

УДК 616-073.584

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ФИЗИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ КОЛЛАГЕНА ПРИ НЕДИФФЕРЕНЦИРОВАННОЙ ДИСПЛАЗИИ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

¹Реушева С.В., ²Реушев М.Ю., ¹Пастухова С.Ю., ³Паничева Е.С.

¹Городская клиническая больница №20, Красноярск, e-mail: borozdun2@mail.ru;

²КНЦ СО РАН, Красноярск;

³Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск

Проведен анализ современных физических методов исследований в области молекулярно-клеточной биологии с целью выявления клинко-молекулярных биомаркеров при проявлениях недифференцированной дисплазии соединительной ткани у людей. Наиболее развитыми при исследовании молекулярных и над-молекулярных структур являются оптические методы фотометрического анализа, эмиссионного спектрального анализа, атомно-абсорбционной спектроскопии, спектроскопии комбинационного рассеяния, а также нефелометрический, турбидиметрический и флуоресцентный анализы. Всё большую роль при структурных исследованиях играют современные методы рентгеноструктурного анализа, электронной спектроскопии, ядерной магнитной спектроскопии 3D и 4D размерности и масс спектроскопии.

Ключевые слова: физические методы исследований, клинко-молекулярные биомаркеры, соединительная ткань

ACTUAL METHODS OF PHYSICAL STUDIES OF COLLAGEN IN UNDIFFERENTIATED CONNECTIVE TISSUE DYSPLASIA

¹Reusheva S.V., ²Reushev M.Y., ¹Pastuhova S.Y., ³Panicheva E.S.

¹City Clinical Hospital № 20, Krasnoyarsk, e-mail: borozdun2@mail.ru;

²KSC RAS, Krasnoyarsk;

³Krasnoyarsk State Medical University n.a. Proff. V.F. Voyno-Yasenezkogo, Krasnoyarsk

The analysis of actual physical methods of research in the field of molecular cell biology to identify clinical and molecular biomarkers in manifestations of an undifferentiated connective tissue dysplasia in humans. The most advanced in the study of molecular and supramolecular structures are optical methods of photometric analysis of emission spectral analysis, atomic absorption spectroscopy, Raman spectroscopy, and nephelometric, turbidimetric and fluorescent assays. The increasing role played by structural studies of modern methods of X-ray diffraction, electron spectroscopy, nuclear magnetic spectroscopy, 3D and 4D dimension and mass spectroscopy.

Keywords: physical methods of research, clinical and molecular biomarkers, the connective tissue

В связи с высокой распространенностью (4-15%) и медико-социальным значением проявлений среди населения форм недифференцированной дисплазии соединительной ткани (ндСТ) данной проблеме посвящено большое количество исследований, как в России, так и за рубежом [4, 2, 5]. Одной из важнейших областей таких исследований является выявление и изучение клинко-молекулярных биомаркеров при ндСТ.

Известно, что в основе ндСТ лежат следующие молекулярные процессы: 1) нарушение синтеза или сборки коллагена; 2) синтез абнормального коллагена; 3) чрезмерная дегградация коллагена; 4) нарушения структуры коллагеновых волокон, вследствие недостаточной поперечной сшивки; 5) аномалии эластиновых волокон; 6) другие, не изученные механизмы.

В настоящее время наблюдается стремительное развитие молекулярно-клеточной биологии, что во многом обусловлено

применением современных физических методов исследования.

Эти методы непрерывно совершенствуются и развиваются. Благодаря физическим методам оказывается возможным не только определять качественный и количественный состав биомассы, но и наблюдать в целом за биологическими макроструктурами. Определять положение в пространстве каждого атома в молекулах глобулярных и фибриллярных белков, изучать изменения формы биополимеров в растворе, разделять разнородные белки, ничтожно мало отличающиеся по своей структуре и т.д.

Среди физических методов исследований наиболее развитыми являются оптические методы, основанные на взаимодействии электромагнитного излучения с веществом. Это взаимодействие приводит к различным энергетическим переходам, которые регистрируются экспериментально в виде поглощения излучения, отражения и рассеяния электромагнитного излучения.

