БИОФИЗИКА, 2020, том 65, № 6, с. 1154–1160

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

УДК 577.112.7, 543.421/.424

ИНФРАКРАСНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ СЫВОРОТКИ КРОВИ БОЛЬНЫХ ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

© 2020 г. Е.А. Тельная*, Л.В. Плотникова*, А.Д. Гарифуллин, ***, ****, А.Ю. Кувшинов**, ***, ****, С.В. Волошин**, ***, ****, А.М. Поляничко*, *******

**Физический факультет Санкт-Петербургского государственного университета, 199034, Санкт-Петербург, Петергоф, Ульяновская ул., 3*

***Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА России, 191024, Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, 16*

****Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6*

*****Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, 191015, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 4*

******Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий просп., 4*

Эл. почта: a.polyanichko@spbu.ru

Поступила в редакцию 25.01.2020 г.
После доработки 12.07.2020 г.
Принята к публикации 08.07.2020 г.

Проведен сравнительный анализ вторичной структуры белков сыворотки крови больных множественной миеломой, хроническим лимфолейкозом и здоровых доноров. Вторичную структуру белков в составе сыворотки определяли методом инфракрасной спектроскопии. Показано, что предложенный подход позволяет зарегистрировать уменьшение доли α-спиральных участков и рост количества β-слоев в образцах сыворотки крови больных множественной миеломой по сравнению со здоровыми донорами и больными хроническим лимфолейкозом.

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

DOI: 10.31857/S0006302920060150

Множественная миелома (ММ) – онкологическое заболевание крови, характеризующееся наличием в крови так называемого М-белка, обусловленного гиперпродукцией моноклональных иммуноглобулинов, и/или их тяжелых и легких цепей [1–3]. В качестве первичного метода диагностики ММ широко применяется электрофоретический анализ, способный выявить присутствие М-белка в виде хорошо разрешимой фракции [4]. Постановка окончательного диагноза требует, однако, проведения дорогостоящих иммунологических исследований. Вместе с тем такой подход позволяет выявить лишь около 80% случаев заболевания, в основном на поздних стадиях [5, 6]. В настоящее время во всем мире ведется активный поиск альтернативных подходов выявления заболевания, в особенности на более ранних стадиях.

Развитие ММ сопровождается существенными изменениями протеома крови. Гиперпродукция М-белка приводит к сильному увеличению содержания иммуноглобулинов и их фрагментов. Параллельно у больных ММ может наблюдаться падение содержания сывороточного альбумина в крови [4]. Будучи наиболее многочисленными белками в составе сыворотки крови иммуноглобулины и альбумины обладают различной вторичной структурой. Так, сывороточный альбумин на две трети состоит из участков в α-спиральной конформации [7, 8] тогда как во вторичной структуре IgG более 70% приходится на β-слои [9, 10]. Таким образом, мы полагаем, что при гиперпродукции М-белка будет изменяться не только содержание патологического белка в сыворотке крови, но и среднее относительное содержание полипептидных цепей с различной вторичной структурой.

Одним из методов, позволяющих оценить вторичную структуру белков в составе концентрированных неоднородных смесей, является инфракрасная (ИК) спектроскопия [11–19]. Ранее нами была продемонстрирована принципиальная возможность различать образцы сыворотки крови больных ММ и здоровых доноров по их ИК-спек-

Сокращения: ММ – множественная миелома, ИК – инфракрасная, ХЛЛ – хронический лимфолейкоз, НПВО – нарушенное полное внутренне отражение.

