

УДК 613-053.2

## ОСОБЕННОСТИ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО СУБПРОТЕОМА СЫВОРОТКИ КРОВИ ДЕТЕЙ С ГАСТРОЭЗОФАГЕАЛЬНОЙ РЕФЛЮКСНОЙ БОЛЕЗНЬЮ

Колесов С.А., Шабунина Е.И., Канькова Н.Ю., Башурова И.А.

ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр» МЗ РФ,  
Нижний Новгород, e-mail: sakdom2@mail.ru

Проведен анализ низкомолекулярного протеома сыворотки крови детей с гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью (ГЭРБ). Оценены основные статистические характеристики полученных масс-спектров и выявлены 39 пептидов и низкомолекулярных белков, отличающих сыворотки крови у здоровых детей и детей с ГЭРБ. Полученные данные свидетельствуют о наличии особых паттернов низкомолекулярных белков и пептидов, характерных для сывороток крови детей с ГЭРБ. Результаты исследования свидетельствуют о наличии особенностей в обмене низкомолекулярных белков и пептидов при ГЭРБ и могут служить основой для разработки малонинвазивной масс-спектрометрической системы для диагностики ГЭРБ и мониторинга состояния больных детей в ходе заболевания.

**Ключевые слова:** дети, гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь, низкомолекулярный субпротеом

## THE PARTICULAR FEATURES OF LOW MOLECULAR WEIGHT SUBPROTEOM OF BLOOD SERUM FOR CHILDREN WITH GASTROESOPHAGEAL REFLUX DISEASE

Kolesov S.A., Schabunina Y.I., Kankova N.Y., Bashurova I.A.

Federal State Budgetary Institution «The Privolzhsky Federal Medical Research Center»  
Ministry of Public Health, Nizhny Novgorod, e-mail: sakdom2@mail.ru

The analysis of blood serum low molecular weight proteome for children with gastroesophageal reflux disease (GERD) was done. The main statistic features of the obtained mass-spectra were assessed; 39 peptides and low molecular weight proteins were identified that help to differentiate the healthy children's serum from the serum of the children with GERD. The obtained data indicate the presence of specific patterns of low molecular weight proteins and peptides that are specific for the blood sera of children with GERD. The results indicate the particularities of the metabolism of low molecular weight proteins and peptides in GERD. The results can be a basis for the further elaboration of minimally invasive mass spectrometer system for the diagnostics of GERD and patients' monitoring during the disease.

**Keywords:** children, gastroesophageal reflux disease, a low molecular weight subproteom

Одним из наиболее перспективных направлений медико-биологических исследований является использование метода масс-спектрометрии для оценки протеома (совокупности белков) в различных биологических субстратах человеческого организма [2, 7]. Протеомика, как самостоятельная наука молода и оформилась в отдельную отрасль знания в конце девяностых годов двадцатого века. Ее развитие явилось следствием завершения международной программы по расшифровке генома человека поскольку генетическая информация может лишь говорить о предрасположенности организма к тем или иным заболеваниям, а изучение изменения протеома позволяет выявлять заболевания на ранних стадиях их возникновения. В настоящее время основное внимание исследователей приковано к проблемам диагностики онкологических заболеваний, гораздо менее изучается протеом при других видах патологий и практически отсутствуют данные у детей.

Патология верхних отделов пищеварительного тракта в структуре детской забо-

леваемости занимают первое место. Среди гастроэнтерологических заболеваний одной из самых распространенных нозологических форм является гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь (ГЭРБ). Несмотря на многочисленность работ по изучению этиологии, патогенеза, способов и особенностей лечения этих заболеваний нельзя сказать, что эти вопросы в целом (и ГЭРБ в частности) окончательно решены, особенно у детей [1, 3, 4]. Важным аспектом при этом является возможность быстрого, неинвазивного и не травматического физически и психологически определения выраженности заболевания и эффективности лечения. Для этих целей, на наш взгляд, перспективным является исследование низкомолекулярного субпротеома сыворотки крови, поскольку многие пептиды являются показателем катаболической активности организма.

В связи с вышеизложенным, нами была предпринята работа, целью которой явилось выявление особенностей низкомолекулярного субпротеома сыворотки крови у детей с ГЭРБ.

### Материалы и методы исследования

Были исследованы образцы сывороток крови, полученных от 16 детей обоего пола с диагностированной ГЭРБ, средний возраст обследуемых - 11,8 лет. Контрольную группу составили 15 здоровых детей обоего пола (средний возраст 10,6 лет). От родителей всех детей и этического комитета получено согласие на проведение исследований.

