

Л. В. Плотникова¹, А. М. Поляничко², М. В. Успенская¹, А. Д. Гарифуллин³,
С. В. Волошин³

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИНФРАКРАСНЫХ СПЕКТРОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ И ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ*

¹ Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий механики и оптики, Российская Федерация, 197101, Санкт-Петербург, Кронверкский пр., 49

² Санкт-Петербургский государственный университет,
Российская Федерация, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9

³ Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии, Российская Федерация, 191024, Санкт-Петербург, 2-я Советская улица, 16

Множественная миелома (ММ) составляет около 1% от всех злокачественных новообразований. ММ характеризуется пролиферацией клона плазматических клеток, который продуцирует и секретирует гомогенный моноклональный иммуноглобулин. К моноклональным иммуноглобулинам обычно применяют термин «парапротеин» или «М-протеин». М-протеин используется как серологический маркер «опухоли», который служит для диагностики и мониторинга заболевания. Электрофоретическая картина позволяет выявить М-протеин в 80% случаев ММ в виде единственного пика или локализованного диапазона. В исследовании применялась комбинация высокоразрешающего электрофореза белков в агарозном геле и инфракрасной спектроскопии нарушенного полного внутреннего отражения для выявления ключевых различий в белковом составе и особенностей вторичной структуры белков в образцах сыворотки крови больных ММ и здоровых доноров. Библиогр. 15 назв. Ил. 3. Табл. 1.

Ключевые слова: множественная миелома, М-протеин, вторичная структура, ИК-спектроскопия.

Для цитирования: Плотникова Л. В., Поляничко А. М., Успенская М. В., Гарифуллин А. Д., Волошин С. В. Сравнительный анализ инфракрасных спектров сыворотки крови больных множественной миеломой и здоровых доноров // Вестник СПбГУ. Физика и химия. 2017. Т. 4 (62). Вып. 1. С. 34–40.

*L. V. Plotnikova¹, A. M. Polyanchko², M. V. Uspenskaya¹, A. D. Garifullin³,
S. V. Voloshin³*

COMPARATIVE ANALYSIS OF FTIR SPECTRA OF SERUM FROM MULTIPLE MYELOMA PATIENTS AND HEALTHY DONORS

¹ Saint Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics, 49, Kronverksky pr., St. Petersburg, 197101, Russian Federation

² St. Petersburg State University,
7–9, Universitetskaya nab., St. Petersburg, 199034, Russian Federation

³ Russian Scientific Research Institute of Hematology and Transfusiology, 16, 2nd Sovetskaya ul., St. Petersburg, 191024, Russian Federation

Multiple myeloma (MM) accounts for about 1% of all types of cancers. MM is characterized by the proliferation of a single clone of plasma cells, which may produce and secrete homogeneous monoclonal immunoglobulin. The monoclonal immunoglobulin is commonly referred to as an

* По материалам IV конференции «Современные проблемы молекулярной биофизики», посвящённой 50-летию специализации «Молекулярная биофизика» на физическом факультете и 105-летию со дня рождения профессора Э. В. Фрисман, 14–15 июня 2016 г., СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия, URL: <http://molbioph.niif.spbu.ru/conference>.

Работа поддержана Правительством Российской Федерации (грант 074-U01) и Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 15-08-06876).

© Санкт-Петербургский государственный университет, 2017

“M-protein”. The M-protein acts as a serological “tumor” marker that is useful for diagnosis and disease monitoring. The electrophoretic pattern reveals the M-protein in 80% of MM patients as a single peak or localized band. In our study we applied a combination of high-resolution protein electrophoresis and Attenuated Total Reflection (ATR) infrared spectroscopy (FTIR) to compare the protein composition and the secondary structures of the serum proteins from MM patients and healthy donors. Refs 15. Figs 3. Tables 1.

Keywords: multiple myeloma, monoclonal immunoglobulin, secondary structure, IR-spectroscopy.

For citation: Plotnikova L. V., Polyanchko A. M., Uspenskaya M. V., Garifullin A. D., Voloshin S. V. Comparative analysis of FTIR spectra of serum from multiple myeloma patients and healthy donors. *Vestnik SPbSU. Physics and Chemistry*. 2017, vol. 4 (62), issue 1, pp. 34–40.

