

Протеомные исследования в ревматологии

А.А. Новиков, Е.Н. Александрова, Е.Л. Насонов

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт ревматологии» РАМН, Москва

Research Institute of Rheumatology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Контакты: Александр Александрович Новиков
aleksandrovaen@irramn.ru

Contact: Aleksandr Aleksandrovich Novikov
aleksandrovaen@irramn.ru

Поступила 23.07.12



А.А. Новиков — ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии и молекулярной биологии ФГБУ «НИИР» РАМН, к.б.н.



Е.Н. Александрова — заведующая лабораторией иммунологии и молекулярной биологии ФГБУ «НИИР» РАМН, д.м.н.



Е.Л. Насонов — директор ФГБУ «НИИР» РАМН, академик РАМН, д.м.н.

Введение

В ходе развития молекулярной биологии стало очевидным, что процессы, протекающие в организме на генетическом, клеточном и онтогенетическом уровнях, невозможно полностью описать, основываясь только на геномных исследованиях [1–3]. Не менее важной является информация о свойствах белков и их роли в живых системах. Появление высокотехнологичных методов, позволяющих идентифицировать первичную структуру и посттрансляционные модификации белка, определить белковый состав биологических объектов, обусловило быстрое развитие протеомики [4]. Протеомные исследования в ревматологии могут преследовать ряд задач, таких как поиск диагностических биомаркеров, идентификация терапевтических мишеней и разработка методов оценки эффективности терапии [5].

Протеомные методы

Двумерный (2D) гель-электрофорез и масс-спектрометрический (MS) анализ являются основными методами для изучения посттрансляционных модификаций белков и поиска биомаркеров [6–9].

2D-гель-электрофорез — метод разделения смеси белков, основанный на использовании их электрических зарядов и молекулярных масс. Хорошо зарекомендовав себя при скрининговых исследованиях и работе с эукариотами, обладающими небольшим количеством закодированных в геноме белков, в области изучения протеома человека данный метод оказался менее эффективным. Анализ многокомпонентных белково-пеп-

тидных смесей, обладающих различными физико-химическими свойствами, с помощью 2D-гель-электрофореза часто не приводит к желаемым результатам. Считается, что для разделения белков более целесообразно использовать многостадийные технологии с преимущественным использованием 2D-хроматографии, специализированных хроматографических чипов и их комбинаций с такими технологическими приемами, как твердофазная экстракция, осаждение, ионообмен и т. д. [10, 11].

Поиск и валидация биомаркеров заболеваний невозможны без количественного профилирования биологических образцов. MS — физико-химический вид анализа, заключающийся в ионизации молекул исследуемого образца с последующим разделением и регистрацией образующихся ионов [12]. Наиболее часто используются время-пролетная (time of flight, TOF) MS, матрица-ассоциированная лазерная десорбция-ионизация (matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI) и усиленная поверхностью лазерная десорбция-ионизация (surface-enhanced laser desorption/ionization, SELDI) [13, 14]. Однако эти методы имеют ряд ограничений, основным из которых является низкий динамический диапазон измерения молекулярных масс. В связи с этим стали развиваться технологии количественной оценки пептидов/белков, использующие изотопные метки, а также методы, стандартизирующие хроматографическое разделение или использующие внутренние пептидные стандарты для калибровки. Одновременно совершенствуются гибридные технологии,

где хроматографическое разделение пептидов/белков сочетается с MALDI-TOF MS [8].

Белковые микрочипы (биочипы)

Биочипы, способные проводить быстрое сверхчувствительное определение множества аналитов в одном образце, широко применяются в протеомных исследованиях, демонстрируя огромный потенциал в идентификации и изучении функций белков с точки зрения протеома в целом [13–15]. Их функционирование основано на способности биологических макромолекул к высокоспецифичному связыванию с другими молекулами [16, 17]. В зависимости от цели использования биочипы можно разделить на аналитические и функциональные. Аналитические служат для выявления белковых профилей в биологических жидкостях и тканях; функциональные используются для изучения биохимических особенностей протеома [15, 18, 19]. Аналитическая чувствительность биочипов примерно в 2 раза выше, чем при иммунофлуоресцентном и иммуноферментном анализе (ИФА) [20]. Однако их специфичность и аффинность сильно зависят от природы белка: структуры, размера, наличия гидрофобных или гетерофильных боковых цепей, посттрансляционных модификаций [16]. Главным элементом биочипов является совокупность микроячеек (планарные микрочипы) или суспензия кодируемых микроносителей, содержащих молекулярные зонды (суспензионные микрочипы), специфичные к одной из множества биологических молекул или их фрагментов (последовательностям ДНК, РНК, белкам) [16, 21–24]. В планарных биочипах процесс идентификации исследуемых объектов основан на определенном пространственном расположении зондов или использовании индивидуальных меток. Биочипы при размере <1 см² могут содержать до 10 тыс. белковых зондов, количество которых возможно увеличивать, используя нанопроточные устройства, нанолитографию и микроконтактную печать [3, 25, 26]. Планарные биочипы подходят для параллельного выполнения множества индивидуальных тестов. Однако при их использовании скорость получения и качество результатов ограничены свойствами плоской подложки.

