



УДК 577.218

**ПРОТЕОМИКА И ПЕПТИДОМИКА В ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ  
И ПРИКЛАДНЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ**

© 2011 г. В. М. Говорун\*, \*\*\*, В. Т. Иванов\*\*

\* Научно-исследовательский институт физико-химической медицины  
Федерального медико-биологического агентства РФ, Россия, Москва;\*\* Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина  
и Ю. А. Овчинникова РАН, 117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 03.09.2010 г. Принята к печати 03.09.2010 г.

Обзор посвящен актуальным вопросам биомедицинской протеомики и пептидомики. Уделено большое внимание современным протеомным технологиям, используемым в медицинских исследованиях — методам экстракции, детекции и анализа получаемых данных. Подробно обсуждены способы применения хроматографических, масс-спектрометрических и хроматомасс-спектрометрических методов в протеомных и биомедицинских исследованиях и при поисках биомаркеров.

*Ключевые слова:* протеомика, пептидомика, биомедицинские исследования.

**ВВЕДЕНИЕ**

Среди постгеномных наук протеомика занимает особое место, поскольку эта дисциплина в основном имеет дело с инвентаризацией и идентификацией участников конечной стадии передачи информации в клетке — белками и пептидами. Несмотря на последние достижения в идентификации белков и пептидов *de novo*, основой протеогеномной инвентаризации являются аннотированные геномы и продукты трипсинолиза белков, полученные *in vitro* [1, 2]. За пятнадцать лет существования термина “протеомика” достигнут значительный прогресс как в самих технологиях идентификации белков, их количественного определения, методов стандартизации протеомных исследований, так и в геномных технологиях, которые, без сомнения, служат основой для развития протеомики и пептидомики [2]. Протеомные технологии используются повсеместно: в сельскохозяйственной и промышленной биотехнологии, клеточной инженерии, криминалистике, микробиологии, палеонтологии и других областях естествознания, поэтому осветить в одной обзорной статье все направления исследования, методы и результаты не представляется возможным.

Мы сконцентрировали свое внимание на основном направлении протеомики, имеющем как фундаментальное, так и прикладное значение — биомедицине, так как в последнее время биомедицинские исследования устойчиво вышли на первое место по

числу публикаций и объемам финансирования в развитых странах мира. В каком-то смысле протеомика человека, поиск новых белковых и пептидных маркеров различных патологий представляет неотъемлемую часть более общего процесса изучения патогенеза распространенных заболеваний и разработки эффективных методов коррекции пограничных патологических состояний [3]. Не удивительно, что с развитием протеомных технологий и так называемых методов “трансляционной медицины” связывают быстрый переход от медицины вообще к персонализации и профилактике для каждого конкретного индивидуума [4]. В обзоре мы постарались уделить особое внимание ключевым вопросам, которые определяют успех проведения любого биомедицинского исследования, и разобрать современные технологические приемы, используемые в протеомных экспериментах. Кроме этого, в разделе, посвященном примерам использования технологий, мы рассмотрели тенденции объединения протеомных данных с метаболическими и геномными исследованиями для обеспечения надежной диагностики заболевания на ранних стадиях и выявления новых комбинаций биомаркеров, способных обеспечить раннюю диагностику в онкологии и других областях медицины.

**СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ  
БИОМЕДИЦИНСКОЙ ПРОТЕОМИКИ  
И ПЕПТИДОМИКИ**

Пептидомика в ее современном виде, безусловно, является частью протеомики. Поскольку эта дисциплина имеет аналогичную или идентичную методическую базу, ее можно рассматривать как

Сокращения: MALDI-TOF/TOF — времяпролетная матрикс-ассоциированная лазерная десорбция/ионизация; ESI — ионизация распылением в электрическом поле.

# Автор для связи (тел.: (499) 246-77-21; эл. почта: govorun@hotmail.ru).



**Рис. 1.** Экспериментальная линейка методов и технологий в протеомике и пептидомике. LC – жидкостная хроматография; ESI-MS/MS – электроспрейная ионизация с тандемной масс-спектрометрией; MALDI-TOF/TOF – матрично-ассоциированная времяпролетная лазерная десорбция/ионизация; LC-MALDI – жидкостная хроматография с последующей матрично-ассоциированной лазерной десорбцией/ионизацией; SELDI – поверхностно-активированная лазерная десорбция/ионизация; SEQUEST – программа анализа данных тандемной масс-спектрометрии; Mascot – программа обработки данных времяпролетной масс-спектрометрии; PCA – компонентный анализ; PLS-DA – статистический метод – дискриминационный анализ наименьших квадратов.

раздел протеомики, анализирующий белки малой массы (<10 кДа), а также весь набор продуктов их протеолитической деградации *in vivo* и *in vitro* [5]. Как и белки, пептиды часто имеют достаточно специфичные функции, являясь гормонами, нейромедиаторами, цитокинами или факторами роста [6]. Некоторые пептиды, являясь продуктами ферментативной деградации белков в организме, часто служат индикаторами нормальных или патологических процессов, что может быть использовано при выявлении новых маркеров ранних стадий заболевания или медиаторов патологического процесса. В каком-то смысле, современные технологии пептидомики и протеомики направлены на разработку этих новых “полей” с целью нахождения отдельных индикаторных пептидов или белков и их идентификации, а также поиску алгоритмов для выявления и последующего использования эффективных комбинаций различных маркеров белково-пептидной природы для диагностики. В основном пептиды могут возникать следующими способами: деградацией белков протеолитическими ферментами внутри- и внеклеточной локализации, а также расщеплением препробелков и непосредственным синтезом.

Биоактивные пептиды играют ключевую роль как медиаторы трансдукции сигнала в респираторной, сердечно-сосудистой, эндокринной, нервной и иммунной системах. Идентификация новых биологически активных пептидов происходит постоянно по мере совершенствования методов их анализа. Фрагменты деградации белков, в том числе “специ-

фических”, попадают в различные биологические жидкости организма человека (кровь, моча, ликвор, лимфа) и являются объектом пристального изучения современной пептидной химии [7].

Анализ белков и пептидов (top/down-proteomics) условно можно разделить на несколько стадий (рис. 1), каждая из которых имеет ряд существенных ограничений и поэтому часто вызывает трудности при интерпретации результатов.

Технологии включают несколько этапов и состоят из сбора материала (часто существенным является источник получения, длительность и условия хранения и многие другие факторы, оговариваемые заранее), пробоподготовки, разделения сложных многокомпонентных смесей, детекции пептидов, их идентификации (структуры пептидов), количественного анализа [8].

Основные методические отличия протеомики от пептидомики сводятся к тому, что белки перед анализом подвергаются протеолитической деградации эндопептидазами, из которых наиболее часто используется трипсин [1]. Также применяют химотрипсин и стафилококковую протеиназу, однако они обладают более низкой активностью. В некоторых специальных случаях протеомного анализа применяют бромциановую фрагментацию по остаткам метионина или ее комбинацию с протеолизом. Все дальнейшие стадии происходят аналогично в протеомике и пептидомике, хотя следует признать, что в случае анализа пептидов эндогенного происхождения возможно получение структуры без предварительной обработки образцов эндопептидазами, –

фрагментацией и точным определением массы материнского иона и продуктов фрагментации в высокоточных масс-детекторах. Точность определения масс и совершенствование методов фрагментации пептидов позволяет в значительном количестве экспериментов получать достоверные сведения о структуре анализируемых пептидов *de novo*.

При анализе смеси пептидов и белков первый и наиболее важный этап заключается в отделении пептидов от высокомолекулярных соединений, с которыми они находятся во взаимодействии. Обязательным для проведения медицинских исследований является стандартизация методов экстракции, поскольку решение этой проблемы обуславливает получение воспроизводимых результатов. Опубликовано ряд экспериментальных статей и обзоров, посвященных методам отделения пептидов от высокомолекулярных белков, разработке и использованию методов десорбции пептидов с высокопредставленных белков плазмы и сыворотки крови человека и лабораторных животных, однако следует отметить, что, несмотря на разнообразие подходов, на практике, как правило, используются комплементарные технологии, позволяющие добиться идентификации и количественной оценки возможно большего пула пептидов в биологических жидкостях и тканях [9]. Рассмотрим вкратце основные методические приемы, используемые для реализации первого этапа.

#### *Твердофазная экстракция*

Твердофазная экстракция используется достаточно давно для пробоподготовки, заключающейся в дополнительной очистке пептидов перед проведением хроматомасс-спектрометрического анализа. Следует отметить, что в настоящее время в медицинских и биомедицинских исследованиях наиболее часто используются магнитные микрочастицы с функционализированной поверхностью, поскольку они позволяют масштабировать процесс пробоподготовки, увеличивают его производительность, а использование современной робототехники делает процесс пробоподготовки стандартизированным [10]. Использование магнитных частиц с хроматографической фазой и проведение так называемой batch-хроматографии делает такой способ пробоподготовки совместимым с целым рядом хроматомасс-спектрометрических устройств в режиме *on-line* и *offline*.

Характеризуя типы активных поверхностей, следует отметить, что в настоящее время широко используются обращенные фазы  $C_2$ ,  $C_4$ ,  $C_8$ ,  $C_{18}$  и хроматографические фазы, позволяющие проводить металлоаффинную, анионо- и катионообменную хроматографию, а также частицы, позволяющие иммобилизовать на своей поверхности выbranные лиганды [11]. Как правило, такие частицы

покрыты функционализированными силанами, позволяющими проводить иммобилизацию лигандов через взаимодействие с амино- или карбоксигруппами [12].

