

## ПРЕСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОТЕОМНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В ДИАГНОСТИКЕ ИППП И ЗАБОЛЕВАНИЙ КОЖИ

Н.В. КИТАЕВА, Н.В. ФРИГО, С.В. РОТАНОВ, Р.Ф. ХАЙРУЛИН

### Prospects of using proteome technologies in the diagnostics of sexually transmitted infections and skin diseases

N.V. KITAYEVA, N.V. FRIGO, S.V. ROTANOV, R.F. KHAIRULIN

Об авторах:

Н.В. Китаева — ведущий научный сотрудник отделения сифилидологии ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий», г. Москва, д.м.н.

Н.В. Фриго — главный научный сотрудник, заведующая отделом лабораторной диагностики ИППП и болезней кожи ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий», г. Москва, д.м.н.

С.В. Ротанов — ведущий научный сотрудник отделения лабораторной диагностики сифилиса отдела лабораторной диагностики ИППП и болезней кожи ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий», г. Москва, д.м.н., доцент  
Р.Ф. Хайрулин — младший научный сотрудник отделения микробиологических методов диагностики ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий», г. Москва

Представлены данные литературы, освещающие современные методы диагностики сифилиса, применяемые в Российской Федерации. Описана основная методическая база протеомики, приведены результаты применения протеомных технологий в диагностике заболеваний, в том числе инфекционных, дана оценка перспектив и возможностей использования прямого протеомного профилирования для разработки нового метода диагностики сифилитической инфекции.  
*Ключевые слова:* сифилис, серологические методы диагностики, протеомные технологии, биомаркеры.

The article presents data from the literature describing up-to-date syphilis diagnostics methods used in the Russian Federation. It also describes main proteome techniques and gives the results of applying proteome technologies in the diagnostics of diseases including infectious ones, and prospects and opportunities for using direct proteome profiling to develop a new method for syphilis diagnostics are analyzed.

*Key words:* syphilis, serological diagnostics methods, proteome technologies, biomarkers.

В связи с наблюдаемым в настоящее время прогрессом в области медицины, актуальным в диагностике ИППП и дерматозов является поиск новых подходов, связанных с развитием геномных и постгеномных технологий.

Ведущая роль в диагностике сифилиса принадлежит лабораторным методам, основанным на непосредственном обнаружении возбудителя инфекции в очагах поражения и выявлении антитрепонемных антител в биологических жидкостях организма человека.

Наиболее убедительным доказательством инфицирования сифилисом является обнаружение возбудителя инфекции — бледной трепонемы (*Treponema pallidum*) в отделяемом эрозивных/язвенных элементов. Однако прямое определение *T. pallidum* позволяет достоверно установить диагноз только при манифестных формах заболевания [1, 2]. По данным официальной статистической отчетности, в последнее время преобладают скрытые формы сифилитической инфекции [3], диагностика которых основана

на выявлении антител к *T. pallidum*. Серологические тесты разделяют на две группы: нетрепонемные, или неспецифические (НТТ), и трепонемные, или специфические (ТТ).

В НТТ применяется антиген нетрепонемного происхождения (как правило, кардиолипин — лецитин — холестеринный антиген), в испытуемой сыворотке выявляются иммуноглобулины М и G (IgM и IgG) — антитела к липидам клеточной стенки *T. pallidum*.

Исторически первым нетрепонемным серологическим тестом на сифилис стала адаптированная А. Вассерманом и соавт. (1906) реакция связывания комплемента (РСК), в которой в качестве антигена был использован экстракт печени новорожденных, больных врожденным сифилисом. После работ М. С. Rangbom (1941) по выделению и очистке кардиолипина [4] (что в последующем позволило стандартизировать кардиолипин — лецитин — холестеринный антигенный комплекс) в РСК стали применять коммерческие препараты кардиолипинового антигена. Кроме РСК с кардиолипиновым антигеном (РСКк) к НТТ относят реакцию микропреципитации (РМП) и тест быстрых плазменных реагинов (RPR).

НТТ используются в качестве отборочных тестов для скрининга большого количества людей и оценки эффективности специфической терапии сифилитической инфекции [5].

В ряде случаев все тесты данной группы могут давать ложноотрицательные результаты, обусловленные феноменом прозоны, когда блокируется реакция антиген—антитело при избыточном количестве антител в исследуемой сыворотке, что наиболее часто (1—2%) наблюдается во вторичном периоде сифилитической инфекции [6, 7], а также при обследовании пациентов с выраженной иммунной недостаточностью и ВИЧ-инфицированных [8].

Кроме того, в НТТ регистрируется значительное количество (до 2,5%) ложноположительных результатов (ЛПР). Последние могут быть обусловлены как экзогенными факторами, зависящими от каких-то внешних моментов по отношению к организму человека, так и эндогенными факторами, обусловленными происходящими в нем процессами [9].

К числу экзогенных причин могут быть отнесены технические ошибки и погрешности при проведении исследования: нарушение условий и методики проведения реакции, а также сроков хранения сыворотки, нестабильные характеристики антигена, выделенного из клеточных компонентов трепонем, различие ингредиентов, качества и рабочей дозы комплемента.

К эндогенным причинам, вызывающим ЛПР, относят генетические особенности отдельных лиц, характеризующиеся склонностью к неспецифическим реакциям, физико-химические изменения сыворотки крови, аутоиммунные нарушения, а также сдвиги в состоянии белкового и липидного обмена. Накопление липидов, участвующих в реактивных реакциях, может происходить в тканях в результате разрушения клеточных митохондрий и высвобождения кардиолипина, входящего в состав митохондриальных мембран, что, в свою очередь, может являться одной из причин неспецифической позитивности липидных тестов.

Ложноположительные результаты НТТ описаны при лепре, туберкулезе, малярии, респираторных заболеваниях, диффузных болезнях соединительной ткани, дерматозах, сахарном диабете, заболеваниях желудочно-кишечного тракта и печени, злокачественных новообразованиях, сердечно-сосудистой и гематологической патологии. Среди заболеваний, вызываемых вирусами, ЛПР зарегистрированы при гриппе, ветряной оспе, гепатите, ВИЧ-инфекции. ЛПР могут отмечаться при наркомании и хроническом алкоголизме, отравлениях и интоксикациях, беременности, менструациях, вакцинации, многократных гемотрансфузиях, в преклонном возрасте. ЛПР нередко могут являться первыми признаками тяжелых заболеваний, таких как системная красная волчанка, ревматизм, онкологические болезни, воспалительные гинекологические заболевания,

тромбоз глубоких вен конечностей, некротическая пурпура.

Титры серологических реакций при ЛПР могут быть как низкими, колеблющимися, так и высокими, что, несомненно, осложняет трактовку результатов реакции и затрудняет диагностику сифилитической инфекции.

Попытки дифференциации истинно положительных результатов серологических реакций на сифилис от ЛПР издавна были связаны с усовершенствованием известных серологических методов диагностики и созданием принципиально новых. Результаты совершенствования тестов не получили широкого признания и не решили имеющуюся проблему.

Переворот в дифференциации истинных и ложноположительных результатов серореакций на сифилис произошел в результате разработки ТТ, в которых применяется антиген трепонемного происхождения. Они используются для подтверждения диагноза, распознавания ложноположительных результатов НТТ.