Таблица. 1. Соответствие положения основных полос в разложении «амид I» различным типам вторичной структуры полипептидной цепи

Структура:	H_2O	D_2O
α-спирали	1650–1657 $см^{-1}$	1649–1656 $см^{-1}$
3_{10}-спирали	1656–1663 $см^{-1}$	–
β-слои (антипараллельные)	1612–1640 $см^{-1}$ Особо выражены: 1624 ± 2 $см^{-1}$, 1627 ± 2 $см^{-1}$, 1633 ± 2 $см^{-1}$	1630 ± 2 $см^{-1}$
β-слои (параллельные)	1626–1640 $см^{-1}$ Особо выражены: 1627 ± 2 $см^{-1}$, 1633 ± 2 $см^{-1}$	1630 ± 2 $см^{-1}$
Повороты	1662–1696 $см^{-1}$ Особо выражены: 1667 ± 2 $см^{-1}$, 1675 ± 2 $см^{-1}$, 1680 ± 2 $см^{-1}$, 1685 ± 2 $см^{-1}$, 1691 ± 2 $см^{-1}$	1663 ± 2 $см^{-1}$ 1671 ± 2 $см^{-1}$ 1683 ± 2 $см^{-1}$ 1689 ± 2 $см^{-1}$
Неупорядоченная структура	1640–1651 $см^{-1}$	1645 ± 4 $см^{-1}$

трам [16, 20]. В данной работе на основе существенно более обширной выборки проводится сравнительный анализ вторичной структуры белков в составе сыворотки крови больных множественной миеломой, хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) и здоровых доноров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение образцов сыворотки крови. Для получения образцов сыворотки крови использовали пробирки S-Monovette (Sarstedt, Германия) с активатором свертывания. Собранные образцы крови оставляли в пробирках в течение 20–30 мин при комнатной температуре (18–24°C), после чего центрифугировали в течение 15 мин при скорости 3000 об/мин (1000 *g*) на центрифуге Heraeus Labofuge 200 (Thermo Scientific, США). До проведения физико-химических исследований образцы замораживали и хранили при температуре −30°C.

ИК-спектры нарушенного полного внутреннего отражения регистрировали на ИК-Фурье-спектрометре Nicolet 8700 (Thermo Scientific, США), оснащенном приставкой однократного нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) на основе кристалла алмаза, а также низкошумящим MCT(HgCdTe)-детектором. Оптические пути продували сухим воздухом. Спектры регистрировали в диапазоне 4000–600 $см^{-1}$ с разрешением 2 $см^{-1}$. Каждый спектр усредняли по 128-ми накоплениям. Коррекцию базовой линии и обработку спектров проводили по описанной ранее методике [15].

Спектры ИК-поглощения регистрировали в растворах D_2O, изотопное замещение растворителя проводили согласно описанной ранее методике [18]. Измерения проводили на приборе Tensor27 (Bruker, Германия) в разборных кюветах на основе кристаллов BaF_2 с длиной оптического пути 50 мкм. Спектры регистрировали с шагом 2 $см^{-1}$ в диапазоне 4000–800 $см^{-1}$. Первичную обработку и анализ спектров проводили с использованием программного обеспечения, поставляемого с прибором.

Анализ вторичной структуры проводили путем разложения полосы «амид I» на составляющие на основе анализа спектра второй производной по описанной ранее методике [15, 16]. Каждый полученный контур в разложении сопоставляли с определенным типом вторичной структуры (табл. 1) согласно полученным ранее отнесениям [11, 12, 21–24]. Долю каждого типа вторичной структуры в общей структуре белка определяли по доле площади соответствующего контура в полосе «амид I». Полученные результаты основаны на анализе ИК-спектров образцов сыворотки крови 60 здоровых доноров, 45 пациентов с диагнозом ММ и 15 пациентов с диагнозом ХЛЛ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поглощение белковых молекул в среднем ИК-диапазоне обусловлено в первую очередь колебаниями в пептидной связи. Эти колебания проявляются в спектрах в виде нескольких широких полос, известных как полосы «амид». Наиболее информативными при анализе вторичной структуры белков являются колебания групп C=O и N—H пептидной связи [15, 25, 26]. Наиболее воспроизводимые результаты позволяет получить анализ суперпозиции колебаний карбонильных групп, проявляющейся в спектре в виде полосы «амид I» в окрестности 1650 $см^{-1}$.