Оптические методы включают в себя большую группу спектральных методов анализа. Среди методов спектрального анализа наиболее широкое распространение получили: фотометрический анализ, эмиссионный спектральный анализ, пламенная эмиссионная спектроскопия, атомно-абсорбционная спектроскопия, спектроскопия комбинационного рассеяния, а также нефелометрический, турбидиметрический и флуоресцентный анализы [6, 7].

Фотометрический анализ относится к абсорбционным методам и основан на измерении поглощения света веществом. Он включает спектрофотометрию, фотоколориметрию и визуальную фотометрию, которую обычно называют колориметрией.

Одним из наиболее эффективных методов спектрофотометрии является метод инфракрасной спектроскопии. Использование инфракрасной спектроскопии при исследовании молекулы коллагена позволяет однозначно различать его структурные особенности, определять изменения структуры коллагена и изучать его пространственную конформацию.

Применение эмиссионного спектрального анализа (ЭСА) и атомно-абсорбционной спектроскопии (ААС) позволяет исследовать содержание наиболее значимых для биомаркеров коллагена микроэлементов кальция, магния, цинка и др. в биологических субстратах. Микроэлементов, управляющих активностью коллагеназы и снижающих уровень деградации коллагенового матрикса [5]. Возможности современных методик качественного и количественного спектрального анализа ЭСА и ААС позволяют обнаруживать содержание микроэлементов более чем для 70 элементов периодической системы Д.И. Менделеева от $10^{-3} \dots 10^{-4} \%$ до $10^{-6} \%$ с погрешностью порядка 1-2%.

Метод флуоресцентной спектроскопии является одним из наиболее распространенных для изучения физико – химических свойств биологических систем [6] и, в частности, структуры коллагенов. Этот метод позволяет следить за изменениями в микроокружении собственных флуорофоров белка или введенной флуоресцентной метки. Среди флуоресцентных методов получил большое развитие метод разрешено – временной флуоресцентной спектроскопии (РВФА). Метод РВФА исключительно ценен при изучении структурной организации надмолекулярных ансамблей, поскольку он, позволяя следить за вращательной динамикой,

как всего комплекса, так и отдельных его фрагментов и дает детальное представление о пространственной организации и динамике комплекса.

Хроматографические методы анализа традиционно играют значительную роль при исследованиях многокомпонентных веществ в том числе и биологического происхождения [6]. Существуют различные виды хроматографического анализа, отличающиеся по способу сорбции и десорбции исследуемых веществ. Определение содержания пептидов, свободных аминокислот, идентификация продуктов распада коллагена в моче, сыроворотке крови позволяет охарактеризовать интенсивность распада коллагена.

Все перечисленные виды физических методов являются косвенными методами при исследовании молекулярных и надмолекулярных структур, таких как фибриллярные белки и их разновидность коллагены и дают лишь усредненную информацию о молекулах, для расшифровки которой необходимо опираться на данные о структуре, полученные другими методами. Такими методами являются: рентгеноструктурный анализ, электронная микроскопия, поляризационно-оптическая микроскопия [1, 6, 7, 8]. Все больше при исследованиях белковых структур возрастает роль методов ядерной магнитной спектроскопии и методов, связанных с электронным парамагнитным резонансом. В медицине они являются инструментом клинической и доклинической диагностики.

Применение электронной микроскопии (ЭМ) позволяет проводить подробный анализ ультраструктурных изменений в соединительной ткани и различных типов коллагенов. Основные трудности ЭМ связаны с пробоподготовкой материала для исследований.

Традиционно основным методом определения пространственной структуры коллагенов является рентгеноструктурный анализ (РСА), позволяющий распознавать последовательность расположения пептидов и аминокислот в молекуле коллагена, молекулярные механизмы деформации молекулы коллагена. Компьютерная обработка результатов РСА является необходимой составляющей процесса расшифровки структуры коллагена.

Для выяснения механизмов биологического действия протеинов, и их целенаправленной модификации необходимо не только определение их пространственного строения, но и исследование динамических кон-

формационных характеристик в условиях максимального приближения к физиологической среде. Наиболее эффективным методом решения подобных задач является спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР). В отличие от рентгеноструктурного анализа в случае ЯМР спектроскопии снижаются требования к пробоподготовке.