Первым ТТ, предложенным в 1949 г. R. Nelson и M. Meyer [10], была реакция иммобилизации бледных трепонем (РИБТ, или РИТ). Суть этой реакции заключается в потере подвижности бледной трепонемы в присутствии антител — иммобилизинов сыворотки крови больных сифилисом и комплемента в условиях анаэробноз. С течением времени стало понятно, что РИТ, как и всякая другая биологическая реакция, не обладает абсолютной специфичностью. Так, А. В. Резайкина (1979) зарегистрировала 0,4% случаев ЛПР в РИТ при исследовании 2157 образцов сыворотки соматических больных [11], Л. А. Пшеничная (1971) получила аналогичные результаты при обследовании больных злокачественными новообразованиями (0,27%), системной красной волчанкой (3%), сердечно-сосудистой патологией (0,19%), пневмониями (0,66%), а также у беременных (0,34%) [12]. В других исследованиях неспецифические положительные результаты РИТ отмечены у больных туберкулезом, генерализованным атеросклерозом, гипертиреозом, системной красной волчанкой, ревмокардитом, язвенной болезнью желудка, у практически здоровых лиц [13], у пациентов с миеомой, саркоидозом, сахарным диабетом, циррозом печени и болезнью Боткина [14]. Значительный процент положительных (2,8%) и слабopоложительных (2,2%) результатов РИТ отмечен у больных лепрой [14]. По мнению некоторых авторов, РИТ совершенно непригодна для дифференциации сифилиса от трепонематозов (беджель, пинта и др.), при которых выявляется почти такой же процент положительных результатов, как и при сифилисе [9]. Вместе с тем РИТ в ряде случаев не выявляет противосифилитические антитела у больных сифилисом, в особенности на ранних стадиях заболевания из-за малого количества иммобилизинов [15].

В 1953 г. была разработана модификация РСК с трепонемным антигеном, приготовленным из непатогенных культуральных *T. phagedenis* (штамм Рейтер), имеющих общие перекрестно-реагирующие антигены с *T. pallidum*. Этот тест давал значительное количество ЛПП при обследовании лиц с системными заболеваниями соединительной ткани, органов кроветворения, диабетом, онкологическими и воспалительными заболеваниями [9]. До 2006 г. на территории Российской Федерации тест применялся в качестве отборочного в составе комплекса серологических реакций (КСР) наряду с РСК с кардиолипидным антигеном и РМП. В настоящее время в связи с разработкой более чувствительных, специфичных и менее трудоемких реакций РСК с кардиолипидным и трепонемным антигенами заменяются современными методами — иммуноферментным анализом (ИФА) и реакцией пассивной гемагглютинации (РПГА) в сочетании с РМП (RPR) [5].

В настоящее время для диагностики сифилиса широко используется также реакция иммунофлюоресценции (РИФ), сочетающая в себе свойства иммунологического исследования, обеспечивающего специфичность, и люминесцентной микроскопии, обуславливающей высокую чувствительность теста. Впервые примененная в сифилидологической практике L. Borel и P. Durel в 1959 г. РИФ является «золотым стандартом» диагностики сифилитической инфекции и обладает высокой чувствительностью и специфичностью при всех формах заболевания. Вместе с тем она не является абсолютно специфичной. По данным S. Larsen (1995), в специфических флюоресцентных тестах сыворотки приблизительно у 1% людей отмечаются ЛПП на сифилис. Неспецифические результаты РИФ отмечены при системной красной волчанке, ревматоидном артрите, склеродермии, сахарном диабете, циррозе печени, генитальном герпесе, лепре, трепонематозах, гипергаммаглобулинемии, беременности, после вакцинации, в старческом возрасте и др. [1, 9].

Для современных трепонемных тестов ИФА и РПГА используют тест-системы промышленного производства. Эти реакции являются как скрининговыми, так и подтверждающими тестами на сифилис [16, 17] и в соответствии с приказом МЗ РФ № 87 от 26.03.2001 г. «О совершенствовании серологической диагностики сифилиса» с 2006 г. на территории Российской Федерации заменяют КСР [5].

Принцип ИФА заключается в соединении комплекса антиген — антитело с конъюгатом, содержащим ферментную метку; при наличии противотрепонемных антител в исследуемом образце сыворотки крови происходит разложение ферментом субстратной смеси, что сопровождается цветным окрашиванием раствора. Существуют тест-системы для выявления IgM-, IgG- и IgM+IgG-антител, а также антител к различным компонентам *T. pallidum* (иммуноблоттинг). Благодаря высокой чувствитель-

ности и специфичности, близкой к таковой у РИФ, метод получил всеобщее признание [1, 16, 18, 19, 20, 21]. Вместе с тем он, так же как и ранее описанные трепонемные реакции, не оказался абсолютно специфичным. Ложноположительные результаты ИФА описаны в 1,5—3,2% случаев. По мнению В. Ф. Ляхова (1991), ЛПП в ИФА могут быть получены за счет ревматоидного фактора, представляющего собой IgM к собственным IgG человека, а также перекрестно-реагирующих с трепонемным антигеном антител, образующихся при различных системных или индуцированных лекарствами либо наркотиками нарушениях обмена [22]. Кроме того, у плода или ребенка IgM-антитела могут образовываться к IgG-антителам матери, попавшим в его организм трансплацентарным путем [22, 23, 24, 25]. Необходимым условием достоверности исследования служит безупречная точность в разделении сывороток на классы иммуноглобулинов (IgM, IgG), так как присутствие в сыворотке даже небольших количеств IgG может дать ложноположительную реакцию по механизму конкурентного торможения [26]. Неспецифические реакции в ИФА могут быть обусловлены техническими причинами и развиваются в результате взаимодействия белков сыворотки или конъюгатов с твердой фазой, а также белок-белковых взаимодействий, связанных с перекрестными реакциями между антителами и антигенами либо сильными гидрофобными связями крупных комплексов с белками на носителе [9].

Одним из наиболее простых и быстрых в постановке трепонемных тестов является РПГА, впервые примененная при сифилисе G. Blumental и W. Bachman в 1932 г. и детально изученная T. Rathlev (1967) и T. Tomizawa и соавт. (1966) [27]. Приоритет применения данной реакции в России принадлежит В. Н. Бедновой и Г. Ф. Тимченко (1987) [28]. По данным литературы [29], РПГА является достаточно специфичной, с ее помощью можно дифференцировать положительные результаты РСК с кардиолипидным антигеном и протеином Рейтера на обусловленные сифилисом и неспецифические. Однако, как оказалось, эта реакция также способна давать ЛПП при ряде заболеваний; таких как лепра, диффузные болезни соединительной ткани, инфекционный мононуклеоз, гетерофильные реакции с несенсибилизированными эритроцитами [1].

Таким образом, ни один из применяемых в настоящее время ТТ не стал реакцией-арбитром, поскольку все они в ряде случаев могут сами оказаться ложноположительными или ложноотрицательными.

Кроме того, следует отметить, что у большинства пациентов после успешного лечения сифилиса ТТ остаются положительными на очень долгое время, а иногда — в течение всей жизни [1, 5, 30, 31]. НТТ, по изменению позитивности которых оценивают эффективность проведенной противосифилитической терапии, в ряде случаев, как было указано ранее, да-

ют ЛПР и затрудняют определение дальнейшей тактики ведения пациента.