На практике регистрация ИК-спектров водных растворов белков осложняется сильным по-

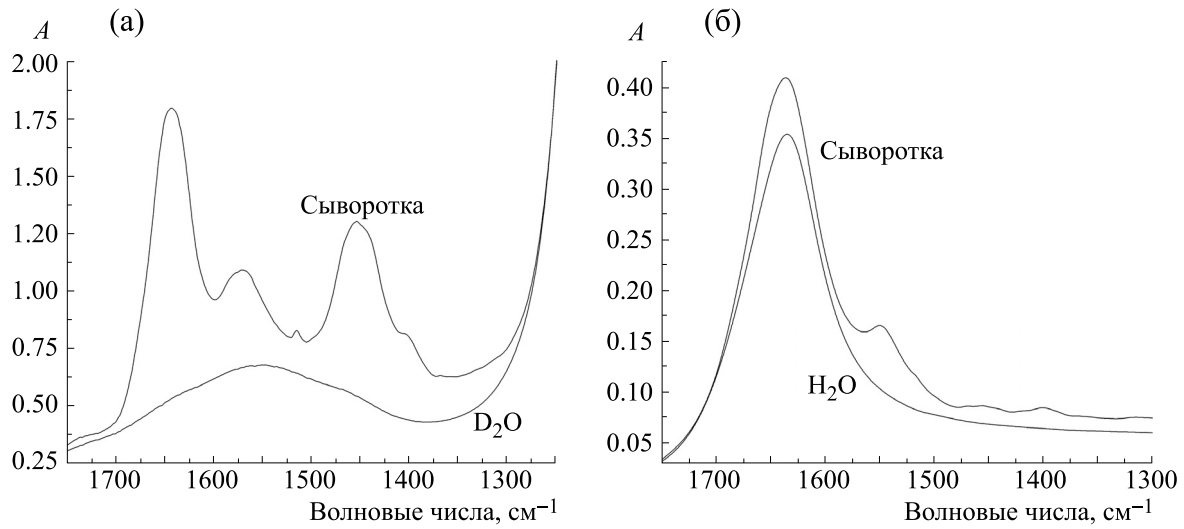

Рис. 1. Спектры ИК-поглощения сыворотки крови при измерении методом НПВО в D_2O (а) и в воде (б): *1* – спектр сыворотки, *2* – спектр растворителя.

глощением воды (H_2O) в этой области спектра. Одним из возможных путей анализа полосы «амид I» в растворах является использование изотопного замещения растворителя на тяжелую воду (D_2O), у которой в области полосы «амид I» имеется окно прозрачности (рис. 1а). Изотопное замещение позволяет добиться удовлетворительного соотношения сигнал/шум, дает надежное определение вторичной структуры белков в пробе, однако требует довольно длительной пробоподготовки. Другой возможный подход основан на применении метода НПВО. Метод основан на эффекте полного внутреннего отражения электромагнитной волны на границе раздела двух сред. При таком отражении происходит частичное проникновение излучения в приграничные области соседней среды на глубину около четверти длины волны. В результате отраженная волна содержит информацию о свойствах приграничного слоя соседней среды. Вместе с тем зависимость глубины проникновения луча от длины волны требует проведения корректировки абсолютных величин поглощения в различных областях спектра. Поправочная функция будет зависеть не только от длины волны, но и от различия показателей преломления двух сред, а также от угла падения луча. На практике для создания полного внутреннего отражения используют прозрачные в ИК-области материалы с высоким показателем преломления, на поверхность которых наносят исследуемый образец. При такой схеме проведения измерений влияние растворителя оказывается минимальным, вследствие малой глубины проникновения луча в среду. По этой же причине необходимо использовать образцы с достаточно высоким содержанием исследуемого вещества. Высокие концентрации белков в сыворотке крови позволяют использовать данный подход без дополнительной пробоподготовки. Однако в этом случае в спектрах возможно появление артефактов, связанных с ошибками компенсации вклада растворителя (H_2O) (рис. 1б).

