

Received: 2009.09.14
Accepted: 2009.10.20
Published: 2009.11.12

Analiza proteomiczna profili białkowych w niektórych stanach patologicznych ludzkiego organizmu

Proteomic analysis of protein profiles in some pathological stages of the human organism

Barbara Kossowska¹, Ilona Dudka², Roman Gancarz²,
Jolanta Antonowicz-Juchniewicz³

¹ Katedra i Zakład Chemii i Immunochemii Akademii Medycznej we Wrocławiu

² Zakład Chemii Medycznej i Mikrobiologii Politechniki Wrocławskiej

³ Klinika Chorób Wewnętrznych, Zawodowych i Nacisnienia Tętniczego Akademii Medycznej we Wrocławiu

Streszczenie

Elektroforeza dwuwymiarowa (2-DE) jest powszechnie stosowaną metodą rozdzielania białek badanego proteomu umożliwiającą ich wykrywanie w szerokim zakresie stężeń. Przygotowanie prób do ogniskowania izoelektrycznego i elektroforezy SDS-PAGE, wizualizacja plam białkowych decydują o jakości uzyskiwanych map białkowych. Komputerowa analiza map proteomu pozwala na porównanie i wykrycie różnic w badanych profilach białkowych, a w połączeniu ze spektrometrią masową (MS) umożliwia identyfikację pojedynczych białek. Za potencjalne źródło nowych biomarkerów diagnostycznych uważa się przede wszystkim niskocząsteczkowe frakcje białkowe fizjologicznych płynów ustrojowych. Frakcje te uzyskuje się z wykorzystaniem technik chromatografii powinowactwa, immunopowinowactwa i metodą ultrafiltracji. Połączenie metod analizy proteomicznej i metabonomicznej dostarcza zbioru nowych markerów przydatnych w nowoczesnej diagnostyce medycznej.

Połączenie techniki 2-DE i spektroskopii ¹H rezonansu magnetycznego umożliwiły monitorowanie rozwoju łagodnego zaburzenia poznawczego (MCI) w pełnoobjawową chorobę Alzheimera (AD). Analiza proteomu wątroby i krwinek czerwonych pacjentów ze zdiagnozowaną schizofrenią wskazuje na przydatność tkanek narządów obwodowych, a nie tylko płynu mózgowo-rdzeniowego, w diagnozowaniu tej choroby. Techniki proteomiczne umożliwiają identyfikację nowych biomarkerów chorób reumatycznych w osoczu, płynie stawowym i tkankach stawowych. Nowe białkowe markery (osocza, surowicy, soku trzustkowego, moczu) chorób nowotworowych umożliwiają wcześniejszą diagnozę i monitorowanie przebiegu choroby. Analiza proteomu matczynej surowicy i płynów owodniowych wskazuje na możliwość wykorzystania w badaniach prenatalnych białkowych markerów w rozpoznaniu zespołu Downa. Badania proteomiczne umożliwiły ocenę wpływu skażenia środowiska na układ odpornościowy.

Słowa kluczowe:

elektroforeza dwuwymiarowa • mapa białek • analiza proteomiczna • marker

Summary

Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) is a widely used method for separation of the proteins of a proteome and it enables their detection in a large concentration range. Sample preparation for isoelectric focusing and SDS-PAGE electrophoresis as well as spot visualization determines the quality of the obtained protein maps. Computer analysis of the proteome maps allows comparison and detection differences in protein profiles. In combination with mass spectrometry (MS) it enables the

identification of a single protein. Low-abundance proteins of physiological body fluids are considered as the potential source of diagnostic biomarkers. These are obtained by such techniques as affinity chromatography, immunoaffinity, and ultrafiltration. A combination of proteomic and metabonomic analysis provides a collection of new markers which are helpful in modern medical diagnostics.

The combination of the 2-DE technique and ^1H MRS enables monitoring mild cognitive impairment (MCI) and the evolution of Alzheimer disease (AD). Proteome analysis of the liver and red blood cells of patients with diagnosed schizophrenia indicates the importance of analyzing external tissue, not only cerebrospinal fluid, in the diagnosis of this disease. Proteomic techniques enable the identification of new biomarkers in rheumatic disease by analyzing plasma, articular fluid and tissues. New protein biomarkers (in plasma, serum, pancreatic juice, urine) enable earlier cancer diagnosis and disease monitoring. Proteome analysis of maternal serum and amniotic fluid creates the possibility detection of protein markers in prenatal tests diagnosing Down's syndrome. Proteomic studies enable assessment of the influence of environmental contamination on the immunological system.

Key words: two-dimensional gel electrophoresis • protein map • proteomic analysis • marker

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=898186>

Word count: 7071

Tables: –

Figures: 2

References: 118

Adres autorki: dr Barbara Kossowska, Katedra i Zakład Chemii i Immunochemii AM, ul. Bujwida 44a, 50-345 Wrocław; e-mail: barbara@immchem.am.wroc.pl

Wykaz skrótów: **aCCP** – przeciwciała przeciw cytrulinowanym białkom/peptydom (anti-cyclic citrullinated peptide); **AD** – choroba Alzheimera (Alzheimer's disease); **A β** – β -amyloid (β -amyloid); **CSF** – płyn mózgowo-rdzeniowy (cerebrospinal fluid); **2D-DIGE** – fluorescencyjna elektroforeza różnicowa (two-dimensional fluorescenc difference gel electrophoresis); **2-DE** – elektroforeza dwuwymiarowa (two-dimensional gel electrophoresis); **HCC** – rak wątrobowokomórkowy (hepatocellular carcinoma); **^1H NMR** – protonowy rezonans magnetyczny (proton nuclear magnetic resonance); **IEF** – ogniskowanie izoelektryczne (isoelectric focusing); **MCI** – łagodne zaburzenia poznawcze (mild cognitive impairment); **ml** – mioinozytol (myo-inositol); **MS** – spektrometria masowa (mass spectrometry); **NAA** – N-acetyloasparaginian (N-acetylaspartate); **OA** – choroba zwyrodnieniowa stawów (osteoarthritis); **RA** – reumatoidalne zapalenie stawów (rheumatoid arthritis); **SDS-PAGE** – elektroforeza w żelu poliakrylamidowym z siarczanem dodecyłu (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis); **TNF- α** – czynnik martwicy nowotworów α (tumor necrosis factor α).

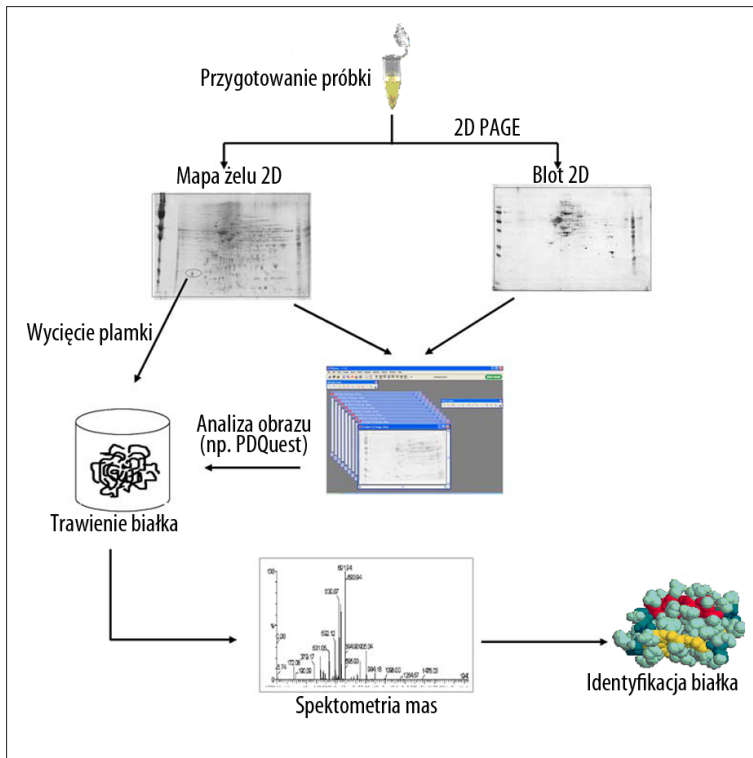
Termin proteomika, czyli analiza proteomu, został wprowadzony przez Marca R. Wilkinsona na konferencji w Sienie w 1994 r. Nazwa proteom pochodzi od angielskiego określenia PROTein complement of the geNOME (składnik białkowy kodowany przez genom) [22,67,70,99]. Celem proteomiki jest poznanie i charakterystyka wszystkich białek, które powstają w wyniku ekspresji ludzkiego genomu. W 2001 r. powołano Organizację Proteomu Ludzkiego – HUPO (Human Proteome Organisation), której założeniem jest koordynacja badań proteomicznych w skali międzynarodowej. Jednym z podstawowych założeń HUPO jest badanie zmian ekspresji białek w procesie rozwoju, zrozumieniu złożonego systemu jaki tworzą białka oraz poznaniu ich roli w procesach patologicznych organizmów żywych [7,22,106].

Sposób badania proteomu znacząco różni się od klasycznych technik biochemicznych stosowanych w identyfikacji, badaniu własności i funkcji pojedynczych białek. Proteomika wykorzystuje wiele technik służących do

jednoczesnej analizy setek lub tysięcy białek. Białka są trudnym obiektem badań ze względu na ich przestrzenną strukturę i występowanie w wielkocząsteczkowych kompleksach. Badanie proteomu nie ogranicza się do otrzymania listy białek znajdujących się w określonej komórce/tkance. Na bardzo dynamiczny obraz proteomu składają się m.in. zmiany w pojedynczej komórce związane z jej cyklem życiowym, rozmieszczeniem białek w obrębie struktur komórki, czy wzajemne oddziaływania komórek tworzących tkanki. Proteomika zmierza do poznania wszystkich białek pojawiających się w danym organizmie w ciągu całego życia [3,16,33,35,70,110].

Liczba białek proteomu jest znacznie większa niż liczba kodujących je genów. Dzięki Projektowi Poznania Ludzkiego Genomu – HGP (Human Genome Project) ustalono, że ludzki genom zawiera w przybliżeniu 30–50 tysięcy genów kodujących białka. Liczba białek ludzkiego proteomu poznanych do tej pory to około 500 tysięcy, co oznacza, że





Ryc. 1. Schemat przebiegu analizy proteomicznej z zastosowaniem elektroforezy dwuwymiarowej w połączeniu z Western blottingiem i spektrometrią mas (opracowano na podstawie [104 i 105] – zmodyfikowano)

na jeden gen przypada prawie 10 różnych wariantów białek. Przyczyną tej dysproporcji są procesy molekularnego składania podczas translacji i powstawania informacyjnego kwasu rybonukleinowego oraz procesy potranslacyjnej modyfikacji, takie jak fosforylacja czy glikozylacja, które wpływają na ostateczną strukturę białka. Pełna analiza białek zawartych w materiale biologicznym może być źródłem wielu nowych informacji o zdrowiu potencjalnego pacjenta [22].

WYBRANE METODY ANALIZY PROTEOMU

W ciągu ostatnich lat opracowano wiele metod umożliwiających całościową analizę proteomu. W wykrywaniu markerów biologicznych stosowane są techniki pozwalające na porównywanie złożonych mieszanin białkowych i ilościową ocenę ich poszczególnych składników. Metody te umożliwiają określenie zmian ekspresji białka, modyfikacji potranslacyjnych, interakcji między białkami i ich rozmieszczenia w komórkach. W proteomice klinicznej, dla której podstawowym celem jest poszukiwanie różnic w profilach białkowych osób zdrowych i chorych, stosowane są głównie elektroforeza dwuwymiarowa i spektrometria masowa [70,84,91,94,96,106,110]. Obie metody umożliwiają identyfikację pojedynczych białek – potencjalnych markerów diagnostycznych. Analiza statystyczna wielu zmiennych, charakteryzujących profile białkowe, pozwala na identyfikację grup białek, dla których zmiany ekspresji mają znaczenie diagnostyczne lub prognostyczne [29,111]. Schemat przebiegu analizy proteomicznej przedstawia ryc.1.

Elektroforeza dwuwymiarowa

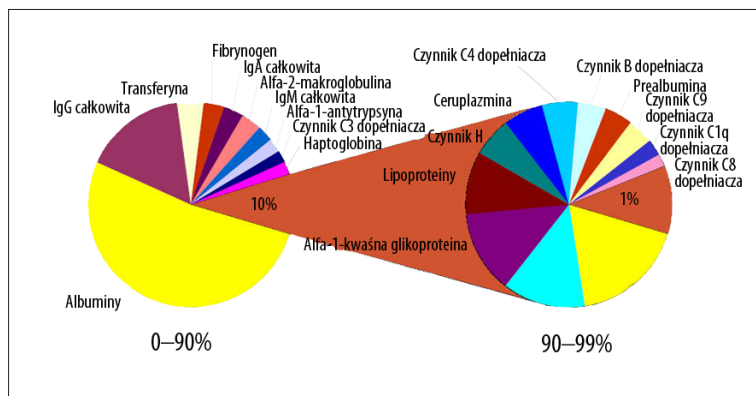
Elektroforeza dwuwymiarowa (2-DE) jest obecnie powszechnie stosowaną metodą rozdzielania, pozwalającą na

jednoczesną separację tysięcy białek. Umożliwia detekcję białek w szerokim zakresie stężeń, z wysoką rozdzielczością. Elektroforeza dwuwymiarowa jest źródłem informacji dotyczących zmian ekspresji pojedynczych białek badanych proteomów oraz ich modyfikacji [6,42,70]. Składa się z dwóch etapów. Pierwszym etapem jest ogniskowanie izoelektryczne (IEF), w którym białka są rozdzielane w gradiencie pH w zależności od punktu izoelektrycznego (pI), czyli wartości pH, przy której ładunek wypadkowy białka jest równy zero. W ogniskowaniu izoelektrycznym stosowane są paski żeli IPG z immobilizowanym gradientem pH (immobilized pH gradient) gwarantującym wysoką rozdzielczość i powtarzalność wyników [85,90,112]. Do rozdzielania białek w IEF można stosować również kapilary z żelem poliakryloamidowym z określonym gradientem pH [26].