Таким образом, современная сифилидология нуждается в принципиально новых подходах к диагностике сифилиса. Необходим такой метод, с помощью которого возможно выявлять инфекцию на любой стадии и при любой форме течения заболевания, вне зависимости от состояния иммунной системы и соматического статуса человека, технических особенностей постановки реакции и который мог бы служить критерием оценки эффективности проведенного специфического лечения.

В конце XX — начале XXI века при разработке новых методов диагностики различных заболеваний, в том числе инфекционных, начало развиваться одно из перспективных направлений — использование протеомных технологий, область применения которых связана с поиском диагностических маркеров заболевания [32, 33]. Основной идеей «маркерной» диагностики является обнаружение определенных молекул или их комплексов, которые присутствуют только в пораженных тканях или клетках (но отсутствуют в нормальных) и выделяются во внешнюю или внутреннюю среду организма. Объектами исследования могут являться биологические жидкости (плазма или сыворотка крови, спинномозговая, синовиальная, амниотическая, бронхоальвеолярная жидкости, моча), клетки и биоптаты тканей человека, а также протеомы микроорганизмов — возбудителей заболеваний [34, 35, 36, 37].

В применении протеомных технологий для выявления биомаркеров можно условно выделить два разных подхода [37]. Первый подход использует новые технические возможности для поиска биомаркеров и их дальнейшей идентификации, после чего найденные маркеры можно использовать в диагностике аналогично методам, применяемым в настоящее время (например, иммунным методом). Другой подход основан на сравнении протеомного профиля больных и здоровых людей с использованием статистических методов с целью выявления значимых различий, не предполагая обязательной идентификации биомаркера. При этом диагностическим признаком является сам состав протеомного профиля, т. е. исследования и непосредственная диагностика могут проводиться одним и тем же методом.

Что же такое «протеомика» и из каких методических подходов она состоит?

Протеомика — направление молекулярной биологии, занимающееся сравнительным изучением клеточных протеомов, т. е. всех белков, которые могут быть экспрессированы геномом данной клетки в определенный момент [38]. Ее основной задачей является выяснение функциональной роли отдельных белков путем экспериментального сопоставления их качественного и количественного составов в разных клетках, а также установление взаимосвязи структуры белка и его функций [39].

Общее число различных белков в организме человека исчисляется миллионами, идентифицировать которые можно только путем их непосредственного анализа. Белки обладают различными свойствами: электрическим зарядом, размером, гидрофобностью, что используют для их разделения и последующей идентификации.

Методическая база протеомики включает набор высокопроизводительных методов разделения и анализа, направленных на получение исчерпывающей информации о биохимических свойствах белков в живых системах (уровень экспрессии, посттрансляционные модификации, их взаимоотношения друг с другом) [7].

В настоящее время в протеомном анализе можно условно выделить несколько этапов: подготовка проб, фракционирование белков, идентификация белков.

*Подготовка проб.* Опыт протеомных исследований показывает, что проблеме подготовки проб необходимо уделить особое внимание, поскольку существуют объективные факторы, способные резко ухудшить разделение белков, и, следовательно, сделать невозможным объективную интерпретацию результатов [7]. Так, большинство биопсийных и аутопсийных проб представляют собой клетки разной тканевой принадлежности (соединительная ткань, органоспецифические клетки, клетки крови и т. д.), что делает интерпретацию результатов затруднительной. В последнее время в протеомных исследованиях стали применять технологию лазерной микродиссекции (LCM; Laser Capture Microdissection) для выделения гомогенной по составу клеточной популяции непосредственно из тканей биопсийных материалов [7].

Подготовка проб более легко выполняема, когда для протеомного анализа используют биологические жидкости организма (плазма и сыворотка крови, синовиальная и спинномозговая жидкости, моча) или лизаты клеток, поскольку в этих препаратах белки уже находятся в растворенном состоянии. Наиболее простой способ дезинтеграции клеток — использование стандартных лизирующих растворов. В некоторых случаях применяют процедуру «замораживание — оттаивание», а также обработку ультразвуком.

*Фракционирование белков.* В настоящее время для разделения белков в протеомных исследованиях широко используются два основных подхода: двумерный (2D) электрофорез и многомерную хроматографию.

Метод 2D-электрофореза основан на фракционировании белков [40, 41], при котором белки разделяют по двум различным физико-химическим свойствам: сначала производят разделение белков по заряду согласно их изоэлектрической точке путем изоэлектрического фокусирования, а затем — по их молекулярной массе с помощью электрофоре-

за. Обе процедуры проводят в полиакриламидном геле. В результате проведения 2D-электрофореза получают двумерную «белковую карту».

За один прием методом двумерного геле-электрофореза можно разделить до 2000 отдельных полипептидных цепей. Разрешение этого метода настолько велико, что позволяет разделить два практически идентичных белка, различающихся одной заряженной аминокислотой.

После разделения белков методом 2D-электрофореза проводят их визуализацию с помощью окрашивания: коллоидным раствором кумасси, серебром (нитратом серебра с тиосульфатом натрия), специальными флюоресцентными красителями SYPRO Ruby.

Для выявления биомаркеров сравнивают «протеомные карты» образцов у больных и здоровых людей, обнаруживая белки, уровень экспрессии которых изменяется при развитии патологии [37]. Далее эти белки вырезают из геля и проводят гидролиз какой-либо эндопептидазой, например трипсином (трипсинолиз), для получения коротких (в среднем 10—15 аминокислотных остатков) пептидов, которые идентифицируют на следующем этапе анализа.

Однако данный метод сложен в исполнении, мало поддается автоматизации и вследствие этого имеет низкую производительность [7]. Кроме того, одним из недостатков в отношении поиска биомаркеров является неудобство применения 2D-электрофореза для разделения низкомолекулярных белков и пептидов.

Многомерная хроматография представляет собой группу хроматографических методов, использующих разнообразные сорбенты, но, как правило, одну систему элюентов для проведения хроматографического разделения фрагментов белков после их гидролиза (трипсинолиза) [7]. В большинстве случаев носитель состоит из двух сорбентов — сильного катионообменника и обращенной фазы.

Протеомные методы, основанные на многомерной хроматографии, достаточно многообразны. К ним относят высокоэффективную жидкостную хроматографию, имеющую высокую производительность, позволяющую существенно повысить разрешающую способность хроматографического разделения пептидов и чувствительность масс-спектрометрического определения белков [42], 2D-хроматографию, позволяющую существенно расширить набор используемых для солиubilизации белков при подготовке проб органических растворителей, детергентов и поверхностно-активных веществ [43], а также метод — SELDI (Surface-Enhanced Laser Desorption Ionization), основанный на применении белковых микрочипов и обладающий высокой чувствительностью и легкой адаптацией к диагностическому формату [44, 45].

*Идентификация белков.* Идентификация белков и пептидов в биологическом материале осуществля-

ется методом масс-спектрометрического анализа, который позволяет получать спектры распределения белков/пептидов по массе: каждому белку соответствует свой пик, положение которого определяется соотношением массы и заряда белка, а интенсивность неявным образом отражает количество белка (рис. 1).

При сопоставлении масс-спектров образцов биологического материала, полученного от больных и здоровых людей, по масс-спектрометрическим сигналам (пикам), достоверно различающимся в сравниваемых группах, обнаруживают белки и пептиды, являющиеся специфичными для данного заболевания маркерами (рис. 2).