Кроме магнитных частиц, остаются популярными хроматографические полоски, работающие по тому же принципу, что и частицы. Впервые такой подход в протеомике реализовала американская компания Cyphergene в 2001 г. [13]. В последнее время для обогащения пептидных смесей и проведения фракционирования стали применяться наноматериалы. Ли с соавт. [14] описали анализ пептидома с использованием модифицированных углеродных нанотрубок в качестве альтернативного адсорбента для эндогенных пептидов плазмы крови человека. Сравнительные исследования показали, что модифицированные углеродные нанотрубки эффективнее связывают пептиды (сравнение проводилось с частицами силикагеля, покрытыми  $C_{18}$ - и  $C_8$ -углеводородами). В итоге, с использованием двумерной хроматомасс-спектрометрии было идентифицировано 374 уникальных пептида.

Кроме этого для отделения пептидной фракции широко используются так называемые мезопористые материалы, имеющие предел исключения 10–12 кДа. Такие материалы эффективно сорбируют на внутренних разветвленных поверхностях пептиды, не вступая во взаимодействие с белками, поскольку последние не способны проникать внутрь пор и соответственно исключаются из анализа в процессе отмывки. Размер пор составляет 2–12 нм, что позволяет, варьируя состав частиц, получать различные фракции пептидов [15].

Одним из перспективных направлений экстракции пептидов и белков из сложных многокомпонентных смесей является разработка материалов, которые позволяют идентифицировать белки на биосенсорах, содержащих так называемый белковый или пептидный отпечаток. Так, в работе Каи с соавт. рассмотрен пример, когда на поверхность нанотрубок был нанесен слой полифенола, в котором были сделаны отпечатки определяемых белков [16]. В дальнейшем исследователям удалось продемонстрировать, что такие биосенсоры селективно узнают определяемые белки (ферритин), причем специфичность, продемонстрированная в этом исследовании, позволяла авторам дискриминировать видовую принадлежность белка, например, отличить бычий ферритин от лошадиного. Авторы метода утверждают, что такая технология при дальнейшем совершенствовании позволит дискриминировать не только незначительные аминокислотные вариации, но и конформационные отличия. Описанный подход можно рассматривать как дальнейшее совершенствование твердофазной экстракции полипептидов, совмещенной с одновременной детекцией единичных молекул. В случае успешного развития данной технологии протеом-



Рис. 2. Сравнение концентраций основных групп белков человека.

ные исследования смогут оперировать данными о присутствии в смесях единичных молекул, и проблема динамического диапазона, возможно, будет снята.

Завершая этот раздел, следует упомянуть специальные технологии, которые позволяют разделять сложные пептидные смеси с использованием хроматографических сорбентов, обеспечивающих ограниченный доступ аналитов (*restricted-access materials*, RAM). Они представляют собой биосовместимые материалы многоразового использования без потери хроматографических свойств при повторении циклов фракционирования. Свойства этих материалов таковы, что в процессе фракционирования происходит разделение пептидов по размерам. Пептиды массой более 1500 Да выходят в свободном объеме, а пептиды меньшей массы разделяются по размерам и одновременно фракционируются по их адсорбционным свойствам на  $C_{18}$ -коллонке. Такие многофункциональные хроматографические системы используются для *online*-разделения и последующего масс-спектрометрического анализа низкомолекулярных (<1500 Да) пептидов, а также для проведения процедуры удаления наиболее высокопредставленных белков плазмы крови [13].

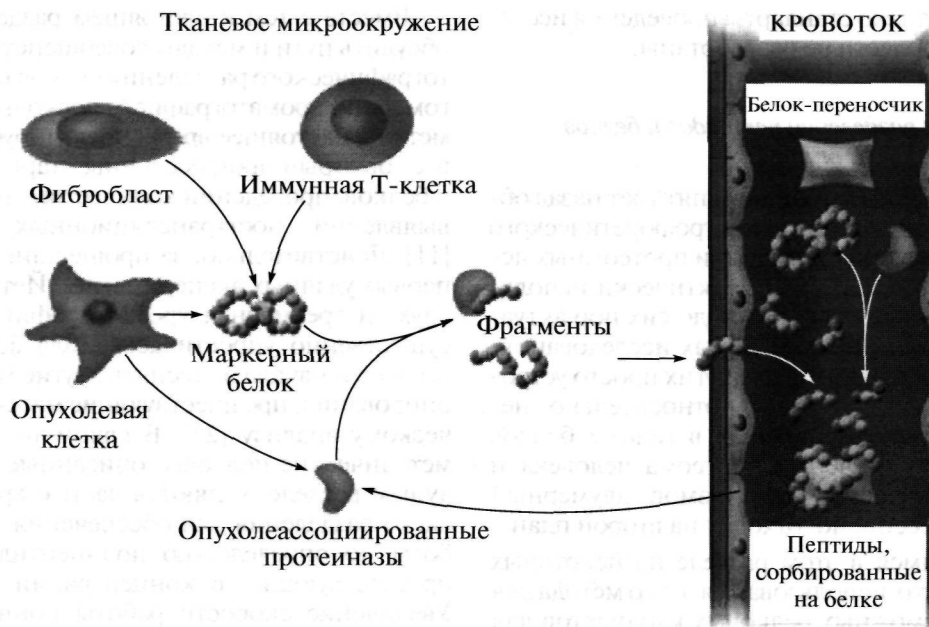
#### Осаждение органическими растворителями

Высаливание органическими растворителями основной фракции белков из биологических жидкостей организма человека, пожалуй, имеет наибольшую историю среди всех описанных в этом раз-

деле методов. Несмотря на длительность использования, эта процедура остается в ряду наиболее эффективных методов, поскольку позволяет быстро, воспроизводимо и дешево получать фракции пептидов для дальнейшего анализа. Альперт с соавт. одними из первых сообщили об использовании органических растворителей для осаждения высокомолекулярных белков. Белки, имеющие массу >20 кДа, осаждались с эффективностью более 90% в пересчете на 6 наиболее представленных полипептидов сыворотки крови [17]. В дальнейшем были опубликованы модификации данного метода, включающие термическую обработку, использование различного pH, ион-парных реагентов и т.д. [18]. В настоящее время осаждение наиболее представленных белков с высокой молекулярной массой для последующего анализа пептидов можно рассматривать как предварительную обработку биологических жидкостей перед фракционированием другими описанными методами.

#### Истощение

Основная проблема, которая встает перед исследователями биологических жидкостей человека и животных, заключается в широком диапазоне концентраций белков и пептидов в этих образцах. Так, концентрация альбумина обычно составляет 30–50 мг/мл сыворотки, а биологически активных соединений таких, например, как интерлейкин 0–1.5 пг/мл (рис. 2). Альбумин и иммуноглобулины составляют 90% всего белка в плазме крови и наиболее часто удаляются аффинной хроматографией с



**Рис. 3.** Возможные пути образования биомаркеров онкологических заболеваний. Маркерные белки способны синтезировать и фибробласты, и клетки иммунной системы, и клетки самой опухоли. Фрагменты этих белков, образовавшиеся под воздействием специфических опухолевых протеиназ, попадают в кровоток, где находятся не только в несвязанном состоянии, но и сорбируются на многочисленные белки-переносчики.

использованием иммобилизованного белка А, обладающего высокой аффинностью по отношению к иммуноглобулинам, и моноклональных антител к альбумину, также иммобилизованных на сорбенте. Кроме этого, как правило, удаляют еще несколько наиболее представленных белков плазмы, для которых разработаны специализированные сорбенты. В связи с популярностью истощения плазмы/сыворотки крови различными способами необходимо упомянуть, что эта процедура имеет ряд недостатков. Известно, что альбумин и другие мажорные белки плазмы крови сорбируют на своей поверхности определенное количество других белков и пептидов. Относительно длительное время жизни альбумина (19 сут) по сравнению с несколькими часами для некоторых пептидов делает их ассоциацию с альбумином физиологически обоснованным процессом, защищающим их от почечного клиренса. Следовательно, истощение плазмы или сыворотки по альбумину и другим высокопредставленным белкам приводит к потере и тех белков и пептидов, которые сорбируются на них. Вместе с тем эти белки и пептиды могут нести достаточно интересную информацию о патологических процессах, поскольку их сорбция на высокопредставленных белках может происходить в патологическом очаге или непосредственно в кровотоке (рис. 3) [19].

Зоу с соавт. провели селективное выделение альбумина, иммуноглобулинов G, трансферрина и аполипопротеина А1. В дальнейшем с использованием микрокапиллярной хроматографии и масс-

спектрометрии ими было продемонстрировано наличие в полученных белковых фракциях 210 белков и пептидов, многие из которых были уникальны [20]. Аналогичное исследование выполнил Гандри с соавт. Этот коллектив исследовал пептиды и белки, ассоциированные с альбумином в сыворотке крови человека. Была показана ассоциация 35 белков с альбумином, причем эти результаты воспроизводились с разными образцами сыворотки [21].

В настоящее время проблему динамического диапазона измерений удастся решить с использованием высокоспецифичных антител к анализам (белкам, пептидам, низкомолекулярным лигандам) и твердофазного иммуноферментного анализа на их основе. Однако для современных методов фракционирования и последующей масс-спектрометрической идентификации и количественного определения динамический диапазон в 9–12 порядков пока непреодолим. Хотя в последнее время продемонстрирована принципиальная возможность измерений в таком диапазоне [22].

Таким образом, при истощении биологических образцов в отношении наиболее представленных белков необходимо иметь в виду, что часть ценной информации о белковом составе может быть потеряна в связи с потерей адсорбированных на высокопредставленных белках других белков и пептидов. Необходимо использовать комплементарные методы десорбции. Особый интерес представляют собой белки и пептиды, сорбированные на поверхности

клеток крови. Однако стандарты проведения исследований в этой области не разработаны.

