

## REFERENCES

- Skvortsova V.I., Stakhovskaya L.V., Pryanikova N.A., Meshkova K.S. The secondary stroke prevention. *Consilium Medicum*. 2006; 8 (12): 70–3. (in Russian)
- Li C., Engström G., Berglund G., Janzon L., Hedblad B. Incidence of ischemic stroke in relation to asymptomatic carotid artery atherosclerosis in subjects with normal blood pressure. A prospective cohort study. *Cerebrovasc. Dis.* 2008; 26(3): 297.
- Gorelick P.B. Lipoprotein-associated phospholipase A2 and risk of stroke. *AM. J. Cardiol.* 2008; 101(12A): 34–40.
- AHA/ASA (2013). Available at <https://www.aan.com/Guidelines/Home/GetGuidelineContent/581>.
- Moussa I.D., Rundek T., Mohr J.P. Asymptomatic Carotid Artery Stenosis: A Primer on Risk Stratification and Management. *Informa UK Ltd.* 2007; 141–8.
- Shmonin A.A., Lazareva N.M., Stukova L.N., Bondareva E.A., Ачкасова В.В., Alexandrova M.A. et al. Insulin-like growth factor study in patients with atherosclerotic carotid stenosis. *Zhurnal Kliniko-laboratornyy konsilium*. 2012; 2–3 (46): 45–50. (in Russian)
- Shmonin A.A., Stukova L.N., Bondareva E.A., Melnikova E.V., Emanuel Y.V. Acute stroke: new treatment concepts. Erythropoietin serum level in patients with atherosclerotic symptomatic and asymptomatic carotid stenosis. *Abstract E-book. 22. European Stroke conference*. 2013: 301.
- Van Lammeren G.W., Moll F.L., De Borst G.J., De Kleijn D.P.V., De Vries J.P.M., Pasterkamp G. Atherosclerotic Plaque Biomarkers: Beyond the Horizon of the Vulnerable Plaque. *Current Cardiology Reviews*. 2011; 7 (1): 22–7.
- Elkind M.S.V., Tai W., Coates K., Paik M.C., Sacco R.L. High-Sensitivity C-Reactive Protein, Lipoprotein-Associated Phospholipase A2, and Outcome After Ischemic Stroke. *Arch Intern Med*. 2006; 166(19): 2073–9.
- Oei H.S., Van der Meer I.V., Hofman A., Koudstaal P.J., Stijnen T., Breteler M.M.B., Witteman J.C.M. Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 Activity Is Associated With Risk of Coronary Heart Disease and Ischemic Stroke: The Rotterdam Study. *Circulation*. 2005; 111 (5): 570–5.
- Ridker P.M., Rifai N., Rose L., Buring J.E., Cook N.R. Comparison of C-Reactive Protein and Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels in the Prediction of First Cardiovascular Events. *N. Engl. J. Med.* 2002; 347(20) : 1557–65.
- Di Napoli M., Schwanager M., Cappelli R., Ceccarelli E., Di Gianfilippo G., Donati C. et al. Evaluation of C-Reactive Protein Measurement for Assessing the Risk and Prognosis in Ischemic Stroke : A Statement for Health Care Professionals From the CRP Pooling Project Members. *Stroke*. 2005; 36 (6): 1316–29.
- Soloveva L.N., Shmonin A.A., Bondareva E.A., Lazareva N.M., Kholopova I.V., Blinova T.V. et al. Atherosclerosis biomarkers in patients with atherosclerotic carotid artery stenosis. *Zhurnal Nevrologii. i Psikiatrii im. S.S. Korsakova. Materialy III Rossiyskogo mezhdunarodnogo kongressa «Tserebrovaskulyarnaya patologiya i insul'v»*. Kazan'. 6–10 October 2014; 114(8): 206–7. (in Russian)
- Smolders B., Lemmens R., Thijs V. Lipoprotein (a) and Stroke A Meta-Analysis of Observational Studies. *Stroke*. 2007; 38(6): 1959–66.
- Christogiannis L., Milionis HJ, Elisaf M. Lipoprotein (a) and Stroke: An Overview. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2010; 19(6): 498.
- Shintani S., Kikuchi S., Hamaguchi H., Shiigai T. High serum lipoprotein(a) levels are an independent risk factor for cerebral infarction. *Stroke*. 1993; 24 (7): 965–9.
- Fialová L., Pilecková N., Bauer J., Soukupová J., Kalousová M., Malbohan I. et al. Pregnancy-associated plasma protein-A in patients with cerebrovascular diseases—a pilot study. *Prague Med. Rep.* 2006; 107(1): 37–45.
- Chen S., Li N., Deb-Chatterji M., Dong Q., Kielstein J.T., Weissenborn K. et al. Asymmetric Dimethylarginine as Marker and Mediator in Ischemic Stroke. Review. *Int. J. Mol. Sci.* 2012; 13(12): 15983–6004.
- Cucchiara B.L., Messe S.R., Sansing L., MacKenzie L., Taylor R.A., Pacelli J. et al. Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 and C-Reactive Protein for Risk-Stratification of Patients With TIA. *Stroke*. 2009; 40 (7): 2332–6.
- Adams H.P., Bendixen B.H., Kappelle L.J., Biller J., Love B.B., Gordon D.L. et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*. 1993; 24(1): 35–41.