Введение. Множественная миелома представляет собой злокачественное новообразование, которое сопровождается продукцией моноклональных иммуноглобулинов клональными плазматическими клетками [1]. В структуре онкологической заболеваемости множественная миелома составляет около 1% от всех видов рака и около 10% злокачественных опухолей системы кроветворения [2, 3]. Нормальные плазматические клетки продуцируют и секретируют различные типы иммуноглобулинов (IgA, IgD, IgE, IgG и IgM), которые циркулируют в крови и являются составной частью иммунной системы. Клетки опухоли вырабатывают моноклональный иммуноглобулин, который обычно называют «парапротеином», или «М-протеином». Идентификация и количественное определение «М-протеина» необходимы, главным образом, для отличия моноклональной и поликлональной продукции иммуноглобулинов, что играет ведущую роль в диагностике множественной миеломы и терапевтическом контроле за течением заболевания. Такой тип анализа обычно осуществляется при использовании электрофореза белков сыворотки крови в агарозном геле [4]. Разработанные на сегодняшний день методики позволяют идентифицировать моноклональный белок в сыворотке крови более чем у 90% больных множественной миеломой. У такого типа больных доминируют моноклональные IgG и IgA, составляющие соответственно примерно 50 и 20% от всех случаев множественной миеломы [1].

Наше исследование направлено на изучение и сравнение вторичной структуры белков сыворотки крови больных множественной миеломой и здоровых доноров с использованием ИК-спектроскопии нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО). Несмотря на то что ИК-спектроскопия уже достаточно давно зарекомендовала себя в качестве полезного инструмента для анализа сыворотки крови у пациентов с различными заболеваниями [5, 6], данное исследование, насколько нам известно, является одной из первых попыток выполнить структурный анализ сывороточных белков при множественной миеломе.

Материалы и методы.

Получение биоматериала. Исследованы образцы крови больных множественной миеломой, находящихся под наблюдением гематологической клиники Российского научно-исследовательского института гематологии и трансфузиологии (Санкт-Петербург). Для получения образцов сыворотки крови использовали пробирки S-Monovette (Sarstedt, Германия) с активатором свертывания. Собранные образцы крови оставляли в пробирках на 20–30 мин при комнатной температуре (18–24°C), после чего центрифугировали в течение 15 мин при скорости 3000 об/мин на центрифуге Heraeus Labofuge 200 (Thermo Scientific, США). Часть собранной сыворотки в течение 2 ч использовали для электрофоретического анализа и иммунофиксации. Основной объём

образца замораживали и хранили при температуре -30°C до проведения спектроскопических исследований.

ИК-спектроскопия. Для регистрации спектров поглощения в среднем ИК-диапазоне использовали фурье-спектрометр Tensor 37 (Bruker, Германия) в сочетании с приставкой НПВО на основе кристалла ZnSe. Коррекцию спектров НПВО производили автоматически с использованием программного обеспечения, поставляемого с прибором. Спектры каждого образца регистрировали с разрешением 2 см^{-1} и усредняли по 300 накоплениям. Из полученных спектров поглощения вычитали спектр физиологического раствора, подбирая коэффициент вычитания таким образом, чтобы добиться ровной базовой линии в области $2200\text{--}2000\text{ см}^{-1}$ [7]. Каждую пробу сыворотки крови делили на две части, одну из которых непосредственно использовали для спектроскопического анализа в жидком состоянии, а другую подвергали лиофильному высушиванию с последующей регистрацией ИК-спектров НПВО сухого образца.

Электрофорез. Электрофоретический анализ сыворотки проводили методом электрофореза на пластинах в агарозном геле с использованием установок SAS-1 Plus и SAS-2 (Helena Biosciences, Великобритания), позволяющих выполнять электрофоретическое разделение белков, а также окраску и денситометрию гелей. Окраска гелей осуществлялась красителем Amido Black B10 (Helena Biosciences, Великобритания). Количественный анализ электрофореграмм проводили с помощью денситометрии предельно высушенных гелей.

