół naukowy wybiera metodę w zależności od tego, co aktualnie chce zbadać. O ile spektrometrem można przeanalizować ilościowo całe widmo związków istniejących w materiale biologicznym, o tyle macierze białkowe są najczęściej nastawione na sprawdzenie obecności konkretnego panelu białek oraz dają możliwość zbadania interakcji białko-białko bądź profilowanie autoprzeciwciał. Obie techniki świetnie się uzupełniają, umożliwiając zarówno profilowanie białek pod kątem biomarkerów, jak i analizę interakcji pod kątem zrozumienia patomechanizmu preeklampsji.

PIŚMIENICTWO

- [1] Anderson U.D., Olsson M.G., Kristensen K.H., Akerstrom B., Hansson S.R.: Review: Biochemical markers to predict preeclampsia. *Placenta*, 2012; 33: S42-S47
- [2] Barbulovic-Nad I., Lucente M., Sun Y., Zhang M., Wheeler A.R., Bussmann M.: Bio-microarray fabrication techniques - a review. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2006; 26: 237-259
- [3] Brower V.: Proteomics: biology in the post-genomic era. Companies all over the world rush to lead the way in the new post-genomics race. *EMBO Rep.*, 2001; 2: 558-560
- [4] Buhimschi I.A., Zhao G., Funai E.F., Harris N., Sasson I.E., Bernstein I.M., Saade G.R., Buhimschi C.S.: Proteomic profiling of urine identifies specific fragments of serpin-1 and albumin as biomarkers of preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2008; 199: 551.e1-551.e16
- [5] Carty D.M., Delles C., Dominiczak A.F.: Novel biomarkers for predicting preeclampsia. *Trends Cardiovasc. Med.*, 2008; 18: 186-194
- [6] Carty D.M., Siwy J., Brennan J.E., Zurbig P., Mullen W., Franke J., McCulloch J.W., Roberts C.T., North R.A., Chappell L.C., Mischak H., Poston L., Dominiczak A.F., Delles C.: Urinary proteomics for prediction of preeclampsia. *Hypertension*, 2011; 57: 561-569
- [7] Conde-Agudelo A., Villar J., Lindheimer M.: World Health Organization systematic review of screening tests for preeclampsia. *Obstet. Gynecol.*, 2004; 104: 1367-1391
- [8] Davila R.D., Julian C.G., Browne V.A., Toledo-Jaldin L., Wilson M.J., Rodriguez A., Vargas E., Moore L.G.: Role of cytokines in altitude-associated preeclampsia. *Pregnancy Hypertens.*, 2012; 2: 65-70
- [9] Davison J.M., Homuth V., Jeyabalan A., Conrad K.P., Karumanchi S.A., Quaggin S., Dechend R., Luft F.C.: New aspects in the pathophysiology of preeclampsia. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2004; 15: 2440-2448