Received 09.04.15

КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616.153.96-078.33

Гуманова Н.Г., Климушина М.В., Метельская В.А., Бойцов С.А.

## ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ТЕХНОЛОГИИ PROTEIN MICROARRAY (МИКРОЧИПОВ) ДЛЯ АНАЛИЗА БЕЛКОВОГО СОСТАВА СЫВОРОТКИ КРОВИ

ФГБУ «Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины» Минздрава России, 101990, г. Москва

Микрочиповая технология представляет собой удобный и относительно экономичный инструмент анализа специфичных биомаркеров с целью диагностики заболеваний, оценки эффективности терапии, исследования сигнальных путей. Для анализа белкового состава сыворотки крови нами были протестированы некоторые виды готовых микрочипов, ранее не применявшиеся на территории России. Нам удалось без предварительного обеднения сыворотки (удаления белков мажорных фракций) обнаружить 2% и 5% от матрицы чипов в зависимости от их разновидности. Таким образом, частичный белковый состав сыворотки крови можно анализировать с помощью микрочипов даже без предварительного удаления из нее белков мажорных фракций.

Ключевые слова: микрочипы; сыворотка крови; белковый состав.

Для цитирования: Клиническая лабораторная диагностика. 2015; 60 (10): 16–21.

Для корреспонденции: Климушина Марина Вячеславовна, [mklimushina@gmail.com](mailto:mklimushina@gmail.com), [mklimushina@gnicpm.ru](mailto:mklimushina@gnicpm.ru)  
For correspondence: [Klimushina M.V.](mailto:Klimushina M.V.), [mklimushina@gmail.com](mailto:mklimushina@gmail.com)

Gumanova N.G., Klimushina M.V., Metelskaya V.A., Boitsov S.A.

THE POSSIBILITIES OF APPLICATION OF TECHNOLOGY PROTEIN MICROARRAY (MICROCHIPS) FOR ANALYSIS OF PROTEIN COMPOSITION OF BLOOD SERUM

The state research center of preventive medicine of Minzdrav of Russia, 117334 Moscow, Russia

*The microchip technology represents convenient and relatively economic tool of analyzing specific biomarkers with the purpose to diagnose diseases, to evaluate effectiveness of therapy and to investigate signaling pathways. To analyze protein composition of blood serum certain types of finished microchips which were not applied previously on the territory of Russia. The detection from 2% to 5% out of matrix of chips depending on their variety was managed without preliminary depletion of serum (removal of proteins of major fractions). Hence, partial protein composition of blood serum can be analyzed with microchips even without preliminary removal of proteins of major fractions.*

**Key words:** microchip; blood serum; protein composition

**Citation:** *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika. 2015; 60 (10): 16–21. (in Russ.)*

**Введение.** Белковый микрочип представляет собой матрицу, содержащую молекулы белков или антител, предназначенную для одновременного анализа большого количества белковых компонентов в одном образце любой биологической жидкости. Микрочиповая технология является удобным и относительно экономичным по сравнению с тандемной масс-спектрометрией инструментом для анализа специфичных биомаркеров с целью диагностики заболеваний, оценки эффективности терапии, исследования сигнальных путей и пр.

Первые белковые микрочипы были разработаны еще в середине 80-х годов прошлого века, до разработки ДНК-микрочипов [1], но в силу длительности процесса их совершенствования они начали завоевывать область применения в лабораторной практике относительно недавно. По мере развития технологий, позволяющих улучшать качество специфичных антител против разнообразных белков, и снижения затрат на их очистку более совершенные микрочипы вышли на новую спираль развития и начали привлекать интерес исследователей в качестве инструмента для относительно экономичного одновременного анализа большого количества белковых маркеров в минимальных объемах сыворотки крови и других биологических сред [2, 3]. К настоящему времени разработаны платформы, содержащие до 9000 белков и более 4000 антител на одном слайде. Микрочипы, основанные на антителах, работают по принципу Western blot. Важно, чтобы выбранный продукт был надежен в эксплуатации и при соблюдении инструкции производителя гарантировал результат, адекватный заявленным характеристикам. Опыт показывает, что такое бывает не всегда. Стоимость микрочипов достаточно высока, чтобы перебирать продукты разных фирм-производителей вслепую и наугад, поэтому информация о том, насколько успешны были те или иные виды чипов для решения конкретных задач в реальной лабораторной практике, была бы полезной для исследователей и могла бы помочь сэкономить их силы, время и средства. На данный момент в российской печати практически отсутствуют сведения об анализе белкового состава биологических сред с использованием готовых микрочипов.