Сыворотки крови пациентов получались стандартным способом. Для последующих масс-спектрометрических исследований образцы подвергались пробоподготовке – обработке с помощью магнитных частиц «Profiling Kit 100 MB-WCX» (Bruker, Германия). Масс-спектры получали на MALDI-TOF масс-спектрометре Bruker Autoflex (Германия). Для нанесения образцов на масс-спектрометрическую мишень использовалась ма-

трица на основе  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричной кислоты, что позволяло выделить в анализируемой пробе сыворотки пептиды и белки в интервале молекулярных масс от 0 до 10000 Да. Полученные результаты получены в виде масс-листов с указанием величин массы к заряду ( $m/z$ ) каждого масс-спектрометрического пика, его площади и интенсивности. Полученные данные были разбиты на кластеры (в зависимости от молекулярного веса) и статистически обработаны при помощи пакета прикладных программ «STATISTICA 6,1».

### Результаты исследования и их обсуждение

Данные по анализу низкомолекулярного субпротеома сыворотки крови детей с ГЭРБ представлен в табл. 1.

Таблица 1

Основные характеристики масс-листов детей с ГЭРБ

Кластеры	Среднее число пиков	Минимальное число пиков	Максимальное число пиков	Среднее значение молекулярного веса (Да)	Минимальное значение молекулярного веса (Да)	Максимальное значение молекулярного веса (Да)	Медиана (Да)
0–1000 Да	8,7	2	14	848,34	800,15	975,81	838,66
1000–2000 Да	14,1	6	31	1540,69	1048,48	1976,11	1564,04
2000–3000 Да	8,5	5	18	2651,45	2006,38	2992,24	2741,29
3000–4000 Да	9,8	6	13	3456,73	3015,19	3982,60	3279,20
4000 – 5000 Да	13,1	7	18	4310,02	4053,93	4966,40	4224,49
5000–6000 Да	7,6	4	11	8686,42	5064,79	5988,19	5805,33
6000–7000 Да	5,6	2	11	6511,21	6051,12	6787,52	6588,26
7000–8000 Да	2,5	1	5	7601,78	7020,49	7927,68	7762,75
8000–9000 Да	5,9	2	13	8718,25	8140,69	8984,28	8730,15
9000–10000 Да	6,6	5	11	9329,73	9059,66	9520,83	9346,52

Из представленных данных следует, что в интервале  $m/z$  от 0 до 10000 Да у детей с ГЭРБ в среднем всего 82,4 масс-спектрометрических пика. Минимальное число пиков у больных детей отмечено в интервалах  $m/z$  от 7000 до 8000 и от 8000 до 9000 Да. Максимальное количество пиков отмечено в интервале  $m/z$  от 1000 до 2000 Да – 31 масс-спектрометрический пик.

Проведенный анализ средних значений  $m/z$  масс-спектрометрических пиков в различных кластерах ( в интервалах масс от 0 до 1000, от 1000 до 2000 и от 5000 до 6000 Да) в 30% случаев выявил достоверные различия в величине показателя между детьми с ГЭРБ и здоровыми детьми. Эта разница свидетельствует о различиях в представленности различных низкомолекулярных белков и пептидов в этих интервалах масс. Аналогичные данные были получены в исследованиях желудочного сока у взрослых пациентов,

в результате которых установлено, что имеются четкие различия паттернов масс-спектров у образцов от здоровых людей и пациентов с заболеваниями желудка.[7]. Результаты, полученные в ходе анализа масс-спектров в анализируемых группах, позволили произвести поиск низкомолекулярных белков и пептидов, представленных в этих группах с максимальными различиями (табл. 2).

В таблицу включены лишь те пептиды и низкомолекулярные белки, при исследовании которых выявлены различия в изучаемых группах.

Анализ представленных в таблице данных свидетельствует о том, что выявлено 18 пептидов и 3 низкомолекулярных белка сыворотки крови, представленных только в группе здоровых детей (с процентом представленности – не ниже 25%) и 14 пептидов и 4 низкомолекулярных белка, представленных только у больных детей.

Следует особо отметить, что наибольшая разница в уровне представленности отмечена для пептидов. При этом определены пептиды, характерные лишь для здоровых детей: так пептид 925 Да отмечен у 93,3% здоровых и полностью отсутствовал в группе детей с ГЭРБ; пептид 909 Да отмечен у 87% здоровых детей и полностью отсутствует у больных, пептид 893 Да встречается в 93,3% образцах сыворотки крови, полученных от здоровых детей и в 6,3% аналогичных образцов, полученных от детей, больных ГЭРБ. Пептиды m/z 2046

и 2669 Да встречаются так же преимущественно у здоровых детей и гораздо менее представлены у больных (80% и 19%; 87% и 25% соответственно). Количество пептидов, характерных для детей с ГЭРБ гораздо меньше – их найдено всего два: пептид 1564 Да отмечен у 50% больных детей и у 0% здоровых и пептид 907 Да отмечен у 62% и 13% соответственно. Полученные нами данные подтверждают мнение о том, что подобные протеомные исследования могут иметь большое значение для клинических исследований [6].