В процессе осуществления масс-спектрометрического анализа исследуемые белки предварительно с помощью протеолиза фрагментируют до пептидов (обычно трипсином), которые затем подвергают ионизации.

В настоящее время для ионизации органических соединений, в том числе белков, используют в основном два метода: матричную лазерную десорбционную ионизацию (MALDI), в результате которой образуются в основном однозарядные ионы белков, хотя могут наблюдаться и двух-, и трехзарядные ионы, и метод ионизации в электроспрее, итогом которого является образование пула многозарядных ионов [7].

После получения ионов начинается второй этап масс-спектрометрического анализа — сортировка ионов по массе (точнее по отношению массы к величине заряда, или  $m/z$ ), происходящий в той части масс-спектрометра, которая называется «масс-анализатором».

Существует несколько типов масс-анализаторов. В современных протеомных исследованиях широко используются времяпролетные масс-спектрометры (Time-of-Flight, ToF), которые хорошо сочетаются с MALDI.

MALDI-TOF-масс-спектрометры позволяют проводить прямой масс-спектрометрический анализ белков сыворотки крови (прямое белковое профилирование) и получать уникальные масс-спектры с высокой точностью и разрешением, характеризующие исследуемый объект по типу «отпечатков пальцев» [46]. Они позволяют очень быстро анализировать большое количество образцов, требуют сравнительно небольшого количества биологического материала, обладают высокой чувствительностью и хорошим разрешением для низкомолекулярных белков и пептидов, что делает особенно перспективным их использование для поиска биомаркеров. Следующим этапом является определение аминокислотной последовательности белка по фрагментам пептида. Существуют базы данных, содержащие аминокислотные последовательности белков, при этом идентификация белка осуществляется в соответствии с запросом по базе данных исходя из известной пептидной последовательности [7].

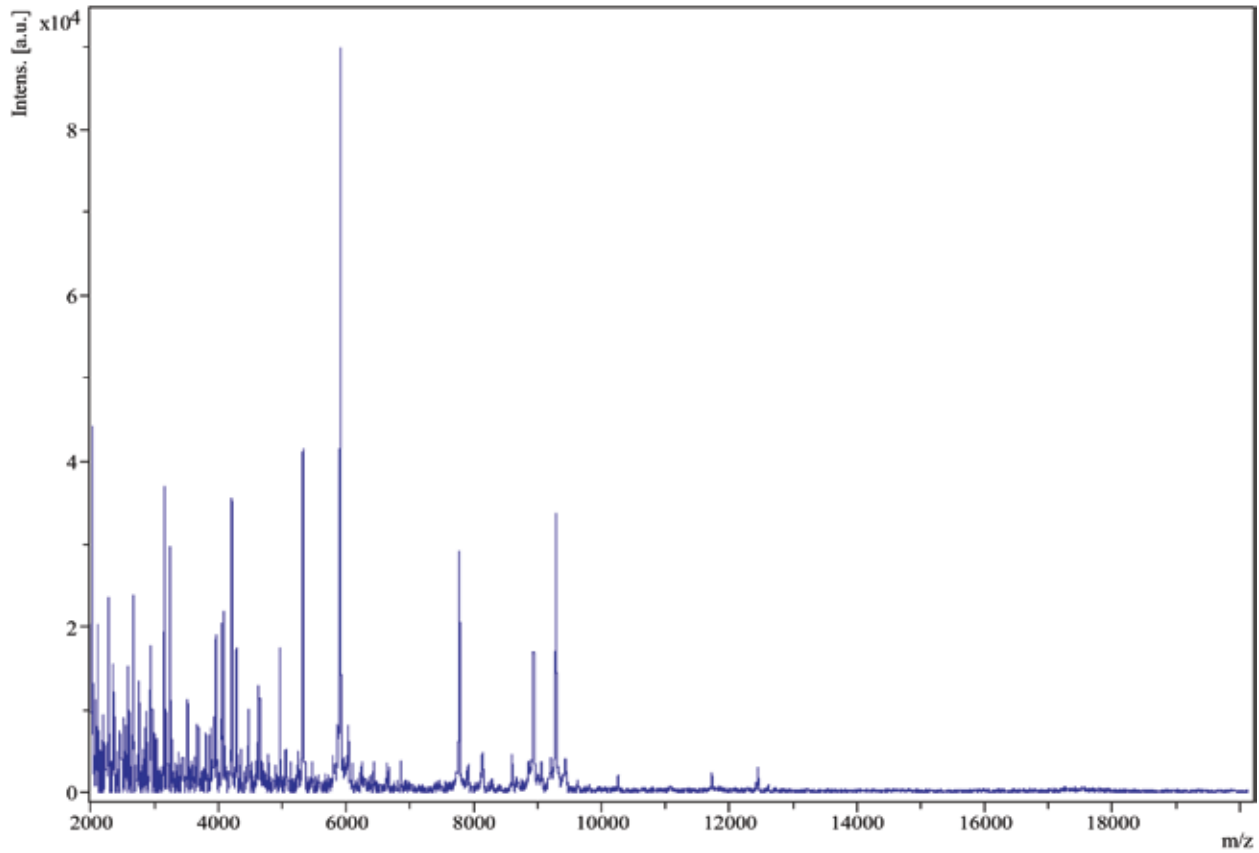


Рис. 1. Спектрограмма распределения молекул белков/пептидов. По вертикали — интенсивность сигнала; по горизонтали — отношение массы молекулы к ее заряду

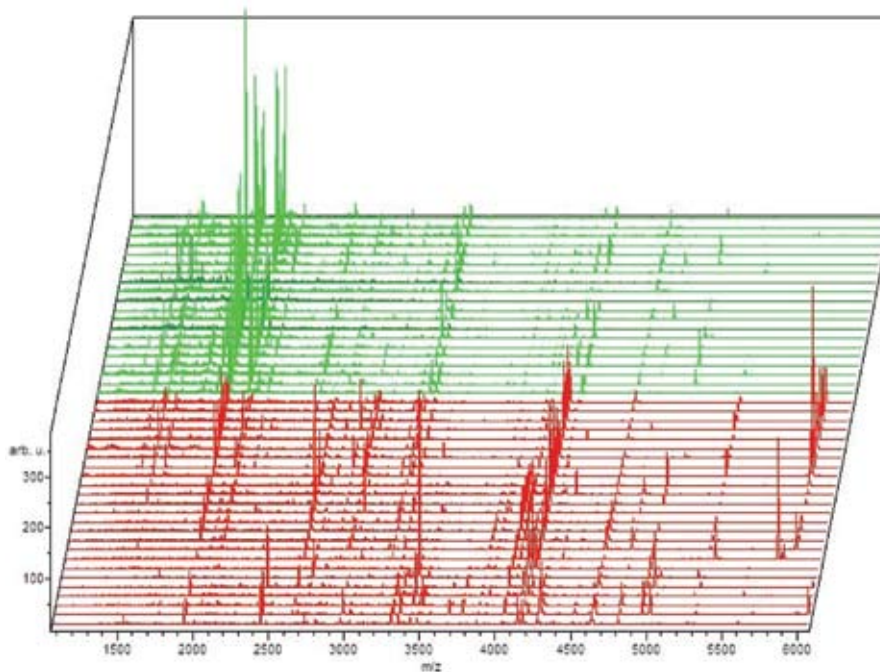


Рис. 2. Распределение масс-спектров белков/пептидов сыворотки крови больных ранними формами (■) сифилиса и здоровых лиц (■)