W drugim etapie elektroforezy białka są rozdzielane zgodnie z ich masą cząsteczkową metodą SDS-PAGE [6,12,30,42,44,70]. Dobierając w drugim etapie elektroforezy odpowiednie stężenia akrylamidu lub stosując gradient stężenia akrylamidu można uzyskiwać rozdzielone białek o podobnych masach cząsteczkowych. Precyzyjne zaplanowanie obu etapów 2-DE umożliwia uzyskanie obrazu nawet kilku tysięcy białek. Możliwe jest wykrycie białek występujących w badanej próbce w ilościach femtomolowych [12]. Opracowane metody detekcji umożliwiają otrzymanie map białkowych badanych proteomów [18,33,57,60,62,64,81,86,92,93,114].

Frakcjonowanie białek badanego proteomu

W badaniach proteomicznych poszukuje się głównie markerów zmian patologicznych w płynach ustrojowych, takich jak: surowica, osocze, ślina, płyn mózgowo-rdzeniowy



Ryc. 2. Diagram kołowy białkowego składu ludzkiego osocza. Dwadzieścia dwa białka stanowią 99% proteomu osocza (opracowano na podstawie rysunku z prezentacji zamieszczonej na stronie internetowej: <http://www.plasmaproteome.org/>)

(CSF), płyn owodniowy, płyn stawowy oraz mocz [16,37,40,50,53,60,97,98,102,104,108,112,114]. Odrębny kierunek badań stanowi analiza proteomu tkanek i komórek [16,50,60,76]. Największy nacisk kładzie się na poszukiwanie białkowych markerów zmian chorobowych w materiale biologicznym, uzyskanym w nieinwazyjny sposób. Znalezienie i identyfikacja swoistych białkowych markerów może wspomóc kliniczną diagnozę, monitorowanie przebiegu choroby oraz prowadzenie terapii.

W ludzkiej surowicy występuje wiele tysięcy białek/peptydów o stężeniu w zakresie $35\text{--}50 \times 10^9$ pg/ml do $0\text{--}5$ pg/ml. Dobrze poznano 22 białka, stanowiące 99% surowiczego proteomu, co przedstawia ryc. 2. Pozostały 1% białek/peptydów, nazywany peptydomem, ma masy cząsteczkowe mniejsze niż 10 000 Da. Większość z tych małych białek/peptydów jest trudnych do zidentyfikowania i wykonania analizy ilościowej, nie tylko z powodu ich małej ilości w surowicy, ale także ze względu na ich tendencję przyłączania się do białek transportujących, takich jak albumina. Niskocząsteczkowa frakcja surowiczego proteomu zawiera m.in.: hormony, cytokiny, czynniki wzrostu i proteolityczne fragmenty wysokocząsteczkowych białek. Białka te odgrywają znaczącą rolę w procesach biologicznych i dlatego mogą się stać wartościowymi biomarkerami diagnostycznymi [31,55,105,115].

Hu i wsp. [36] w pracy przeglądowej poświęconej analizie proteomu ludzkich płynów fizjologicznych cytują 10 prac, w których usuwano z osocza/surowicy: albuminy, immunoglobuliny IgG, α 1-antytrypsynę, fibrynogen i haptoglobinę przed wykonaniem analizy proteomu. Usunięcie z badanego materiału białek występujących w największych ilościach umożliwia analizę ekspresji białek, których stężenie jest niewielkie [11,21,25,31,42,55,87,100,115,116].

Metody usuwania białek występujących w dużych ilościach w badanym materiale opierają się m.in. na technice chromatografii powinowactwa [2,11], w tym głównie chromatografii immunopowinowactwa z wykorzystaniem przeciwciał [11,42] czy separacji białek w zależności od masy cząsteczkowej z użyciem odpowiednich membran [30,55,115,116].

Do najczęściej usuwanych białek z surowiczego proteomu należą albuminy i immunoglobuliny klasy G. Millionsi i wsp. [61] rekomendują zestaw HSA/IgG Removal Kit do szybkiego usuwania albumin i IgG. Akgo i wsp. [4] opracowali syntetyczne polimeryczne złożo, na bazie polietylenu,

charakteryzujące się pseudoswoistym powinowactwem do albumin i IgG. Polimeryczne złożo umożliwia usunięcie tych białek z ludzkiej surowicy. Złożem najczęściej stosowanym do usuwania albumin z surowiczego proteomu jest Cibracon Blue (wielopierścieniowy anionowy ligand). W zestawie ProteoPrep Blue firmy SIGMA stosowany jest barwnik Cibracon Blue immobilizowany do agarozy. Barwnik ten wiąże nie tylko albuminy, ale również białka związane z albuminami. Oznacza to pewne straty w badanym proteomie [21,25]. W zestawie ProteoPrep Blue firmy SIGMA zastosowano również białko G immobilizowane do agarozy, wiążące się z fragmentem Fc immunoglobulin klasy G. Inne klasy immunoglobulin pozostają w materiale badanym [25,42].

Do usuwania białek występujących w surowicy w największych ilościach stosowane są również przeciwciała poliklonalne. Umożliwiają one wiązanie znacznych ilości określonych białek, przy jednoczesnej minimalizacji utraty pozostałych składników surowicy [42]. Chromatografia immunopowinowactwa z zastosowaniem kurzych przeciwciał IgY pozwala na usunięcie z ludzkiego osocza albumin, IgG, IgA, IgM, fibrynogenu, transferyny, haptoglobiny, α -makroglobuliny, α -kwasnej glikoproteiny, α -1-antytrypsyny, apolipoproteiny A-I HDL, apolipoproteiny A-II HDL, czynnik dopełniacza C3 oraz apolipoproteiny B [87].

Coraz częściej stosowaną metodą usuwania białek wysokocząsteczkowych z badanych proteomów jest filtracja płynów fizjologicznych przez membrany. W procesie ultrafiltracji zawieszona ciała stałe i substancje rozpuszczone o dużej masie cząsteczkowej są zatrzymywane, a niskocząsteczkowe białka/peptydy przechodzą przez membranę [55]. Membrany umożliwiają otrzymywanie frakcji białkowych o masach do 10 kDa [7,115], do 30 kDa [100,116] i do 50 kDa [30,66]. Warunki prowadzenia ultrafiltracji decydują o końcowym składzie filtratu [30]. Udowodniono, że dodanie acetonitrylu do rozcieńczonej surowicy lub osocza do końcowej objętości 20 lub 25% (v/v) korzystnie wpływa na ilość uzyskiwanych niskocząsteczkowych białek/peptydów. Acetonitryl jest czynnikiem denaturującym białka i ma wpływ na interakcję białko-białko/peptyd. Powoduje to uwolnienie niskocząsteczkowych białek, związanych z albuminami lub innymi wysokocząsteczkowymi białkami. Tłumaczy to 15% wzrost ilości białek, przechodzących przez membranę w stosunku do ultrafiltracji badanego materiału bez użycia acetonitrylu [55]. Wyniki prac wielu badaczy wskazują, że warunki ultrafiltracji,

zastosowanie rozcieńczonej surowicy lub osocza i odpowiedni dobór stężenia acetonitrylu decydują o wzbogaceniu niskocząsteczkowej frakcji białek przeznaczonych do analizy proteomicznej [30,55,115,116]. Metoda ultrafiltracji umożliwiła identyfikację niskocząsteczkowych biomarkerów, m.in. raka płuc [34], raka jajnika [9], raka wątrobowokomórkowego [69].

Przygotowanie prób do IEF i SDS-PAGE

Obraz mapy badanego proteomu zależy od warunków rozdzielania białek w gradiencie pH i elektroforezy SDS-PAGE. Decydujące znaczenie ma skład buforów stosowanych w obu wymiarach.

Podstawowym składnikiem roztworów stosowanych w ogniskowaniu izoelektrycznym w warunkach denaturujących jest mocznik. Jest on neutralnym chaotropem denaturującym białka przez rozerwanie wiązań niekowalencyjnych i jonowych. Roztwory, w których rozpuszczane są próby białek zawierają mocznik w stężeniu 5,0–9,8 M/L. Mocznik wchodzi również w skład buforów równoważących żele z białkami rozdzielonymi w gradiencie pH przed elektroforezą SDS-PAGE [33,42,85]. Zapobiegając tworzeniu się agregatów białkowych dodaje się do roztworów denaturujących tiomocznik. Dla poprawienia rozpuszczalności białek hydrofobowych stosuje się roztwór mocznika i tiomocznika w stężeniach odpowiednio 5–7 i 2 M/L [2,40,68].

Przed elektroforezą SDS-PAGE, prowadzoną w warunkach denaturujących i redukujących, żele z białkami rozdzielonymi w gradiencie pH, równoważy się w odpowiednim buforze. Bufor o pH 8,8 zawiera m.in. czynnik redukujący 1,4-ditiotreitol (DTT) oraz jodoacetamid. Ditiotriitol stosowany w stężeniach 20–100 mM/L redukuje mostki disiarczkowe [33,42,85]. Jodoacetamid (stosowany w stężeniu 2–4%) alkiluje grupy sulfhydrylowe cysteiny uniemożliwiając ich reoksydację w trakcie elektroforezy SDS-PAGE [40,85,112]. W buforze równoważącym o pH 8,8 jodoacetamid może reagować z tiomocznikiem. Obniża to wydajność reakcji alkilowania grup –SH cysteiny, co może prowadzić do odtwarzania mostków disiarczkowych. Dodatkowo stwierdzono, że tiomocznik utrudnia opłaszczanie białek przez SDS [42,85]. Konsekwencją obecności tiomocznika mogą być „fałszywe” plamy białkowe, smugi i ciemniejsze tło na mapie badanego proteomu [42].

Dodanie amfolin do roztworu, w którym białka ulegają ogniskowaniu izoelektrycznemu, minimalizuje agregację białek i poprawia przewodnictwo elektryczne w całym zakresie pH [42]. Amfoliny są niskocząsteczkowymi, amfoterycznymi związkami o dużej pojemności buforowej.

W skład roztworu, w którym białka są rozdzielane w gradiencie pH, wchodzi również detergenty znacząco wpływające na rozpuszczalność białek. Dla warunków niedenaturujących ogniskowania izoelektrycznego rekomendowane są detergenty niejonowe: Nonidet NP-40 i Triton X-100 stosowane w stężeniach 0,4–4% [33,85].

Detergentem stosowanym w IEF i dodawanym do buforu równoważącego przed SDS-PAGE jest CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimetyloamnio]-1-propanosulfonian) zawierający czwartorzędową grupę amoniową o ładunku

dodatnim i grupę sulfonową o ładunku ujemnym. CHAPS (zwitterionic detergent), stosowany w stężeniu 4%, jest detergentem rekomendowanym do rozpuszczania białek błonowych, głównie roślinnych. W praktyce CHAPS stosuje się rutynowo w elektroforezie 2-D [33, 40,85,90,112].

W elektroforezie 2-D znaczącą rolę odgrywa jonowy detergent – SDS (siarczan dodecyłu VI). SDS jest detergentem denaturującym białko. Stosowany w stężeniu 0,1–2% dodawany jest do buforu równoważącego przed elektroforezą SDS-PAGE. Siarczan dodecyłu opłaszczając cząsteczki białek nadaje im ładunek ujemny [17,40,85]. Stosowanie SDS w roztworach do IEF jest kontrowersyjne [90,112]. Siarczan dodecyłu znakomicie poprawia rozpuszczalność rozdzielanych w gradiencie pH białek, ale interferuje z ich natywnym ładunkiem. Uważa się, że dopuszczalne stężenie SDS w roztworze do ogniskowania izoelektrycznego białek nie powinno być wyższe niż 0,25% [42,85].

Wizualizacja map białkowych

Wybarwienie białek jest etapem kończącym elektroforezę 2-D. Najczęściej stosowane barwniki to: błękit Coomassie Brilliant Blue R-250, srebro koloidalne oraz znaczniki fluorescencyjne. Barwienie błękitem Coomassie jest rutynowo stosowane w detekcji białek rozdzielonych w SDS-PAGE. Metoda ta jest szybka, łatwa, odtwarzalna, ale stosunkowo mało czuła, wykrywa białka w zakresie 10–40 ng [33,64,81,104].