Суспензионные биочипы обладают целым рядом преимуществ перед планарными, они лишены диффузных ограничений, обладают лучшими кинетическими и сепарационными свойствами [21–24, 27]. Кроме того, возможность создавать суспензии из микроносителей с различной кодировкой позволяет гибко адаптировать суспензионные биочипы под условия конкретного эксперимента [28]. Для кодировки микросфер используют спектрометрический, графический, электронный и физические методы (табл. 1) [22, 29–58].

Поиск биомаркеров ревматических заболеваний

Биомаркером принято считать показатель, который можно объективно измерить, оценить и использовать в качестве индикатора нормального или патологического процесса в организме либо ответа на проводимую терапию [57, 58]. Теоретически каждое заболевание должно обладать своим уникальным биомаркером [59, 60]. «Идеальный» биомаркер должен иметь высокую диагностическую чувствительность (ДЧ), специфичность (ДС) и позволять поставить верный диагноз даже в отсутствие клинических признаков заболевания [61]. Простота использования, стандартизация, возможность четкой интерпретации являются основными условиями успешного внедрения биомаркера в клиническую практику [62].

В основе стратегии поиска биомаркеров лежит выявление из общего количества исследуемых показателей так называемых кандидатных, обладающих наилучшими ДЧ и ДС. В процессе исследования пропорционально снижению числа кандидатных биомаркеров должно возрастать количество анализируемых образцов, что создает определенные проблемы в связи с отсутствием соответствующего высокопроизводительного оборудования [60–64]. Так, при выявлении профиля из 1000 белков методом жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии (LS/MS) один образец можно обработать лишь за сутки. В результате в исследование редко включают более 10 образцов биоматериала, что не позволяет провести полноценный статистический анализ, однако в большинстве случаев этот факт исследователями игнорируется [63, 65]. Несмотря на большое количество выявленных кандидатных биомаркеров

Таблица 1 Мультиплексные протеомные технологии

Тип биочипа	Тип твердой фазы	Метод детекции	Расчетное количество одновременно измеряемых аналитов	Количество протестированных аналитов	Источник
Планарный	Полистироновый микрочип		20	14	[45, 46]
		Флуоресценция	>10 000	115	[47]
	Модифицированный слайд		>10 000	196	[48]
	для микроскопии	Адресный параллельный химический синтез	>10 000	–	[49]
		Хемилюминесценция	>5000	18	[50]
	Микроплата, мембранный ПВДФ-фильтр		>10 000	4800	[51, 52]
	Микроплата	Колориметрический (PISA)	96	15	[53]
	Нитроцеллюлозная мембрана	Дот-блоттинг (UPA)	≈200	48	[54]
Суспензионный	Полиэтиленовые микростержни, микроплата	ИФА	96	96	[55, 56]
	Микросферы	Проточная цитофлуориметрия	100	16	[29]
	Микрочастицы с нанобаркодом	Световая микроскопия, флуоресценция, MS	80 000	2	[38]

Примечание. ПВДФ – поливинилденфторид, PISA – определение белка *in situ*, UPA – универсальный анализ белков.

различных заболеваний, основное их количество обладает небольшим клиническим значением. Следующим шагом является валидация кандидатных биомаркеров, при которой уже используются сотни образцов биоматериала и в каждом определяется порядка 10 аналитов. На данном этапе применяются иммунологические методы исследований, ограничением которых является отсутствие качественных антител. Альтернативным методом может служить MS, недостатком которого является существенная длительность исследования: на анализ одного образца требуется около 1 ч и в среднем 40 дней на все исследование (см. табл. 1) [60–65].

Большинство выявляемых маркеров относятся к белкам острой фазы воспаления или синтезируются в ответ на внешние стрессовые факторы (например, медикаментозную терапию). Эти белки, составляя основную массу в сыворотке/плазме, мешают выделению истинных болезнеспецифических показателей.