- [10] Gerszten R.E., Wang T.J.: The search for new cardiovascular biomarkers. *Nature*, 2008; 451: 949-952
- [11] Griffin J.L., Shockcor J.P.: Metabolic profiles of cancer cells. *Nat. Rev. Cancer*, 2004; 4: 551-561
- [12] Gulmann C., Sheehan K.M., Kay E.W., Liotta L.A., Petricoin E.F.3rd: Array-based proteomics: mapping of protein circuitries for diagnostics, prognostics, and therapy guidance in cancer. *J. Pathol.*, 2006; 208: 595-606
- [13] Hartmann M., Roeraade J., Stoll D., Templin M.F., Joos T.O.: Protein microarrays for diagnostic assays. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009; 393: 1407-1416
- [14] Hortin G.L.: The MALDI-TOF mass spectrometric view of the plasma proteome and peptidome. *Clin. Chem.*, 2006; 52: 1223-1237
- [15] Hou L., Zhu Y., Ma X., Li J., Zhang W.: Serum protein microarray analysis of patients with preeclampsia. *Mol. Med. Rep.*, 2012; 6: 83-87
- [16] Jonsson Y., Ruber M., Matthiesen L., Berg G., Nieminen K., Sharma S., Ernerudh J., Ekerfelt C.: Cytokine mapping of sera from women with preeclampsia and normal pregnancies. *J. Reprod. Immunol.*, 2006; 70: 83-91
- [17] Karas M., Bahr U., Dulcks T.: Nano-electrospray ionization mass spectrometry: addressing analytical problems beyond routine. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 2000; 366: 669-676
- [18] Kaufmann P., Black S., Huppertz B.: Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol. Reprod.*, 2003; 69: 1-7
- [19] Kim Y.J.: Pathogenesis and promising non-invasive markers for preeclampsia. *Obstet. Gynecol. Sci.*, 2013; 56: 2-7
- [20] Kingsmore S.F.: Multiplexed protein measurement: technologies and applications of protein and antibody arrays. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2006; 5: 310-320
- [21] Kronborg C.S., Gjedsted J., Vittinghus E., Hansen T.K., Allen J., Knudsen U.B.: Longitudinal measurement of cytokines in pre-eclamptic and normotensive pregnancies. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 2011; 90: 791-796
- [22] Lam C., Lim K.H., Karumanchi S.A.: Circulating angiogenic factors in the pathogenesis and prediction of preeclampsia. *Hypertension*, 2005; 46: 1077-1085
- [23] Laudanski P., Lemancewicz A., Kuc P., Charkiewicz K., Ramotowska B., Kretowska M., Jasinska E., Raba G., Karwasik-Kajszczarek K., Krackowski J., Laudanski T.: Chemokines profiling of patients with preterm birth. *Mediators Inflamm.*, 2014; 2014: 185758
- [24] Laudanski P., Lemancewicz A., Pierzynski P., Akerlund M., Laudanski T.: Decreased serum level of macrophage inflammatory chemokine-3 β /CCL19 in preterm labor and delivery. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 2006; 124: 23-26
- [25] Laudanski P., Zbucka-Kretowska M., Charkiewicz K., Wolczynski S., Wojcik D., Charkiewicz R.: Maternal plasma and amniotic fluid chemokines screening in fetal Down syndrome. *Mediators Inflamm.*, 2014; 2014: 835837
- [26] Lee E.S., Oh M.J., Jung J.W., Lim J.E., Seol H.J., Lee K.J., Kim H.J.: The levels of circulating vascular endothelial growth factor and soluble Flt-1 in pregnancies complicated by preeclampsia. *J. Korean Med. Sci.*, 2007; 22: 94-98
- [27] Liu C., Zhang N., Yu H., Chen Y., Liang Y., Deng H., Zhang Z.: Proteomic analysis of human serum for finding pathogenic factors and potential biomarkers in preeclampsia. *Placenta*, 2011; 32: 168-174
- [28] MacLellan W.R., Wang Y., Lusis A.J.: Systems-based approaches to cardiovascular disease. *Nat. Rev. Cardiol.*, 2012; 9: 172-184
- [29] Max Planck Institute for plant breeding research. MALDI-TOF-TOF MS/MS. https://www.mpi.z.mpg.de/44542/MALDI-TOF-TOF_MS_MS (15.03.2014)
- [30] Oh K.J., Park J.S., Norwitz E.R., Kim S.M., Kim B.J., Park C.W., Jun J.K., Syn H.C.: Proteomic biomarkers in second trimester amniotic fluid that identify women who are destined to develop preeclampsia. *Reprod. Sci.*, 2012; 19: 694-703
- [31] Pawlak M., Schick E., Bopp M.A., Schneider M.J., Oroszlan P., Ehrat M.: Zeptosens[®] protein microarrays: a novel high performance microarray platform for low abundance protein analysis. *Proteomics*, 2002; 2: 383-393
- [32] Pinheiro M.B., Martins-Filho O.A., Mota A.P., Alpoim P.N., Godoi L.C., Silveira A.C., Teixeira-Carvalho A., Gomes K.B., Dusse L.M.: Severe preeclampsia goes along with a cytokine network disturbance towards a systemic inflammatory state. *Cytokine*, 2013; 62: 165-173
- [33] Potter J.M., Nestel P.J.: The hyperlipidemia of pregnancy in normal and complicated pregnancies. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1979; 133: 165-170
- [34] Sattar N., Greer I.A.: Pregnancy complications and maternal cardiovascular risk: opportunities for intervention and screening? *Br. Med. J.*, 2002; 325: 157-160
- [35] Sauer S., Lange B.M., Gobom J., Nyarsik L., Seitz H., Lehrach H.: Miniaturization in functional genomics and proteomics. *Nat. Rev. Genet.*, 2005; 6: 465-476
- [36] Sun L.Z., Yang N.N., De W., Xiao Y.S.: Proteomic analysis of proteins differentially expressed in preeclamptic trophoblasts. *Gynecol. Obstet. Invest.*, 2007; 64: 17-23
- [37] Szarka A., Rigo J.Jr., Lazar L., Beko G., Molvarec A.: Circulating cytokines, chemokines and adhesion molecules in normal pregnancy and preeclampsia determined by multiplex suspension array. *BMC Immunol.*, 2010; 11: 59
- [38] VanMeter A.J., Rodriguez A.S., Bowman E.D., Jen J., Harris C.C., Deng J., Calvert V.S., Silvestri A., Fredolini C., Chandhoke V., Petricoin E.F.3rd, Liotta L.A., Espina V.: Laser capture microdissection and protein microarray analysis of human non-small cell lung cancer: differential epidermal growth factor receptor (EGFR) phosphorylation events associated with mutated EGFR compared with wild type. *Mol. Cell. Proteomics*, 2008; 7: 1902-1924
- [39] Watanabe H., Hamada H., Yamada N., Sohda S., Yamakawa-Kobayashi K., Yoshikawa H., Arinami T.: Proteome analysis reveals elevated serum levels of clusterin in patients with preeclampsia. *Proteomics*, 2004; 4: 537-543
- [40] Weibel K.E., Mor J.R., Fiechter A.: Rapid sampling of yeast cells and automated assays of adenylate, citrate, pyruvate and glucose-6-phosphate pools. *Anal. Biochem.*, 1974; 58: 208-216
- [41] Yarmush M.L., Jayaraman A.: Advances in proteomic technologies. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2002; 4: 349-373
- [42] Yin P., Zhao X., Li Q., Wang J., Li J., Xu G.: Metabonomics study of intestinal fistulas based on ultra-performance liquid chromatography coupled with Q-TOF mass spectrometry (UPLC/Q-TOF MS). *J. Proteome Res.*, 2006; 5: 2135-2143
- [43] Young B.C., Levine R.J., Karumanchi S.A.: Pathogenesis of preeclampsia. *Annu. Rev. Pathol.*, 2010; 5: 173-192
- [44] Yu X., Schneiderhan-Marra N., Hsu H.Y., Bachmann J., Joos T.O.: Protein microarrays: effective tools for the study of inflammatory diseases. *Methods Mol. Biol.*, 2009; 577: 199-214
- [45] Yu X., Schneiderhan-Marra N., Joos T.O.: Protein microarrays for personalized medicine. *Clin. Chem.*, 2010; 56: 376-387
- [46] Zenobi R.: Single-cell metabolomics: analytical and biological perspectives. *Science*, 2013; 342: 1243259
- [47] Zhu H., Snyder M.: Protein chip technology. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2003; 7: 55-63

Autorzy deklaruja brak potencjalnych konfliktow interesow.