В данной работе нами проведен сравнительный анализ ИК-спектров образцов сыворотки крови здоровых доноров, больных ММ и ХЛЛ, как после изотопного замещения (рис. 2а), так и без дополнительной подготовки методом НПВО (рис. 2б). В спектрах поглощения отчетливо выделяются две полосы: полоса «амид I» (1700–1600 $см^{-1}$), соответствующая валентным колебаниям карбонильной группы C=O пептидной связи, а также полоса «амид II» (1600–1500 $см^{-1}$ в растворах H_2O), либо соответствующая ей после изотопного замещения полоса «амид II¢» (1500-1400 $см^{-1}$ в растворах D_2O), происходящие от суперпозиции деформационных колебаний связи N–H (N–D), связанных с валентными колебаниями связи C–N. На рис. 1 отчетливо видно отличие в форме полос «амид I» в спектрах образцов ММ, отражающее изменение относительного содержания участков в α-спиральных и β-слойных конформациях вследствие гиперпродукции иммуноглобулинов. Для определения удельного содержания различных типов вторичной структуры в пробе было проведено разложение полос «амид I» на составляющие методом второй производной [15]. Характерные разложения спектров сыворотки крови здоровых доноров, больных ММ и ХЛЛ представлены на рис. 3 (H_2O) и рис. 4 (D_2O). Отнесения полученных в результате разложения полос представлены в табл. 1. На осно-

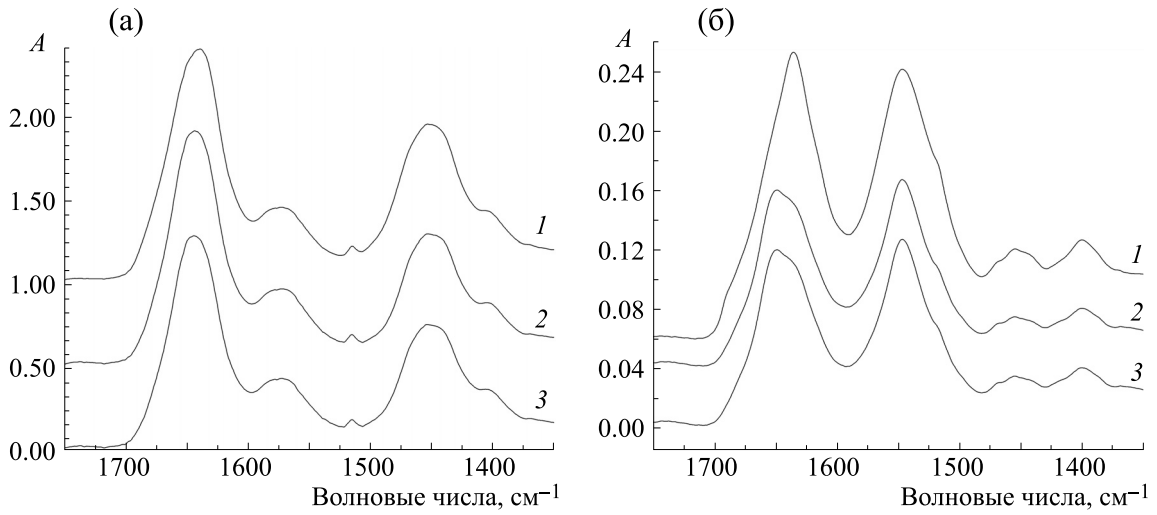

Рис. 2. Спектры ИК-поглощения сыворотки крови при измерении методом НПВО в D_2O (а) и в воде (б): *1* – пациент с ММ, *2* – пациент с ХЛЛ, *3* – здоровый донор.

вании приведенных отнесений было определено среднее содержание каждого типа вторичных структур во всех образцах.