Для обнаружения биомаркеров заболеваний была также разработана технология SELDI-TOF, совмещающая в себе масс-спектрометрическую детекцию белков с использованием белковых чипов. В качестве биологического материала для исследования с помощью метода SELDI-TOF могут использоваться как белковые экстракты из тканей, так и биологические жидкости (плазма или сыворотка крови, моча). Однако сыворотка крови является сложной смесью, в которой в больших концентрациях присутствуют мажорные белки (например, альбумин). Можно предположить, что в условиях конкуренции за место связывания с поверхностью чипа преимущественно будут иметь мажорные белки, тогда как потенциальные биомаркеры, присутствующие в следовых количествах, просто не свяжутся с чипом. По этой же причине количество связавшегося белка и, следовательно, величина пика могут зависеть не только от количества белка, но и от концентрации других белков в сыворотке [47]. Поэтому реальные пределы чувствительности метода при работе не с изолированными белками, а со сложной смесью, такой как сыворотка крови, пока не определены. В настоящее время технология SELDI-TOF широко применяется для разработки методов диагностики различных видов рака, оставаясь в значительной степени эмпирическим методом [37].

Разрешение методов масс-спектрометрии возможно улучшить путем применения тандемной масс-спектрометрии (MS/MS), при которой используются два масс-спектрометра [7]. Принцип метода состоит в том, что ионизированные пептиды, выбранные по массе в первом масс-спектрометре, подвергаются дальнейшей фрагментации при столкновении с газом во втором и по фрагментам пептида устанавливается их аминокислотная последовательность.

В настоящее время одной из перспективных систем, предназначенных для решения задач клинической протеомики, является система C1INPROT™ производства компании «Bruker Daltonics» (Германия), включающая средства для фракционирования, измерения и визуализации профилей пептидов и белков, программное обеспечение для обработки полученных данных. В основе метода фракционирования лежат различные виды хроматографии в объеме (ионообменная, металлоаффинная, хроматография гидрофобных взаимодействий). Использование робота ClinProtRobot обеспечивает автоматизацию очистки пробы, ее фракционирования и подготовки соответствующей мишени для масс-спектрометрического анализа. Профильные спектры разделенных биомолекул регистрируются масс-спектрометром MALDI-TOF microflex, позволяющим распределять большое количество белков и пептидов по соотношению масса/заряд в биологическом образце, или MALDI-TOF ultraflex, позволяющим обработать каждый пептид и определить последо-

вательность аминокислот, образующих целевой пептид. Установленная последовательность аминокислот дает возможность идентификации в базах данных протеина, который может быть специфичным для данного заболевания, по сути являясь его маркером. Обработка данных осуществляется с помощью программного обеспечения ClinProTools™, которое позволяет сравнивать большие объемы данных, а также распознавать сложные комбинации биомаркеров. Таким образом, в масс-спектрах определяют пики, по которым выявляются наиболее достоверные различия между больными и здоровыми людьми, что позволяет установить маркер заболевания.

Полученные пики можно применять не только в качестве объекта исследования, но и как диагностический признак [37]. Задача исследователей заключается в подборе условий для получения наиболее информативных и воспроизводимых спектров и выработке правила, в соответствии с которым тот или иной спектр можно было бы классифицировать как «здоровье» или «болезнь».

Возможности протеомных технологий сразу привлекли внимание исследователей в области медицины.

Наибольшее число исследований посвящено поиску биомаркеров онкологических заболеваний [42, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57]. Показано, что путем сравнения «белковых карт» 2D-электрофореза белков, выделенных из разных опухолей, можно изолировать белки, экспрессия которых закономерно повышена или понижена в клетках определенных новообразований. MALDI-TOF позволяет быстро идентифицировать и изучить все дифференциально экспрессирующиеся белки.

К настоящему моменту опубликован ряд работ по разработке метода диагностики рака яичников с применением протеомных технологий. Большинство исследователей ставили задачу выявления значимых различий в спектрах у больных и здоровых людей без выяснения природы этих различий и разработки на их основе правила диагностики [58, 59], другие авторы идентифицировали различающиеся пики [10, 60].

Необходимо отметить, что наборы потенциальных биомаркеров, полученные разными исследователями, совершенно разные. Среди них 2 белка встречаются более чем в одной работе: это маркер массой примерно 11,7 кД [10, 58], идентифицированный как сывороточный амилоид A1 [10], и маркер с массой примерно 28 кД, идентифицированный как аполипопротеин A1 [60]. Сывороточный амилоид A1 — известный белок воспаления, уровень которого повышается при многих инфекционных заболеваниях, травмах и воспалительных процессах [61]. Опубликованы данные о повышении его концентрации в крови при раке легких [62, 63] и почек [64]. Аполипопротеин A1 продуцируется печенью,

и его концентрация напрямую связана с наличием или отсутствием воспалительного процесса [65]. Идентифицированные белки являются продуктами не самой раковой ткани, а печени, и, следовательно, повышение их концентрации в крови является следствием системного ответа организма на присутствие злокачественного образования. По-видимому, изменение концентрации найденных биомаркеров может быть вызвано не только раком, но и другими воспалительными процессами [37].

Е. F. Petricoin и соавт. [66] на основании результатов сравнения протеомного профиля плазмы больных, страдающих раком яичников и различными доброкачественными образованиями, довольно точно определили I стадию рака яичников от II—IV стадии заболевания. Из 66 больных доброкачественными новообразованиями яичника у 3 был неверно диагностирован рак яичников. Можно предположить, что воспалительные заболевания и доброкачественные опухоли имеют собственные характерные профили экспрессии белков.

С помощью протеомных технологий ведется поиск биомаркеров при заболевании раком носоглотки [67]. При сравнении протеомных профилей сыворотки крови пациентов с раком носоглотки и здоровых людей обнаружены два белка с молекулярными массами 11,6 и 11,8 кД, представляющие собой две изоформы сывороточного амилоида А, содержание которых значительно повышено у больных со злокачественной опухолью носоглотки. Длительный мониторинг больных показал, что уровень сывороточного амилоида А в сыворотке крови значительно повышается при рецидиве болезни.

При исследовании методом 2D-электрофореза в сочетании с масс-спектрометрией биоптатов эпителиальной ткани рака легкого обнаружены белки, имеющие диагностическую значимость. Выявленные белки включают: 15-гидроксипростагландиндегидрогеназу, 3-гидроксиметилглутарилкоэнзимА-синтетазу, аполипопротеин J, бета-глюкуро니다зу, флавинредуктазу, CuZn-супероксиддесмутаза, катепсин D, белок теплового шока 27 и др. [68].

При протеомном профилировании мочи пациентов с карциномой почки обнаружен ряд ферментов, контролирующих метаболизм, уровень экспрессии которых значительно повышен по сравнению с показателями у здоровых людей [66]. Обнаруженные белки принимают участие в таких важнейших метаболических процессах, как гликолиз, метаболизм пирувата, цикл превращения мочевины.

При исследовании белкового профиля биологических образцов пациентов с раком предстательной железы найдены белки: аннексин I, II и VII, уровень экспрессии которых различался у больных и здоровых людей [69].