*Технологии разделения пептидов и белков  
“2D or not 2D”*

Обычно под таким заголовком пять лет назад обсуждалась роль двумерного электрофоретического разделения белков при проведении протеомных исследований. Метод, который практически используется уже на протяжении 40 лет, до сих пор актуален при проведении скрининговых исследований, анализа бактерий и некоторых других просто устроенных организмов, имеющих относительно небольшое число закодированных в геноме белков [23]. Однако при изучении протеома человека и других эукариотических организмов двумерный электрофорез, бесспорно, отходит на второй план.

Мы остановимся в этом разделе на некоторых недавних примерах использования этого метода для определения возможных белковых кандидатов для многопараметрической диагностики так называемых “суррогатных” маркеров заболеваний человека. За последние несколько лет были опубликованы работы, где авторы, проводя истощение плазмы и сыворотки крови иммуноаффинной хроматографией, в дальнейшем осуществляли разделение оставшихся компонентов 2D-электрофорезом и анализировали характерные изменения профилей стандартными программными пакетами (PD Quest, Melanie) [24]. Оригинальность этой идеи состоит в том, что картину двумерного электрофореза белков, если эксперимент стандартизован и воспроизводим, можно рассматривать как своеобразный биочип, так как все белки на фореграмме, в отличие от традиционного метода разделения, распределены по их физико-химическим свойствам: изоэлектрической точке и молекулярной массе. Изменения в интенсивности белковых пятен на геле или подвижности определенных белков при разделении можно принимать как отличительные признаки, в дальнейшем используемые для диагностики. Этот подход был продемонстрирован для выявления маркеров аденокарциномы яичника и некоторых других патологических процессов.

К сожалению, вследствие того, что анализируемые образцы представляют собой многокомпонентные белково-пептидные смеси, использование привычных методов 2D-электрофоретического разделения не дает желаемых результатов. Большой динамический диапазон концентраций, широкий ассортимент физико-химических свойств делает необходимым использование многостадийных технологий разделения с преимущественным использованием 2D-хроматографии, специализированных хроматографических чипов и всевозможных их комбинаций с технологическими приемами, описанными выше (твердофазная экстракция, осаждение, истощение и т.д.).

Вместе с тем в настоящем разделе необходимо обсудить пути и методы совершенствования хроматографического разделения белков и пептидов многомерной хроматографией, поскольку именно этот метод в настоящее время превалирует и обуславливает быстрый прогресс в инвентаризации пептидов и белков, проведении количественных измерений и выявлении посттрансляционных модификаций [11]. Действительно, за прошедшие пять лет после первых удачных экспериментов Йетса и его группы двух- и трехмерная хроматография полипептидов существенно упростилась, стала более доступной по цене и начала вытеснять другие методы фракционирования, предшествующие масс-спектрометрическому анализу [25]. В каком-то смысле многие методические подходы, описанные нами в предыдущем разделе, являются частью хроматографического разделения для обеспечения устойчивой работы по определению полипептидных аналитов, присутствующих в концентрации 1–0.01 фмоль. Увеличение скорости работы ионных ловушек и квадруполь в масс-спектрометрии позволяет в настоящее время анализировать до десяти материнских ионов за доли секунды (50–300 мс), проводя их фрагментацию и последующий анализ полученных продуктов.

Такое совершенствование сопряженной технологии хроматомасс-спектрометрии обуславливает быстрый рост баз данных идентифицированных пептидов и белков человека. В настоящее время проверка надежности инвентаризации производится согласно опубликованному протоколу, подразумевающему использование масс-спектрометрических детекторов с определенной точностью и разрешением, а также идентификацию белков с использованием не менее двух пептидов для фрагментации [25].

*Многомерная хроматография белков и пептидов*

Впервые такой подход был предложен Йетсом с соавт., назвавшими его “многомерная технология идентификации белков (multidimensional protein identification technology MudPIT)” [26]. В предложенной технологии слабая катионообменная смола и обращенная фаза были помещены в одну колонку и фракционирование вначале проводили на слабом катионообменном носителе, а затем фракции пептидов, полученные ступенчатым изменением градиента соли, были разделены на обращенной фазе и проанализированы масс-спектрометрически в режиме on-line. Преимущества такой системы заключаются прежде всего в том, что смена растворителей между колонками осуществляется системой клапанов, управляемых программным модулем, не требующим дополнительных ручных манипуляций. С момента описания такой принцип претерпел множество различных модификаций, но до сих пор является, наверное, самым используемым хромато-

графическим приемом в пептидомных и протеомных исследованиях. В частности, вместо слабого катионообменного носителя в ряде случаев используют две обращенно-фазовые колонки, меняя рН элюента на каждом этапе разделения, изменяют первую ступень фракционирования, вводя вместо слабого катионообменного сорбента иные хроматографические носители, выводя первую фазу хроматографии из автоматизированного цикла, дополняя *offline* другими способами предварительного фракционирования, такими, например, как электрофорез или изоэлектрофокусирование [11].

Схема хроматографического разделения, безусловно, зависит от конкретной задачи экспериментатора. Однако необходимо учитывать тот факт, что увеличивая количество стадий предварительного хроматографического разделения многокомпонентных белково-пептидных фракций, экспериментатор рискует существенно ухудшить воспроизводимость результатов, получаемых при масс-спектрометрическом анализе. Вследствие этого достаточно активно развивается другое направление хроматографического сепарирования белково-пептидных смесей, обусловленное возможностью использования сверхвысоких давлений (так называемая высокопроизводительная жидкостная хроматография UHPLC) при проведении хроматографии, сочетаемого с уменьшением размера частиц хроматографической фазы и параллельным увеличением длины разделяющего капилляра. Увеличение соотношения длины капилляра к площади его сечения обуславливает увеличение числа теоретических тарелок и, как следствие, увеличение числа идентифицированных пептидов. Так, в работе Зоу и соавт. [27] для получения пептидома сыворотки крови использована колонка длиной 80 см и внутренним диаметром 100 мкм. Авторы использовали масс-спектрометрию с преобразованием Фурье и идентифицировали в общей сложности 845 пептидов [27]. Очевидно, что совершенствование технологий изготовления сорбентов позволит существенно увеличить количество инвентаризированных пептидов в ходе одного эксперимента.

#### *Масс-спектрометрические анализаторы*

В настоящем обзоре мы намеренно опустим обсуждение масс-спектрометрии, поскольку для этого понадобилось бы слишком большое внимание уделить этому, безусловно, важному компоненту протеомики и пептидомики. Констатируем, что литературы, посвященной масс-спектрометрии в биомедицине достаточно, чтобы любознательный читатель мог ознакомиться с ней самостоятельно. Отметим только, что за последние пять лет был достигнут значительный прогресс в увеличении точности определения масс и разрешения, а также внедрении в практику новых методов фрагментации, позволяющих не только идентифицировать

структуры анализируемых пептидов, но и выявлять их посттрансляционные модификации. В конце обзора мы приведем специальную литературу, посвященную этой теме, а также основные компьютерные алгоритмы, которые предназначены для идентификации посттрансляционных модификаций [28, 29].

#### *Количественный протеомный анализ для поиска биомаркеров*

Количественные измерения являются неотъемлемой частью процедуры поиска и валидации биомаркеров различных заболеваний [8]. Как уже отмечалось выше, такие измерения могут быть реализованы в различных форматах.

Наиболее распространенным методом является прямое профилирование биологических образцов (жидкостей) с использованием технологий время-пролетной масс-спектрометрии и MALDI/SELDI [30]. Несмотря на популярность, такой подход имеет ряд существенных ограничений, среди которых, безусловно, главным является относительно низкий динамический диапазон измерений молекулярных масс  $10^3$ – $10^4$ . Десятилетие использования прямого белкового профилирования, многочисленные публикации выявили определенное количество пептидов и белков с молекулярной массой не более 20 кДа, которые на сегодняшний момент можно рассматривать как потенциальные биомаркеры ранних стадий заболеваний человека [31]. Однако все эти маркеры могут быть отнесены к разряду суррогатных, поскольку представляют собой белки острой или хронической фазы воспаления, белки-компоненты системы свертывания крови, фрагменты белков, которые образуются при повышении активности внутри- и внеклеточных металлопротеиназ, вследствие метастазирования опухолевых клеток и т.д. [8]. Идентификация истинных маркеров, специфичных для онкологических клеток, вряд ли может быть достигнута при использовании MALDI/SELDI-профилирования плазмы/сыворотки крови.

Исходя из ограничений прямого профилирования, в последние годы стали активно развиваться новые технологии количественной оценки пептидов и белков, которые основываются на использовании изотопных меток, либо методы, стандартизирующие хроматографическое разделение или использующие внутренние пептидные стандарты для калибровки. Такие технологии, как правило, основаны на времени хроматографического удержания пептида, нормировании интенсивности сигнала (ионного тока в определенной точке хроматографического процесса). В то же время активно развиваются гибридные технологии, где хроматографическое разделение пептидов и белков активно сочетается с MALDI-TOF-масс-спектрометрией в *offline*-режиме.