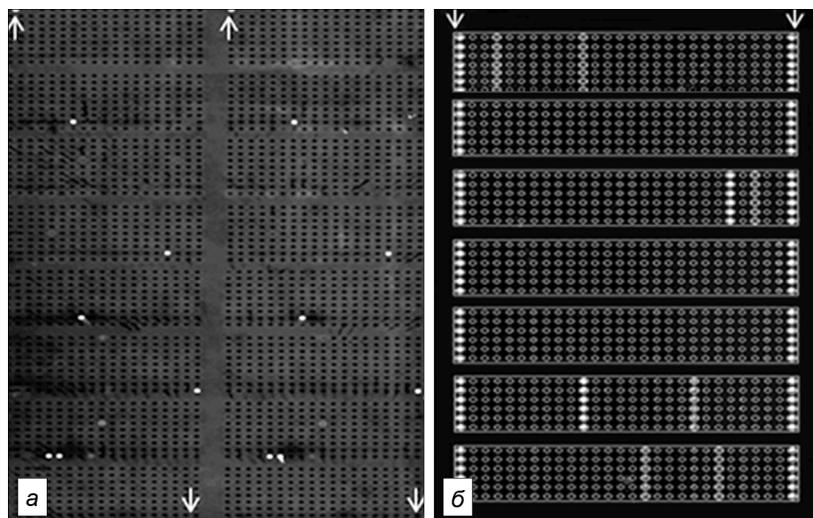
Прежде чем переходить к решению более тонких задач, связанных с поиском специфичных биомаркеров, мы протестировали некоторые виды чипов с целью определения наиболее подходящих для решения проблем, указанных выше. Для анализа белкового состава сыворотки нами были выбраны микрочипы SET 100 Full Moon Biosystems Signaling Explorer Antibody Microarray [4] (далее SET 100), AST 160 Full Moon Biosystems Signal Transduction Pathway Antibody Microarray (далее AST 160) (Full Moon Biosystems, США) и PlasmaScan™ 380 Antibody Microarrays (далее PS380) (Arrayit Corporation, США). Микрочипы SET 100 содержат 1358 уникальных антител, вовлеченных в 20 биологических сигнальных путей в двух репликах. Микрочипы AST 160 содержат 165 высокоспецифичных антител в шести репликах, характеризующих пути передачи сигнала. PS380 содержит 380 антител в шести копиях на слайде, что позволяет с помощью гибридационной кассеты одновременно проанализировать

шесть различных образцов на одном слайде. Известно, что данные виды чипов в нашей стране не применялись. Перечень белков, предназначенных для определения с помощью микрочипов, содержится в соответствующих GAL-файлах, которые доступны для скачивания на сайте компаний-производителей. Аббревиатура GAL образована начальными буквами исторически сложившегося названия списка компонентов GenePix Array List. Ныне эта аббревиатура укоренилась как термин и применяется для всех видов микрочипов.

**Материалы и методы. Обработка крови.** Кровь брали натощак из локтевой вены у нескольких добровольцев. Сыворотку крови получали методом центрифугирования крови при 1000g, 20 мин при 4°C. После отбора сыворотку центрифугировали при 10 000g, 15 мин при 4°C, затем аликвотировали. Аликвоты хранили при –25°C. В сыворотке измеряли концентрацию белка по методу Лоури [5], калибровку строили по человеческому сывороточному альбумину (ЧСА). Затем сыворотку разводили фосфатно-солевым буферным раствором (PBS), готовым к употреблению (Arrayit, США) до конечной концентрации 100 мкг белка/100 мкл. Для этого сыворотку разводили сначала в 2 раза, затем, отобрав объем, содержащий 100 мкг белка, доводили объем PBS до 100 мкл.

**Мечение белков сыворотки.** В микроцентрифужные пробирки объемом 0,5 мл, помещенные в баню со льдом, вносили 100 мкл (100 мкг белка) разведенной PBS сыворотки (конечная концентрация 100 мкг/мкл). Затем в пробу вносили 20 мкл буфера для мечения белков, разведенного водой согласно инструкции производителя (Protein Labeling Buffer, Arrayit, США; H<sub>2</sub>O Arrayit, USA Protein Labeling Kit, Arrayit, США), и перемешивали на мешалке Vortex. После этого в пробу микрошприцем вносили 1 мкл краски (Arrayit Green540, готовая к употреблению) и перемешивали на мешалке Vortex. Смесь инкубировали на ледяной бане в темноте в течение 1 ч. Молекулы флуоресцентного красителя ковалентно связываются с первичными аминами, обеспечивая прямое мечение белка. Молярное отношение красителя к белку составляет 40:1, т.е. 5–10 молекул краски на белок при мечении 100 мкг белка. Для остановки реакции мечения добавляли 10 мкл Stop Solution (Arrayit, США), перемешивали на Vortex и для инактивации молекул красителя инкубировали на льду 30 мин в темноте.