Основные протеомные исследования в дерматовенерологии сосредоточены на поиске биомаркеров опухолевого роста при таких заболеваниях, как

плоскоклеточный рак [60, 70] и меланома [71, 72]. В этих исследованиях протеомный профиль изучается как в образцах ткани опухоли, так и в биологических жидкостях пациентов: крови и слюне [73]. Методом 2D-электрофореза в сочетании с масс-спектрометрией в слюне больных плоскоклеточным раком обнаружены 2 белка:  $\alpha_1$ -В-гликопротеин и фактор В комплемента, отсутствующие в слюне здоровых людей [70]. У больных меланомой выявлено несколько видов белков с молекулярной массой около 30 кД, которые отсутствуют в сыворотке крови здоровых людей. Количество пептидов с молекулярными массами 2,5 — 3,5 кД у больных меланомой зависит от клинической стадии заболевания [73].

Протеомные исследования широко применяются в изучении псориаза. В ходе анализа белкового профиля кожи больных псориазом методом 2D-электрофореза с последующим микросеквенированием белков кератиноцитов выявлено 6 белков с кажущимися молекулярными массами 40,3, 12,4, 11,9, 11,6, 11,6 и 10,1 кД, экспрессия которых при псориазе повышена в 5 раз и более по сравнению со здоровыми людьми. При сравнении протеомного профиля биоптатов кожи у больных с разными формами псориаза (бляшечной и каплевидной) и здоровых людей установлено, что при обеих формах заболевания увеличена экспрессия белков SCCA-2 и RhoGDI, при бляшечной форме псориаза повышена также экспрессия белков HSP27 и 14-3-3 $\sigma$  [74].

Кроме того, проводятся исследования протеомного профиля при различных аутоиммунных заболеваниях [75], таких как красная волчанка [76], склеродермия [77], витилиго [78]. При исследованиях применялись 2D-электрофорез, масс-спектрометрия, SELDI; в качестве субстрата использовались сыворотка крови, синовиальная жидкость, биоптаты тканей. Полученные данные свидетельствуют о том, что в патогенезе аутоиммунных заболеваний особую роль играют цитокины, хемокины, а также белки, связанные с процессом апоптоза клеток.

Возможность использования протеомных технологий для диагностики заболеваний активно изучается в ревматологической практике. Проведены исследования различий белкового профиля сыворотки крови у больных остеоартритом и ревматоидным артритом [79]. В сыворотке крови больных ревматоидным артритом идентифицировано почти 90 белковых субъединиц, которые отсутствовали у пациентов с остеоартритом. При протеомном анализе белков плазмы крови и синовиальной жидкости у пациентов с различными формами артрита выявлены: 1) продукты деградации  $\beta$  цепи фибриногена в синовиальной жидкости — у всех пациентов; 2) белки кальгранулина В (MRP14) и кальгранулина С — исключительно в синовиальной жидкости пациентов с ревматоидным артритом; 3) фракции амилоидно-



го А-протеина в плазме крови и синовиальной жидкости — у больных с ревматоидным артритом [80]. В ближайшие годы в ревматологии предполагается выявление многих новых биомаркерных молекул пептидов, связанных с болезнью-ассоциированными состояниями [81].

Имеются отдельные исследования по применению протеомного профилирования плазмы крови у больных с патологией сердечно-сосудистой системы и нарушением мозгового кровообращения [82]. Показано, что по меньшей мере 177 белков плазмы крови можно использовать в качестве диагностических маркеров.

Протеомный анализ плазмы крови больных атипичной пневмонией (SARS) позволил идентифицировать 38 белков, большинство из которых характерны для острой фазы заболевания и появляются в крови больных SARS вследствие запуска каскада процессов, обусловленных действием SARS-коронавируса [83]. Среди них гаптоглобин, который широко используется в качестве маркера воспаления при диагностике инфекционных и воспалительных поражений в ветеринарной медицине [84], манноза-связывающий белок, относящийся к семейству лектинов С-типа и тесно связанный с инфекционными заболеваниями [85], иммунным ответом при инфицировании вирусом гриппа А типа [86] и ВИЧ [87].

В научной литературе нет данных о результатах использования протеомного профилирования сыворотки крови для изучения сифилитической инфекции. Однако с учетом имеющихся сведений о методологии протеомных технологий метод протеомного профилирования можно считать перспективным для разработки новой технологии диагностики, в том числе дифференциальной диагностики сифилиса, которая позволит выявлять инфекцию на ранних стадиях заболевания и оценивать эффективность специфической терапии.

Таким образом, использование протеомного профилирования сыворотки крови в совокупности с высокопроизводительным аналитическим инструментом протеомики — масс-спектрометрическим анализом белков — предоставляет возможность разработки принципиально нового подхода к диагностике сифилитической инфекции, способного преодолеть ограничения серологических методов.