Было установлено, что наиболее информативными при сравнении образцов являются показатели содержания α-спиральных и β-слойных участков (табл. 2). Анализ результатов, полученных с использованием приставки НПВО, показал, что в сыворотке крови здоровых доноров и больных ХЛЛ доминируют полипептидные цепи в α-спиральных конформациях (около 50%), тогда как участки с β-структурами различного типа составляют чуть более 40%. Для образцов больных ММ картина противоположная: доминируют участки с β-структурой (более 50%), тогда как доля α-спиралей падает до уровня ниже 40%. Для описанной выше процедуры анализа вторичной структуры белков по спектрам водных растворов характерна достаточно высокая погрешность в определении содержания α-спиральных участков, обусловленная перекрыванием соответствующей полосы в разложении с полосой поглощения воды. При этом в группе образцов, полученных из сыворотки крови больных ММ, дополнительно наблюдается достаточно высокая гетерогенность, и абсолютные показатели отдельных образцов могут заметно отличаться. Это обусловлено объективными различиями, в том числе различиями в типе и количестве секретируемого М-белка у пациентов с разным типом ММ. Сравнение образцов сыворотки крови больных ММ с результатами анализа второй контрольной группы – больных ХЛЛ, у которых отсутствует гиперпродукция иммуноглобулинов и их фрагментов, выявилJ аналогичные различия. Таким образом, изменения, наблюдаемые в спектрах, обусловлены особенностями развития ММ, а не различиями белкового состава сыворотки крови здоровых доноров от пациентов с произвольной патологией крови.

Анализ ИК-спектров образцов сыворотки крови, подвергавшихся изотопному замещению, дал результаты, полностью аналогичные описанным выше (табл. 2). Для вторичной структуры белков в сыворотке крови пациентов с ММ характерно повышенное по сравнению со здоровыми донорами содержание β-структур ($54 \pm 5\%$) и снижение доли α-спиральных участков ($38 \pm 2\%$). Наиболее наглядно зарегистрированные изменения проявляются при анализе соотношения между основными типами вторичных структур в исследуемых образцах (табл. 2). В частности, соотношение вкладов α-спиральных участков и β-структур дает для здоровых пациентов в среднем величину 1.1 (1.04 ± 0.06 при измерениях методом НПВО и $1\ 13 \pm 0.07$ в растворах D_2O). В то же время для больных ММ этот параметр существенно меньше и составляет в среднем 0.7 (0.7 ± 0.1 при измерениях методом НПВО и 0.70 ± 0.04 в растворах D_2O). Таким образом, оба подхода дали хорошо согласующиеся между собой результаты, что позволяет использовать для экспресс-анализа вторичной структуры белков в составе сыворотки крови метод НПВО без какой-либо дополнительной подготовки образцов. Вместе с тем измерения, проведенные в растворах D_2O, позволили заметно повысить точность определения доли α-спиралей во вторичной структуре белков благодаря отсутствию полос поглощения растворителя в данной области. Как следствие, в умеренно гетерогенных образцах здоровых доноров и пациентов с ХЛЛ при измерениях в D_2O удалось выявить незначительные