**Гель-фильтрация для удаления несвязавшихся молекул флуоресцентной краски.** Избыток молекул красителя удаляли методом гель-фильтрации. Подготовку колонок (Spin Columns, Arrayit Labeling Kit, Arrayit, США) проводили во время предшествующей часовой инкубации (на каждую пробу отводится по 2 колонки). В сухое содержимое колонок вносили по 650 мкл PBS, интенсивно перемешивали до полного растворения и образования геля. Затем гель перемешивали тонкой спицей для удаления пузырьков. Инкубировали в течение 45 мин при комнатной температуре с целью гидратации и активации гелеобразного матрикса. Затем колонки центрифугировали в течение 2 мин при 750g для удаления PBS. После этого на готовые к употреблению колонки наносили по 65 мкл полученной смеси меченых белков, что составляло



Изображение белковых микрочипов Full Moon Biosystems: *a* – SET 100; *б* – AST 160 с решеткой (GAL-файл). Стрелками указаны положительные контроли.

половину от объема каждой пробы. Колонки устанавливали в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл для сбора меченых белков и центрифугировали при 750g 2 мин. Несвязавшаяся краска осталась в гелеобразном матриксе колонок. Выход белка после гель-фильтрации составил около 90%. Меченые белки хранили при -26°C.

**Микрочипы.** Выбранные нами микрочипы SET 100 и AST 160 (Full Moon Biosystems, США) и PS380 (Arrayit Corporation, США) представляют собой высококачественные стеклянные слайды размером 76×25×1 мм, покрытые 3D-полимером с ковалентно иммобилизованными антителами. Перечень антител содержится в прилагаемых к микрочипам GAL-файлах. Микрочипы SET 100 представляют собой платформу, содержащую 1385 антител в двух репликах на одном слайде, что позволяет анализировать один образец в параллелях для получения более точных результатов. Микрочипы AST 160 содержат 165 антител на один слайд, что позволяет анализировать один образец в шести параллелях (см. рисунок).

Микрочип PS380 позволяет одновременно анализировать шесть различных образцов с помощью гибридизационной кассеты.

В микрочипы включены положительные и отрицательные контроли. Положительные контроли представляют собой антитела, связанные с Су3, они предназначены для четкого позиционирования решетки GAL-файла при накладывании ее на пятна, полученные в результате сканирования микрочипа. Отрицательные контроли содержат бычий сывороточный альбумин. Они выглядят как пустые пятна и используются для учета фона при анализе изображения.

**Подготовка и блокировка микрочипа.** Микрочип до извлечения из упаковки выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин. После извлечения из упаковки давали слайду просохнуть 15 мин. Затем слайд инкубировали в растворе Blocking Solution (30 мл) с 0,9 г сухого молока (Full Moon, США) в течение 40 мин на шейкере при комнатной температуре. Далее слайд десятикратно промывали деионизованной водой, поместив его в коническую центрифужную пробирку объемом 50 мл и интенсивно встряхивая в течение 10 с.

**Гибридизация.** Слайд инкубировали в гибридизационной камере в течение 2 ч при комнатной температуре, перемешивая на шейкере в растворе Protein Coupling Mix, содержащем 6 мл Coupling Solution, 180 мкг сухого молока и 30 мкл меченого белка. Затем слайд дважды отмывали в 30 мл Wash Solution (Full Moon, США), перемешивая на шейкере при комнатной температуре в течение 10 мин. Далее микрочип десятикратно промывали деионизованной водой, как описа-

но ранее. После этого слайд осушали центрифугированием на специальной центрифуге (Arrayit, США) и сканировали с помощью лазерного сканера для микрочипов (InnoScan® Microarray Scanner 900).

**Сканирование микрочипов и анализ изображения.** Микрочипы сканировали в ручном режиме при настройках: Scan Mode – normal, Speed = 20 l/s; Laser Power = 5,0 mW; PMT Gain = 100%; Pixel Size = 10 microns; Wavelengths = 532 nm.

После загрузки GAL-файлов и настройки решетки в ручном режиме с ориентацией по положительным контролям проводили анализ изображения с помощью программы Marix V7.0.0, позволяющей получить до 25 разнообразных характеристик пятен, в том числе с вычетом фона, и идентифицировать пятна как белки согласно перечню, представленному в GAL-файлах.