В фазе клинической апробации, когда необходимо исследовать тысячи образцов, а MS уже не эффективна в связи с плохим сочетанием производительности и точности, используются методы, обладающие большой пропускной способностью, позволяющие тестировать максимальное возможное количество аналитов в одном образце [66].

К настоящему времени не удалось обнаружить лабораторный маркер, который выявлялся бы только при одном конкретном ревматическом заболевании (РЗ), поэтому с целью повышения диагностической точности в лабораторной практике начинают применяться диагностические индексы, полученные путем многопараметрического анализа *in vitro* (In Vitro Diagnostic Multivariate Index Assay, IVDMA). При их разработке следует учитывать ряд рекомендаций, выполнение которых приводит к повышению аналитической и клинической точности результатов. Необходимо строгое соблюдение правил преаналитического этапа для всех биологических образцов, включенных в исследование. Для получения достоверных результатов отношение числа образцов биоматериала к количеству исследуемых биомаркеров должно быть не менее 10:1. Кроме того, важно оценить аналитическую и диагностическую точность каждого биомаркера отдельно (табл. 2).

Приводим критерии качества и достоверности IVDMA [67–70].

Критерии качества IVDMA

1. Оценка аналитических характеристик (точность, чувствительность, линейность, воспроизводимость и др.) каждого биомаркера.

2. Соответствие ДЧ и ДС каждого аналита таковой при его индивидуальном определении.

3. Меньшая длительность исследования, чем суммарно затраченное время на определение всех аналитов по отдельности.

4. Клиническая информативность комбинации определяемых аналитов.

Критерии достоверности IVDMA

1. Демографическая и клиническая сопоставимость всех групп лиц, включенных в исследование.

2. Стандартизация преаналитического этапа.

3. Достаточное для корректной статистической обработки (создания индекса) количество биообразцов.

4. Подтверждение ДЧ и ДС теста (помимо групп больных, входящих в эксперимент) в общей популяции.

5. Сопоставимость диагностической точности индекса с таковой всех входящих в него компонентов.

6. Диагностическая эффективность теста должна быть выше, чем у рутинно применяющегося однопараметрического теста.

Поиск новых биомаркеров РЗ, обладающих высокой диагностической точностью, является важной задачей современной ревматологии (табл. 3) [71, 72].

При исследовании мочи пациентов с системной красной волчанкой (СКВ) у лиц с люпус-нефритом было выявлено повышение уровней гепсидина, сывороточного амилоида Р (САР), простагландина D₂ (ПГД₂), супероксиддисмутазы (СОД), ренина и протеазы [73–75]. Протеомный состав слюнных желез больных синдромом Шегрена (СШ) характеризовался гиперэкспрессией таких белков, как β-актин, α-дефенсин, кальмодулин, кальгранулин и кератин. Повышенный уровень последнего ассоциировался с поражением ацинарных клеток, а содержание кальмодулина и кальгранулина отражало активность воспалительного процесса [76]. У пациентов с остеоартрозом (ОА) в хондроцитах хряща при помощи 2D-гель-электрофореза и MS было идентифицировано 20 белковых кандидатных маркеров заболевания. Однако при дальнейших исследованиях наличие диагностического значения подтвердилось только для сериновой протеазы (HttA1), коллагена и виментина [77–80]. A. Claudon и соавт. [45] с помощью планарных микрочипов выявили снижение таких маркеров костного метаболизма, как CTX-1, PINP и остеокальцин у 56 женщин в постменопаузе с остеопорозом на фоне терапии ибандронатом после 6 мес применения препарата.

В результате протеомных исследований синовиальной ткани, а также сыворотки и плазмы крови при ревма-

Таблица 2 Этапы поиска биомаркеров

Этап	Основные методы	Количество биообразцов	Количество белков/пептидов
Поиск кандидатных биомаркеров	2D-гель-электрофорез, ВЭЖХ, MS	≈10–100	>1000
Валидация кандидатных биомаркеров:			
оценка ДЧ	MS/MS	≈200–500	≈100
оценка ДС	ИФА, MRM	≈200–500	≈10–50
Клиническая апробация:			
оценка диагностической точности в широкомасштабных исследованиях	Биочипы, MRM	>1000	≈10

Примечание. MS/MS – масс-спектрометрия/масс-спектрометрия, MRM – мониторинг множественных реакций, ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография.