Stosowanie soli srebra w celu wizualizacji rozdzielonych białek, jest jedną z popularniejszych metod barwienia. Wynika to z wysokiej czułości (0,3–10 ng), łatwości wykonania i niskiego kosztu odczynników. Mapy białkowe wybarwia się odczynnikami srebrowymi, jeśli w analizie badanego proteomu planowana jest spektrometria masowa [18,33,86,104].

W proteomice klinicznej coraz częściej stosuje się znakowanie białek fluorescencyjnymi barwnikami cyjaninowymi (Cy3 – zielony, Cy5 – czerwony, Cy2 – niebieski) [62]. Barwniki cyjaninowe znacznie zwiększają czułość detekcji białek. Wykrywają 0,025–1 ng białka [57,110,114]. Znaczniki Cy stosowane są w dwuwymiarowej fluorescencyjnej elektroforezie różnicowej 2D-DIGE (two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis). Technika ta umożliwia ilościową analizę różnicową ekspresji białek w badanym materiale [21,30,33,57,106]. Próby białek znakowane są w technice 2D-DIGE przed elektroforezą. Zastosowanie trzech barwników: Cy2, Cy3 i Cy5 umożliwia rozdzielenie białek w tym samym żelu, np. dwóch badanych surowic i białkowych standardów mas cząsteczkowych i punktów izoelektrycznych. Podstawowym celem tej techniki jest wykrycie białek wykazujących statystycznie istotne różnice w ekspresji w badanym proteomie. Stwarza to możliwość identyfikacji potencjalnych biomarkerów, które mogą być wykorzystywane we wczesnej diagnostyce [21,28,30,57,76,106].

W analizie proteomicznej znajdują zastosowanie również inne znaczniki fluorescencyjne, np. SYPRO Orange, SYPRO Red lub SYPRO Ruby. Barwniki te, podobnie jak błękit Coomassie Brilliant Blue i srebro koloidalne, są stosowane do znakowania białek po elektroforezie 2-D. Techniki

wykorzystujące barwniki fluorescencyjne są bardzo czułe, a intensywność wybarwienia plam białkowych koreluje z ilością białka [33,60,92,93].

Spektrometria masowa

Spektrometria masowa (MS – mass spectrometry) jest techniką umożliwiającą analizę próbek o wysokiej złożoności. Metoda ta była początkowo stosowana tylko do identyfikacji białek. Obecnie wykorzystywana jest także do ilościowej oceny ich ekspresji [22,37,72,96].

Spektrometria masowa znajduje zastosowanie w badaniach proteomicznych m.in. oddziaływań między białkami, posttranslacyjnych modyfikacji, mapowaniu przestrzeni komórkowych. Białka badanego proteomu, rozdzielone techniką 2-DE, są ekstrahowane z żelu, poddawane enzymatycznemu trawieniu z użyciem swoistych proteaz oraz identyfikowane za pomocą MS. Czułość tej metody umożliwia rozpoznanie białka z pojedynczej plamy w żelu w ilości poniżej 1 ng [6,16,30,43,96,106].

W analizie proteomu najczęściej są wykorzystywane dwie techniki, MALDI (matrix assisted laser desorption/ionization) oraz tandemowa spektrometria mas (MS/MS-tandem mass spectrometry). MALDI oraz MS/MS stosowane są w połączeniu z elektroforezą dwuwymiarową lub stanowią samodzielną metodę identyfikacji białek badanego proteomu [6,15,30,33,49,71,72,94,96,106,114]. Często stosowana jest również technika „shotgun”, umożliwiająca określenie częściowej sekwencji i identyfikację białek [58,59]. Uzyskane widma masowe map peptydowych mogą być porównywane z widmami z baz danych, np. Mascot, SEQUEST [6,15,49,54,76,94,96,105].

Bioinformatyka w proteomice

Bioinformatyka wykorzystuje programy komputerowe do rozwiązywania problemów badawczych i udostępniania nowych informacji. Bioinformatyka proteomiczna to nowa, bardzo wąsko wyspecjalizowana dziedzina. Koncentruje się na opracowywaniu algorytmów i programów służących do gromadzenia i analizy wyników eksperymentów proteomicznych. Znajomość tych metod jest niezbędna do prawidłowej interpretacji otrzymanych wyników.

Analizę porównawczą profili białkowych prowadzi się w próbach pochodzących od pojedynczych pacjentów lub – znacznie częściej – na puli materiału pochodzącego od niewielkiej grupy pacjentów klinicznie zdiagnozowanych. Jeśli planuje się analizę proteomu kilkusetosobowej grupy pacjentów wraz z liczną grupą kontrolną należy zaplanować analizę przesiewową na bazie wyników klinicznych obu grup. Ma to na celu wybranie prób najbardziej reprezentatywnych dla badanych grup. Najkorzystniejsze jest wykonanie analiz z zastosowaniem wielu algorytmów. Analiza korelacji macierzy oraz analiza głównych komponentów może zdecydować o wyborze próbek przeznaczonych do analizy. Analiza klastrowa grupująca obiekty o podobnych cechach (przy zastosowaniu różnych algorytmów i metryk klasyfikujących) może pozwolić na pulowanie prób grupy badanej i kontrolnej. Zmniejsza to zdecydowanie liczbę koniecznych analiz do porównania profili białkowych grupy badanej i kontrolnej. Można stosować również inne

metody z dziedziny rozpoznawania obrazu, takie jak: sieci neuronowe, nieliniowe odwzorowanie lub inne [14].

Metodą stosowaną powszechnie w proteomice jest elektroforeza dwuwymiarowa. Ze względu na złożoność obrazów żeli 2-DE najłatwiejsza jest analiza z pomocą komputera wyposażonego w odpowiednie oprogramowanie. Istnieje kilka komercyjnie dostępnych oprogramowań do analizy 2-DE. Najbardziej znane i stosowane to: Melanie III (Genbio i Bio-Rad) [10,78], PDQuest (Bio-Rad) [54,112] i Z3 (Compugen) [78]. Programy te pozwalają na porównanie i identyfikację różnic w profilach białkowych – obecność lub brak białka na żelach, zmiany w poziomie ekspresji (na podstawie intensywności wybarwienia), przesunięcie pozycji występowania białka wynikające np. z jego modyfikacji. Programy dostosowują plamki do modeli gaussowskich, które rozdzielają obszary plamek zachodzących na siebie (na podstawie różnic gęstości), usuwają smużenie i poprawiają dokładność wyznaczania gęstości plamek [12]. Programy przeprowadzając normalizację, tzn. usuwanie parametrów zmiennych związanych z niedoskonałością obrazów, pozwalają na ujednoczenie intensywności plam tych białek, których ekspresja na pewno nie zmieniła się w trakcie wykonywania eksperymentu [103].

Serie kroków do właściwej oceny żeli można podsumować w następujący sposób: skanowanie, filtrowanie obrazów, automatyczne wykrywanie plam, łączenie profili białkowych, normalizacja, analiza różnicowa, analiza statystyczna. W końcowym efekcie każdy żel przedstawiony jest w trzech wersjach: oryginalny, niezmieniony obraz; przefiltrowany obraz, który jest przefiltrowaną i przetworzoną kopią oryginalnego obrazu oraz gaussowski obraz, który jest syntetycznym obrazem, zawierającym gaussowskie modele plam. Programy tego typu pozwalają też na stworzenie syntetycznego żelu – żelu idealnego (Master Gel), zawierającego gaussowskie modele wszystkich zidentyfikowanych plam w całym zbiorze żeli. Żel idealny jest niezbędny w badaniu różnic w ekspresji białek między żelami. Wartości punktów izoelektrycznych i mas cząsteczkowych wszystkich plam na żelach mogą być oszacowane przez przypisanie znanych wartości kilku zidentyfikowanych białek. Analiza statystyczna pozwala na wybranie tych plam, które znacząco różniują porównywane żele lub grupy żeli. W zaawansowanych wersjach programów komputerowych możliwe jest również porównanie wyników otrzymanych z kilku odrębnych eksperymentów [33,56].

PROTEOMIKA KLINICZNA

Istotą proteomiki klinicznej jest poszukiwanie różnic w profilach białkowych osób zdrowych i chorych. Uzyskane wyniki mogą umożliwić weryfikację diagnozy lekarskiej, stwarzają nadzieję na opracowanie metod umożliwiających szybszą diagnozę, wykrycie zmian chorobowych na poziomie komórki przed wystąpieniem zmian klinicznych, monitorowanie przebiegu leczenia choroby oraz opracowywanie leków dla pojedynczych pacjentów. Bardzo często zmiany w ekspresji, wywołane procesem chorobowym, dotyczą białek, które występują w materiale biologicznym w znikomych ilościach [30,36,100,115].

Porównywanie proteomów osób chorych i zdrowych stwarza możliwość poznania przyczyn, mechanizmów i przebiegu



schorzeń [30,62,70,96,106]. Przydatność zidentyfikowanych białek w diagnostyce poszczególnych jednostek chorobowych potwierdza się testami immunoenzymatycznymi i/lub Western blottingiem [15,37,41,43,60,63,80,97].

Intensywnie rozwijana jest proteomika chorób neurodegeneracyjnych i psychicznych [16,22,39,76,84,97,110,114], nowotworowych [33,41,68,70,92,96] oraz reumatycznych [24,35,36, 53,60,73,83,99,112]. Identyfikacja nowych markerów zespołu Downa technikami proteomicznymi stwarza nadzieję na udoskonalenie badań prenatalnych [62,74,102,117]. Rozwijane są badania nad nowymi biomarkerami przedklinicznych zmian i schorzeń u osób przewlekłe narażonych na zanieczyszczenia środowiska, w tym metale ciężkie [40,51,79].

W ostatnich kilku latach powstały prace łączące analizę proteomiczną, wykonywaną techniką elektroforezy 2-D i analizę metabonomiczną z zastosowaniem głównie ^1H NMR. Metabonomika to nowa dziedzina nauki, zajmująca się jakościowym pomiarem dynamicznej odpowiedzi organizmów żywych na bodźce zewnętrzne lub modyfikacje genetyczne [65]. Głównymi technikami wykorzystywanymi w metabonomice są: spektroskopia rezonansu magnetycznego i spektrometria masowa [5]. Do niedawna proteomika i metabonomika były metodami stosowanymi osobno do poszukiwania nowych markerów zmian chorobowych. Połączenie obu tych metod uważa się dziś za wysoce synergiczne. Wyniki uzyskane z zastosowania obu metod jednocześnie mogą dostarczyć zbioru nowych biomarkerów, charakteryzujących się większą swoistością i czułością. Analiza statystyczna danych prometabonomicznych łączy złożone zbiory danych, pochodzących z równoległe stosowanych technik 2-DE i ^1H NMR. Jednym ze sposobów przedstawiania wyników jest wizualizacja relacji metabolit-białko w postaci map korelacyjnych, obrazujących stopień zależności między tymi dwoma zbiorami [107].

Krótką charakterystyką aktualnych metod diagnostycznych wybranych jednostek chorobowych, w zestawieniu z wynikami badań proteomicznych, wskazuje na udział proteomiki klinicznej w rozwoju nowoczesnej diagnostyki medycznej.

Proteomika w badaniach choroby Alzheimera i schizofrenii

Choroby neurodegeneracyjne, takie jak choroba Alzheimera, Parkinsona, stwardnienie zanikowe boczne reprezentują jedną z najważniejszych grup chorób w starzejącej się ludzkiej populacji [16]. Patogeneza tych schorzeń jest niepewna, a diagnoza, oparta głównie na klinicznej obserwacji, nie jest wystarczająca. Odkrycie swoistych białkowych markerów może umożliwić badanie przebiegu choroby i ustalenie efektywnej terapii [16]. Heterogenność populacji pacjentów ze schizofrenią jest jednym z czynników, odpowiedzialnych za niewielką ilość biomarkerów, charakteryzujących tę chorobę [84].

Jedną z głównych przyczyn starzenia się organizmu człowieka i licznych chorób neurodegeneracyjnych jest stres oksydacyjny. Wolne rodniki powstałe podczas przemian metabolicznych organizmu atakują różne składniki komórek. W trakcie starzenia się organizmu stwierdza się postępujące gromadzenie uszkodzeń DNA w komórkach większości

tkanek. Zmiany degeneracyjne, wywołane wolnymi rodnikami, objawiają się klinicznie, gdy dysfunkcja neuronów przewyższa zdolność kompensacyjną mózgu [15,77,80].

Coraz częściej diagnoza chorób neurodegeneracyjnych uzupełniana jest o czynnościową analizę obrazowania [109]. Charakterystyka proteomu ludzkiego mózgu jest pierwszym krokiem w kierunku zrozumienia jego struktury i funkcji. Większość chorób neurodegeneracyjnych jest swoista dla określonych regionów mózgu. Mózg nie jest łatwo dostępny do badań diagnostycznych. Próbkę ludzkiej kory mózgowej są pobierane i badane dopiero pośmiertnie [16,71,114]. Spośród płynów fizjologicznych najbardziej wiarygodnym źródłem biomarkerów dla diagnostyki chorób neurodegeneracyjnych i psychicznych jest proteom CSF. Płyn mózgowo-rdzeniowy najlepiej odzwierciedla zmiany chorobowe ośrodkowego układu nerwowego, wywołane chorobami neurodegeneracyjnymi i psychicznymi, ze względu na jego obecność w obrębie przestrzeni podpajęczynówkowej, komorach mózgu oraz w kanale rdzenia kręgowego. Markery zawarte w osoczu, moczu i ślinie w diagnozowaniu chorób ośrodkowego układu nerwowego są znacznie mniej swoiste [16,84].