### Литература

1. Дмитриев Г. А., Фриго Н. В. Сифилис. Дифференциальный клинико-лабораторный диагноз М.: Мед. книга, 2004.
2. Johnson P. C., Farnie M. A.; Testing for syphilis. *Dermatol Clin*; 1994; 12 (1); 9—17.
3. Ресурсы и деятельность кожно-венерологических учреждений. Заболеваемость за 2002—2006 годы. Статистические материалы, М., 2003, 2004, 2005, 2006, 2007.
4. Pangborn M. C.; A new serologically active phospholipids from beef heart. *Proc Soc Exp Biol Med*; 1949; 48 484—486.
5. Приказ Минздрава Российской Федерации № 87 от 26.03.01 «О совершенствовании серологической диагностики сифилиса».
6. Jurado R. L., Campbell J., Martin P. D.; Prozone phenomenon in secondary syphilis. Has its time arrived? *Arch Intern Med*; 1993; 153 (21); 2496—2498.
7. Говорун В. М., Арчаков А. И. Протеомные технологии в современной биомедицинской науке. *Биохимия*; 2002; 67 (10); 1341—1359.
8. Czelusta A., Yen-Moore A., Van Der Straten M., et al.; An overview of sexually transmitted diseases. Part III. Sexually transmitted diseases in HIV-infected patients. *J Am Acad Dermatol*; 2000; 43 (3); 409—432; 433—406.
9. Неспецифические положительные результаты серологических реакций на сифилис. Количественные модификации современных серологических реакций. Методические рекомендации. М., 1990.
10. Nelson R. A., Mayer M. M.; Immobilization of treponema pallidum in vitro by antibody produced in syphilitic infection. *The Journal of Experimental Medicine*; 1949; 89 (4); 369—393.
11. Резайкина А. В. РИФ-абс с сывороткой крови, РИФц и РСК на холоде с ликвором в выявлении сифилиса среди соматических больных и декретированных контингентов: Автореф. дисс. канд. мед. наук. М.; 1979.
12. Пшеничная Л. А. Материалы к изучению возможности выпадения ложноположительных результатов реакции иммобилизации бледных трепонем при некоторых хронических заболеваниях несифилитической этиологии.: Автореф. дисс. канд. мед. наук. М.; 1971
13. Anderson R. I., Kent J. F., Sanders R. W.; Frozen syphilitous rabbit testes as source of *Treponema pallidum* for the immobilization (TPI) test for syphilis. *Am J Syph Gonorrhea Vener Dis*; 1954; 38 (6); 527—530.
14. Kern A.; Die problematic und Bedeutung der unspezifisch positiven-Reaktionen in der Lues Serologie *Derm Wschr* 145 (25); 633.
15. White M. Y., Van Eyk J. E.; Cardiovascular proteomics: past, present, and future. *Mol Diagn Ther* 2007; 11 (22); 83—95.
16. Дмитриев Г. А., Брагина Е. Е. Современные методы лабораторной диагностики сифилиса. Часть II. *Вестн. дерматол.*, 1996; 3 33—38.
17. Zhang Z., Bast R. C., Y. Y., et al.; Three Biomarkers Identified from Serum Proteomic Analysis for the Detection of Early Stage Ovarian Cancer. *Cancer Research*; 2004; 64 (16); 5882—5890.
18. Беднова В. Н., Дмитриев Г. А., Бабий А. В. и др. Новая тест-система ИФА на сифилис. *Вестн. дерматол. венерол.*; 1994; 4 51.
19. Рассказов Н. И., Ермолин Г. А., Чалов В. В. и др. Применение иммуноферментного анализа для регистрации специфических IgM-антител у больных сифилисом. *Вестн. дерматол. венерол.* 1990; 11 12—16.
20. Backhouse J. L., Nesteroff S. I.; *Treponema pallidum* western blot: comparison with the FTA-ABS test as a confirmatory test for syphilis. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 2001; 39 (1); 9—14.
21. Кубанова А. А., Фриго Н. В., Ротанов С. В., и др. Применение метода иммуноблоттинга для диагностики сифилиса с помощью коммерческой тест-системы INNO-LIA™ Syphilis Score. М.: 2005. 48.
22. Ляхов В. Ф. Разработка иммуноферментного ловушечного метода определения IgM и IgG антител при сифилисе с помощью пероксидазного трепонемного конъюгата: Автореф. дисс. канд. мед. наук. М.; 1991.
23. Scarlett C. J., Saxby A. J., Nielsen A., et al.; Proteomic profiling of cholangiocarcinoma: Diagnostic potential of SELDI-TOF MS in malignant bile duct stricture. *Hepatology*; 2006; 44 (3); 658—666.
24. Рассказов Н. И., Ермолин Г. А., Ефремов Е. Е., и др. Возможные механизмы формирования ложной позитивности в иммуноферментном анализе. *Вестн. дерматол.* 1988; 4 26—29.
25. Сидорова Е. В., Ляхов В. Ф.; Значение определения противотрепонемных IgM — антител в серодиагностике сифилиса. *ЗППП* 1995; 4 11—14.
26. Lobos P., Ortega R., Vera C., et al.; Prevalencia de serología falsa positiva para sífilis en una población de embarazadas. *Rev Med Chil*; 1992; 120 (10); 1121—1126.
27. Rawstrom S. A., Mehta S., Marceffino L. E. A.; Congenital syphilis and fluorescent treponemal antibody test reactivity after the age of 1 year Sex. *Transm. Dis*; 1994; 280 319—324.
28. Беднова В. Н., Тимченко Г. Ф. Сравнительное изучение РПГА с диагностикумами из патогенных и культуральных бледных трепонем при различных формах сифилиса. *Вестн. дермат.* 1987; 4 43—45.