Так, Таммен и соавт. предложили метод, названный “дифференциальный пептидный дисплей”, где на первом этапе получали из биологического образца 1500–3000 пептидов молекулярной массой 750–15000 Да, разделенных с использованием хроматографии ультравысокого давления на RP18, а затем отдельные фракции анализировали времяпролетной масс-спектрометрией [32]. Эмулирование масс-спектрометрических профилей в формат псевдо-1D-геля позволяло применять для анализа электрофоретических данных, для выравнивания и анализа получаемых спектров стандартные пакеты компьютерных программ. В дальнейшем информация об отличиях в интенсивности пиков и их положении на псевдогеле была сопоставлена со временем удерживания на хроматографической фазе, и сгенерированы двумерные пептидомные карты, используемые для окончательного анализа [31].

Один из подходов, используемых в современной пептидомике и протеомике, позволяющий существенно повысить чувствительность масс-спектрометрического определения маркеров и достичь показателей, необходимых для клинических исследований, был недавно продемонстрирован Фортином и соавт., которые применили технологию множественного мониторинга реакций, хорошо известную в других областях использования масс-спектрометрии (мониторинг окружающей среды, фармакокинетические исследования и т.д.) [33]. Для ее применения в пептидомных и протеомных исследованиях необходимо было определить так называемые протеотипические пептиды – фрагменты анализируемых белков, имеющих высокую степень ионизации и хорошую фрагментацию в условиях выбранных методов. Следует отметить, что использование протеотипических пептидов в настоящее время характерно не только для биомедицинской протеомики и пептидомики, но и для фундаментальных и прикладных исследований в микробиологии [34–36]. Как продемонстрировано в работе Аберсолда с соавт., выбор и использование протеотипических пептидов в так называемой “исчерпывающей протеомике” микроорганизмов позволяет сократить время анализа с нескольких дней или недель до нескольких часов. При этом 80% всех идентифицированных стандартной технологией белков удалось надежно определить по их протеотипическим пептидам.

Говоря о технике множественного или единичного мониторинга продуктов реакции (MRM или SRM), следует отметить, что в цитируемой работе [37] авторам с использованием простатического антигена (ПСА) удалось показать, что чувствительность и специфичность хроматомасс-спектрометрического определения сопоставима или превосходит используемые в настоящее время в клинических исследованиях традиционные методы иммуноферментного анализа и достигает 1 нг/мл. Авторы стандартизировали систему пробоподготовки, которая за-

ключалась в иммунохимическом истощении 100 мкл сыворотки человека по альбумину, твердофазной экстракции белков и пептидов, получении триптического гидролизата экстрагированных белков и хроматомасс-спектрометрического анализа с использованием техники MRM. В качестве протеотипических пептидов ПСА были выбраны короткие олигопептиды LSEPAELTDAVK и IVGG-WECEK, определение которых позволило достичь линейности в определении ПСА в интервале от 1 до 1000 нг/мл.

#### Изотопные методы

Методы введения стабильных изотопов можно разделить на происходящие *in vivo* и *in vitro*. Примером метаболического получения изотопомеров сразу всех белков клетки является метод SILAC (Stable isotope labeling with amino acids in cell culture – маркировка аминокислот стабильными изотопами в культуре клеток), при котором культивирование происходит в среде, содержащей  $^{15}\text{N}$ - и  $^{13}\text{C}$ -меченные аминокислоты [35]. Этот метод, как правило, используется только для культур клеток. Описаны отдельные примеры получения меченых организмов, *Drosophila melanogaster* и даже лабораторных мышей, но стоимость таких экспериментов очень высока. Кроме того, подбор специальных сред может вносить искажения в биологические процессы клетки.

Изотопомеры *in vitro* могут быть получены энзиматически или химически. Примером энзиматического получения изотопных стандартов служит метод AQUA, при котором протеолиз белков осуществляется в тяжелой ( $\text{H}_2^{18}\text{O}$ ) воде, что приводит к включению  $^{18}\text{O}$  в C-концевые карбоксильные группы образовавшихся пептидов. Одной из основных проблем является плохо контролируемая степень протеолиза и введения изотопов, а также обратный изотопный обмен, что может повлечь за собой значительные ошибки измерений. Кроме того, по причине включения в пептид только одного  $^{18}\text{O}$ - или  $^{16}\text{O}$ -атома небольшая разница в массе (2 Да) приводит к перекрыванию изотопных кластеров, что затрудняет интерпретацию получаемых данных [33].

На практике наиболее часто используются химические методы введения изотопов. Они основаны на селективной ковалентной модификации белков или полученных при протеолизе пептидов реагентами, содержащими стабильные изотопы, и соответственно разнятся по времени проведения реакции и модифицирующим реагентам. Как правило, модификация сопровождается изменением химического строения и физико-химических характеристик вещества, поэтому аналогичной обработке изотопнолегким и изотопнотяжелым вариантами реагента подлежат как контрольное, так и анализируемое соединение. Например, в методе ICAT



(Isotope-Coded Affinity Tag — изотопных аффинных меток) реагентами, содержащими биотин и изотопные линкеры, селективно модифицируются цистеиновые остатки целых белков контрольного и опытного образцов. Этот прием позволяет объединить пробы и проводить все дальнейшие процедуры разделения и протеолиза белков совместно. Наличие биотина делает возможным аффинное выделение цистеинсодержащих пептидов для дальнейшего МС/МС-анализа. Ограничением метода является довольно низкая встречаемость цистеиновых остатков: не все белки оказываются представлены хотя бы одним цистеинсодержащим пептидом.

Другая легко и селективно модифицируемая группа в белках — аминокислотная группа лизиновых остатков. В продаже есть целый ряд реагентов, применимых для изотопного мечения аминокислотных групп белков (<http://www.piercenet.com>). Интересным примером является семейство изобарных меток для относительного и абсолютного количественного анализа (ITRAQ — isobaric tag for relative and absolute quantitation) — 4 изотопных варианта. Они имеют одинаковую массу пришиваемого к белку химического остатка, но разное внутримолекулярное расположение  $^{13}\text{C}$ -атомов. Таким образом, молекулярные массы всех вариантов модифицированных пептидов равны, что очень удобно при выделении ионов для МС/МС-анализа, различия же выявляются именно на стадии получения спектров фрагментации. Метки типа ITRAQ можно применять как для мечения лизиновых остатков целых белков, так и для модификации N-концевых аминокислотных групп пептидов, полученных в результате протеолиза белков [36]. Выбор диктуется конкретной задачей. Введение метки непосредственно в белки ограничивает количество анализируемых пептидов и частично препятствует проведению гидролиза трипсином, однако обеспечивает идентичность протекания стадий белкового разделения и очистки (электрофореза или хроматографии), сопровождающихся неминуемыми потерями, а также протеолиза в паре опыт—контроль.

Модификация аминокислотных групп пептидов, полученных в результате протеолиза, позволяет анализировать все пептиды, однако делает невозможным контроль на предварительных стадиях работы с образцами. В целом использование изобарных меток, а также методов, позволяющих оценить относительное изменение белков в паре контроль—опыт без использования изотопов, в настоящее время используется приблизительно в равной степени. Совершенствование техники хроматографического разделения пептидов, по-видимому, перераспределяет методы количественной протеомики в сторону большего использования безметочных технологий.

#### *Методы прямого использования масс-спектрометрии в биомедицине*

Одним из направлений развития аналитических процедур протеомики и пептидомики являются так называемые прямые масс-спектрометрические методы анализа, среди которых необходимо выделить MALDI-TOF-масс-спектрометрию, десорбцию с последующей электроспрейной ионизацией (DESI) и прямой анализ в реальном времени с использованием времяпролетных масс-спектрометров (DART) [37]. Среди перечисленных методов MALDI-TOF-масс-спектрометрия безусловно лидирует, поскольку два подхода — так называемое прямое профилирование бактерий для их быстрой идентификации и метод масс-спектрометрической визуализации тканей и клеток получили широкое распространение и уже вошли в практику использования бактериологическими лабораториями и отделениями патологии. Естественно, что совершенствование методов прямого белково-пептидного профилирования не останавливается, и они в настоящее время довольно широко используются и в исследовательской деятельности [37].

#### *Прямое белково-пептидное профилирование микроорганизмов*

Идея использования масс-спектрометрии для быстрой идентификации микроорганизмов была впервые сформулирована Анхальтом и Фенселау в 1975 г. [38]. Однако долгое время эти разработки не выходили из стен исследовательских лабораторий вследствие недостаточной степени стандартизации процедуры экстракции белков и пептидов из бактериальных клеток [39]. В начале этого века несколько групп авторов разработали и опубликовали простые и воспроизводимые протоколы, позволяющие использовать прямое белковое профилирование для идентификации бактерий в клинической микробиологии. Принцип этих протоколов заключается в одновременной инактивации микроорганизмов этанолом и экстракции преимущественно щелочных белков (рибосомных бактериальных белков) кислотными водно-ацетонитрильными растворами. Относительная толерантность MALDI-масс-спектрометрии к загрязнению солями и другими примесями позволяет проводить прямой масс-спектрометрический анализ содержимого микробной клетки (прямое профилирование) без фракционирования и очистки отдельных компонентов.

В общем случае метод предполагает анализ сложных смесей клеточных компонентов (белков, пептидов, липидов, нуклеиновых кислот). Однако состав экстрагирующих растворов и органических матриц, а также параметры снятия масс-спектров позволяют регистрировать преимущественно белковые молекулы, что наиболее ценно: в клетке содержится множество белков в различных количе-

ствах, которые при этом несут разнообразные пост-трансляционные модификации [39].

Возможность регистрации масс-спектров, уникальных и воспроизводимых для семейств, родов, видов и подвидов микроорганизмов, формирует основу для применения масс-спектрометрии для идентификации и типирования бактерий. Стоит отметить, что такой подход не предполагает идентификацию отдельных микробных белков, а позволяет использовать уникальный масс-профиль для характеристики микроорганизма по принципу “отпечатков пальцев”. В настоящее время прямое бактериальное профилирование активно используется для идентификации и классификации широкого спектра микроорганизмов [40, 41].