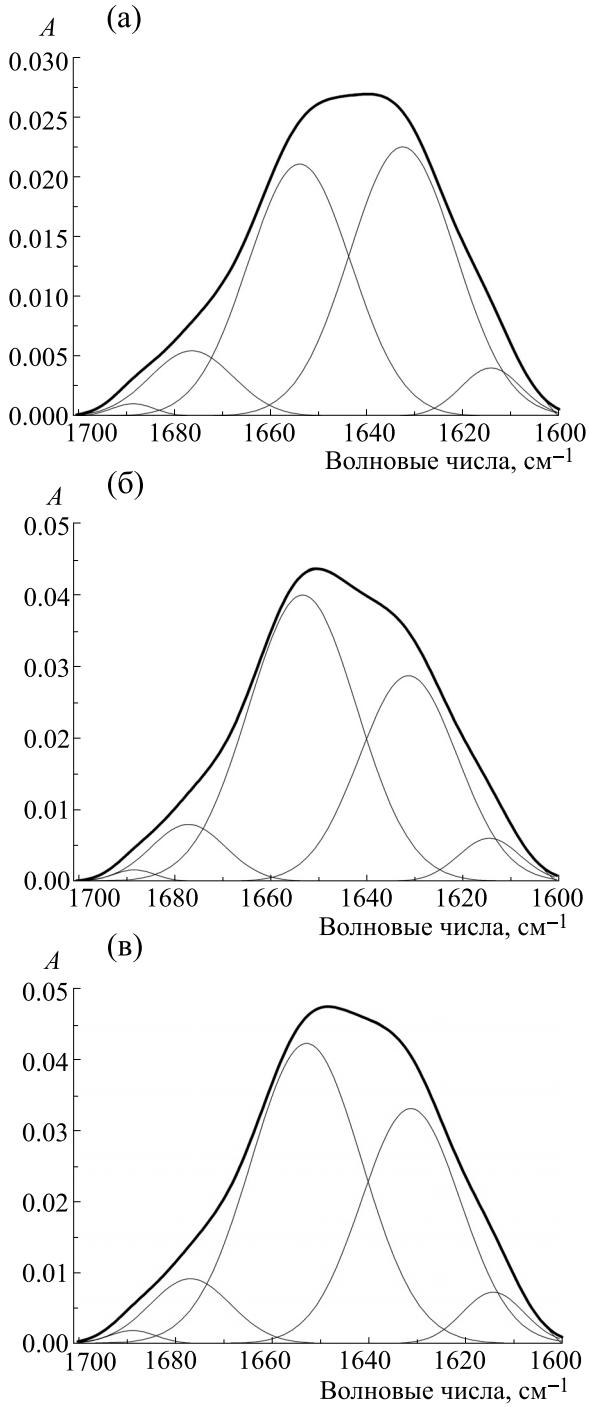

Рис. 3. Пример разложения полосы «амид I» при регистрации спектра методом НПВО: (а) – пациент с ММ, (б) – пациент с ХЛЛ, (в) – здоровый донор.

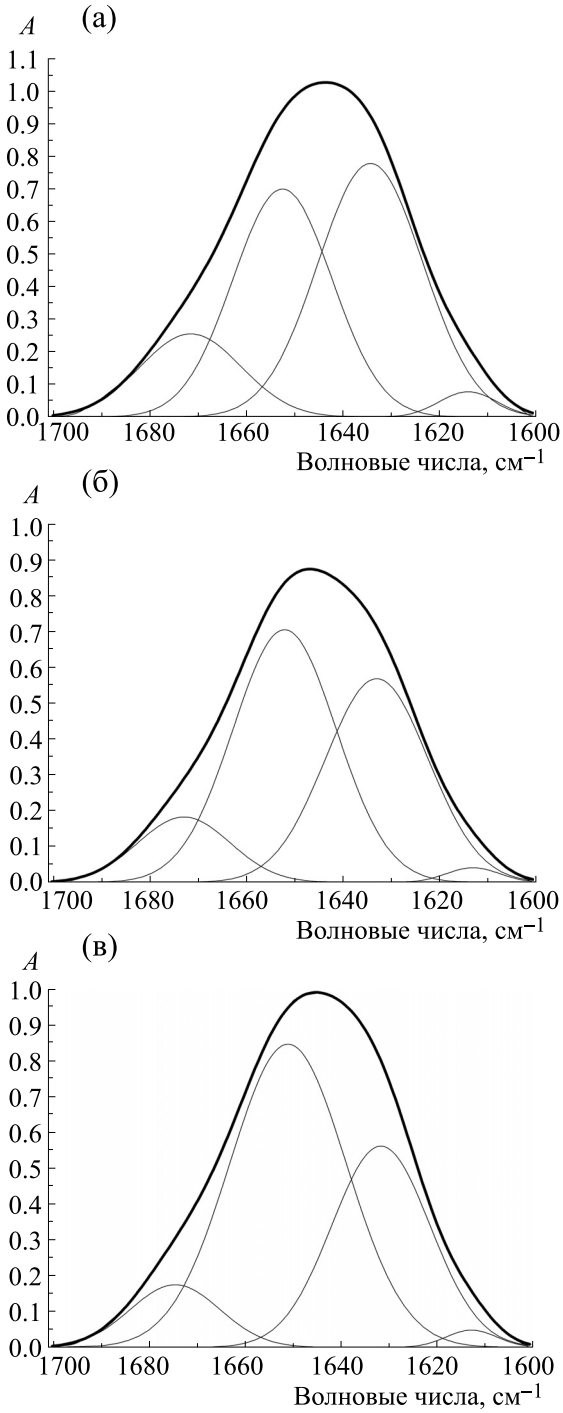

Рис. 4. Пример разложения полосы «амид I» при регистрации спектра в растворе D_2O: (а) – пациент с ММ, (б) – пациент с ХЛЛ, (в) – здоровый донор.