Choroba Alzheimera

Chorobę Alzheimera (AD) charakteryzuje ubytek neuronów głównie w hipokampie i regionach blisko z nim związanych. Hipokamp i kora śródwęczowa ulegają uszkodzeniu w AD w pierwszej kolejności. W późniejszych etapach rozwoju AD we wszystkich częściach kory mózgowej dochodzi, m.in. do gromadzenia się wewnątrzkomórkowych zwyrodnień włóknienkowych typu Alzheimera (patologia białka tau), akumulacji zewnątrzkomórkowych blaszek amyloidowych (zaburzony metabolizm białka App) [16, 47].

Białko tau i β -amyloid ($A\beta$ – β -amyloid) są najlepiej scharakteryzowanymi molekularnymi biomarkerami choroby Alzheimera. Stosunek ilościowy fosforylowanego białka tau i stężenia $A\beta$ w płynie mózgowo-rdzeniowym jest swoistym wskaźnikiem choroby Alzheimera, umożliwiającym przewidywanie rozwoju zaburzeń poznawczych od łagodnych (MCI) do pełnoobjawowej AD [13,46].

Obecnie uważa się, że w diagnozowaniu AD oraz łagodnych zaburzeń poznawczych (MCI), które z czasem mogą się rozwinąć w pełnoobjawową demencję typu Alzheimera, najbardziej przydatne są badania neuroobrazowe: tomografia komputerowa (computed tomography – CT), rezonans magnetyczny (magnetic resonance imaging – MRI), pozytronowa emisyjna tomografia komputerowa (positron emission tomography – PET), emisyjna tomografia komputerowa pojedynczego fotonu (single photon emission computed tomography – SPECT) [48,88,97,109]. Inną zaawansowaną metodą neuroobrazowania jest wykorzystanie specjalnego znacznika (Pittsburgh compound – B) w badaniu pozytronowej emisyjnej tomografii komputerowej. Badanie to swoiście oznacza depozyty β -amyloidu w mózgu [13,109].

Włączenie technik proteomicznych do badań diagnostycznych choroby Alzheimera pozwala odkryć nowe potencjalne markery AD. Praca przeglądowa Zellnera i wsp. [114], obejmująca badania z ostatnich kilkunastu lat, podsumowuje dotychczasowe wyniki analizy proteomicznej

pacjentów ze zdiagnozowaną chorobą Alzheimera. W tkankach różnych regionów mózgu zidentyfikowano dotąd 15 potencjalnych białkowych biomarkerów AD. Należą do nich m.in.: α -enolaza (w hipokampie), β_5 -tubulina (w płacie czołowym), mutaza 1 fosfoglicerolu (w hipokampie) i inne. W płynie mózgowo-rdzeniowym znaleziono 19 potencjalnych markerów AD w tym m.in.: α_1 -antytrypsynę, apolipoproteinę E, β -fibrynogen, transferrynę. W osoczu pacjentów z AD zidentyfikowano do tej pory tylko dwa potencjalne markery białkowe [37,114]. Hye i wsp. [37] w analizie porównawczej proteomu osocza pacjentów z chorobą Alzheimera i osób wiekowo dobranych z grupy kontrolnej wykazali obecność 15 białek, których ekspresja znacząco odróżniała pacjentów z AD od osób z grupy kontrolnej. Stosując technikę Western blottingu wytypowali z tej grupy białek dwa potencjalne biomarkery AD: α_2 -makroglobulinę (A2M – α_2 -macroglobulin) i czynnik dopełniacza H (CFH – complement factor).

Thambisetty i wsp. [97], kontynuując badania poszukujące w osoczu białkowych markerów choroby Alzheimera, połączyli wyniki analizy spektroskopowej ^1H rezonansu magnetycznego hipokampa i pomiaru objętości hipokampa opartego na MRI z analizą proteomiczną osocza pacjentów z AD. Badania takie wykonano w grupie osób z wczesną chorobą Alzheimera oraz łagodnymi zaburzeniami poznawczymi (MCI – mild cognitive impairment). Spektroskopia ^1H rezonansu magnetycznego hipokampa umożliwiła oszacowanie wzajemnego stosunku dwóch metabolitów: N-acetyloasparginianu do mioinozytolu (NAA/mI – N-acetylaspartate/mioinozytole). Rola N-acetyloasparginianów (NAA) w mózgu nie została dotąd ostatecznie wyjaśniona. Sugeruje się, że biorą one udział w procesie syntezy białek neuronalnych, metabolizmie neuroprzekazników oraz dostarczają grup acetylowych podczas syntezy związków tłuszczowych, wchodzących w skład osłonki mielinowej. Inozytol (I) składa się z czterech substancji – fosfatydyloinozytolu, inozytolu polifosforowego, inozytolu monofosforowego, mioinozytolu (mI). Inozytol odpowiada za regulację osmozy i utrzymywanie prawidłowej objętości komórkowej [109].

Ackla i wsp. [1] oznaczali stężenia mI, NAA i kreatyniny w substancji białej, szarej i hipokampie w grupie pacjentów z AD, MCI oraz grupie kontrolnej. Tylko u pacjentów z AD stwierdzono znaczący wzrost mI/NAA w substancji szarej i białej w porównaniu z grupą MCI i grupą kontrolną. Rose i wsp. [82] zbadali korelację między NAA/mI a atrofią mózgu (jako pomiar składu CSF i substancji szarej) u pacjentów z AD. Korelacja między NAA/mI a składem CSF była silnie ujemna, a zależność między NAA/mI a składem substancji szarej była silnie dodatnia.

Thambisetty i wsp. [97] stwierdzili, że stosunek NAA/mI był znacząco dodatnio skorelowany z ekspresją dwóch surowiczych potencjalnych markerów AD i MCI: czynnika H układu dopełniacza (CFH) oraz α_2 -makroglobuliny (A2M). Stosowane przez zespół badaczy metody neuroobrazowania potwierdziły przydatność diagnostyczną surowiczych białkowych markerów AD i MCI, wytypowanych z użyciem techniki 2-DE. Badania te udowodniły znaczącą rolę analizy proteomicznej białek osocza w diagnozowaniu AD w połączeniu z technikami neuroobrazowania [97].

Schizofrenia

Schizofrenia to zaburzenie psychiczne zaliczane do grupy psychoz endogennych. Wyniki badań wskazują, że w patogenie tej choroby mają znaczenie czynniki genetyczne, rozwojowe i środowiskowe. Molekularne mechanizmy schizofrenii pozostają w większości przypadków nieznanne [58,84].

Zastosowanie technik proteomicznych umożliwiło porównanie osoczowego proteomu pacjentów ze zdiagnozowaną schizofrenią i osób zdrowych. Ekspresja łańcucha α -haptoglobiny, α_1 -antytrypsyny, składnika P surowiczego amyloidu, β_1 -mikroglobuliny, antytrombiny III i białka wiążącego witaminę D były znacząco wyższe u pacjentów ze schizofrenią w porównaniu z grupą kontrolną [22,110]. Jiang i wsp. [39], stosując te same techniki badawcze, udowodnili przydatność oznaczeń apolipoproteiny AIV w płynie mózgowo-rdzeniowym jako potencjalnego markera schizofrenii.

Bardzo interesującym kierunkiem badań, zmierzającym do identyfikacji nowych białkowych markerów schizofrenii, jest praca Prabakarana i wsp. [76]. Autorzy wykonali analizę proteomu wątroby i krwinek czerwonych (RBC – red blood cells) pobranych od pacjentów ze zdiagnozowaną schizofrenią i osób z grupy kontrolnej z wykorzystaniem techniki 2D-DIGE.

Analiza różnicowa proteomu wątroby pacjentów ze zdiagnozowaną schizofrenią i osób z grupy kontrolnej wykazała obecność 14 potencjalnych białkowych markerów schizofrenii. Sześć z nich to białka związane ze stresem oksydacyjnym, w tym: dysmutaza ponadtlenkowa [Cu-Zn] (SOD1) oraz białko wiążące selen (SBP1 – selenium-binding protein). Analiza porównawcza proteomów krwinek czerwonych pozwoliła na identyfikację ośmiu potencjalnych markerów schizofrenii, z czego cztery są białkami stresu oksydacyjnego: białko wiążące selen (SBP1), transferaza-S-glutationowa (GSTA3 – glutathione-S-transferase), tioredoks w peroksydazie (PRDX5 – thioredoxin peroxidase) i białka szoku cieplnego (70 kDa). Wyniki te uzupełniają wcześniejsze badania zespołu Prabakarana i wsp. [75] dotyczące tkanki mózgowej badanej pośmiertnie. Autorzy pracy udowadniają, że zmiany metaboliczne prowadzące do stresu oksydacyjnego są związane z rozwojem schizofrenii. Proteom wątroby i krwinek czerwonych stanowi potencjalne źródło nowych białkowych markerów schizofrenii. Wskazuje to na przydatność oznaczania białek proteomów tkanek obwodowych, a nie tylko płynu mózgowo-rdzeniowego, w diagnozowaniu tej choroby [76].

Proteomika w prenatalnym rozpoznawaniu zespołu Downa

Zespół Downa jest zaburzeniem rozwojowym o podłożu genetycznym, należy do najczęstszych autosomalnych mutacji genomowych. Objawia się licznymi zmianami dysmorfotycznymi oraz różnym stopniem upośledzenia psychicznego. U większości chorych występują wady serca, przewodu pokarmowego, zaburzenia odpowiedzi immunologicznej. Nieprawidłowości te są spowodowane nadmiarem materiału genetycznego, wynikającego z obecności dodatkowego, całego lub fragmentu chromosomu 21



(trisomia 21) [62,74,102,117]. Diagnostyka prenatalna zespołu Downa opiera się na ocenie kariotypu komórek płodu uzyskanych z biopatu kosmówki lub amniopunkcji, badaniu USG (ocena przezierności karkowej). Rozpoznanie zespołu Downa oparte jest również na pomiarze stężeń kombinacji matczynych markerów surowiczych, takich jak osoczowe białko ciążowe (PAPP-A – pregnancy-associated plasma protein A), α -fetoproteina (AFP – α -fetoprotein), gonadotropina kosmówkowa (hCG – human chorionic gonadotropin), niezwiązany estriol (uE3 – unconjugated estriol) oraz inhibina A [62,74]. Metody te wykazują znaczny odsetek fałszywie pozytywnych wyników. Dlatego istnieje potrzeba dalszego poszukiwania nieinwazyjnych testów prenatalnych, pozwalających rozpoznać zespół Downa [62].

Badania prowadzone przez Nagalla i wsp. [62] z zastosowaniem technik proteomicznych, pozwoliły na identyfikację kilku potencjalnych, nowych surowiczych biomarkerów w pierwszym i drugim trymestrze ciąży. Większość z nich to glikoproteiny. Zidentyfikowane białka o zmienionej glikozylacji to m.in. α_1 -kwasna glikoproteina, α_2 -HS glikoproteina, globulina wiążąca kortyzol (transkortyna) oraz globulina wiążąca tyroksynę.

Tsangaris i wsp. [102] badali płyn owodniowy pochodzący od kobiet spodziewających się dziecka z zespołem Downa oraz z prawidłowej ciąży. W trisomii 21 stwierdzono prawie czterokrotny wzrost ilości PGBM (basement membrane-specific heparian sulfate proteoglycan core protein) w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolną. PGBM to proteoglikan – siarczan heparanu wydzielany do przestrzeni pozakomórkowej z błony podstawnej. Uczestniczy w procesie chondrogenyzy i rozwoju kości. Autorzy pracy [102] stwierdzili również dwukrotny wzrost stężenia α_1 -mikroglobuliny (AMBP – α_1 -microglobulin/bikunin precursor) w płynie owodniowym od pacjentek spodziewających się dziecka z zespołem Downa w porównaniu z grupą kontrolną. Białko to jest immunomodulatorem, uczestniczy w mechanizmie obrony płodu przed matczynym systemem odpornościowym [102]. W płynach owodniowych uzyskanych od przypadków z zespołem Downa zaobserwowali prawie 40% spadek stężenia prekursora insulinopodobnego czynnika wzrostu wiążącego białko (IBP-1 – insulin-like growth factor binding protein 1 precursor). Marker ten moduluje działanie insulinopodobnych czynników wzrostu I i II (IGF I – insulin-like growth factors I, IGF II – insulin-like growth factors II) odgrywających istotną rolę w procesach wzrostu, rozwoju, metabolizmu i apoptozy [102].

Analiza proteomu matczynej surowicy i płynów owodniowych bardzo wyraźnie wskazuje na potrzebę rozwoju badań proteomicznych, umożliwiających wdrożenie oznaczania zidentyfikowanych białkowych markerów w surowicy ciężarnych do prenatalnego rozpoznania zespołu Downa [62,102].