**Результаты и обсуждение.** Для анализа белкового состава с помощью микрочипов SET 100 выбрали 7 образцов сыворотки добровольных доноров мужского и женского пола (4 мужчины и 3 женщины). В общей сложности в образцах

Таблица 1

Белки, обнаруженные в сыворотке крови с помощью микрочипов SET 100

№	Обозначение белка	Наименование
1	human Albumin	ЧСА
2	IgG	Иммуноглобулины фракции G
3	IgM	Иммуноглобулины фракции M
4	IgA	Иммуноглобулины фракции A
5	Fibronectin	Фибронектин
6	Chk2	Киназа контрольной точки клеточного цикла
7	BLK	Тирозиновая протеинкиназа Blk
8	Testosteron	Тестостерон
9	Heregulin	Херегулин
10	GADD45 beta	Представитель семейства белков Gadd45
11	IkB alpha	Регуляторный белок, ингибитор ядерного фактора NF-каппа-B
12	CRP	C-реактивный белок
13	S100A10 (или P11)	Легкие цепи аннексина (семейство белков S100)
14	C56D2	Белок – опухолевый супрессор
15	HSPB2	Низкомолекулярный белок теплового шока 2 (small heat shock protein 2)
16	BAD	Bcl2-ассоциированный антагонист апоптоза
17	eNOS	Эндотелиальная NO-синтаза
18	PKM2	Изофермент пируваткиназы
19	beta-2-Microglobulin	β2-Микроглобулин (B2M), является компонентом главного комплекса гистосовместимости, присутствующего во всех ядродержащих клетках.
20	VCAM-1	VCAM-1 (CD106; vascular cell adhesion molecule 1), васкулярная молекула клеточной адгезии 1 – белок, входящий в суперсемейство иммуноглобулинов
21	EGFR	Рецептор эпидермального фактора роста
22	NCOA3	Коактиватор ядерного рецептора 3, кодируемый геном NCOA3

Таблица 2

**Воспроизводимость результатов анализа белкового состава одного и того же образца сыворотки с помощью микрочипов SET 100**

№	Обозначение белка	Проба 1			Проба 2			CV% межсерийный из четырех измерений
		F532 Mean – B532 (среднее из двух измерений ± SD)	нормализованные по ЧСА значения (отн. ед. ± SD)	CV% внутрисерийный	F532 Mean – B532 (среднее из двух измерений ± SD)	нормализованные по ЧСА значения (отн. ед. ± SD)	CV% внутрисерийный	
1	human Albumin (контроль)	57326,3 ± 795,686	1 ± 0,01		59509,93 ± 1462,36	1 ± 0,02		
2	IgG	26597,87 ± 2160,2	0,46 ± 0,038	8,1	30280,08 ± 2625,79	0,49 ± 0,02	3,2	5,5
3	IgM	55452,13 ± 3286,37	0,96 ± 0,057	5,9	1635,38 ± 379,38	0,95 ± 0,008	0,8	3,4
4	IgA	4982,07 ± 621,87	0,08 ± 0,011	12,4	4689,24 ± 544,61	0,104 ± 0,01	7,7	9,9
5	Fибронектин	24621,69 ± 3632,98	0,43 ± 0,063	14,7	16613,9 ± 2292,94	0,44 ± 0,009	1,9	8,2
6	Chk2	1648,82 ± 133,03	0,03 ± 0,002	8,1	1635,38 ± 379,38	0,03 ± 0,000	1,6	4,9
7	BLK	3613,72 ± 635,33	0,06 ± 0,011	17,5	4689,24 ± 544,61	0,075 ± 0,006	7,4	12,1
8	Тестостерон	16587,89 ± 3423,13	0,28 ± 0,06	20,6	16613,91 ± 2292,94	0,28 ± 0,004	1,3	11,1
9	Heregulin	10465,79 ± 1309,53	0,18 ± 0,023	12,5	4992,16 ± 159,75	0,11 ± 0,035	32,1	19,8*
10	Gadd45 beta	5468,73 ± 596,72	0,09 ± 0,01	10,9	5612,86 ± 235,54	0,09 ± 0,00	0,4	5,7
11	IκB alpha	5534,1 ± 29,63	0,09 ± 0,001	0,5	5317,54 ± 382,82	0,091 ± 0,003	2,7	1,6
12	beta-2-Microglobulin	1229,0 ± 185,5	0,02 ± 0,003	15,1	1071,49 ± 117,93	0,019 ± 0,001	6,4	11,0
13	BAD	3395,76 ± 390,66	0,05 ± 0,007	11,5	4137,03 ± 208,76	0,067 ± 0,004	5,4	8,3
14	eNOS	1567,42 ± 783,1	0,02 ± 0,014	49,9	2627,25 ± 85,50	0,04 ± 0,006	14,8	29,1*
15	PKM2	5166,27 ± 4364,55	0,09 ± 0,076	84,4	1837,28 ± 45,10	0,046 ± 0,021	45,8	71,3*

Примечание. \* – белки с высокими колебаниями в количественном составе: CV > 15%.