Результаты и обсуждение. В работе использовали образцы сыворотки крови больных обоих полов в возрасте от 54 до 78 лет, а также контрольные образцы сыворотки крови 55 здоровых доноров. У всех 11 больных множественной миеломой была диагностирована III стадия заболевания по классификации Дьюри—Салмона [8], которая соответствовала II ($n = 5$) и III ($n = 6$) стадиям ISS (International Staging System) [9]. Первичный анализ образцов проводили методом электрофореза в агарозном геле [10]. Электрофоретический анализ позволяет быстро и надёжно выявить парапротеин в пробе, наличие которого при данном методе характерно для 80% пациентов с множественной миеломой. Электрофоретическое разделение белков сыворотки крови больных ММ выявило полосу, соответствующую М-протеину в 10 пробах из 11 (рис. 1). При иммунофиксации парапротеин был определён как патологический моноклональный IgG или IgA в 7 и 4 случаях соответственно.

Для анализа вторичной структуры белков сыворотки крови мы применили ИК-спектроскопию НПВО. Этот подход хорошо зарекомендовал себя ранее для изучения образцов с относительно высокой концентрацией белка [11]. Наиболее достоверные результаты при определении вторичной структуры белков по ИК-спектрам достигаются при анализе суперпозиции колебаний, образующих полосу амид I [12]. На основе

Отнесение основных спектральных компонент, основанное на анализе работ [11–15]

Вторичная структура	Расположение диапазона, см^{-1}
α -спираль	1648–1657
β -слой	1618–1641
	1670–1695
β -повороты	1660–1686
Неупорядоченные цепи	1642–1657

имеющихся в литературе данных была построена таблица отнесений для данного диапазона частот, которую и использовали в работе при анализе полученных данных. Число таких колебаний и их положение в спектре поглощения определялись по описанной ранее методике [11]. Экспериментально полученные профили полосы амид I аппроксимировали суперпозицией гауссовых контуров, используя программный пакет OriginPro (Originlab Corporation, США).

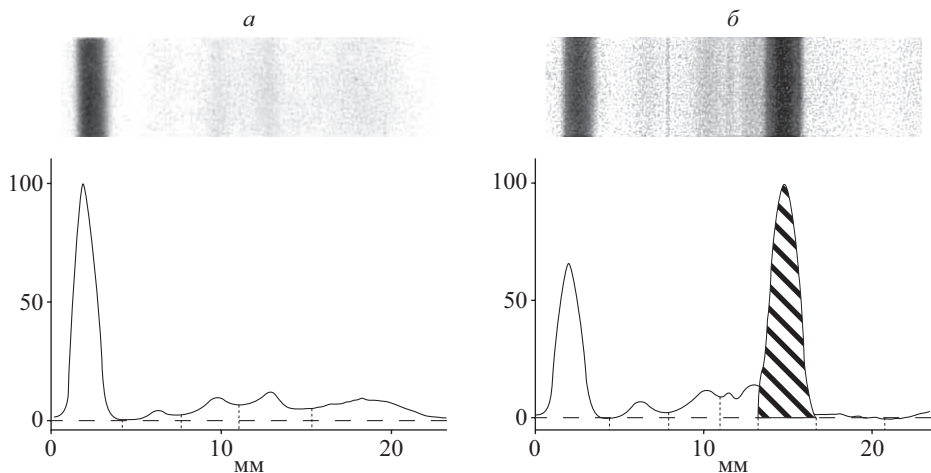


Рис. 1. Характерный вид электрофореграмм сыворотки здоровых доноров (а) и больных множественной миеломой, в сыворотке которых определяется М-белок (б)

Примеры полученных спектров и их разложения приведены на рис. 2. Вклад каждого типа вторичной структуры оценивался как доля площади под соответствующим контуром в общей площади полосы амид I.