Proteomika w badaniach chorób reumatycznych

Choroby reumatyczne charakteryzują się przewlekłymi zmianami zapalnymi w obrębie tkanki łącznej, spowodowanymi najczęściej reakcją autoimmunologiczną. Są to m.in. reumatoidalne zapalenie stawów (RA – rheumatoid arthritis), chorobę zwyrodnieniową stawów (OA – osteoarthritis), łuszczycowe zapalenie stawów (AP – arthritis psoriatica), młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów (JIA

– juvenile idiopathic arthritis), sklerodermię. Przyczyny powstania tych chorób są złożone. Pod uwagę bierze się predyspozycje genetyczne, wiek, płeć, a także czynniki środowiskowe, czy infekcje bakteryjne [20,118].

Rutynowa diagnostyka chorób reumatycznych opiera się na badaniach radiologicznych oraz badaniach laboratoryjnych, obejmujących oznaczanie stężenia białek ostrej fazy, m.in. CRP, a także ocenę składu pozostałych białek surowicy krwi. W rozdziale elektroforetycznym stwierdza się zmniejszoną ilość albumin, a zwiększoną globulin α_1 i α_2 w ostrych stanach zapalnych. W przewlekłych zapaleniach obserwuje się wzrost frakcji γ -globulin [73,118].

Reumatoidalnemu zapaleniu stawów oraz innym układowym chorobom tkanki łącznej towarzyszą zaburzenia procesów odpornościowych. Prowadzi to do wytworzenia autoprzeciwciał przeciw wielu autoantygenom. Oznaczanie tych przeciwciał jest przydatne diagnostycznie ze względu na znaczenie prognostyczne i odzwierciedlenie aktywności procesu chorobowego. Trzy z nich mają odpowiednią czułość i swoistość, aby mogły być stosowane w codziennej praktyce diagnostycznej RA: czynnik reumatoidalny (RF – rheumatoid factor), przeciwciała przeciw białku wiążącemu immunoglobulinę oraz przeciwciała przeciw cytrulinowanym białkom/peptydom aCCP (anti-cyclic citrullinated peptide) [35,60].

Przeciwciała przeciw cyklicznym cytrulinowanym peptydom (aCCP) są wytwarzane w jamie stawowej w procesach patologicznych. Ich stężenie w płynie stawowym jest wyższe niż w surowicy [60]. Obecność przeciwciał przeciw cyklicznym cytrulinowanym peptydom ma znaczenie prognostyczne i predykcyjne. Przeciwciała aCCP są bardzo swoistym (>95%) i czułym (65%) markerem RA. Rzadko są obserwowane w innych chorobach tkanki łącznej.

Ekspresja przeciwciał aCCP może wyprzedzać objawy chorobowe o kilka lat. Umożliwia odróżnienie RA z innymi chorobami reumatycznymi, a także koreluje z agresywniejszym przebiegiem RA ze znaczną destrukcją stawów [118].

Wciąż jeszcze niewiele wiadomo na temat cytrulinacji białek tkanek stawowych i ich autoantygenowości. Matsuo i wsp. [60], stosując technikę 2-DE, wykryli w homogenacie błony maziowej pacjentki ze zdiagnozowanym RA 51 cytrulinowanych białek reagujących z przeciwciałami anty-CCP. Cytrulinowane białka stanowiły 5,2% wszystkich białek badanego proteomu. W spulowanej surowicy pacjentów z RA autorzy wykryli 30 cytrulinowanych białek reagujących z przeciwciałami anty-CCP, a tylko kilka cytrulinowanych białek zidentyfikowali w spulowanej surowicy osób zdrowych. Niektóre z białek proteomu błony maziowej zidentyfikowano dzięki zastosowaniu spektrometrii masowej. Należą do nich: fibrynogen γ , prekursor asporyny, mutant β -aktyny, podjednostka α_1 F-aktyny (CapZ α -1) i inne. Zastosowanie testu ELISA umożliwiło ocenę związku cytrulinacji CapZ α -1 z jego autoantygenowością. Autorzy pracy uważają, że cytrulinacja i autoantygenowość badanego białka są ze sobą związane, ale obie postaci CapZ α -1 (cytrulinowana i niecytrulinowana) pełnią różne role w przebiegu RA [60].

Stosowanie technik proteomicznych w immunodiagnostyce chorób reumatycznych umożliwia jednoczesne oznaczenie

autoprzeciwić przeciw wielu antygenom pochodzenia jądrowego i cytoplazmatycznego. Pozwala to na określenie pełnego profilu nieprawidłowości immunologicznych. Umożliwi to w przyszłości zdiagnozowanie choroby reumatycznej przed wystąpieniem objawów klinicznych lub we wczesnym stadium jej rozwoju. Nowe markery białkowe mogą również umożliwić różnicowanie schorzeń reumatycznych lub monitorowanie etapów rozwoju choroby i procesu leczenia [24,36,60,73,112].

Tilleman i wsp. [99], stosując techniki proteomiczne, zidentyfikowali w surowicy i płynie stawowym pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów (RA) białko amyloidowe (SAA – serum amyloid A). Białko amyloidowe nie jest wykrywane u pacjentów z chorobą zwyrodnieniową stawów (OA). Osoczowe białko amyloidowe należy do białek ostrej fazy, działa chemotaktycznie na neutrofile, stymuluje ich fagocytozę i degranulację, a w następstwie tych procesów uwolnienie wewnątrzkomórkowych cytokin. Analiza proteomiczna surowicy osób z RA umożliwiła również wykrycie autoprzeciwić przeciw białkom glikolitycznym: izomerazie glukozy-6-fosfatazy i aldolazie A [99]. U osób z rozpoznaną chorobą zwyrodnieniową stawów Tilleman i wsp. [99] stwierdzili w płynie stawowym i surowicy wysokie miano autoprzeciwić rozpoznających izomerazę fosfotriozową (TPI – triose phosphate isomerase).

Yamagiwa i wsp. [112] zastosowali technikę 2-DE w analizie profili białkowych płynów stawowych pacjentów ze zdiagnozowaną chorobą zwyrodnieniową stawów. Powtarzalność wyników, uzyskanych w analizach densytometrycznych otrzymanych map białkowych, potwierdziła znacząco dodatnia korelacja między trzema mapami białkowymi wykonanymi dla pojedynczego pacjenta. Analiza różnicowa map białkowych płynów stawowych czterech pacjentów ze zdiagnozowaną chorobą zwyrodnieniową stawów wskazała na znaczącą dodatnią zależność między mapami białkowymi tych pacjentów. Znaczące różnice w ekspresji kilkunastu białek badanych proteomów tych czterech pacjentów ze zdiagnozowanym OA wskazują, zdaniem autorów, na możliwość wykorzystania analizy proteomu płynu stawowego m.in. do oceny stopnia zaawansowania choroby, oceny destrukcji stawów i monitorowania odpowiedzi organizmu na terapię.

Jednym z rodzajów terapii stosowanych w leczeniu RA oraz innych chorobach stawów jest podawanie preparatów blokujących czynnik martwicy nowotworów α (TNF – tumor necrosis factor- α) [24]. Drynda i wsp. [24] stosując technikę 2-DE i spektrometrię masową zidentyfikowali nowy białkowy marker S100A9 (MRP14) potencjalnie umożliwiający monitorowanie terapii anty-TNF- α . Stężenie tego białka maleje w czasie terapii. Analiza profili białkowych pacjentów ze zdiagnozowanym RA i OA oraz spektrometria masowa pozwoliły na identyfikację tego białka oraz jego kompleksu S100A8/A9 w badanych płynach stawowych i osoczach. Znana jest prozapalna aktywność S100A9. Białko to i jego kompleks indukują chemotaksję neutrofilów [83]. Badania ekspresji tego białka i jego kompleksu z wykorzystaniem technik immunoenzymatycznych wykazały, że jego stężenie w płynie stawowym koreluje z jego stężeniem w osoczu. Dodatkowo umożliwia odróżnienie pacjentów z RA od OA i grupy kontrolnej. Poziom S100A9 jest znacznie wyższy w płynie stawowym i osoczu pacjentów ze zdiagnozowanym RA niż

u pacjentów z OA oraz w grupie kontrolnej. Wydaje się, że białko S100A9 jest potencjalnie bardzo dobrym markerem diagnozowania i terapii RA [24].

Białkowe markery chorób nowotworowych

Do zdiagnozowania chorób nowotworowych i terapii przeciwnowotworowej istotne jest badanie zmian ekspresji białek w czasie progresji nowotworu. Zastosowanie proteomiki w diagnostyce nowotworów umożliwia rozwój wiedzy na temat molekularnego podłoża procesu karcynogenezy [70, 96]. Biomarkery wykorzystywane rutynowo w diagnostyce onkologicznej to m.in.: antygen swoisty dla prostaty (PSA) stosowany w rozpoznawaniu raka stercza, α -fetoproteina (AFP – α -fetoprotein) wykorzystywana w diagnostyce raka wątroby. Antygen CD20 na komórkach nowotworowych chłoniaków B jest celem w immunoterapii chłoniaków niezłośliwych [96].

Rozpoznanie raka wątrobowokomórkowego (HCC – hepatocellular carcinoma) we wczesnym stadium jest trudne, mimo że znane są czynniki ryzyka, do których zalicza się m.in.: przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby typu B i C, czy alkoholizm. Wpływ mają również wiek, płeć i skłonności genetyczne. Proteomiczna analiza różnicowa Steela i wsp. [92] białek surowicznych pacjentów z HCC pozwoliła na identyfikację dwóch białek z obniżającą się ekspresją wraz z rozwojem choroby. Różnice między grupą kontrolną a pacjentami z HCC były istotne statystycznie. Zidentyfikowane białka to fragment czynnika C3 dopełniacza oraz izoforma apolipoproteiny A1 (ApoA1 – apolipoprotein A1) [92, 96]. Badania nad HCC prowadzone przez Kennedy'ego [41] pozwoliły na zidentyfikowanie w surowicy osób chorych kilku białek, które mogą korelować z masą guza i rutynowo oznaczaną α -fetoproteina. Są to cztery składniki układu dopełniacza, hemoglobina 1 i 2 oraz dwa nowe białka, które są badane.

Analiza surowiczego proteomu osób zarażonych wirusem żółtaczki typu B (HBV – hepatitis B virus) oraz osób ze zdiagnozowanym nowotworem wątroby (HCC) pozwoliła na znalezienie dwóch potencjalnych markerów umożliwiających monitorowanie procesu nowotworzenia u osób z HBV. Stężenia dwóch zidentyfikowanych białek: białka C3 oraz izoformy apolipoproteiny AI maleją wraz z kolejnymi etapami rozwoju choroby nowotworowej (HCC) u chorych z HBV [96].

Analiza surowicznych profili białkowych pacjentów z rakiem jelita grubego i osób ze zdiagnozowanym gruczolakami wykazała istnienie siedmiu biomarkerów, różnicujących obie grupy pacjentów z czułością rzędu 89% i swoistością 83%. Z grupy tych biomarkerów zidentyfikowano 3 białka: apolipoproteinę A1, apolipoproteinę C1 i fragment łańcucha albuminy [32].

Elektroforeza dwuwymiarowa w połączeniu z Western blottingiem pozwoliła na identyfikację surowiczego, potencjalnego markera gruczolakoraka okrężnicy: α -defensyny. Stwierdzono znacznie zwiększony poziom tego peptydu w surowicach osób ze zdiagnozowanym gruczolakorakiem okrężnicy w porównaniu do osób zdrowych. Oznaczanie tego markera stwarza, zdaniem autorów pracy, możliwość wcześniejszego diagnozowania gruczolakoraka okrężnicy [63].



Technikę 2D-DIGE zastosowano w badaniach proteomu wycinków tkankowych pobranych od pacjentów z rakiem przełyku. Analiza różnicowa umożliwiła wykrycie w puli ponad 1000 białek badanego proteomu 58 białek o trzykrotnie większej ekspresji w komórkach stransformowanych nowotworowo w porównaniu z grupą kontrolną. Jednym ze zidentyfikowanych białek jest glikoproteina 96, należąca do białek szoku cieplnego. Glikoproteina 96 chroni strukturę i funkcje innych białek, uczestniczy w ich wewnątrzkomórkowym transporcie [96].

Zastosowanie techniki 2D-DIGE w analizie porównawczej linii komórkowych od kobiet zdrowych i od kobiet z rozpoznaną transformacją nowotworową gruczołu piersiowego umożliwiło wykrycie zmian w komórkach objętych procesem karcynogenezy. Stwierdzono w nich nadekspresję L-plastyny (białka wiążącego aktyne), białka 14-3-3 β (odpowiedzialnego za rozwój neuronalny, kontrolę wzrostu i cyklu komórkowego), a także enzymów metabolicznych: glutaminazy C, syntetazy karbamoilofosforanowej (CAD – carbamoyl phosphate synthetase-aspartate transcarbamoylase-dihydroorotase) oraz reduktazy aldehydowej [27].

Techniki proteomiczne pozwoliły na wykrycie nowych surowiczych markerów raka jajników: transterytryny (białka transportowego tyroksyny i retinolu), α -hemoglobiny, apolipoproteiny AI i transferryny. W połączeniu z rutynowo oznaczanym antygenem CA 125, mają one znaczenie prognostyczne w rozpoznawaniu wczesnych postaci nowotworów o granicznej złośliwości i złośliwych. Badania proteomiczne moczu, pochodzącego od kobiet zdrowych, z łagodnymi zmianami w przydatkach oraz z rakiem jajnika wykazały obecność neurotoksyny eozynofilowej o aktywności RNA-zy i osteopontyny – markera progresywności procesu nowotworowego. Oba białka wykazują nadekspresję w raku jajnika [67,101,108,113].