удалось обнаружить 22 вида белков (табл. 1). Из них 9 видов присутствовали постоянно во всех анализируемых образцах (ЧСА, иммуноглобулины фракций G, M и A, фибронектин, киназа контрольной точки клеточного цикла, тирозиновая протеинкиназа Blk, тестостерон, херегулин), поскольку эти белки составляют значительную часть всего белкового состава сыворотки; остальные 13 видов белков присутствовали в тех или иных комбинациях.

Чтобы оценить воспроизводимость исследуемого полуквантитативного метода определения белкового состава сыворотки с помощью SET 100, один и тот же образец сыворотки подвергали повторному анализу (табл. 2). При характеристике пятна мы ориентировались на показатель F532 Mean – B532, который представляет собой среднюю интенсивность пятна в пикселях с вычетом фона при длине волны 532 нм (зеленый сигнал лазера). Интенсивность пятен в пикселях нормализовали по ЧСА, разделив интенсивность полученных пятен на интенсивность пятна ЧСА. Полученные значения, отражающие относительное количество белка, выразили в относительных единицах (отн. ед.). Воспроизводимость по качественному составу анализируемых образцов сыворотки составила 100%: 15 из 15 обнаруженных белков были воспроизведены при повторном анализе. В среднем внутрисерийный и межсерийный коэффициенты вариации (CV%) составили 9,4 и 14,4% соответственно. Однако из табл. 2 видно, что есть некоторые белки, коэффициент вариации которых составляет более 30%. Мы полагаем, что такие выпадения следует рассматривать индивидуально и, возможно, исключать из анализа либо принимать решения относительно надежности измерения в каждом отдельном случае в зависимости от поставленных целей. При использовании данного метода с целью анализа биомаркеров, вероятно, не стоит рассматривать белки, определенные с высоким коэффициентом вариации, как надежную мишень.

Для трех из 15 белков (херегулин, eNOS, PKM2) межсерийный CV% оказался >15%, для остальных белков – <15%, что является хорошим результатом для биологического теста.

Мы попытались увеличить количество видов белков, определяемых с помощью микрочипов SET 100, путем увеличения времени инкубации сыворотки крови с мечеными белками с 2 ч при комнатной температуре (как указано в ин-

Таблица 3

**Сравнение белкового состава в образце сыворотки при стандартном режиме инкубации (2 ч, 25 °C) и длительной инкубации (на ночь, 4 °C) с микрочипами SET 100**

№	Белок	Инкубация 2 ч при 25 °C	Инкубация на ночь при 4 °C	Отношение количества белка, определенного при ночной инкубации, к количеству белка, определенного при 2-часовой инкубации
		отн. ед. (1)	отн. ед. (2)	
1	Albumin	1	1	
2	IgG	0,56	0,4	0,7
3	IgM	1,2	1,03	0,9
4	IgA	0,14	0,11	0,7
5	Fибронектин	0,27	0,28	1,04
6	Chk2	0,17	0,26	1,5
7	BLK	0,12	0,22	1,7
8	Тестостерон	0,91	0,83	0,9
9	Heregulin	0,08	0,85	1,1
10	IκB alpha	0,12	0,24	2,0
13	S100A10/P11	Не выявлен	0,07	
14	HSPB2	Не выявлен	0,06	
15	GADD45 beta	Не выявлен	0,06	

Таблица 4

**Белки сыворотки в зависимости от пола при анализе с помощью микрочипов SET 100**

№	Белок	Мужчины (n = 4)	Женщины (n = 3)
1	human Albumin	+	+
2	IgG	+	+
3	IgM	+	+
4	IgA	+	+
5	Fibronektin	+	+
6	Chk2	+	+
7	BLK	+	+
8	Testosteron	+	+
9	Heregulin	+	+
10	LkB alpha	+	+
13	S100A10/P11	+	+
14	HSPB2	+	+
15	GADD45 beta	+	+
16	BAD	+	-
17	eNOS	+	-
18	PKM2	+	-
19	beta-2-Microglobulin	+	-
20	VCAM-1	+	-
21	EGFR	+	-
22	NCOA3	+	-

струкции производителя) до 16 ч (оставив образцы на ночь при 4 °С (табл. 3).

В результате ночной инкубации к уже обнаруженным белкам прибавились еще несколько видов белков (GADD45

Таблица 5

**Белки, обнаруженные в сыворотке с помощью микрочипов AST 160 (по результатам анализа трех образцов сыворотки крови мужчин)**

№	Обозначение	Наименование
1	IgA	Иммуноглобулины фракции А
2	IgM (m-Heavy Chain)	Иммуноглобулины фракции М
3	alpha-1-antitrypsin	Ингибитор сериновых протеаз, относящийся к группе серпинов
4	alpha-1-antichymotrypsin	Гликопротеин, входящий в суперсемейство серпинов
5	Factor VIII Related Antigen	Фактор Виллебранда – гликопротеин плазмы крови
6	Nck	Белок-адаптор-1 некаталитического участка тирозинкиназы (non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1)
7	Stat-1	Белок, передающий сигнал, и активатор транскрипции (signal transducer and activator of transcription)
8	ERK1	Экстраклеточно регулируемая киназа 1 (extracellular-signal-regulated kinases) – относится к семейству митогенактивируемых протеинкиназ
9	Heat Shock Protein 90a/hsp86	Белок теплового шока 90a/hsp86

beta, S100A10/P11, HSPB2), которые не были выявлены при стандартном времени инкубации. Однако в результате длительной инкубации некоторые пятна теряли четкость контура, поэтому мы не рекомендуем использовать столь продолжительную инкубацию как способ повышения качественного разнообразия белкового состава сыворотки.