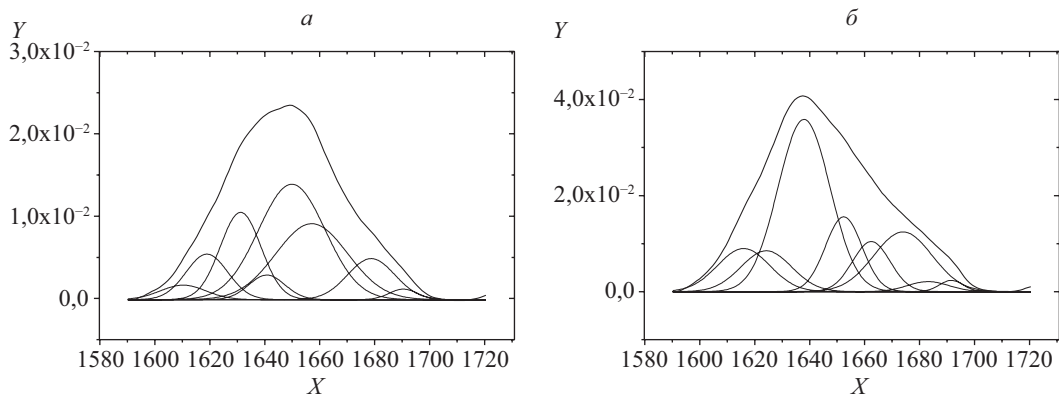


Рис. 2. Разложение полосы амид I в спектрах образцов жидкой сыворотки крови здорового донора (а) и больного множественной миеломой (б)

Анализ ИК-спектров жидких образцов показал, что вторичная структура белков сыворотки крови больных множественной миеломой и здоровых доноров различна.

Особенностью анализа ИК-спектров водных растворов белков является сильное перекрытие частотных диапазонов колебаний участков полипептидного остова, находящихся в α -спиральной и неупорядоченной конформациях. Для их достоверного разделения в ИК-спектрах желательно проводить изотопное замещение воды в образцах на D_2O либо полностью избавляться от воды путём высушивания пробы. Однако длительная процедура изотопного замещения может негативно отразиться на сохранности биологического материала. В связи с этим мы провели сравнительный анализ исходных образцов в физиологическом растворителе и тех же образцов, подвергшихся лиофильной сушке.

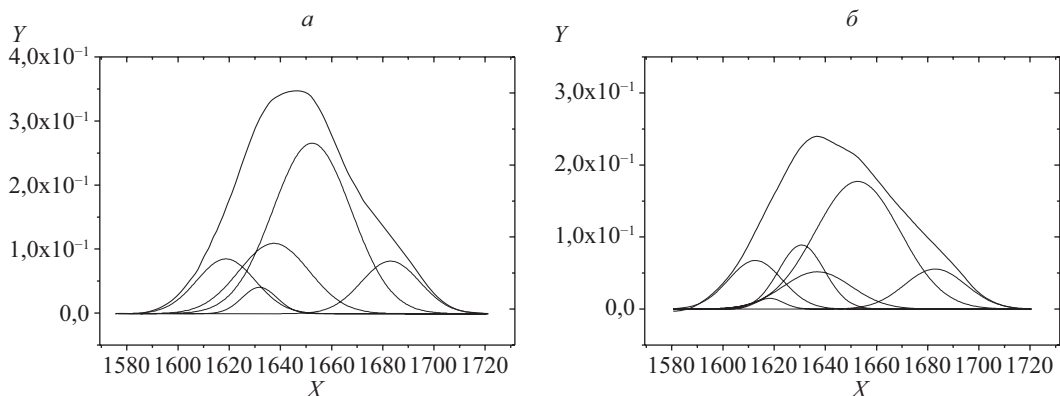


Рис. 3. Разложение полосы амид I в спектрах образцов лиофилизированной сыворотки крови здорового донора (а) и больного множественной миеломой (б)

Анализ полученных спектров в целом показал хорошее согласование результатов для сухих и жидких образцов (рис. 2 и 3), с учётом несколько лучшего разделения полос, соответствующих α -спиралям и неупорядоченному состоянию в сухих образцах. Важной особенностью обеих серий спектров является существенное различие между вторичной структурой белков больных множественной миеломой и здоровых доноров. В составе сыворотки крови здоровых доноров доминируют белки преимущественно с α -спиральной структурой, доля которой достигает 60%. Остальные фракции включают межмолекулярные β -структуры ($\approx 10\%$) и внутримолекулярные β -слои ($\approx 20\%$). Во вторичной структуре белков в образцах, полученных у пациентов с множественной миеломой, доминируют межмолекулярные β -слои (до 30–40%) и внутримолекулярные β -структуры (10–20%). При этом доля α -спиральных и неупорядоченных участков в совокупности значительно снижается (в общей сложности 10–20%).