Одной из первых, заявивших о возможности применения масс-спектрометрического профилирования бактерий в практических лабораториях, стала компания WATERS, США. Выпускаемый компанией программный продукт MicrobeLynx™ 4.0 предназначен для идентификации микроорганизмов по их уникальным MALDI-масс-спектрам при доступе к обновляемым базам данных, которые на 2004 г. содержали идентификационные масс-спектры для более чем 3400 видов бактерий.

Вполне очевидно, что при подобных исследованиях для сопоставимости результатов, полученных в разных лабораториях, требуется выработка и соблюдение условий единой стандартной методики, желательно, одинаково эффективной для разных микроорганизмов.

Сегодня на рынке применения масс-спектрометрического профилирования для видовой идентификации бактерий активно выступают компании Bruker Daltonics (Германия) и Shimadzu (Япония), каждая из которых предлагает оригинальные программные продукты обработки и хранения данных – MALDI Biotyper и SARAMIS соответственно. Обе эти системы позволяют одинаково эффективно, быстро и дешево осуществлять видовую идентификацию микроорганизмов в клинической практике [42].

#### *Масс-спектрометрическое профилирование эукариотических клеток и тканей (масс-спектрометрическая визуализация)*

Основные работы в этой области принадлежат Каприоли с соавт. [43]. На протяжении последних десяти лет эта группа исследователей разрабатывала масс-спектрометрические методы, предназначенные для визуализации клеток и тканей организма человека и лабораторных животных. Определенный прогресс в этой области наметился тогда, когда времяпролетные масс-спектрометры стали комплектоваться лазерами с диаметром лазерного пучка менее 50 мкм. В настоящее время эта величина не превышает 10 мкм, что сопоставимо с линейными размерами клетки, прикрепленной на подложке.

Таким образом, имеется возможность получать масс-спектры с единичных клеток или их небольших скоплений при исследовании патологических и нормальных тканей или их фрагментов. Такая технология выглядит многообещающей, поскольку позволяет рассчитывать на снятие ограничения при исследовании ранних стадий развития опухолевого процесса.

Известно, что современные методы микродиссекции могут выделить для анализа несколько тысяч или десятков тысяч клеток, что недостаточно для применения традиционных методов протеомного анализа [44]. Каприоли и соавт. полагают, что прямая масс-спектрометрическая детекция позволит идентифицировать маркеры непосредственно в клетках-мишенях [43]. В недавно опубликованной работе они продемонстрировали эффективность разработанного подхода для профилирования аденокарциномы кишечника, выделенной из экспериментальных мышей, а также клеток аденокарциномы человека [45]. Авторам удалось не только найти отличия в пептидных и белковых профилях, но и идентифицировать некоторые масс-спектрометрические пики с последующей их фрагментацией. В частности, были идентифицированы белки, которые определяют нормальный фенотип эпителия кишечника и основной антиген S108A1, используемый в иммуногистохимическом анализе для подтверждения онкологического диагноза.

Следует отметить, что методы прямого масс-спектрометрического профилирования клеток и тканей человека и лабораторных животных используются не только в протеомных и пептидомных исследованиях, они также позволяют проводить эффективный мониторинг распределения фармакологических средств в организме человека и животных и получать спектры липидов, изучая изменения липидного профиля клеток в эксперименте или при характеристике патологических процессов.

#### *Протеомный атлас*

Одной из альтернатив существующим в настоящее время протеомным и пептидомным технологиям, изложенным в этом обзоре, является наличие международной инициативы по получению высокоспецифичных антител ко всем аннотированным белкам человека, предназначенных для иммуногистохимических, терапевтических и диагностических целей. Эта инициатива получила название Протеомный атлас. Разработаны и внедрены высокопроизводительные автоматизированные системы клонирования и экспрессии белков и пептидов, получения поликлональных и моноклональных антител, а также методов их тестирования. К настоящему времени получено 8299 антител и рекомбинантных белков, предназначенных для диагностических целей. Как уже упоминалось выше, использование антител в качестве самостоятельно-

го детектирующего агента либо в комбинации с масс-спектрометрическим определением продуктов взаимодействия антиген–антитело позволяет существенно повысить чувствительность протеомных технологий.

Современные методы пептидомики и протеомики, освещенные в данном разделе, позволяют в автоматизированном режиме проводить эксперименты по инвентаризации белков и пептидов, количественно оценивать их, а также определять характер посттрансляционных модификаций. Вместе с тем, к сожалению, не удастся определить универсальную комбинацию перечисленных методов и подходов для того, чтобы окончательно унифицировать некую исследовательскую платформу, предназначенную для исчерпывающей протеомно-пептидомной инвентаризации. Однако уже сегодня протеомные технологии позволили существенно расширить спектр потенциальных биомаркеров ранних стадий патологических процессов, увеличивая эффективность диагностики и своевременного адресного лечения.

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРОТЕОМНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

#### *Основные ограничения в работе с биоматериалом. Биомедицинские исследования и протеомика*

Стандартизация процедуры сбора материала и его хранения является, пожалуй, основной проблемой всех биомедицинских исследований, в которых используются протеомные технологии. Это утверждение в равной степени касается как биологических жидкостей (кровь, сыворотка, моча), так и тканей. К сожалению, перечень вариантов, которые можно использовать в процедуре забора материала, слишком велик, для того, чтобы исследовать влияние особенностей каждого из них на получаемые результаты. Существуют, по крайней мере, два подхода к исследованию биомаркеров, находящихся в крови, которые четко определяют протокол забора крови – для получения сыворотки либо плазмы.

До настоящего времени основное число публикаций, безусловно, выполнено на сыворотке крови, хотя теоретически плазма представляет собой более стандартную среду для выполнения протеомных и пептидомных исследований. Основные факторы, которые влияют на воспроизводимость результатов, следующие: время хранения, использование протеазных ингибиторов, количество циклов замораживания/оттаивания, пол, возраст пациента, у которого взята кровь. Неслучайно поэтому HUPO (Human Proteome Organization) выработала определенные рекомендации для забора и хранения материала [46].

Как уже отмечалось выше, кроме используемых для стандартизации параметров, многие другие факторы влияют на воспроизводимость результа-

тов. Так, например, показано, что при получении сыворотки пептидные профили существенно зависят от физико-химических свойств шариков в емкости для забора крови, которые усиливают ее агрегацию и свертываемость. Кроме этого, существенным является время получения сыворотки, а также время хранения образца сыворотки или плазмы до замораживания. Влияние замораживания/оттаивания до сих пор является дискуссионным вопросом [47]. Некоторые авторы отмечают, что при многократном замораживании/оттаивании происходят незначительные изменения в профилях пептидов и белков, однако рекомендации HUPO подразумевают однократное оттаивание образцов при проведении анализа и процедуру предварительного аликвотирования для создания криобанка [46]. Тип антикоагулянта, используемый при получении плазмы, также имеет значение. Использование в качестве антикоагулянта EDTA в наибольшей степени влияет на масс-спектрометрические результаты белкового и пептидного профилирования, в отличие от гепарина и цитрата [47].

При заборе материала, представляющего собой биоптат или аутопсию, необходимо особое внимание уделять отбору морфологически однотипных клеток, поскольку любая ткань представляет собой совокупность большого количества клеток сосудов, соединительной ткани, иммунокомпетентных клеток, специализированных клеток и т.д. К сожалению, процедура микродиссекции не дает возможности получения необходимого для анализа количества клеток и требуется их культивирование *in vitro*, что, конечно, существенно влияет на сопоставимость результатов, получаемых в системах *in vitro* и *in vivo* [48].

Одной из отличительных особенностей проведения биомедицинских исследований с использованием протеомных и пептидомных технологий является их сопряженность с геномными, транскриптомными и метаболомными методами исследования и использование системного подхода для поиска оптимальных комбинаций биомаркеров. Такой системный анализ биообразцов налагает особые требования к планированию и выполнению процедур обследования пациентов, их информированного согласия, а также обеспечения качественной процедуры учета и хранения биообразцов, предназначенных для дальнейшего анализа [8]. Указанные требования, безусловно, определяют одно из важнейших отличий современных биомедицинских исследований от ранних аналогов. Необходим адекватный менеджмент таких процедур с обеспечением максимальной активности врачебного и сестринского персонала клиник, адекватной патоморфологической характеристикой биообразцов и диагнозов, а также выбор соответствующих комплексных схем исследования в лаборатории для получения результатов [30].