29. Дмитриев Г. А., Тимченко Г. Ф. Современное состояние реакции пассивной гемагглютинации в серодиагностике сифилиса. В кн. Кожные и венерические болезни. Сборник научных работ сотрудников ЦКВИ, посвященный 75-летию института. М.: 1996. 171—175.
30. Лечение и профилактика сифилиса. Методические указания. М., 1999.
31. Luger A. F., Schmidt B. L., Kaulich M.; Significance of laboratory findings for the diagnosis of neurosyphilis. *Int J STD AIDS*; 2000; 11 (4); 224—234.
32. Титов В. Н., Дугин С. Ф., Крылин В. В. Протеомика, метаболомика и будущее клинической лабораторной диагностики (лекция) КЛД; 2007; 1 23—34.
33. Anderson N. L., Anderson N. G.; The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics*; 2002; 1 (11); 845—867.
34. Дынник О. Б., Залесский В. Н. Современные биоаналитические (протеомные) технологии в лабораторной диагностике ревматических заболеваний. *Укр. ревм. журнал*, 2006; 2 (24); 17—24.
35. Arevalo-Ferro C., Hentzer M., Reil G., et al.; Identification of quorum-sensing regulated proteins in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* by proteomics. *Environ Microbiol*; 2003; 5 (12); 1350—1369.
36. Liberatori S., Bini L., De Felice C., et al.; Acute-phase proteins in perinatal human plasma. *Electrophoresis*; 1997; 18 (3—4); 520—526.
37. Власова М. А., Мошковский С. А., Сафарова М. Р. Молекулярная диагностика рака яичника с использованием протеомных технологий. *Биомедицинская химия*; 2005; 51 (4); 367—383.
38. Weber G. F. U.; Kasuistischer Beitrag zur Unspezifität des «Nelson-Testes» bei der Lues lateens. *Z Hautkr* 1973; 48 (18); 775—778.
39. Humphrey-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.
40. Link A. J. 2-D Proteome Analysis Protocols. New Jersey Humana Press; 1999.
41. Matsui N. M., Smith-Beckerman D. M., Fishman J., et al. 2-D Proteome Analysis Protocols. New Jersey Humana Press; 1999.
42. G. Y., W. S.-L., Meyer J. L., et al.; Proteomic Analysis of High-Grade Dysplastic Cervical Cells Obtained from ThinPrep Slides Using Laser Capture Microdissection and Mass Spectrometry. *Journal of Proteome Research*; 2007; 6 (11); 4256—4268.
43. Link A. J., Eng J., Schieltz D. M., et al.; Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Biotechnol*; 1999; 17 (7); 676—682.
44. Issaq H. J., Veenstra T. D., Conrads T. P., et al.; The SELDI-TOF MS approach to proteomics: protein profiling and biomarker identification. *Biochem Biophys Res Commun*; 2002; 292 (3); 587—592.
45. Veldkamp J., Visser A. M.; Application of Enzyme — linked Immunosorbent Assay (ELISA) in the serodiagnosis of syphilis. *Br J Venereal Dis* 1975; 51 227—231.
46. Van Baar B. L.; Characterisation of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionisation and electrospray mass spectrometry. *FEMS Microbiol Rev*; 2000; 24 (2); 193—219.
47. Diamandis E. P.; Point: Proteomic patterns in biological fluids: do they represent the future of cancer diagnostics? *Clin Chem*; 2003; 49 (8); 1272—1275.
48. Young H.; Guidelines for serological testing for syphilis. *Sexually transmitted infections*; 2000; 76 (5); 403—405.
49. Takikawa M., Akiyama Y., Maruyama K., et al.; Proteomic analysis of a highly metastatic gastric cancer cell line using two-dimensional differential gel electrophoresis. *Oncol Rep* 2006; 16 (4); 705—711.
50. Melle C., Bogumil R., Ernst G., et al.; Detection and identification of heat shock protein 10 as a biomarker in colorectal cancer by protein profiling. *PROTEOMICS*; 2006; 6 (8); 2600—2608.
51. Holt G. E., Schwartz H. S., Caldwell R. L.; Proteomic profiling in musculoskeletal oncology by MALDI mass spectrometry. *Clin Orthop Relat Res*; 2006; 450 105—110.
52. Faca V., Krasnoselsky A., Hanash S.; Innovative proteomic approaches for cancer biomarker discovery. *Biotechniques*; 2007; 43 (3); 279, 281—273, 285.
53. Banerjee H. N., Verma M.; Use of nanotechnology for the development of novel cancer biomarkers. *Expert Rev Mol Diagn*; 2006; 6 (5); 679—683.
54. Downes M. R., Byrne J. C., Dunn M. J., et al.; Application of proteomic strategies to the identification of urinary biomarkers for prostate cancer: a review. *Biomarkers*; 2006; 11 (5); 406—416.
55. Lim M. S., Elenitoba-Johnson K. S.; Mass spectrometry-based proteomic studies of human anaplastic large cell lymphoma. *Mol Cell Proteomics*; 2006; 5 (10); 1787—1798.
56. 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.
57. Trcka J., Kunz M.; Functional Genome and Proteome Analyses of Cutaneous Autoimmune Diseases. *Curr Pharm Des* 2006; 12 (29); 3787—3798.
58. Wasinger V. C., Cordwell S. J., Cerpa-Poljak A., et al.; Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*; 1995; 16 (1); 1090—1094.
59. Randolph T. W., Mitchell B. L., McLerran D. F.; Quantifying peptide signal in MALDI-TOF mass spectrometry data. *Mol Cell Proteomics*; 2005; 4 (12); 1990—1999.
60. Zhou L., Cheng L., Tao L., et al.; Detection of hypopharyngeal squamous cell carcinoma using serum proteomics. *Acta Oto-laryngologica*; 2006; 126 (8); 853—860.
61. Vlahou A., Schorge J. O., Gregory B. W., et al.; Diagnosis of Ovarian Cancer Using Decision Tree Classification of Mass Spectral Data. *J Biomed Biotechnol*; 2003; 5 308—314.
62. Howard B. A., Wang M. Z., Campa M. J., et al.; Identification and validation of a potential lung cancer serum biomarker detected by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight spectra analysis. *PROTEOMICS*; 2003; 3 (9); 1720—1724.
63. Khan N., Cromer C. J., Campa M., et al.; Clinical utility of serum amyloid A and macrophage migration inhibitory factor as serum biomarkers for the detection of nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*; 2004; 101 (2); 379—384.
64. Kimura M., Tomita Y., Imai T., et al.; Significance of serum amyloid A on the prognosis in patients with renal cell carcinoma. *Cancer*; 2001; 92 (8); 2072—2075.
65. Chait A., Han C. Y., Oram J. F., et al.; Thematic review series: The immune system and atherogenesis. Lipoprotein-associated inflammatory proteins: markers or mediators of cardiovascular disease? *J Lipid Res*; 2005; 46 (3); 389—403.
66. Emanuel F. P., Ali M. A., Ben A. H., et al.; Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *The Lancet*; 2002; 359 (9306); 572—577.
67. Cho W. C. S., Yip T. T. C., Yip C., et al.; Identification of Serum Amyloid A Protein As a Potentially Useful Biomarker to Monitor Relapse of Nasopharyngeal Cancer by Serum Proteomic Profiling. *Clinical Cancer Research*; 2004; 10 (1); 43—52.
68. Massion P. P., Caprioli R. M.; Proteomic strategies for the characterization and the early detection of lung cancer. *J Thorac Oncol*; 2006; 1 (9); 1027—1039.
69. Stockwin L. H., Blonder J., Bumke M. A., et al.; Proteomic Analysis of Plasma Membrane from Hypoxia-Adapted Malignant Melanoma. *Journal of Proteome Research*; 2006; 5 (11); 2996—3007.
70. Ohshiro K., I. R. D., Koomen J. M., et al.; Pre-analytic saliva processing affect proteomic results and biomarker screening of head and neck squamous carcinoma. *International journal of oncology*; 2007; 30 (3); 743—749.
71. Mian S., Ugurel S., Parkinson E., et al.; Serum Proteomic Fingerprinting Discriminates Between Clinical Stages and Predicts Disease Progression in Melanoma Patients. *Journal of Clinical Oncology*; 2005; 23 (22); 5088—5093.
72. 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.
73. Drake R. R., Cazare L. H., Semmes O. J., et al.; Serum, salivary and tissue proteomics for discovery of biomarkers for head and neck cancers. *Expert Rev Mol Diagn*; 2005; 5 (1); 93—100.
74. Carlen L. M., Sanchez F., Bergman A. C., et al.; Proteome analysis of skin distinguishes acute guttate from chronic plaque psoriasis. *J Invest Dermatol*; 2005; 124 (1); 63—69.
75. Hueber W., Robinson W. H.; Proteomic biomarkers for autoimmune disease. *PROTEOMICS*; 2006; 6 (14); 4100—4105.
76. Turner M. W.; Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunology Today*; 1996; 17 (11); 532—540.

77. Feghali-Bostwick C.A.; Genetics and proteomics in scleroderma. *Curr Rheumatol Rep*; 2005; 7 (2); 129—134.
78. Lucchese A., Willers J., Mittelman A., et al.; Proteomic scan for tyrosinase peptide antigenic pattern in vitiligo and melanoma: role of sequence similarity and HLA-DR1 affinity. *J Immunol*; 2005; 175 (10); 7009—7020.
79. X. W. H., Chen Y. D., H. Y., et al.; Preoperatively molecular staging with CM10 ProteinChip and SELDI-TOF-MS for colorectal cancer patients. *Journal of Zhejiang University. Science. B*; 2006; 7 (3); 235—240.
80. Andrew B. S., James L. M., Susan J. M., et al.; Expression of Annexin I, II and VII Proteins in Androgen Stimulated and Recurrent Prostate Cancer. *The Journal of urology*; 2004; 171 (2); 916—920.
81. Rathlev T.; Haemagglutination test utilizing pathogenic *Treponema pallidum* for the sero-diagnosis of syphilis. *The British journal of venereal diseases*; 1967; 43 (3); 181—185.
82. Wilson L. L., Tran L., Morton D. L., et al.; Detection of Differentially Expressed Proteins in Early-Stage Melanoma Patients Using SELDI-TOF Mass Spectrometry. *Annals of the New York Academy of Sciences*; 2004; 1022 (1); 317—322.
83. Chen J. H., Chang Y. W., Yao C. W., et al.; Plasma proteome of severe acute respiratory syndrome analyzed by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S.A.*; 2004; 101 (49); 17039—17044.
84. Eckersall P.D., Duthie S., Toussaint M.J., et al.; Standardization of diagnostic assays for animal acute phase proteins. *Adv Vet Med*; 1999; 41 643—655.
85. Eisen D. P., Minchinton R. M.; Impact of mannose-binding lectin on susceptibility to infectious diseases. *Clin Infect Dis*; 2003; 37 (11); 1496—1505.
86. Hartshorn K. L., Sastry K., White M. R., et al.; Human mannose-binding protein functions as an opsonin for influenza A viruses. *J Clin Invest*; 1993; 91 (4); 1414—1420.
87. Uchida T., Fukawa A., Uchida M., et al.; Application of a Novel Protein Biochip Technology for Detection and Identification of Rheumatoid Arthritis Biomarkers in Synovial Fluid. *Journal of Proteome Research*; 2002; 1 (6); 495—499.