Rak jasnokomórkowy nerek (RCC – renal cell carcinoma) stanowi prawie 2% wszystkich nowotworów tego narządu. Charakteryzuje go wysoka śmiertelność spowodowana późnym rozpoznaniem. Wykorzystanie techniki 2-DE w analizie proteomu komórek pochodzących z usuniętych nerek chorych z rozpoznaniem RCC, pozwoliło na wykazanie obniżonej ekspresji enylo-CoA hydratazy, α -dehydrogenazy aldehydowej I oraz aminoacylasy I [70].

W badaniach moczu pacjentów ze zdiagnozowanym RCC stwierdzono nadekspresję białka wiążącego retinol, anhidrazy węglanowej I oraz β_2 -mikroglobuliny. Obniżoną ekspresję, w porównaniu z białkami występującymi w moczu osób zdrowych, stwierdzono dla lektyny wiążącej mannozę proteazy serynowej 2 (MASP-2 – mannan-binding lectin serine peptidase 2) i kininogenu (składnika wewnątrzpochodnego toru krzepnięcia). Lektyna wiążąca mannozę proteazy serynowej 2 spełnia ważną rolę w nieswoistej odpowiedzi immunologicznej i aktywacji dopełniacza na drodze lektynowej [70].

Wykorzystując techniki proteomiczne w badaniach surowicy osób ze zdiagnozowanym nowotworem płuc, stwierdzono wzrost ekspresji apolipoproteiny J (Apo J – apolipoprotein J) oraz zmniejszenie ekspresji gelsoliny u pacjentów z rakiem płuc w porównaniu do osób zdrowych. Apo J jest związana głównie z lipoproteinami HDL. Zahamowanie

ekspresji gelsoliny (białka przyłączającego się do aktyny) wpływa na wzrost ruchliwości komórek, powoduje zaburzenia architektury cytoszkieletu komórki, co sprzyja przerzutowaniu nowotworu. Analiza surowiczego proteomu wykazała również wysoką czułość i swoistość białka wiążącego retinol oraz α_1 kwaśnej glikoproteiny w wykrywaniu raka płuc [68].

Techniki proteomiczne znalazły także zastosowanie przy identyfikacji nowych biomarkerów przewodowego gruczolakoraka trzustki (PDAC – pancreatic ductal adenocarcinoma), charakteryzującego się najgorszym rokowaniem ze wszystkich nowotworów przewodu pokarmowego. W soku trzustkowym zidentyfikowano 170 białek. Potwierdzono przydatność oceny ekspresji białek związanych ze stanem zapalnym trzustki (PAP – pancreatitis-associated protein) w soku trzustkowym, jako nowych markerów PDAC. Białka PAP, zaliczane do lektyn, stymulują aktywność makrofagów. W badaniach z użyciem techniki 2D-DIGE soku trzustkowego osób z PDAC wykazano również wzrost ekspresji onkogenu DJ-1, metaloproteiny 9 macierzy (MMP-9 – matrix metalloproteinase 9), prekursora α_1 -glikoproteiny (α_1 -AGP – α_1 -acid glycoprotein) [98].

Analiza proteomu osób narażonych środowiskowo

Ważnym kierunkiem badań jest wykrywanie zmian w proteomie osób narażonych na kontakt ze szkodliwymi związkami chemicznymi [40,52,79], w tym również oceny zagrożenia zdrowia osób przewlekle narażonych na metale ciężkie [51].

Zastosowanie technik proteomicznych w badaniach *in vitro* przez Raveendrana i wsp. [79] umożliwiło ocenę zmian ekspresji białek komórek śródbłonna aorty po 4 godzinach kontaktu z wodnym ekstraktem dymu papierosowego. Komórki śródbłonna aorty stanowią pierwszą linię obrony ściany naczynia przed uszkodzeniami, indukowanymi dymem papierosowym, który jest uznanym czynnikiem miazdżycorodnym. Stwierdzono zmienioną ekspresję 389 białek. Białka, których stężenie znacząco wzrastało w narażeniu na dym papierosowy to: białka szoku cieplnego (HSP-70, HSP-27, glikoproteina 96), aneksyna 6 i 2, α -aktylina, meozyna, białko wiążące lamininę. Wyraźne zmniejszenie ekspresji w kontakcie z substancjami zawartymi w dymie papierosowym stwierdzono dla: lekkiego łańcucha miozyny, propylo-4-hydroksylazy, eukariotycznego czynnika inicjacji transkrypcji 4A, α -enolazy i α -tubulin. Autorzy pracy [79] uważają, że zastosowanie proteomiki przybliży badaczy do poznania molekularnych mechanizmów patologicznych zmian w ludzkim organizmie, wywołanych narażeniem na dym papierosowy.

Na stały kontakt z niewielkimi ilościami par benzenu narażonych jest wiele osób. Benzen jest składnikiem dymu papierosowego, benzyny, spalin silników samochodowych. Długotrwałe działanie par benzenu w małych stężeniach wpływa na układ krwiotwórczy, prowadząc do rozwoju niedokrwistości aplastycznej, leukopenii lub trombocytopenii. W zaawansowanych przypadkach dochodzi do znacznego zmniejszenia liczby wszystkich elementów morfotycznych-pancytopenii, często poprzedzającej występowanie białaczki. W monitorowaniu ekspozycji na benzen oznacza się jego stężenie w moczu i krwi oraz poziom

metabolitów benzenu: kwasu S-fenylmerkapturowego (S-PMA – S-phenylmercapturic acid) i kwasu trans, transmukonowego (t, t-MA – trans, trans-muconic acid) w moczu [40,52].

Stosując techniki proteomiczne w badaniu osocza osób pracujących w narażeniu na benzen zidentyfikowano 18 białek o zwiększonej ekspresji w porównaniu z grupą osób nienarażonych. Sześć spośród tych białek ma istotny wpływ na funkcje układu odpornościowego. Największą różnicę stężeń w osoczu, między grupą narażoną i kontrolną, stwierdzono dla receptora β limfocytów T (TCR β – T cell receptor chain). Zwiększona ekspozycja na benzen powoduje zahamowanie proliferacji limfocytów T i zwiększenie ilości receptora TCR β . Białkiem, którego ekspresja w osoczu wzrasta w kontakcie człowieka z benzenem jest immunofolina FKBP51. Izoforma tego białka – FKB23 to białko regionu zmiennego łańcucha lekkiego immunoglobulin. Immunofolina FKBP51, wiążąc substancje immunosupresyjne, indukuje odpowiedź immunologiczną [40,45].

Jednym z głównych czynników skażenia środowiska są metale ciężkie: ołów, kadm i arsen. Są one szeroko rozpowszechnione w środowisku człowieka – w powietrzu atmosferycznym, wodzie, pożywieniu czy glebie i mogą pochodzić zarówno ze źródeł naturalnych, jak i antropogenicznych, zwłaszcza z przemysłu. Należy podkreślić znaczenie ekspozycji czynnej i biernej na dym tytoniowy, jako istotnego źródła narażenia ludzi na metale ciężkie, głównie kadm [19].

Arsen i kadm są czynnikami karcynogennymi, a związki ołowiu potencjalnymi czynnikami karcynogennymi. Rozwój nowotworów wywołanych ekspozycją na arsen dotyczy przede wszystkim tkanki płucnej i skóry, obserwowane są także nowotwory pęcherza, wątroby i nerek. Długotrwała ekspozycja na ołów powoduje zmiany hematologiczne, neurologiczne i nefrologiczne. Epidemiologiczne dane o potencjalnej karcynogenności związków ołowiu są stosunkowo nowe. Rakotwórczość kadmu jest do pewnego stopnia pochodną jego toksyczności. Dla rozwoju nowotworu znaczący jest długotrwały kontakt tkanek z kadmem, nawet w dawkach nietoksycznych [95].

Lantz i wsp. [51] zastosowali techniki proteomiczne w badaniach popłuczyn pęcherzykowo-oskrzelowych myszy (BALF – bronchoalveolar lavage fluid) przewlekle ekspozowanych na małe dawki arsenu. Za potencjalne biomarkery narażenia na arsen uznano: receptory końcowych produktów zaawansowanej glikacji RAGE (receptor for advanced glycation end products), transferazę S glutationu (GST – glutathione-S-transferase) oraz apolipoproteinę A-1. Ekspresja tych białek jest zmniejszona przy ekspozycji na arsen w porównaniu z grupą kontrolną. Poziom ekspresji enolazy 1 i peroxiredoxinu-6 jest wyższy w grupie narażonej.

Zmniejszenie poziomu RAGE zaobserwowano także w płwocinie ludzi narażonych środowiskowo na arsen w porównaniu z osobami nienarażonymi [51]. Receptory końcowych produktów zaawansowanej glikacji znajdują się na powierzchni komórek śródbłonna, komórek mięśni gładkich i makrofagów. Łączą się z zaawansowanymi końcowymi produktami glikacji, tworząc kompleksy odpowiadające za zaburzenia funkcji komórek śródbłonna naczyniowego, zwiększenie przepuszczalności naczyń krwionośnych oraz inicjację procesów zapalnych [23,51]. Znaczenie pozostałych białek różniących się ekspresją u myszy narażonych na arsen i nieekspozowanych nie zostało jeszcze udowodnione u ludzi. Trwają badania nad zidentyfikowaniem panelu białek, umożliwiającego wykrycie zmian molekularnych związanych ze środowiskowym narażeniem na niskie dawki arsenu, ingerujących już w przemiany metaboliczne organizmu, ale niewywołujących jeszcze objawów klinicznych [51].

W zespole Small Area Health Statistics Unit (SAHSU) w Imperial College London prowadzone są badania nad toksycznymi skutkami przewlekłego narażenia na kadm. Ich celem jest zintegrowanie badań ekspozycyjnych i klasycznych biomarkerów z metodami metabonomicznymi. Dotychczas udało się połączyć potwierdzone markery nefropatii, w tym N-acetylo- β -D-glukozaaminidazę (NAG – N-acetyl β -D glucosaminidase), z profilami metabonomicznymi moczu. Zaobserwowano znacząco ujemną korelację między 3-hydroksyzowalerianianem i nieznanym metabolitem (rezonans w regionie dimetyloglicyny) a stężeniem kadmu w moczu. Znacząco dodatnia korelacja została zanotowana między widmem ^1H NMR moczu a NAG. Badania te pozwolą ocenić wpływ środowiskowego skażenia kadmem na ludzkie zdrowie (publikacja w przygotowaniu) [38,89].

PODSUMOWANIE

Zastosowanie techniki elektroforezy dwuwymiarowej w połączeniu ze spektrometrią mas stwarza możliwość precyzyjnej analizy profili białkowych w różnych stanach patologicznych ludzkiego organizmu dostarczając potencjalnych biomarkerów wielu jednostek chorobowych. Porównanie stosowanych dotychczas metod, markerów wykorzystywanych obecnie w diagnostyce medycznej, z wynikami analiz proteomicznych wskazuje na znaczący udział nowych, białkowych markerów w rozwoju nowoczesnej diagnostyki medycznej. Połączenie technik proteomicznych i metabonomicznych może dostarczyć zbioru nowych markerów, charakteryzujących się większą swoistością i czułością w porównaniu z markerami białkowymi. Można je przedstawić w postaci matematycznego profilu, różnicującego osoby zdrowe i chore, umożliwiając również wykrywanie w ludzkim organizmie zmian patologicznych, ujawniających się na poziomie komórkowym, przed wystąpieniem zmian klinicznych.