тоидном артрите (РА) с использованием MS было выявлено около трех десятков белков, ассоциирующихся с заболеванием [88, 89]. Особый интерес вызвали сывороточный амилоидный белок А (САА), супероксиддисмутаза (СОД), триоз-фосфат изомераз (ТФИ), так как их повышение было выявлено независимыми исследователями. Установлено, что, в отличие от других РЗ, при РА более часто обнаруживается белковый гетерокомплекс S100A8/S100A9 [90, 91]. К. Raza и соавт. [92], используя суспензионные биочипы провели исследование цитокинового профиля синовиальной жидкости у больных РА и пациентов с другими вариантами неревматоидного персистирующего артрита на ранней стадии развития. Авторами показано транзитное

увеличение концентрации интерлейкина 2 (ИЛ2), ИЛ4, ИЛ13, ИЛ17, ИЛ15, фактора роста фибробластов β (ФРФ β) и эпидермального фактора роста (ЭФР) у больных с ранним РА и повышение уровня интерферона γ (ИФ γ) при недифференцированном и псориатическом артрите. W. Huebner и соавт. [93] выявили при раннем РА достоверное увеличение концентрации провоспалительных цитокинов: ИЛ1 β , фактора некроза опухоли α (ФНО α), ИЛ12p40, ИЛ13 и хемокинов: ИФ γ -индуцибельного белка (ИБ10), моноцитарного хемоаттрактантного белка (МХБ1), эотаксина, а при псориатическом артрите и спондилоартрите – ИЛ8. S. Syversen и соавт. [94] сделали вывод об ассоциации содержания эотаксина в сыворотке крови

Таблица 3 Протеомные маркеры РЗ

Заболевание	Биологический материал	Метод	Протеомные маркеры	Источник
РА	Сыворотка крови	SELDI-TOF	САА*	[81]
		TMS	Кальгранулин* А, В* и С*	[97]
	Плазма крови	FT/MS	Актин, кальгранулин А*, В* и С*, талин 1, тимозин β 4, виментин*	[82]
		2D-гель-электрофорез, MALDI-TOF	Коактозин-подобный белок-1*	[83]
		SELDI-TOF	Аполипопротеин А-1*, тромбоцитарный фактор 4*	[86]
		2D-гель-электрофорез	САА*	[87]
	Синовиальная жидкость/ткань	TMS	Кальгранулин А*, нейтрофильный галактиназа-ассоциированный липокалин*, ТФИ*	[88]
		MALDI-TOF	Нейтрофильный галактиназа-ассоциированный липокалин*, кальгранулин А*, В, α -энолаза*, аннексин*, СОД*, катепсин D*, АТФаза эндоплазматического ретикулума, пероксиридоксин 2*, трансглутаминаза 2, гомолог Tubby-протеина, тиоредоксин домен-содержащий протеин 5*	[98, 99]
	Цереброспинальная жидкость	2D-электрофорез	Сератотрансферрин, транстиретин, простангландин-D-синтетаза	[100]
	Слюна	MALDI-TOF	6-фосфоглюконат дегидрогеназа, белки семейства 14-3-3*, аполипопротеин А*, кальгранулин А* и В, эпителиальный белок, связывающий жирные кислоты*, GRP78/BiP-белки*, пероксиридоксин-2*	
ОА	Синовиальная ткань	SELDI, DESI	Алкоголь-дегидрогеназа, аденилат-киназы изонезим 1, аннексин-1*, коллаген I* и VI* типа	[101]
	Хрящевая ткань	LTQ-FT/MS	α -Энолаза, флавин-редуктаза, Hsp-27*, HtrA1*, пируват-киназы изонезим M1/M2, фосфатидилэтаноламин-связывающий белок, тиоредоксин-зависимая пероксид-редуктаза, виментин*	[102]
	Хондроциты	MALDI-TOF	Реактивные формы кислорода, супероксиддисмутаза-2, митохондриальная супероксиддисмутаза, ассоциированный с рецептором ФНО белок-1	[103]
		2D-гель-электрофорез	Виментин	[104]
	Сыворотка крови	TMS	Предшественник гаптоглобина*	[105]
АС	Мононуклеары периферической крови	УВЭЖХ/ESI	Кератин, белок – активатор протеосомы 20S, супероксиддисмутаза*	[106]
СКВ	Моча	SELDI-TOF	Гепсидин-20*, -25*,	[73]
		2D-гель-электрофорез	Простагландин D2*, ренин*, сывороточный амилоидный белок Р*, супероксиддисмутаза*, протеазы*	[74]
СШ	Слюна	2D-гель-электрофорез	α -Амилаза*, α -дефенсин*, амилаза (профермент), β -актин*, кальгранулин А* и В*, карбоангидраза, предшественник цистатина*, белок, связывающий жирные кислоты, глутатион, кератин*, ингибитор лейкоцитарной эластазы, пролактин-индуцируемый белок, сывороточный альбумин, витамин D	[107, 108]
		ВЭЖХ/ESI	α -Дефенсин*	[109]
	Слюнные железы	ESI/ TMS	α -Дефенсин*, кальмодулин*	[76]