отличия в содержании α-спиральных участков: $54 \pm 2\%$ и $49 \pm 1\%$ соответственно. Наблюдаемое снижение доли α-спиральных участков у пациентов с ХЛЛ может быть следствием понижения уровня сывороточного альбумина в сыворотке крови при развитии заболевания. Снижение уровня сывороточного альбумина в крови может наблюдаться при различных заболеваниях и не является уникальной особенностью ХЛЛ. Данное обстоятельство с нашей точки зрения указывает на перспективность использования данного подхода при изучении и диагностике более широкого круга заболеваний.

Таблица 2. Процентное содержание участков в α-спиральных и β-слойных конформациях и их соотношение в образцах сыворотки крови

Тип вторичной структуры:		Здоровые доноры	Больные ММ	Больные ХЛЛ
α-спирали	НПВО	49 ± 3%	38 ± 8%	51 ± 2%
	D_2O	54 ± 2%	38 ± 2%	49 ± 1%
β-структуры	НПВО	47 ± 2%	54 ± 5%	46 ± 2%
	D_2O	48 ± 3%	54 ± 5%	46 ± 2%
α/β	НПВО	1.04 ± 0.06	0.7 ± 0.1	1.11 ± 0.05
	D_2O	1.13 ± 0.07	0.70 ± 0.04	1.07 ± 0.04

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Соответствие результатов, полученных в двух различных сериях экспериментов, позволяет заключить, что оба подхода оказываются пригодными для определения вторичной структуры белков в составе сыворотки крови. Полученные нами результаты указывают на то, что ИК-спектроскопия позволяет выделять образцы сыворотки крови пациентов с диагнозом ММ на фоне здоровых доноров. Можно также заключить, что при гиперпродукции моноклональных иммуноглобулинов в сыворотке крови больных ММ удается наблюдать увеличение доли полипептидных цепей в β-слойных конформациях на 6–9% и уменьшение доли α-спиральных участков на 8–16%. Данные различия можно наблюдать путем прямого анализа ИК-спектра сыворотки крови в области полосы «амид I» без какой-либо дополнительной пробоподготовки образца. Вместе с тем результаты наших наблюдений показали, что имеются также небольшие различия в спектрах здоровых доноров и больных ХЛЛ, которые нам удалось выявить только при измерениях в растворах D_2O.

БЛАГОДАРНОСТИ

Часть работ была выполнена с использованием оборудования ресурсных центров научного парка СПбГУ («Оптические и лазерные методы исследования вещества» «Центр диагностики функциональных материалов для медицины фармакологии и наноэлектроники», «Нанотехнологии», «Криогенный отдел»).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-08-01500).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствовали этическим стандартам Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям. От участников исследования было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. K. Kumar, V Rajkumar, R. A. Kyle, et al., Nat. Rev. Dis. Prim. **3**, 17046 (2017).
2. C. Röllig, S. Knop, M. Bornhäuser, et al., Lancet **385** (9983), 2197 (2015).
3. S. V. Rajkumar, Am. J. Hematol. **93** (8), 1091 (2018).
4. Л. П. Менделеева, О. М. Вотякова, О. С. Покровская и др., Гематология и трансфузиология **61** (1–2), (2016).
5. R. A. Kyle, S. V. Rajkumar, et al., Leukemia **23** (1), 3 (2009).
6. С. С. Бессмельцев, Клин. онкогематология **6** (3), 237 (2013).
7. K. A. Majorek, P. J. Porebski, A. Dayal, et al., Mol. Immunol. **52** (3–4), 174 (2012).
8. A. A. Bhattacharya, T. Grüne, S. Curry, et al., J. Mol. Biol. **303** (5), 721 (2000).
9. H. R. Costantino, J. D. Andya, J. D. Shire, et al., Pharm. Sci. **3** (3), 121 (1997).
10. L. J. Harris, S. B. Larson, K. W. Hasel, et al., Biochemistry **36** (7), 1581 (1997).
11. H. Yang, S. Yang, and J. Kong, Nat. Protoc. **10** (3), 382 (2015).
12. G. E. Trante, in *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, (Academic Press, Amsterdam, Netherlands, 2017), pp. 740–758.