Среди методов ЯМР, наиболее важные для практических применений являются методы спектроскопии, использующие протонный магнитный резонанс (ПМР-спектроскопия), а также ЯМР на ядрах углерода-13 (^{13}C ЯМР-спектроскопия), фтора-19 (^{19}F ЯМР-спектроскопия), фосфора-31 (^{31}P ЯМР-спектроскопия).

Подобно инфракрасной спектроскопии (ИКС), ЯМР выявляет информацию о молекулярном строении химических веществ. Однако, он обеспечивает более полную информацию, чем ИКС, позволяя изучать динамические процессы в образце, определять константы скорости химических реакций, величину энергетических барьеров внутримолекулярного вращения. Эти особенности делают ЯМР – спектроскопию удобным средством для анализа биологических объектов.

Большинство последних инноваций в ЯМР спектроскопии сделаны в области ЯМР спектроскопии белков, которая становится очень важным техническим инструментом в современной биологии и медицине. ЯМР спектроскопия белков позволяет получать изображения и исследовать 3-мерные структуры протеинов в высоком разрешении, подобно структурным исследованиям твердых тел методами рентгеновской кристаллографии. К примеру, использование метода меченых атомов позволило получить 3D-спектр коллагена, что стало прорывом в современной медицине. В последнее время получают распространение методики получения 4D-спектров и спектров большей размерности, основанные на методах нелинейного семплирования с последующим восстановлением сигнала спада свободной индукции с помощью специальных математических методик.

Как известно исследованием белкового комплекса всего организма как единого целого занимается научная дисциплина – протеомика. В результате комплексных протеомических исследований, появились исчерпывающие базы данных, содержащие

последовательности всех белков человека, а также их протеолитических фрагментов, полученных в стандартных условиях. Обычно, протеомика оперирует большим объемом данных, для обработки которых требуются специализированные алгоритмы и большие вычислительные мощности, что тесно связывает протеомику с биоинформатикой. В настоящее время биоинформатика интенсивно развивающийся метод исследований, использующий методы математического анализа для разработок алгоритмов моделирования структуры белков.

При проведении исследований в направлениях протеомики масс-спектрометрия стала одним из наиболее универсальных инструментов [8] при анализе сложных биологических проб. Этот метод обладает большой чувствительностью, что позволяет его использовать во многих областях, касающихся молекулярной биологии, биохимии и протеомики человека. Среди методов масс-спектрометрии, используемых в протеомных исследованиях, масс-спектрометрия ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (ИЦР ПФ) занимает особое место. Главными достоинствами этого метода являются: сверхвысокая разрешающая способность и рекордная точность измерения масс. С помощью современного масс-спектрометра ИЦР ПФ можно однозначно как идентифицировать индивидуальные биомолекулы, так и определять состав их смесей.

Список литературы

1. Владимиров Ю.А. Физико-химические основы фотобиологических процессов / Ю.А. Владимиров, А.Я. Потепенко. – М.: Высш. шк., 1989.
2. Гавалов С.М. Особенности течения заболеваний у детей с недифференцированными (малыми) формами дисплазии соединительной ткани / С.М. Гавалов, В.В. Зеленская, Е.П. Тимофеева, Г.В. Праворотов – Новосибирск, 1998. – 46 с.
3. Дорохова Е.Н., Прохорова Г.В. Аналитическая химия. Физико-химические методы анализа. – М.: Высшая школа, 1991. – 256 с.
4. Кадурина Т.И. Дисплазия соединительной ткани: рук. для врачей / Т.И. Кадурина, В.Н. Горбунова. – СПб: ЭЛБИ-СПБ, 2009. – 701 с.
5. Наследственная патология человека / Под ред. Ю.Е. Вельтищева, Н.П. Бочкова – М., 1992. – Т. 1. – С. 91-162.
6. Огурцов А.Н. Введение в биофизику. – Харьков: Изд-во Харьк. политехн. ин-та, 2008.
7. Практическое руководство по физико-химическим методам анализа / под ред. И.П. Алимарина и В.М. Иванова. – М., 1987, с. 5.
8. Aebersold R., Mann M. Mass spectrometry-based proteomics // Nature. 2003. Mar. 13, v. 422, N 6928. P. 198–207.