Примечание. АС – анкилозирующий спондилит, SELDI – усиленная поверхностью лазерная десорбция-ионизация, TMS – тандемная масс-спектрометрия, FT/MS – квадрупольная масс-спектрометрия, УВЭЖХ – ультравысокоэффективная жидкостная хроматография, DESI – десорбционная ионизация под действием электрораспыления, LTQ-FT/MS – гибридная масс-спектрометрия: линейная квадрупольная ионная ловушка – ионно-циклотронный резонанс с преобразованием Фурье, ESI – ионизация электрораспылением. * – маркер описан в нескольких независимых исследованиях.

с рентгенологической прогрессией суставной деструкции. W. Jager и соавт. [95] выявили повышение уровня ФНО α , фактора, ингибирующего миграцию макрофагов, МХБ1, макрофагального воспалительного белка (МВБ1 α), эотаксина-1, макрофаг-производного хемокина и CXCL9 в плазме крови больных ювенильным идиопатическим артритом. При этом в синовиальной жидкости увеличение концентрации ИЛ6, ИЛ8, ИЛ15, МХБ1, МВБ1 α и ИБ10 было более выраженным, чем в плазме.

P. Chandra и соавт. [46] с помощью планарного и суспензионного мультиплексного анализа создали панель из 6 кандидатных антигенов: histone 2B/e, виментин, фибриноген А, олигомерный матриксный протеин хряща (COMP), профилагрин, IgA ревматоидный фактор (РФ), специфичных для РА. ДЧ и ДС данной панели оказались сопоставимыми с показателями для антител к циклическо-

му цитруллинированному пептиду и превышали таковые для РФ. Накопленная к настоящему времени информация об особенностях белкового профиля при РА позволила создать IVDMIA для определения индекса активности болезни, основанный на измерении концентрации 12 ключевых белков (молекулы адгезии сосуда эндотелия 1-го типа, ЭФР, васкулоэндотелиального фактора роста, ИЛ6, ФНОР1, матриксных металлопротеиназ 1 и 3, хрящевого гликопротеина 39, лептина, резистина, САА и С-реактивного белка, ассоциирующихся с определенными компонентами DAS28 [96].