Одной из характерных особенностей иммуноглобулинов является их способность образовывать при взаимодействии друг с другом устойчивые межмолекулярные комплексы. Наши спектроскопические данные указывают на то, что избыточная продукция моноклональных иммуноглобулинов, характерная для множественной миеломы, приводит к усилению подобных взаимодействий, которое проявляется в спектрах как нарастающее количество межмолекулярных α -структур. Несмотря на то что ИК-спектры не дают прямого ответа на вопрос о том, как взаимодействуют между собой различные виды иммуноглобулинов, они показывают важность межмолекулярных взаимодействий, происходящих в растворе.

Вывод. Сравнительный анализ образцов крови здоровых доноров и пациентов с множественной миеломой выявил различия во вторичной структуре белков сыворотки. На основании полученных результатов мы полагаем, что ИК-фурье-спектрометрия может быть использована в качестве дополнительного подхода при изучении белковых нарушений у больных ММ и определения их значения при этом заболевании.

Литература

1. Gertz M. A. Multiple myeloma. Diagnosis and treatment. New York: Springer, 2014. 311 p.
2. Mimura N., Hideshima T., Anderson K. C. Novel therapeutic strategies for multiple myeloma // Exp. Hematol. 2015. Vol. 43. P. 732–741.

3. Rajkumar S. V., Gertz M. A., Kyle R. A., Greipp P. R. Mayo clinic myeloma, Amyloid; disproteinemia group. Current therapy for multiple myeloma // *Mayo Clin. Proc.* 2002. Vol. 77, N 8. P. 813–822.
4. Kyle R. A., Rajkumar S. V. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma // *Leukemia*. 2009. Vol. 23, N 1. P. 3–9.
5. Benezzeddine-Boussaidi L., Cazorla G., Melin A. M. Validation for quantification of immunoglobulins by Fourier transform infrared spectrometry // *Clin. Chem. Lab. Medicine*. 2009. Vol. 47, N 1. P. 83–90.
6. Rehman I., Movasaghi Z. *Vibrational spectroscopy for Tissue A analysis*. Boca Raton: CRC Press, 2013. 343 p.
7. Powell J. R., Wasacz F. M., Jakobsen R. J. An algorithm for the reproducible spectral subtraction of water from the FT-IR spectra of proteins in dilute solutions and adsorbed monolayers // *App. Spectroscopy*. 1986. Vol. 40. P. 339–344.
8. Durie B. G., Salmon S. E. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival // *Cancer*. 1975. Vol. 36. P. 842–854.
9. Greipp P. R., San Miguel J., Durie B. G. et al. International staging system for multiple myeloma // *J. Clin. Oncol.* 2005. Vol. 23. P. 3412–3420.
10. Chernecky C. C., Berger B. J. *Laboratory tests and diagnostic procedures*: 6th ed. Saunder: Elsevier, 2012. 1232 p.
11. Полянничко А. М., Романов Н. М., Старкова Т. Ю., Костылева Е. И., Чихиржина Е. В. Анализ вторичной структуры линкерного гистона H1 по спектрам инфракрасного поглощения // *Цитология*. 2014. Т. 56, № 4. С. 316–322.
12. Barth A., Zscherp C. What vibrations tell about proteins // *Quarterly Rev. Biophys.* 2002. Vol. 35. P. 369–430.
13. Susi H., Byler D. M. Protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy: second derivative spectra // *Biochem Biophys Res Commun*. 1983. Vol. 115, N 1. P. 391–397.
14. Susi H., Byler D. M., Purcell J. M. Estimation of beta-structure content of proteins by means of deconvolved FTIR spectra // *J. Biochem. Biophys. Methods*. 1985. Vol. 11, N 4–5. P. 235–240.
15. Goormaghtigh E., Cabiaux V., Ruysschaert J. M. Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. III. Secondary structures // *Subcell. Biochem*. 1994. Vol. 23. P. 405–450.