PIŚMIENICTWO

- [1] Ackl N., Ising M., Schreiber Y.A., Atiya M., Sonntag A., Auer D.P.: Hippocampal metabolic abnormalities in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.*, 2005; 384: 23–28
- [2] Ahmed N., Barker G., Oliva K., Garfin D., Talmadge K., Georgiou H., Quinn M., Rice G.: An approach to remove albumin for the proteomic analysis of low abundance biomarkers in human serum. *Proteomics*, 2003; 3: 1980–1987
- [3] Ahmed N., Rice G.E.: Strategies for revealing lower abundance protein in two dimensional protein maps. *J. Chromatogr. B*, 2005; 815: 39–50
- [4] Akgo S., Ozkara S., Uzun L., Yilmaz F., Denizl A.: Pseudospecific magnetic affinity beads for immunoglobulin G depletion from human serum. *J. Appl. Polymer Sci.*, 2007; 106: 2405–2412
- [5] Ala-Korpela M.: Critical evaluation of ¹H NMR metabonomics of serum as a methodology for disease risk assessment and diagnostics. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2008; 46: 27–42
- [6] Anderson N.L., Anderson N.G.: The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol. Cell. Proteomics*, 2002; 1: 845–867
- [7] Aristoteli L.P., Molloy M.P., Baker M.S.: Evaluation of endogenous plasma peptide extraction methods for mass spectrometric biomarker discovery. *J. Proteome Res.*, 2007; 6: 571–581
- [8] Balabanov S., Zimmermann U., Protzel C., Scharf C., Klebingat K.J., Walther R.: Tumour-related enzyme alterations in the clear cell type of human renal cell carcinoma identified by two-dimensional gel electrophoresis. *Eur. J. Biochem.*, 2001; 268: 5977–5980
- [9] Bergen H.R. III, Vasmataz G., Cliby W.A., Johnson K.L., Oberg A.L., Muddiman D.C.: Discovery of ovarian cancer biomarkers in serum using NanoLC electrospray ionization TOF and FT-ICR mass spectrometry. *Dis. Markers*, 2003–2004; 19: 239–249
- [10] Bini L., Liberatori S., Pallini V.: Infectious Diseases. W: Biomedical applications of proteomics, red.: J.C. Sanchez, G.L. Corthals, D.F. Hochstrasser. Wiley-VCH, Weinheim 2004, 225–313
- [11] Bjorhall K., Miliotis T., Davidsson P.: Comparison of different depletion strategies for improved resolution in proteomic analysis of human serum samples. *Proteomics*, 2005; 5: 307–317
- [12] Bonar E., Bierczyńska-Krzysik A., Dubin A.: Elektroforeza dwuwymiarowa w żelu poliakrylamidowym. W: *Proteomika*, red. A. Kraj, J. Silberring. Wydział Chemii UJ, Kraków 2004, 54–60
- [13] Britschgi M., Wyss-Coray T.: Blood protein signature for the early diagnosis of Alzheimer disease. *Arch. Neurol.*, 2009; 66: 161–165
- [14] Bultinoc P., Dekker M.: Computational Medicinal Chemistry for Drug Discovery Today. Inc, New York 2004
- [15] Castegna A., Thongboonkerd V., Klein J.B., Lynn B., Markesbery W.R., Butterfield D.A.: Proteomic identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain. *J. Neurochem.*, 2003; 85: 1394–1401
- [16] Caudle W.M., Pan S., Shi M., Quinn T., Hoekstra J., Beyer R.P., Montine T.J., Zhang J.: Proteomic identification of proteins in the human brain: Towards a more comprehensive understanding of neurodegenerative disease. *Proteomics Clin. Appl.*, 2008; 2: 1484–1497
- [17] Chen J.H., Chang Y.W., Yao C.W., Chiueh T.Z., Huang S.C., Chien K.Y., Chen A., Chang F.Y., Wong C.H., Chen Y.J.: Plasma proteome of several acute respiratory syndrome analyzed by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 17039–17044
- [18] Chevallet M., Luche S., Rabilloud T.: Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nat. Protoc.*, 2006; 1: 1852–1858
- [19] Chlebda E., Antonowicz-Juchniewicz J., Andrzejak R.: Wpływ ekspozycji zawodowej na ołów i arsen na stężenie karotenoidów w surowicy u pracowników hut miedzi. *Med. Pr.*, 2004; 55: 389–401
- [20] Choroby reumatyczne. http://www.chorobyreumatyczne.pl/dla_lekarzy.html?fs=small (28.04.2009)
- [21] Chromy B.A., Gonzales A.D., Perkins J., Choi M.W., Corzett M.H., Chang B.C., Corzett C.H., McCutchen-Maloney S.L.: Proteomic analysis of human serum by two-dimensional differential gel electrophoresis after depletion of high-abundant proteins. *J. Proteome Res.*, 2004; 3: 1120–1127
- [22] Dmitrzak-Węglarz M., Hauser J.: Wykorzystanie badań proteomicznych w poszukiwaniu markerów biologicznych dla chorób psychicznych. *Psychiatria*, 2006; 3: 118–127
- [23] Dorzhko R., Witkowska M.: Zaburzenia gospodarki węglowodanowej a ryzyko chorób układu sercowo-naczyniowego. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2006; 15: 911–916
- [24] Drynda S., Ringel B., Kekow M., Kühne C., Drynda A., Glocker M.O., Thiesen H.J., Kekow J.: Proteome analysis reveals disease-associated marker proteins to differentiate RA patients from other inflammatory joint diseases with the potential to monitor anti-TNF α therapy. *Pathol. Res. Pract.*, 2004; 200: 165–171
- [25] Echan L.A., Tang H.Y., Ali-Khan N., Lee K., Speicher D.W.: Depletion of multiple high-abundance proteins improves protein profiling capacities of human serum and plasma. *Proteomics*, 2005; 5: 3292–3303
- [26] Encarnacion S., Hernandez M., Martinez-Batallar G., Contreras S., del Carmen Vargas M., Mora J.: Comparative proteomics using 2-D gel electrophoresis and mass spectrometry as tools to dissect stimulators and regulons in bacteria with sequenced or partially sequenced genomes. *Biol. Proced. Online*, 2005; 7: 117–135
- [27] Gharbi S., Gaffner P., Yang A., Zvelebil M.J., Cramer R., Waterfield M.D., Timms J.F.: Evaluation of two-dimensional differential gel electrophoresis for proteomic expression analysis of a model breast cancer cell system. *Mol. Cell. Proteomics*, 2002; 1: 91–98
- [28] Gloerich J., Wevers R.A., Smeitink J.A., van Engelen B.G., van den Heuvel L.P.: Proteomics approaches to study genetic and metabolic disorders. *J. Proteome Res.*, 2007; 6: 506–512
- [29] Grove H., Jørgensen B.M., Jessen F., Søndergaard I., Jacobsen S., Hollung K., Indahl U., Færgestad E.M.: Combination of statistical approaches for analysis of 2-DE data gives complementary results. *J. Proteome Res.*, 2008; 7: 5119–5124
- [30] Guo Y., Fu Z., Van Eyk J.E.: A proteomic primer for the clinician. *Proc. Am. Thorac. Soc.*, 2007; 4: 9–17
- [31] Harper R.G., Workman S.R., Schuetzner S., Timperman A.T., Sutton J.N.: Low molecular-weight human serum proteome using ultrafiltration, isoelectric focusing, and mass spectrometry. *Electrophoresis*, 2004; 25: 1299–1306
- [32] Herman R.M., Wałęga P., Sałowska J., Kenig J.: Koloproktologia – postępy 2006. *Med. Prakt. Chir.*, 2007; 1: 119–124
- [33] Hierosimczyk A., Dejeans N., Sayd T., Ożgo M., Skrzypczak W.F., Mazur A.: Plasma proteome analysis: 2D gels and chips. *J. Physiol. Pharmacol.*, 2006; 57: 81–93
- [34] Hood B.L., Lucas D.A., Kim G., Chan K.C., Blonder J., Issaq H.J., Veenstra T.D., Conrads T.P., Pollet I., Karsan A.: Quantitative analysis of the low molecular weight serum proteome using ¹⁸O stable isotope labeling in a lung tumor xenograft mouse model. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2005; 16: 1221–1230
- [35] Hrycaj P.: Nowe testy serologiczne w diagnostyce reumatologicznej. *Reumatologia*, 2007; 45: 369–373
- [36] Hu S., Loo J. A., Wong D. T.: Human body fluid proteome analysis. *Proteomics*, 2006; 6: 6326–6353
- [37] Hye A., Lynham S., Thambisetty M., Causevic M., Campbell J., Byers H.L., Hooper C., Rijdsdijk F., Tabrizi S.J., Banner S., Shaw C.E., Foy C., Poppe M., Archer N., Hamilton G., Powell J., Brown R.G., Sham P., Ward M., Lovestone S.: Proteome-based plasma biomarkers for Alzheimer's disease. *Brain*, 2006; 129: 3042–3050
- [38] Imperial College London Dr James Ellis <http://www1.imperial.ac.uk/medicine/people/j.ellis/> (13.08.2009)
- [39] Jiang L., Lindpaintner K., Li H.F., Gu N.F., Langen H., He L., Fountoulakis M.: Proteomic analysis of the cerebrospinal fluid of patients with schizophrenia. *Amino Acids*, 2003; 25: 49–57
- [40] Joo W.A., Sul D., Lee D.Y., Lee E., Kim C.W.: Proteomic analysis of plasma proteins of workers exposed to benzene. *Mutat. Res.*, 2004; 558: 35–44
- [41] Kennedy S.: Proteomic profiling from human samples: the body fluid alternative. *Toxicol. Lett.*, 2001; 120: 379–384
- [42] Kim M.R., Kim C.W.: Human blood plasma preparation for two-dimensional gel electrophoresis. *J. Chromatogr. B*, 2007; 849: 203–210
- [43] Kim S.S., Kim M.H., Shin B.K., Na H.J., Choi J.Y., Kee M.K., Chong S.A., Nam M.J.: Different isoforms of apolipoprotein AI present heterologous post-translational expression in HIV infected patients. *J. Proteome Res.*, 2007; 6: 180–184
- [44] Knepper M.A.: Proteomics and the kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2002; 13: 1398–1408