Мы проанализировали белковый состав образцов сыворотки, определенный с помощью микрочипов SET 100, в зависимости от пола (табл. 4).

Во всех образцах сыворотки мужчин (n = 4) и женщин (n = 3) мы обнаружили 15 совпадающих видов белков. В то же время у мужчин обнаружили 7 видов белков, которых не было ни в одном образце сыворотки от женщин. Таким образом, у мужчин было обнаружено 22 вида белков, а у женщин – 15. Очевидно, что при поиске биомаркеров с помощью микрочипов необходимо соблюдать максимально одинаковые характеристики пациент/контроль, включая пол, чтобы обнаружить как можно более достоверные различия в белковом составе.

Результаты анализа белкового состава сыворотки крови с помощью микрочипов другого вида – AST 160 (Full Moon Biosystems, США) – приведены в табл. 5. Белки суммированы по результатам анализа трех образцов сыворотки от доноров-

Таблица 6

**Сравнение качественного и количественного белкового состава в трех различных образцах сыворотки крови мужчин**

№ образца	Обозначение белка	F532 Mean – B532 (среднее из шести измерений ± SD), пиксели	Нормализованные по IgA значения, отн. ед.	CV% внутрисерийный
1	IgA	25246,2 ± 1185,88	1,0	4,7
	IgM (m-Heavy Chain)	31197,2 ± 878,08	1,2	2,8
	alpha-1-antitrypsin	5582,9 ± 125,7	0,2	2,2
	alpha-1-antichymotrypsin	3262,6 ± 203,81	0,1	6,2
	Factor VIII Related Antigen*	808,1 ± 51,2	0,03	6,3
2	IgA	50012,5 ± 3025,7	1,0	6,1
	IgM (m-Heavy Chain)	43276,8 ± 3395,58	0,8	7,8
	alpha-1-antitrypsin	13729,7 ± 1118,53	0,3	8,1
	alpha-1-antichymotrypsin	6325,2 ± 507,06	0,13	8,1
	Factor VIII Related Antigen*	1016,1 ± 120,39	0,02	11,8
3	IgA	13792,2 ± 602,02	1,0	4,3
	IgM (m-Heavy Chain)	26031,4 ± 1693,38	2,8	6,5
	alpha-1-antitrypsin	6925,6 ± 350,02	0,5	5,1
	alpha-1-antichymotrypsin	4131,1 ± 303,37	0,5	7,3
	Nck*	1498,2 ± 292,34	0,49	19,5
	Stat-1*	940,9 ± 80,28	0,13	8,5
	ERK1*	772,1 ± 73,78	0,12	9,5
HSP 90a/hsp86*	1112,6 ± 118,67	0,20	10,6	

Примечание. \* – белки, обнаруженные не во всех трех образцах.

добровольцев мужского пола. Белок считали обнаруженным, если соответствующее ему пятно воспроизводилось в шести репликах (как отмечено выше, данные микрочипы содержат матрицу в шести репликах по каждому белку). Всего было обнаружено девять видов белков, из них четыре вида (IgA, IgM,  $\alpha$ 1-антитрипсин,  $\alpha$ 1-антихимотрипсин) – во всех трех образцах, остальные пять – факультативно. IgA и IgM, в отличие от остальных обнаруженных белков, были идентифицированы с помощью микрочипов обоих видов в силу того, что антитела против этих белков заложены в обоих видах чиповых матриц. Остальные виды белков в матрицах исследуемых микрочипов не пересекались.

В табл. 6 приведены количественные характеристики пятен, обнаруженных с помощью микрочипов AST 160. Видно, что чипы демонстрируют отличную внутрисерийную воспроизводимость. Средний CV% по микрочипам AST 160 составил 7,2%.

Наряду с экспериментами с использованием микрочипов SET 100 и AST 160 нами был проведен экспериментальный анализ белкового состава сыворотки крови с помощью микрочипов PS380 (Arrayit Corporation, США). С помощью данных микрочипов нам не удалось добиться результатов в силу того, что вместо пятен, которые должны быть окрашены в зеленый цвет на черном фоне, мы получили цветные пятна на белом фоне. Причины пока установить не удалось.