Таблица 2

Данные сравнительного анализа низкомолекулярного субпротеома сыворотки крови у здоровых детей и детей с ГЭРБ

Молекулярный вес (Да)	Представленность у больных		Представленность у здоровых		Молекулярный вес (Да)	Представленность у больных		Представленность у здоровых	
	Чел.	%	Чел.	%		Чел.	%	Чел.	%
811	8	50	1	6,7	2954	4	25	0	0
814	7	44	0	0	3208	0	0	6	40
834	6	38	1	6,7	3218	4	25	0	0
837	4	25	0	0	3279	3	19	11	73,3
845	5	31,3	0	0	3317	4	25	0	0
850	1	6,3	7	46,7	4153	1	6,3	6	40
865	1	6,3	8	53	4193	4	25	0	0
877	2	12,5	13	86,7	4169	0	0	6	40
878	8	50	0	0	4196	0	0	4	26,7
893	1	6,3	14	93,3	4224	7	44	0	0
907	10	62,5	2	13,3	4226	1	6,3	8	53,3
909	0	0	13	86,7	4248	4	25	10	67
925	0	0	14	93,3	4283	0	0	4	26,7
931	0	0	5	33,3	4304	0	0	4	26,7
1451	4	25	0	0	5248	0	0	4	26,7
1472	4	25	0	0	5354	0	0	7	46,7
1523	4	25	0	0	5794	0	0	4	26,7
1564	8	50	0	0	5922	0	0	6	40
1568	5	31,3	0	0	5926	5	31,3	0	0
1574	4	25	0	0	5942	0	0	4	26,7
1597	5	31,3	0	0	5943	0	0	4	26,7
1968	0	0	6	40	6050	0	0	4	26,7
2022	0	0	4	26,7	6632	2	12,5	8	53,3
2046	3	19	12	80	8629	1	6,3	4	26,7
2134	0	0	6	40	8813	4	25	1	6,7
2669	4	25	13	87	9327	1	6,3	5	33,3
2755	0	0	4	26,7	9362	2	12,5	6	40
2926	4	25	0	0	9419	4	25	0	0
2960	0	0	6	4					

### Заключение

В результате исследования низкомолекулярного субпротеома сыворотки крови у больных с ГЭРБ установлены различия с аналогичными показателями, характерными для здоровых детей.

Выявлены 39 пептидов и низкомолекулярных белков сыворотки крови, присущих преимущественно здоровым или больным детям.

Полученные данные свидетельствуют о наличии особых паттернов (сигнатур) низкомолекулярных белков и пептидов, характерных для сывороток крови детей с ГЭРБ. Полученные результаты свидетельствуют о наличии различий в обмене низкомолекулярных белков и пептидов при ГЭРБ и могут служить основой в разработке малоинвазивной масс-спектрометрической системы как для диагностики ГЭРБ, так и мониторинга состояния больных детей в ходе заболевания.

### Список литературы

1. Видманова Т.А., Жукова Е.А., Сыресина О.В. с соавт. Гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь в педиатрической практике // Педиатрия. приложение к журналу Consilium Medicum. – 2010. – № 4. – С. 59–64.
2. Кропотов В.С., Колесов С.А., Васильева Е.А. с соавт. Спектр белков, продуцируемый дермальными фибробластами, у детей с болезнью Крона // Вопросы современной педиатрии. – 2013. – № 6. – С. 120–122.
3. Сыресина О.В., Жукова Е.А., Шабунина Е.И. с соавт. Нарушения гастроинтестинальных гормонов у детей с гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью // Вопросы диагностики в педиатрии. – 2012. – № 2. – С. 9–13.
4. Сыресина О.В., Жукова Е.А., Видманова Т.А. с соавт. Мелатонин в комплексном лечении гастроэзофагеальной рефлюксной болезни у детей. Педиатрическая фармакология. – 2012. – № 1. – С. 77–80.
5. Chang W.C., Hsu P.I., Chen Y.Y. et al. Observation of peptide differences between cancer and control in gastric juice // Proteomics Clin Appl. – 2008. – № 2(1). – P. 55–62.
6. Paulo J.A.I., Kadiyala V., Banks P.A. et al. Massspectrometry-based proteomics for translational research: a technical overview // Yale J Biol Med. – 2012. – № 85(1). – P. 59–73.
7. Zhang A., Sun H., Wang P. et al. Salivary proteomics in biomedical research. Clin Chim Acta. – 2013. – № 415. – P. 261–265.