References

1. Gertz M. A. *Multiple myeloma. Diagnosis and treatment*. New York, Springer, 2014. 311 p.
2. Mimura N., Hideshima T., Anderson K. C. Novel therapeutic strategies for multiple myeloma. *Exp. Hematol.*, 2015, vol. 43, pp. 732–741.
3. Rajkumar S. V., Gertz M. A., Kyle R. A., Greipp P. R. Mayo clinic myeloma, Amyloid; disproteinemia group. Current therapy for multiple myeloma. *Mayo Clin. Proc.*, 2002, vol. 77, no 8, pp. 813–822.
4. Kyle R. A., Rajkumar S. V. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia*, 2009, vol. 23, no 1, pp. 3–9.
5. Benezzeddine-Boussaidi L., Cazorla G., Melin A. M. Validation for quantification of immunoglobulins by Fourier transform infrared spectrometry. *Clin. Chem. Lab. Medicine*, 2009, vol. 47, no 1, pp. 83–90.
6. Rehman I., Movasaghi Z. *Vibrational spectroscopy for Tissue A analysis*. Boca Raton, CRC Press, 2013. 343 p.
7. Powell J. R., Wasacz F. M., Jakobsen R. J. An algorithm for the reproducible spectral subtraction of water from the FT-IR spectra of proteins in dilute solutions and adsorbed monolayers. *App. Spectroscopy*, 1986, vol. 40, pp. 339–344.
8. Durie B. G., Salmon S. E. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer*, 1975, vol. 36, pp. 842–854.
9. Greipp P. R., San Miguel J., Durie B. G. et al. International staging system for multiple myeloma. *J. Clin. Oncol.*, 2005, vol. 23, pp. 3412–3420.
10. Chernecky C. C., Berger B. J. *Laboratory tests and diagnostic procedures*: 6th ed. Saunder, Elsevier, 2012. 1232 p.
11. Полянничко А. М., Романов Н. М., Старкова Т. Ю., Костылева Е. И., Чихиржина Е. В. Analysis of the secondary structure of linker histone H1 based on IR absorption spectra. *Cell and Tissue Biology*, 2014, vol. 8, no 4, pp. 352–358.
12. Barth A., Zscherp C. What vibrations tell about proteins. *Quarterly Rev. Biophys.*, 2002, vol. 35, pp. 369–430.

13. Susi H., Byler D. M. Protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy: second derivative spectra. *Biochem Biophys Res Commun.*, 1983, vol. 115, no 1, pp. 391–397.
14. Susi H., Byler D. M., Purcell J. M. Estimation of beta-structure content of proteins by means of deconvolved FTIR spectra. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 1985, vol. 11, no 4–5, pp. 235–240.
15. Goormaghtigh E., Cabiaux V., Ruyschaert J. M. Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. III. Secondary structures. *Subcell. Biochem.*, 1994, vol. 23, pp. 405–450.

Статья поступила в редакцию 30 июня 2016 г.

Контактная информация

Плотникова Людмила Валерьевна — заведующая лабораторией; e-mail: ljusja@mail.ru

Полянничко Александр Михайлович — кандидат физико-математических наук, доцент;
e-mail: a.polynichko@spbu.ru

Успенская Майя Валерьевна — доктор технических наук, профессор;
e-mail: mv_uspenskaya@corp.ifmo.ru

Гарифуллин Андрей Дамирович — аспирант; e-mail: grif-10@yandex.ru

Волошин Сергей Владимирович — кандидат медицинских наук; e-mail: servolos@gmail.com

Plotnikova Lyudmila V. — Head of laboratory; e-mail: ljusja@mail.ru

Polyanichko Alexander M. — PhD, Associate Professor; e-mail: a.polynichko@spbu.ru

Uspenskaya Maya V. — Doctor of Engineering Sciences, Professor; e-mail: mv_uspenskaya@corp.ifmo.ru

Garifullin Andrew D. — post-graduate student; e-mail: grif-10@yandex.ru

Voloshin Sergey V. — PhD; e-mail: servolos@gmail.com