Таким образом, сравнивая результаты анализов белкового состава с помощью микрочипов SET 100 и AST 160, можно заключить следующее. Удалось без предварительного обеднения сыворотки (удаления мажорных фракций белков) обнаружить в случае SET 100 2% от матрицы чипа, в случае AST 160 – около 5% от матрицы чипа. Матрицы указанных микрочипов пересекались только по наличию IgM и IgA. Остальной белковый состав матрицы по выявленным белкам был уникален. Предварительное фракционирование сыворотки

крови человека с помощью специальных коммерческих наборов Depletion kit, предназначенных для удаления мажорных сывороточных фракций, иммуноглобулинов и альбумина или еще большего количества видов мажорных белков, обеспечило бы повышение количества белка минорных фракций в объеме нанесения и таким образом могло бы способствовать повышению количества определяемых белков [6].

Таким образом, проведенный анализ белкового состава крови с помощью технологии микрочипов SET 100 и AST 160 позволяет анализировать частичный белковый состав сыворотки даже без предварительного удаления из сыворотки белков мажорных фракций.

#### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ekins R.P. and Chu F.W. Multianalyte microspot immunoassay – microanalytical “compact disk” of the future. *Clin. Chem.* 1991; 37: 1955–67.
2. Zhu H., Bilgin M., Bangham R., Hall D., Casamayor A., Bertone P., Lan N., Jansen R. Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science.* 2001; 293: 2101–5.
3. Wingren C. and Borrebaeck C. Antibody-based microarrays. *Methods Mol Biol.* 2009; 509: 57–84.
4. Cui W., Zhao S., Polanowska-Grabowska R., Wang J., Wei J., Dash B., Chang S., Saucerman J., Gu J., Li M. Identification and characterization of poly(I:C)-induced molecular responses attenuated by nicotine in mouse macrophages. *Mol. Pharmacol.* 2013; 83(1): 61–72.
5. Lowry O.H., Rosbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265.
6. Luczak M., Marczak L., Stobiecki M. Optimization of plasma sample pretreatment for quantitative analysis using iTRAQ labeling and LC-MALDITOF/TOF. *PLoS One.* 2014; 9(7).

Поступила 16.03.15

Received 16.03.15

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 617.721.6-002-07:617.764-008.84:577.175.446

Конькова А.Ю.<sup>1</sup>, Соснин Д.Ю.<sup>1</sup>, Гаврилова Т.В.<sup>1</sup>, Черешнева М.В.<sup>2</sup>

## ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОКАЛЬЦИТОНИНА В СЛЕЗНОЙ ЖИДКОСТИ И СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРИ УВЕИТАХ

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера» Минздрава России, 614000, г. Пермь; <sup>2</sup>ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения РАН, 620049, г. Екатеринбург

*Исследована концентрация прокальцитонина (ПКТ) в слезной жидкости и сыворотке крови у 15 условно здоровых лиц (контрольная группа), 16 пациентов с увеитами (основная группа) и 14 пациентов с невоспалительной патологией органа зрения (группа сравнения). Концентрацию ПКТ определяли иммуноферментным методом с использованием коммерческой тест-системы «Прокальцитонин – ИФА – БЕСТ» («Вектор-Бест», Россия).*

*В сыворотке крови содержание ПКТ было низким (75% квартиль – 0,031 нг/мл) и между группами достоверно не различалось (Н-критерий Краскела–Уоллиса,  $p = 0,0872$ ). В слезной жидкости уровень ПКТ в 8–11 раз превышал его концентрацию в сыворотке крови во всех группах (критерий Вилкоксона,  $p < 0,005$ ). Наименьшее содержание ПКТ обнаружено в слезной жидкости больных группы сравнения ( $0,072 \pm 0,064$  нг/мл), в основной и контрольной группах его уровень был достоверно выше (Н-критерий Краскела–Уоллиса,  $p = 0,0002$ ) и составил  $0,257 \pm 0,146$  и  $0,198 \pm 0,151$  нг/мл соответственно. Корреляционный анализ между концентрациями ПКТ в слезе и сыворотке крови не обнаружил зависимости (коэффициент корреляции Спирмена во всех группах не превышал  $|0,1|$ ).*

*Развитие увеитов не сопровождается изменением концентрации ПКТ ни в сыворотке крови, ни в слезной жидкости. Отсутствие корреляции и более высокая концентрация ПКТ в слезе по сравнению с сывороткой крови свидетельствуют о дополнительном источнике этого белка в слезной жидкости.*

**Ключевые слова:** прокальцитонин; слезная жидкость; увеиты; жидкости организма.

**Для цитирования:** Клиническая лабораторная диагностика. 2015; 60 (10): 21–25.

Для корреспонденции: Конькова Анна Юрьевна, nu\_86@mail.ru

For correspondence: Konkova A. Yu., nu\_86@mail.ru