13. I. Rehman, Z. Movasaghi, and S. Rehman, in *Vibration spectroscopy for tissue analysis* (CRC Press, New-York, USA, 2013), pp 356.
14. L. Benezzeddine-Boussaidi, G. Cazorla, and A. M. Melin, Clin. Chem. Lab. Med. **47** (1), 83 (2009).
15. A. M. Polyanichko, N. M. Romanov, T. Y. Starkova, et al., Cell Tissue Biol. **8** (4), 352 (2014).
16. L. V. Plotnikova, A. M. Polyanichko, T. Nosenko, et al., AIP Conference Proceedings **1760**, 020052 (2016).
17. A. M. Polyanichko and H. Wieser, Biopolymers **78** (6), 329 (2005).
18. A. M. Polyanichko, V. V. Andrushchenko, E. V. Chikhirzhina, et al., Nucl. Acids Res. **32** (3), 989 (2004).
19. T. S. Sych, Z. V. Reveguk, V. A. Pomogaev, et al., J. Phys. Chem. C **122** (51), 29549 (2018).
20. L. V. Plotnikova, M. O. Kobeleva, E. V. Borisov, et al., Cell and Tissue Biology **13** (2), 130 (2019).
21. M. K. Bellamy, J. Chem. Educ. **87** (12), 1399 (2010).
22. A. Barth, Biochim. Biophys. Acta **1767** (9), 1073 (2007).
23. E. Goormaghtigh, V. Cabiaux and J. M. Ruysschaert, Subcell. Biochem. **23**, 405 (1994).
24. J. Kong and S. Yu, Acta Biochim. Biophys. Sin. **39** (8), 549 (2007).
25. A. Barth and C. Zscherp, Q. Rev. Biophys. **35** (4), 369 (2002).
26. K. Murayama and M. Tomida, Biochemistry **43** (36), 11526 (2004).

Infrared Spectroscopy of Serum from Patients with Oncohematological Diseases

E.A. Telnaya*, L.V. Plotnikova*, A.D. Garifullin, ***, ****, A.Yu. Kuvshinov**, ***, ****, S.V. Voloshin**, ***, ****, and A.M. Polyanichko*, *******

**Department of Physics, St. Petersburg State University, Uljanovskaya ul. 3, Peterhof, St. Petersburg, 199034 Russia*

***Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, Federal Biomedical Agency of the Russian Federation, ul. 2-ya Sovetskaya 16, St. Petersburg, 191024 Russia*

****Military Medical Academy named after S.M. Kirov, ul. Akademika Lebedeva 6, St. Petersburg, 194044 Russia*

*****North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, ul. Kirochnaya, 4, St. Petersburg, 191015 Russia*

******Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Tikhoretskii prosp. 4, St. Petersburg, 194064 Russia*

A comparative analysis was performed of the secondary structure of serum proteins in patients with multiple myeloma, chronic lymphocytic leukemia patients and healthy donors. Determination of serum protein secondary structure was accomplished by the application of IR spectroscopy. It has been shown that the proposed approach allows to detect a decrease in the length of α-helical regions and an increase in the content of β-sheets in the serum of patients with multiple myeloma compared to healthy donors and chronic lymphocytic leukemia patients.

Keywords: IR spectroscopy, multiple myeloma, protein secondary structure