## Наиболее часто используемые ранние маркеры онкологических заболеваний

Маркер	Заболевание	Значимая концентрация	Чувствительность, %	Специфичность, %	Ссылка
СЕА (карциноэмбриотический антиген)	Злокачественный плевральный выпот	Не определена	57.5	78.6	(Ли и др., 2003) [51]
СЕА (карциноэмбриотический антиген)	Перитонеальный распространённый рак	0.5 нг/мл	75.8	90.8	(Ямамото и др., 2004) [52]
Her2/neu (рецептор к человеческому ростовому фактору)	Рак молочной железы IV стадии	15 нг/мл	40	98 <sup>1</sup>	(Кук и др., 2001) [53]
Антиген опухоли мочевого пузыря	Уротелиальная клеточная карцинома	Не определена	52.8	70	(Маин и др., 2000) [54]
Тироглобулин	Рак щитовидной железы с метастазами	2.3 нг/мл <sup>2</sup>	74.5	95	(Лима и др., 2002) [55]
Альфа-фетопротеин	Печеночно-клеточная карцинома	20 нг/мл	50	70	(Де-Маси и др., 2005) [56]
PSA (простат-специфический антиген)	Рак простаты	4.0 нг/мл	46	91	(Ганн и др., 1995) [57]
CA 125	Немелкоклеточный рак яичников	95 ед./мл	84	80	(Дабровска и др., 2004) [58]
CA 19.9	Рак поджелудочной железы	Не определена	75	80	(Ямагучи и др., 2004) [59]
CA 15.3	Рак молочной железы	40 ед./мл	58.2	96.0	(Кода и др., 1993) [60]
Лептин, пролактин, остеопоптин и IGF-II	Рак яичников	Не определена	95	95	(Мор и др., 2005) [61]
CD98, фасцин, sPlgR <sup>3</sup> , и 14-3-3 eta	Рак легкого	Не определена	96	77	(Ксиао и др., 2005) [62]
Тропонин I	Инфаркт миокарда	0.1 мкг/л	93	81	(Эггерс и др., 2004) [63]
Натрийуретический пептид типа В	Плухота	8 пг/мл	98	92	(Дао и др., 2001) [64]

<sup>1</sup> Относительно доброкачественного рака груди.<sup>2</sup> Относительно трех недель после операции.<sup>3</sup> Вещество связывается с полимерными иммуноглобулиновыми рецепторами.*Протеомика и пептидомика онкологических заболеваний. Поиск новых маркеров?*

Совершенно естественно, что наибольшее внимание исследователей привлечено к проблеме поиска новых биомаркеров онкологических заболеваний, поскольку этот вид патологии стремительно выходит на первое место в развитых странах мира по частоте смертельного исхода. В настоящее время каждая четвертая смерть в США – это смерть от онкологических заболеваний [49].

Исследование онкомаркеров началось в 1847 г. Бен-Джонсом с его открытия продуцируемых миломами легких цепей антител, в дальнейшем получивших название белков Бен-Джонса. К сожалению, сегодня найдется немного энтузиастов, которые верят в возможность обнаружения специфических белков или пептидов для большинства клеток злокачественного происхождения, как это в

свое время сделал Бен-Джонс [50]. В настоящее время, несмотря на все усилия исследователей, немногим более 10 белковых маркеров были разрешены для клинического применения в диагностике онкологических заболеваний. В то же время опубликованы тысячи работ с использованием протеомных технологий, которые позволили выявить Н. Андерсону более 1261 белкового маркера для более чем 15 видов опухолей [9, 50]. Анализ специфичности и чувствительности разрешенных маркеров показывает, что их использование имеет невысокую эффективность (таблица).

Этот парадокс достаточно легко объясним, поскольку до середины 90-х годов прошлого века иммунохимическими методами были найдены, описаны и использованы практически все современные белковые маркеры, применяемые сегодня в практическом здравоохранении. Как уже упоминалось вы-

ше, иммунохимические методы, в частности иммуноферментный анализ, обладает за счет использования антител высоким значением динамического диапазона измерений и позволяет выявлять 1 пг анализита в миллилитре сыворотки или плазмы. На самом деле, теоретический вопрос о том, какую концентрацию белка или пептида, претендующего на роль биомаркера, необходимо измерять для выявления заболевания на ранней стадии, остается открытым. При этом следует отметить, что разработаны технологические приемы так называемого иммуно-ПЦР, которые позволяют идентифицировать белки в количестве, не превышающем 1000 копий полипептида на пробу. Вследствие этого, основные усилия исследователей сконцентрированы на обнаружении определенных закономерностей в изменении концентрации белков и пептидов, представленных в сыворотке, плазме или моче в гораздо больших концентрациях и эффективного сочетания определяемых параметров с уже известными биомаркерами [65].

Обсуждаемые маркеры могут быть условно разбиты на три категории:

(1). Белки воспаления. К этой группе маркеров относят фрагменты белков компонента, сывороточный амилоид, альфа-1-антитрипсин, гаптоглобин, фрагменты фибрина и т.д. Обнаружение их в образцах сыворотки пациентов с онкологическими заболеваниями не удивительно, поскольку опухоль при своей прогрессии вызывает процесс асептического воспаления [8].

(2). Транспортные белки. Аполипопротеины, транстеритин, гемоглобин, трансферрин. Обнаружение отличий в присутствии этой группы белков обусловлено так называемым метаболическим стрессом вследствие развития опухоли [24, 30].

(3). Иммуномодуляторы, цитокины, клеточные металлопротеиназы, каспазы и кадхерины. Выявление этой группы маркеров, пожалуй, наиболее специфичной по отношению к предыдущим двум, сдерживается отсутствием методов с расширенным динамическим диапазоном определения анализитов [66].

Исходя из списка перечисленных выше маркеров, становится понятно, каков основной тренд их использования для диагностики. Исследователи определяют комбинации неспецифических маркеров и разрабатывают специальные программы для их интерпретации. В качестве примера можно привести определение пяти маркеров: транстеритина, аполипопротеина А1, бета-2 микроглобулина, трансферрина СА-125, предложенные компанией "Вермилион" (Россия) для раннего выявления аденокарциномы яичника у пациенток с наличием новообразования в малом тазу [67]. Другие авторы предложили для ранней диагностики опухолей яичника использовать комбинацию известного маркера СА-125 с белком HE-4, являющимся ингибито-

ром протеиназы, активно синтезируемым опухолями яичника [66, 68, 69].

Китайские исследователи опубликовали работу, где комплементарное использование альфафетопротеина и цитокератина 8 позволило увеличить чувствительность обнаружения злокачественной гепатомы на 12%, а специфичность на 5 [70]. К настоящему времени опубликованы несколько примеров того, как комбинирование протеомных маркеров способно увеличивать специфичность и чувствительность раннего выявления онкологических процессов в организме человека [71, 72]. Однако до настоящего времени ни одна из этих схем не была разрешена FDA (FDA US – Food and Drug Administration) для клинического использования.

Существует очевидная логическая связь между обнаружением маркеров существующими в настоящее время протеомными и пептидомными технологиями и последующим проведением широкомащтабных скрининговых или валидирующих исследований с использованием иммуноферментного анализа или применением иммунохимических чипов для одновременного количественного определения нескольких параметров в образце. Однако нельзя исключить, что уже в самое ближайшее время появятся альтернативные хроматомасс-спектрометрическому подходу технологии, способные существенно обогатить базу потенциальных онкомаркеров. В качестве одной из альтернатив еще раз позволим себе упомянуть Протеомный атлас – инициативу, которая в ближайшее время позволит выявлять белки человека с использованием иммунохимических технологий, а также быстрое развитие наноматериалов и, как следствие, создание биосенсоров на белки и пептиды, основанных на распознавании поверхностных зарядов и профилей гидрофобности [73].

### ПРОТЕОГЕНОМИКА. ВОЗМОЖНА ЛИ В НАСТОЯЩЕЕ ВРЕМЯ ОБРАТНАЯ ГЕНЕТИКА?

Одним из направлений развития протеомных технологий является становление относительно молодой дисциплины, называемой протеогеномикой. Несмотря на то что протеогеномные технологии в основном используются для исследования структуры и функции геномов прокариот, существует как минимум несколько причин, побудивших нас описать это направление в данной работе.

(1). Аннотация генома человека все еще далека от своего завершения. Исследования продуктов альтернативного сплайсинга, точек начала транскрипции, идентификация генов, кодирующих малые полипептиды, активно ведутся [2].

(2). Накопление массива данных о существовании генов, кодирующих пептиды, в том числе в межгенных областях [74].

(3). Наличие белковых продуктов, являющихся следствием нарушений генетического аппарата клеток при их малигнизации [72].

(4). Необходимость коррекции последовательности ДНК путем определения структуры белков.

Иными словами, изучение генома с использованием протеомных технологий обусловлено несовершенством алгоритмов компьютерной обработки данных и наличием белковых продуктов, которые невозможно предсказать.

Идея обратной геномики относительно не нова и впервые была высказана М. Манном в 2000 г. [2]. Однако в то время достигнуть необходимого разрешения и точности определения пептидов и белков не представлялось возможным, и следующие экспериментальные подходы были сформулированы в 2006 г. [75]. Основная суть метода состоит в том, что проводится тотальная трансляция со всех возможных рамок считывания генома, во всех ориентациях и определяется последовательность всех возможных пептидов длиной от 6 а.о. После этого получают масс-спектры тотального гидролизата всех белков и производится идентификация белков и пептидов, исходя из базы данных предсказанных теоретически продуктов.

Возможные модификации такого метода включают селективное обогащение протеома *N*-концевыми фрагментами или пептидами специального свойства (щелочными, кислыми), которые используются для более точной разметки генов и определения сплайс-вариантов. В частности, Вандеркирхове с соавт. активно развивают эту технологию, получившую название COFRADIC (combined fractional diagonal chromatography – комбинированная фракционная диагональная хроматография) [76]. Суть метода заключается в получении пептидов после использования процедуры трипсинолиза экстракта белков, их разделения на обращенной фазе RP18 с последующей ферментативной или химической модификацией отдельных фракций для изменения структуры полученных пептидов. Модификации подбираются таким образом, чтобы придать пептидам определенные физико-химические свойства, способные изменить время удержания на хроматографической фазе. Сравнение двух хроматографических экспериментов до и после модификации позволяет отделить нужные фракции и определить их состав масс-спектрометрически.