- [45] Kochel I., Strzdała L.: Rola białek wiążących FK506 w regulacji aktywności czynników transkrypcyjnych w komórkach T. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2004, 58: 118–127
- [46] Kowalska A.: Genetyka zespołów otepiennych. Część 1: Podłoże molekularne otepienia czolowo-skroniowego i parkinsonizmu sprzężone z chromosomem 17 (FTDP-17). *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2009; 63: 278–286
- [47] Kowalska A.: Genetyka zespołów otepiennych. Część 2: Biologia choroby Alzheimerera. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2009; 63: 287–295
- [48] Kozera D.: Badania obrazowe mózgu. http://www.neurologiczne.pl/badania_obrazowe_mozgu.htm (04.08.2009)
- [49] Kraj A., Dyląg T., Górecka-Drzazga A., Bargiel S., Dziuban J., Silberring J.: Desorption/ionization on silicon for small molecules: a promising alternative to MALDI TOF. *Acta Biochim. Pol.*, 2003; 50: 783–787
- [50] Lakhan S.E., Kramer A.: Schizophrenia genomics and proteomics: are we any closer to biomarker discovery? *Behav. Brain Funct.*, 2009; 5: 2
- [51] Lantz R.C., Lynch B.J., Boitano S., Poplin G.S., Littau S., Tsapralis G., Burgess J.L.: Pulmonary biomarkers based on alterations in protein expression after exposure to arsenic. *Environ. Health Perspect.*, 2007; 4: 586–591
- [52] Lebrecht G., Czerczak S., Szymczak W.: Benzen. Dokumentacja proponowanych wartości dopuszczalnych poziomów narażenia zawodowego. *Podst. i Met. Oceny Śr. Pr.*, 2003; 35: 5–60
- [53] Liao H., Wu J., Kuhn E., Chin W., Chang B., Jones M.D., O'Neil S., Clauser K.R., Karl J., Hasler F., Roubenoff R.: Use of mass spectrometry to identify protein biomarkers of disease severity in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2004; 50: 3792–3803
- [54] Liu X.Y., Yang J.L., Chen L.J., Zhang Y., Yang M.L., Wu Y.Y., Li F.Q., Tang M.H., Liang S.F., Wei Y.Q.: Comparative proteomics and correlated signaling network of rat hippocampus in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Proteomics*, 2008; 8: 582–603
- [55] Luque-Garcia J.L., Neubert T.A.: Sample preparation for serum/plasma profiling and biomarker identification by mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 2007; 1153: 259–276
- [56] Marengo E., Robotti E., Antonucci F., Cecconi D., Campostrini N., Righetti P.G.: Numerical approaches for quantitative analysis of two-dimensional maps: a review of commercial software and home-made systems. *Proteomics*, 2005; 5: 654–666
- [57] Marouga R., David S., Hawkins E.: The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005; 382: 669–678
- [58] Martins-de-Souza D., Gattaz W.F., Schmitt A., Rewerts C., Maccarrone G., Dias-Neto E., Turck C.W.: Prefrontal cortex shotgun proteome analysis reveals altered calcium homeostasis and immune system imbalance in schizophrenia. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.*, 2009; 259: 151–163
- [59] Martins-de-Souza D., Maccarrone G., Reckow S., Falkai P., Schmitt A., Turck C.W.: Shotgun mass spectrometry analysis of the human thalamus proteome. *J. Sep. Sci.*, 2009; 32: 1231–1236
- [60] Matsuo K., Xiang Y., Nakamura H., Masuko K., Yudoh K., Noyori K., Nishioka K., Saito T., Kato T.: Identification of novel citrullinated autoantigens of synovium in rheumatoid arthritis using a proteomic approach. *Arthritis Res. Ther.*, 2006; 8: 175–187
- [61] Millions R., Puricelli L., Iori E., Tessari P.: Rapid, simple and effective technical procedure for the regeneration of IgG and HSA affinity columns for proteomic analysis. *Amino Acids*, 2008; 34: 507–509
- [62] Nagalla S.R., Canick J.A., Jacob T., Schneider K.A., Reddy A.P., Thomas A., Dasari S., Lu X., Lapidus J.A., Lambert-Messerlian G.M., Gravett M.G., Roberts C.T., Luthy D., Malone F.D., D'Alton M.E.: Proteomic analysis of maternal serum in Down syndrome: identification of novel protein biomarkers. *J. Proteome Res.*, 2007; 6: 1245–1257
- [63] Nam M. J., Kee M. K., Kuick R., Hanash S. M.: Identification of defensin $\alpha 6$ as a potential biomarker in colon adenocarcinoma. *J. Biol. Chem.*, 2005; 9: 8260–8265
- [64] Nesatyy V.J., Ross N.W.: Recovery of intact proteins from silver stained gels. *Analyst*, 2002; 127: 1180–1187
- [65] Nicholson J.K., Wilson I.D.: Understanding 'global' systems biology: metabolomics and the continuum of metabolism. *Nat. Rev. Drug Disc.*, 2003; 2: 668–676
- [66] Noben J.P., Dumont D., Kwaskowska N., Verhaert P., Somers V., Hupperts R., Stinissen P., Robben J.: Lumbar cerebrospinal fluid proteome in multiple sclerosis: characterization by ultrafiltration, liquid chromatography, and mass spectrometry. *J. Proteome Res.*, 2006; 5: 1647–1657
- [67] Nowak-Markwitz E., Spaczyński M.: Postępy w diagnostyce raka jajnika. *Przegl. Menop.*, 2006; 10: 12–16
- [68] Okano T., Kondo T., Kakisaka T., Fujii K., Yamada M., Kato H., Nishimura T., Gemma A., Kudoh S., Hirohashi S.: Plasma proteomics of lung cancer by a linkage of multi dimensional liquid chromatography and two-dimensional difference gel electrophoresis. *Proteomics*, 2006; 6: 3938–3948
- [69] Orvisky E., Drake S.K., Martin B.M., Abdel-Hamid M., Resson H., Varghese R.S., An Y., Saha D., Hortin G.L., Loffredo C.A., Goldman R.: Enrichment of low molecular weight fraction of serum for mass spectrometric analysis of peptides associated with hepatocellular carcinoma. *Proteomics*, 2006; 6: 2895–2902
- [70] Ożóg M., Skrzypczak W.F., Herosimczyk A., Mazur A.: Proteomika a fizjologia i patofizjologia nerek. *Med. Wet.*, 2007; 63: 1146–1150
- [71] Pan S., Shi M., Jin J., Albin R.L., Lieberman A., Gearing M., Lin B., Pan C., Yan X., Kashima D.T., Zhang J.: Proteomics identification of proteins in human cortex using multidimensional separations and MALDI tandem mass spectrometer. *Mol. Cell. Proteomics*, 2007; 6: 1818–1823
- [72] Patterson S.D.: Mass spectrometry and proteomics. *Physiol. Genomics*, 2000; 2: 59–65
- [73] Pepys M.B., Hirschfield G.M.: C-reactive protein: a critical update. *J. Clin. Invest.*, 2003; 111: 1805–1812
- [74] Pietrzyk J.J.: Zespół Downa. *MP. Peditria*. <http://www.mp.pl/artykuly/?aid=11444> (07.03.2009)
- [75] Prabakaran S., Swatton J.E., Ryan M.M., Huffaker S.J., Huang J.T., Griffin J.L., Wayland M., Freeman T., Dudbridge F., Lilley K.S., Karp N.A., Hester S., Tkachev D., Mimmack M.L., Yolken R.H., Webster M.J., Torrey E.F., Bahn S.: Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: evidence for compromised brain metabolism and oxidative stress. *Mol. Psychiatry*, 2004; 9: 684–697
- [76] Prabakaran S., Wengenroth M., Lockstone H.E., Lilley K., Leweke F.M., Bahn S.: 2-D DIGE analysis of liver and red blood cells provides further evidence for oxidative stress in schizophrenia. *J. Proteome Res.*, 2007; 6: 141–149
- [77] Przybyszewski W.M., Rzeszowska-Wolny J.: Stres oksydacyjny w procesach przerostu i kancerogenezy gruczołu sterczowego. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2009; 63: 340–350
- [78] Raman B., Cheung A., Marten M.R.: Quantitative comparison and evaluation of two commercially available, two-dimensional electrophoresis image analysis software packages, Z3 and Melanie. *Electrophoresis*, 2002; 23: 2194–2202
- [79] Raveendran M., Senthil D., Utama B., Shen Y., Wang J., Zhang Y., Wang X.L.: Effect of water-soluble fraction of cigarette smoke on human aortic endothelial cells – a proteomic approach. *Cell. Biol. Toxicol.*, 2005; 21: 27–40
- [80] Reed T.T., Pierce W.M., Markesbery W.R., Butterfield D.A.: Proteomic identification of HNE-bound proteins in early Alzheimer disease: Insights into role of lipid peroxidation in the progression of AD. *Brain Res.*, 2009; 1274: 66–76
- [81] Roncada P., Bortolato M., Frau R., Saba P., Flore G., Soggiu A., Pisanu S., Amoresano A., Carpentieri A., Devoto P.: Gating deficits in isolation-reared rats are correlated with alterations in protein expression in nucleus accumbens. *J. Neurochem.*, 2009; 108: 611–620
- [82] Rose S.E., de Zubicaray G.I., Wang D., Galloway G.J., Chalk J.B., Eagle S.C., Semple J., Doddrell D.M.: A 1H MRS study of probable Alzheimer's disease and normal aging: implications for longitudinal monitoring of dementia progression. *Magn. Reson. Imaging*, 1999; 17: 291–299
- [83] Ryckman C., Vandal P., Rouleau M., Talbot M., Tessier P.A.: Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9 and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J. Immunol.*, 2003; 170: 3233–3242
- [84] Schwarz E., Bahn S.: Biomarker discovery in psychiatric disorders. *Electrophoresis*, 2008; 29: 2884–2890
- [85] Shaw M.M., Riederer B.M.: Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics*, 2003; 3: 1408–1417
- [86] Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M.: Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.*, 1996; 68: 850–859
- [87] Sigma-Aldrich. <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/proteomics/protein-sample-preparation/protein-depletion-products/seppro-depletion-resins/seppro-igy14-system.html> (18.04.2009)
- [88] Ślawek J.: Otepienie w zespołach pozapiramidowych. *Pol. Przegl. Neurol.*, 2008; 4: 129–139



- [89] Small Area Health Statistics Unit within the Department of Epidemiology and Public Health at Imperial College London. <http://www.sahsu.org/index.php> (13.08.2009)
- [90] Smith M.A., Bains S.K., Betts J.C., Choy E.H., Zanders E.D.: Use of two-dimensional electrophoresis to measure changes in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis treated with antibody to CD4. *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, 2001; 8: 105–111
- [91] Sowell R., Owen J.B., Butterfield D.A.: Proteomics in animal models of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Ageing Res. Rev.*, 2009; 8: 1–17
- [92] Steel L.F., ShumPERT D., Trotter M., Seeholzer S.H., Evans A.A., London W.T., Dwek R., Block T.M.: A strategy for the comparative analysis of serum proteomes for the discovery of biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Proteomics*, 2003; 3: 601–609
- [93] Steinberg T.H., Jones L.J., Haugland R.P., Singer V.L.: SYPRO Orange and SYPRO Red Protein Gel Stains: One-step fluorescent staining of denaturing gels for detection of nanogram levels of protein. *Anal. Biochem.*, 1996; 239: 223–237
- [94] Sultana R., Perluigi M., Butterfield D.A.: Oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease (AD), mild cognitive impairment and animal models of AD: role of A β in pathogenesis. *Acta Neuropathol.*, 2009; 118: 131–150
- [95] Szymańska-Chabowska A., Antonowicz-Juchniewicz J., Andrzejak R.: Analiza stężeń wybranych markerów neoplazmatycznych u osób zawodowo narażonych na arsen i metale ciężkie. *Med. Pr.*, 2004; 55: 313–320
- [96] Tarkowski B., Girstun A.: Zastosowanie spektrometrii mas w poszukiwaniach biomarkerów chorób nowotworowych. *Kosmos*, 2005; 54: 331–343
- [97] Thambisetty M., Hye A., Foy C., Daly E., Glover A., Cooper A., Simmons A., Murphy D., Lovestone S.: Proteome-based identification of plasma proteins associated with hippocampal metabolism in early Alzheimer's disease. *J. Neurol.*, 2008; 255: 1712–1720
- [98] Tian M., Cui Y.Z., Song G.H., Zong M.J., Zhou X.Y., Chen Y., Han J.X.: Proteomic analysis identifies MMP-9, DJ-1 and A1BG as overexpressed proteins in pancreatic juice pancreatic ductal adenocarcinoma patients. *BMC Cancer*, 2008; 8: 241–252
- [99] Tilleman K., Deforce D., Elewaut D.: Rheumatology: a close encounter with proteomics. *Rheumatology*, 2005; 44: 1217–1226
- [100] Tirumalai R.S., Chan K.C., Prieto D.A., Issaq H., Conrads T.P., Veenstra T.D.: Characterization of the low molecular weight human serum proteome. *Mol. Cell. Proteomics*, 2003; 2: 1096–1103
- [101] Tomaszewska K., Nalewaj J., Markowska J.: Proteomika – nowa metoda oznaczania markerów nowotworowych. *Rak jajnika. Onkol. Pol.*, 2005; 8: 79–81
- [102] Tsangaris G. T., Karamessinis P., Kolialexi A., Garbis S.D., Antsaklis A., Mavrou A., Fountoulakis M.: Proteomic analysis of amniotic fluid in pregnancies with Down syndrome. *Proteomics*, 2006; 6: 4410–4419
- [103] Van Belle W., Anensen N., Haaland I., Bruslerud Ø., Høgda K.A., Gjertsen B.T.: Correlation analysis of two-dimensional gel electrophoretic protein patterns and biological variables. *BMC Bioinformatics*, 2006; 7: 198
- [104] Vascotto C., Salzano A.M., D'Ambrosio C., Fruscalzo A., Marchesoni D., di Loreto C., Scaloni A., Tell G., Quadrioglio F.: Oxidized transthyretin in amniotic fluid as an early marker of preeclampsia. *J. Proteome Res.*, 2007; 6: 160–170
- [105] Veenstra T.D., Conrads T.P., Hood B.L., Avellino A.M., Ellenbogen R.G., Morrison R.S.: Biomarkers: mining the biofluid proteome. *Mol. Cell. Proteomics*, 2005; 4: 409–418
- [106] Verrills N.M.: Clinical proteomics: present and future prospects. *Clin. Biochem. Rev.*, 2006; 27: 99–116
- [107] Vilasi A., Cutillas P.R., Maher A.D., Zirah S.F., Capasso G., Norden A.W., Holmes E., Nicholson J.K., Unwin R.J.: Combined proteomic and metabolomic studies in three genetic forms of the renal Fanconi syndrome. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 2007; 293: F456–F467
- [108] Waksmański B., Olejek A.: Proteomika w prognozowaniu wystąpienia raka jajnika: rzeczywistość i nadzieje. *Przegl. Menop.*, 2006; 10: 352–357
- [109] Walecki J., Pawłowska-Detko A., Adamczyk M.: Rola współczesnych metod obrazowania w rozpoznaniu i monitorowaniu otyłości. *Pol. Przegl. Neurol.*, 2007; 3: 69–89
- [110] Wan C., La Y., Zhu H., Yang Y., Jiang L., Chen Y., Feng G., Li H., Sang H., Hao X., Zhang G., He L.: Abnormal changes of plasma acute phase proteins in schizophrenia and the relation between schizophrenia and haptoglobin (Hp) gene. *Amino Acids*, 2007; 32: 101–108
- [111] Wilkins M.R.: Biomarker identification: the role of experimental design, statistics, and data sharing. W: *Clinical Proteomics. From Diagnosis to Therapy*, red.: J.E. Van Eyk, M.J. Dunn. Wiley-VCH, Weinheim 2008, 113–120
- [112] Yamagami H., Sarkar G., Charlesworth M.C., McCormick D.J., Bolander M.E.: Two-dimensional gel electrophoresis of synovial fluid: method for detecting candidate protein markers for osteoarthritis. *J. Orthop. Sci.*, 2003; 8: 482–490
- [113] Ye B., Skates S., Mok S.C., Horick N.K., Rosenberg F.H., Vitonis A., Edwards D., Sluss P., Han W.K., Berkowitz R.S., Cramer D.W.: Proteomic-based discovery and characterization of glycosylated eosinophil-derived neurotoxin and COOH-terminal osteopontin fragments for ovarian cancer in urine. *Clin. Cancer Res.*, 2006; 12: 432–441
- [114] Zellner M., Veitinger M., Umlauf E.: The role of proteomics in dementia and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.*, 2009; 118: 181–195
- [115] Zheng X., Baker H., Hancock W.S.: Analysis of the low molecular weight serum peptidome using ultrafiltration and a hybrid ion trap-Fourier transform mass spectrometer. *J. Chromatogr. A*, 2006; 1120: 173–184
- [116] Zhou M., Lucas D.A., Chan K.C., Issaq H.J., Petricoin E.F., Liotta L.A., Veenstra T.D., Conrads T.P.: An investigation into the human serum "interactome". *Electrophoresis*, 2004; 25: 1289–1298
- [117] Ziętek M., Grzebieluch W., Kobierska-Brzoza J., Malicka B., Składnik-Jankowska J.: Wybrane parametry śliny u dzieci i młodzieży z zespołem Downa – doniesienia wstępne. *Dent. Med. Probl.*, 2008; 45: 165–168
- [118] Zimmermann-Górska I.: *Choroby reumatyczne*. Wyd. PZWL, Warszawa 2004

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.