В 2003 г. был опубликован метод выделения *N*-концевых пептидов из смеси, полученной трипсинолизом. Центральным звеном метода явилась модификация  $\alpha$ -аминогрупп образовавшихся при ферментализе “внутренних” пептидов 2,4,6-тринитробензенсульфоновою кислотой [77]. В результате модификации внутренние пептиды приобретали высокую степень гидрофобности и могли быть отделены от концевых пептидов. Помимо использования COFRADIC’a для определения *N*-конце-

вых последовательностей, эта лаборатория разработала аналогичные процедуры для идентификации ряда посттрансляционных модификаций, включая сиаилирование, фосфорилирование и ацилирование белков.

## ПРОТЕОМИКА, ПЕПТИДОМИКА И СИСТЕМНАЯ БИОЛОГИЯ

Как было сказано во “Введении” протеомные технологии развиваются параллельно с геномными и метаболомными, зачастую дополняя друг друга [2]. Как правило, использование геномных технологий, параллельного секвенирования на предмет обнаружения соматических мутаций) предшествует протеомному и пептидному скринингу, а также метаболомным экспериментам. Такой подход, несмотря на значительную стоимость, оказался абсолютно оправданным, так как характеристика сложных систем, к которым относятся клетки человека, с помощью только одной технологии оказывается неполной. Так, в рамках изучения механизмов формирования аденокарциномы ректального отдела кишечника, выполнен ряд работ, где выявлены характерные изменения на уровне протеома раковой клетки. Затем с использованием лабораторных моделей предраковых состояний кишечника и проб мочи и крови, полученных от пациентов 1. – со вновь выявленными случаями колоректального рака и 2. – в постоперационном периоде, определен спектр метаболитов методами газовой хроматографии, масс-спектрометрии и ВЭЖХ-МС. Показано, что у пациентов обеих групп значительно уменьшается содержание ферментов цикла трикарбонных кислот и соответственно симбатно изменяется спектр метаболитов этого цикла. Из более чем 200 определенных метаболитов найдены характерные различия между обеими группами пациентов и группой контроля от нормы выявлены в 82, причем самым изменяемым оказался триптофан в сыворотке крови и 5-гидрокситриптофан в моче. Характерно, что такие отличия, впервые обнаруженные с использованием образцов сыворотки крови пациентов, затем были подтверждены и на модели предраковых состояний у лабораторных животных. Параллельно были проведены систематические исследования микробиоты кишечника и выявлены характерные изменения профиля микроорганизмов, которые, впрочем, интерпретируются авторами как следствие хирургического вмешательства.

Данный пример четко демонстрирует важную тенденцию в проведении биомедицинских исследований. Использование различных модификаций хроматомасс-спектрометрии позволяет проводить системные исследования образцов и выявлять определенные закономерности, присущие заболеванию на разных уровнях, – физиологическом, биохимическом, молекулярно-биологическом.

Перспектива таких исследований будет, по-видимому, определяться разработкой стандартных протоколов метаболомных и протеомных исследований и анализом объединенных данных.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ. ПЕРСПЕКТИВЫ И РАЗОЧАРОВАНИЯ

Десятилетие надежд, связанных с поиском новых маркеров и разработкой новых алгоритмов и методов диагностики, сменилось определенным скептицизмом, поскольку до сих пор, несмотря на значительный прогресс в поиске и идентификации новых маркерных молекул, ведущие контрольные агентства не разрешили применение ни одного из них. Несмотря на это, можно надеяться, что продолжающиеся интенсивные изыскания в этой области и совершенствование технологий, используемых для анализа, позволят в обозримом будущем анализировать белки, пептиды и низкомолекулярные аналиты в концентрациях, соответствующих ранним стадиям основных заболеваний человека. Расширение динамического диапазона измерений, увеличение комплексности и интенсификация информационных технологий в этой области будет способствовать прогрессу. Вместе с тем следует отметить, что одна из современных тенденций в биомедицинской протеомике и пептидомике заключается в объединении усилий разных лабораторий в консорциумы, поскольку многие технические и технологические задачи требуют больших инвестиций. Недавно HUPO (Human Proteome Organization) объявила о создании международного проекта, аналогичного проекту "Геном человека". Россия будет участвовать в качестве корпоративного исследователя 18-й хромосомы. Основная задача данного проекта — инвентаризация всех белков 18-й хромосомы и изучение их функции в норме и при патологических состояниях [<http://www.hupo.org/research/hpp/>]. Такого рода проекты, безусловно, будут способствовать развитию протеомики и получению новых знаний о структуре и функциях белков и пептидов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hufnagel P., Rabus R.* // J. Molecular Microbiology and Biotechnology. 2006. V. 11. P. 53–81.
2. *Pandey A.D., Mann M.* // Nature. 2000. V. 15. P. 837–846.
3. *Арчаков А.И., Говорун В.М.* // Биохимия. 2002. V. 67. P. 1109–1123.
4. *Jiang Y., Wang M.* // Biomark. Med. 2010. V. 4. P. 523–533.
5. *Deusch E.W., Lam H., Aebersold R.* // EMBO Reports. 2008. V. 9. P. 429–434.
6. *Ivanov A., Karelin A., Yatskin O.* // Biopolymers. 2005. V. 80. P. 332–346.
7. *Ivanov T., Yatskin O.* // Expert. Rev. Proteomics. 2005. V. 2. P. 463–473.
8. *Matt P., Fu Z., Fu Q., van Eyk J.E.* // Physiological Genomics. 2008. V. 33. P. 12–17.
9. *Anderson N.L., Polanski M., Pieper R., Gatlin T., Tirumalai R.S., Conrads T.P., Veenstra T.D., Adkins J.N., Pounds J.G., Fagan R., Lobley A.* // MCP. 2004. V. 3. P. 311–326.
10. *Bayard F., Raveneau A., Letourneau A., Joucla G., Barbot C., Garbay B., Cabanne C.* // Anal. Biochem. 2009. V. 384. P. 350–352.
11. *Zhang X., Fang A., Riley C., Wang M., Regnier C., Buck C.* // Anal. Chim. Acta. 2010. V. 664. P. 101–113.
12. *Oztürk N., Günay M., Akgöl S., Denizli A.* // Biotechnol. Prog. 2007. V. 23. P. 1149–1156.
13. *Wolters D.A., Washburn M.P., Yates J.R.* // Anal. Chem. 2001. V. 73. P. 5683–5690.
14. *Li X., Xu S., Pan C., Zhou H., Jiang X., Zhang Y., Ye M., Zou H.* // J. Sep. Sci. 2007. V. 30. P. 930–943.
15. *Terracciano R., Pasqua L., Casadonte F., Frasca S., Preianò M., Falcone D., Savino R.* // Bioconjug. Chem. 2009. V. 20. P. 913–923.
16. *Cai D., Ren L., Zhao H., Xu C., Zhang L., Yu Y., Wang H., Lan Y., Roberts M.F., Chuang J.H., Naughton M.J., Ren Z., Chiles T.C.* // Nat. Nanotechnol. 2010. V. 5. P. 597–601.
17. *Alpert A.J., Shukla M., Shukla A.K., Zieske L.R., Yuen S.W., Ferguson M.A., Mehlert A., Pauly M., Orlando R.* // Chromatogr. A. 1994. V. 676. P. 191–122.
18. *Kawashima Y.* // J. Proteome Res. 2010. V. 9. P. 1694–1705.
19. *Liotta L.A., Petricoin E.F.* // Clin. Chem. 2010. in press.
20. *Zhou M., Lucas D.A., Chan K.C., Issaq H.J., Petricoin E.F., 3rd, Liotta L.A., Veenstra T.D., Conrads T.P.* // Electrophoresis. 2004. V. 25. P. 1289–1298.
21. *Gundry R.L., Fu Q., Jelinek C.A., Eyk J.E., van Eyk J.E., Cotter R.J.* // Proteomics Clin. Appl. 2007. V. 1. P. 73–88.
22. *Wu L., Han D.K.* // Expert. Rev. Proteomics. 2006. V. 3. P. 611–619.
23. *Ye Y., Mar E., Tong S., Sammons S., Fang S., Anderson L.J., Wang D.* // J. Virol. Methods. 2010. V. 163. P. 87–95.
24. *Huang H.L., Stasyk T., Morandell S., Dieplinger H., Falkensammer G., Griesmacher A., Mogg M., Schreiber M., Feuerstein I., Huck C.W., Stecher G., Bonn G.K., Huber L.A.* // Electrophoresis. 2006. V. 27. P. 1641–1650.
25. *Cañas B., López-Ferrer D., Ramos-Fernández A., Camafeita E., Calvo E.* // Briefings in Functional Genomics Proteomics. 2006. V. 4. P. 295–320.
26. *Chen E.I., Hewel J., Felding-Habermann B., Yates J.R.* // MCP. 2006. V. 5. P. 53–56.
27. *Zhou J., Petritis B., Petritis K., Norbeck A., Weitz K., Moore R., Camp D.K.* // Nat. Nanotechnol. 2009. V. 8. P. 5387–5395.
28. *Vogeser M., Seger C.F.* // Clin. Chem. 2010. V. 56. P. 1234–1244.
29. *Zhang X., Fang A., Riley P., Wang M., Regnier F.* // Anal. Chim. Acta. 2010. V. 664. P. 101–113.
30. *Anderson N.L., Anderson N.G.* // MCP. 2002. V. 1. P. 845–867.

31. *Hu L., Ye M., Zou H.* // *Expert. Rev. Proteomics*. 2009. V. 6. P. 433–447.
32. *Tammen H., Kreipe H., Hess R., Kellmann M., Lehmann U., Pich A., Lamping N., Schulz-Knappe P., Zucht H.* // *Breast Cancer Res Treat.* 2003. V. 79. P. 83–93.
33. *Fortin T., Salvador A., Charrier J.P., Lenz C., Lacoux X., Morla A., Choquet-Kastylevsky G., Lemoine J.* // *Mol. Cell. Proteomics*. 2009. V. 8. P. 1006–1015.
34. *Gstaiger M., Aebersold R.* // *Nat. Rev. Genet.* 2009. V. 10. P. 617–627.
35. *Cox J., Mann M.* // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. P. 1367–1372.
36. *Xiang F., Ye H., Chen R., Fu Q., Li L.* // *Anal. Chem.* 2010. V. 1. P. 2817–2825.
37. *Zhang K., McKinlay C., Hocart C.H., Djordjevic M.A.* // *J. Proteome Res.* 2006. V. 5. P. 3355–3367.
38. *John P., Anhalt C.F.* // *Anal. Chem.* 1975. V. 47. P. 219–225.
39. *Seng P., Drancourt M., Gouriet F., La Scola B., Fournier P.E., Rolain J.M., Raoult D.* // *Clin. Infect Dis.* 2009. V. 49. P. 543–551.
40. *Irina E.N., Borovskaya A.D., Vereshchagin V.A., Kubanova A.A., Kruglov A.N., Svistunova T.S., Gazarian A.O., Maier T., Kostrzewa M.* // *J. Mol. Diagn.* 2009. V. 11. P. 75–68.
41. *Fenselau C., Demirev P.A.* // *Mass Spectrom. Rev.* 2001. V. 20. P. 157–171.
42. *Cherkaoui A., Hibbs J., Emonet S., Tangomo M., Girard M., Francois P., Schrenzel J.* // *J. Clin. Microbiol.* 2010. V. 48. P. 1169–1175.
43. *Schwamborn K., Caprioli R.M.* // *Nat. Rev. Cancer.* 2010. V. 10. P. 639–646.
44. *Schad M., Lipton M., Giavalisco P., Smith R.D., Kehr J.* // *Electrophoresis*. 2005. V. 26. P. 2729–2738.
45. *Oppenheimer S., Mi D., Sanders M., Caprioli R.M.* // *J. Proteome Res.* 2010. V. 9. P. 2182–2190.
46. *Rodriguez H., Snyder M., Uhlén M., Andrews P., Beavis R., Borchers C., Chalkley R.J., Cho S.Y., Cottingham K., Dunn M., Dylag T., Edgar R., Hare P., Heck A.J., Hirsch R.F., Kennedy K., Kolar P., Kraus H.J., Mallick P., Nesvizhskii A., Ping P., Pontén F., Yang L., Yates J.R., Stein S.E., Hermjakob H., Kinsinger C.R., Apweiler R.* // *J. Proteome Res.* 2009. V. 8. P. 3689–3692.
47. *Loo D., Jones A., Hill M.M.* // *J. Proteome Res.* 2010 [Epub ahead of print].
48. *Banks R., Dunn M., Forbes M., Stanley A., Pappin D., Naven T., Gough M., Harnden P.* // *Electrophoresis*. 1999. V. 20. P. 689–700.
49. American Society of Clinical Oncology.
50. *Polanski M., Anderson N.L.* // *Biomarker Insights*. 2007. V. 1. P. 1–48.
51. *Li Y.P., Hu C.P.* // *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2003. V. 28. P. 608–610.
52. *Yamamoto M., Baba H., Kakeji Y., Endo K., Ikeda Y., Toh Y., Kohnoe S., Okamura T.* // *Oncology*. 2004. V. 67. P. 19–26.
53. *Cook G.B., Neaman I.E., Goldblatt J.L., Cambetas D.R., Hussain M., Lüftner D., Yeung K.K., Chan D.W., Schwartz M.K., Allard W.J.* // *Anticancer Res.* 2001. V. 21. P. 1465–1477.
54. *Mian C., Lodde M., Haitel A., Egarter Vigl E., Marberger M., Pycha A.* // *Urology*. 2000. V. 56. P. 228–231.
55. *Lima N., Cavaliere H., Tomimori E., Knobel M., Medeiros-Neto G.* // *J. Endocrinol. Invest.* 2002. V. 25. P. 110–115.
56. *De Masi S., Tosti M., Mele A.* // *Dig. Liver. Dis.* 2005. V. 37. P. 260–268.
57. *Gann P.H., Hennekens C.H., Stampfer M.J.* // *JAMA*. 1995. V. 273. P. 289–294.
58. *Dabrowska M., Grubek-Jaworska H., Domagaa-Kulawik J., Bartoszewicz Z., Kondracka A., Krenke R., Nejman P.* // *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2004. V. 111. P. 659–665.
59. *Yamaguchi K., Nagano M., Torada N., Hamasaki N., Kawakita M., Tanaka M.* // *Rinsho Byori*. 2004. V. 52. P. 336–339.
60. *Coda C., Cartia G.L., Ciambellotti E.* // *Minerva Med.* 1993. V. 84. P. 107–112.
61. *Mor G., Visintin I., Lai Y., Zhao H., Schwartz P., Ruthersford T., Yue L., Bray-Ward P., Ward D.C.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102. P. 7677–7682.
62. *Xiao T., Ying W., Li L., Hu Z., Ma Y., Jiao L., Ma J., Cai Y., Lin D., Guo S., Han N., Di X., Li M., Zhang D., Su K., Yuan J., Zheng H., Gao M., He J., Shi S., Li W., Xu N., Zhang H., Liu Y., Zhang K., Gao Y., Qian X., Cheng S.* // *Mol. Cell Proteomics*. 2005. V. 4. P. 1480–1486.
63. *Eggers K.M., Oldgren J., Nordenskjöld A., Lindahl B.* // *Am. Heart. J.* 2004. V. 148. P. 574–581.
64. *Dao Q., Krishnaswamy P., Kazanegra R., Harrison A., Amirov R., Lenert L., Clopton P., Alberto J., Hlavin P., Maisel A.S.* // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2001. V. 37. P. 379–385.
65. *Ziganshin R., Alekseev D.G., Arapidi G.P., Ivanov V.T., Moshkovski S.A., Govorun V.M.* // *Biomed. Khim.* 2008. V. 54. P. 408–419.
66. *Schaner M.E., Ross D.T., Ciaravino G., Sorlie T., Troyanskaya O., Diehn M., Wang Y.C., Duran G.E., Sikic T.L., Caldeira S., Skomedal H., Tu I.P., Hernandez-Boussard T., Johnson S.W., O'Dwyer P.J., Fero M.J., Kristensen G.B., Borresen-Dale A.L., Hastie T., Tibshirani R., van de Rijn M., Teng N.N., Longacre T.A., Botstein D., Brown P.O., Sikic B.I.* // *Mol. Biol. Cell*. 2003. V. 14. P. 4376–4386.
67. *Su F., Lang J., Kumar A., Ng C., Hsieh B., Suchard M.A., Reddy S.T., Farias-Eisner R.* // *Biomarker Insights*. 2007. V. 2. P. 369–375.
68. *Rustin G.J., Bast R.C., Jr., Kelloff G.J., Barrett J.C., Carter S.K., Nisen P.D., Sigman C.C., Parkinson D.R., Ruddon R.W.* // *Clin. Cancer. Res.* 2004. V. 10. P. 3919–3926.
69. *Amonkar S.D., Bertenshaw G.P., Chen T.H., Bergstrom K.J., Zhao J., Seshaiyah P., Yip P., Mansfield B.C.* // *PLoS One*. 2009. V. 4. P. e4599.
70. *Cho M.S., Lee S.N., Sung S.H., Han W.S.* // *Pathol. Int.* 2004. V. 54. P. 446–450.
71. *Goh D.P., Neo A.H., Goh C.W., Aw C.C., New L.S., Chen W.S., Atcha Z., Browne E.R., Chan E.C.* // *J. Proteome Res.* 2009. V. 8. P. 5679–5690.



72. Shirakawa H., Kuronuma T., Nishimura Y., Hasebe T., Nakano M., Gotohda N., Takahashi S., Nakagohri T., Konishi M., Kobayashi N., Kinoshita T., Nakatsura T. // Intern. J. Oncology. 2009. V. 34. P. 649–656.
73. Kang J.H., Asami Y., Murata M., Kitazaki H., Sadanaga N., Tokunaga E., Shiotani S., Okada S., Maehara Y., Niidome T., Hashizume M., Mori T., Katayama Y. // Biosens. Bioelectron. 2010. V. 15. P. 1869–1874.
74. Zhang C.-Y., Wang Y., Zhang Z. // PLoS Computational Biology. 2010. V. 6. P. online publication.
75. Mann M., Ong S.E. // Nat. Protoc. 2006. V. 1. P. 2650–2660.
76. Gevaert K., Vandekerckhove J. // Methods Mol. Biol. 2009. V. 527. P. 219–227.
77. Gevaert K., Goethals M., Martens L., van Damme J., Staes A., Thomas G., Vandekerckhove J. // Nat. Biotechnol. 2003. V. 21. P. 566–569.

## Proteomics and Peptidomics in Fundamental and Applied Medical Studies

V. M. Govorun\*.\*\*\* and V. T. Ivanov\*\*

#Phone: (499) 246-77-21; эл. почта: govorun@hotmail.ru

\*Scientific Research Institute of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia

\*\*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

The review is focused on current issues of biomedical proteomics and peptidomics. The main attention is paid to modern proteomics technologies applied in medical research – extraction, detection and data analysis techniques. The use of chromatography, mass spectrometry and chromatography mass spectrometry in proteogenomic, biomedical studies and biomarker discovery is discussed in detail.

*Key words: proteomics, peptidomics, biomedical research.*