Таким образом, использование современных протеомных технологий, позволяющих модифицировать имеющиеся и создавать новые концепции поиска и валидации биомаркеров, открывает широкие перспективы для развития лабораторной диагностики РЗ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gygi S.P., Rochon Y., Franza B.R. et al. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* 1999;19(3):1720–30.
2. Anderson L., Seilhamer J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis* 1997;18(3–4):533–7.
3. Олейников А.В. Полупроводниковые флуоресцентные нанокристаллы (квантовые точки) в белковых биочипах (обзорная статья). *Биоорг химия* 2011;37(2):171–89.
4. Wasinger V.C., Cordwell S.J., Cerpa-Poljak A. et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 1995;16(7):1090–4.
5. Lambrecht S., Tilleman K., Elewaut D. et al. Proteomics in rheumatology: The beginning of a fairy tale? *Proteomics Clin Appl* 2008;2(3):411–9.
6. Glöckler J., Angenendt P. Protein and antibody microarray technology. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003;797(1–2):229–40.
7. Vanarsa K., Mohan C. Proteomics in rheumatology: the dawn of a new era. *F.1000 Med Rep* 2010;8(2):87.
8. Говорун В.М., Иванов В.Т. Протеомика и пептидомика в фундаментальных и прикладных медицинских исследованиях. *Биоорг химия* 2011;37(2):199–215.
9. Ye Y., Mar E.C., Tong S. et al. Application of proteomics methods for pathogen discovery. *J Virol Methods* 2010;163(1):87–95.
10. Лебедев А.Т. Масс-спектрометрия в органической химии. М.: БИНОМ, 2003;10.
11. Matt P., Fu Z., Fu Q. et al. Biomarker discovery: proteome fractionation and separation in biological samples. *Physiol Genomics* 2008;33(1):12–7.
12. Anderson N.L., Anderson N.G. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* 2002;1(11):845–67.
13. MacBeath G. Protein microarrays and proteomics. *Nat Genet* 2002;32(Suppl):526–32.
14. Stoll D., Templin M.F., Schrenk M. et al. Protein microarray technology. *Front Biosci* 2002;1(7):13–32.
15. Zhu H., Bilgin M., Bangham R. et al. Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science* 2001;293(5537):2101–5.
16. Чечеткин Д.В., Прокопенко Д.В., Макаров А.А. и др. Биочипы для медицинской диагностики. *Росс нанотехнол* 2006;1(1,2):13–27.
17. Ройт А. Основы иммунологии. М.: Мир, 1991;328.
18. Kader H.A., Tchernev V.T., Satyaraj E. et al. Protein microarray analysis of disease activity in pediatric inflammatory bowel disease demonstrates elevated serum PLGF, IL-7, TGF-beta1, and IL-12p40 levels in Crohn's disease and ulcerative colitis patients in remission versus active disease. *Am J Gastroenterol* 2005;100(2):414–23.
19. Hall D.A., Ptacek J., Snyder M. Protein microarray technology. *Mech Ageing Dev* 2007;128(1):161–7.
20. Chen C.S., Zhu H. Protein microarrays. *Biotechniques* 2006;40(4):423–7.
21. Finkel N.H., Lou X., Wang C. et al. Barcoding the microworld. *Anal Chem* 2004;76(19):352A–359A.
22. Braeckmans K., de Smedt S.C., Leblans M. et al. Encoding microcarriers: present and future technologies. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1(6):447–56.
23. Fortina P., Kricka L.J., Surrey S. et al. Nanobiotechnology: the promise and reality of new approaches to molecular recognition. *Trends Biotechnol* 2005;23(4):168–73.
24. Fan J.B., Chee M.S., Gunderson K.L. Highly parallel genomic assays. *Nat Rev Genet* 2006;7(8):632–44.
25. Ramachandran N., Raphael J.V., Hainsworth E. et al. Next-generation high-density self-assembling functional protein arrays. *Nat Methods* 2008;5(6):535–8.
26. Situma C., Hashimoto M., Soper S.A. Merging microfluidics with microarray-based bioassays. *Biomol Eng* 2006;23(5):213–31.
27. Meza M.B. Bead-based HTS applications in drug discovery. *Drug Discovery Today* 2000;5(1):38–41.
28. Nolan J.P., Sklar L.A. Suspension array technology: evolution of the flat-array paradigm. *Trends Biotechnol* 2002;20(1):9–12.
29. Fulton R.J., McDade R.L., Smith P.L. et al. Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix system. *Clin Chem* 1997;43(9):1749–56.
30. Battersby B.J., Bryant D., Meutermans W. et al. Toward larger chemical libraries: encoding with fluorescent colloids in combinatorial chemistry. *J Am Chem Soc* 2000;122:2138–9.
31. Xu H., Sha M.Y., Wong E.Y. et al. Multiplexed SNP genotyping using the Qbead system: a quantum dot-encoded microsphere-based assay. *Nucleic Acids Res* 2003;31(8):e43.
32. Han M., Gao X., Su J.Z. et al. Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules. *Nat Biotechnol* 2001;19(7):631–5.
33. Zhao X.W., Liu Z.B., Yang H. et al. Uniformly colorized beads for multiplex immunoassay. *Chem Mater* 2006;18(9):2443–9.
34. Cunin F., Schmedake T.A., Link J.R. et al. Biomolecular screening with encoded porous-silicon photonic crystals. *Nat Mater* 2002;1(1):39–41.
35. Su X., Zhang J., Sun L. et al. Composite organic-inorganic nanoparticles (COINs) with chemically encoded optical signatures. *Nano Lett* 2005;5(1):49–54.
36. Fenniri H., Chun S., Ding L. et al. Preparation, physical properties, on-bead binding assay and spectroscopic reliability of 25 bar-coded polystyrene-poly(ethylene glycol) graft copolymers. *J Am Chem Soc* 2003;125(35):10546–60.

37. Zhi Z.L., Morita Y., Hasan Q. et al. Micromachining microcarrier-based biomolecular encoding for miniaturized and multiplexed immunoassay. *Anal Chem* 2003;75(16):4125–31.
38. Nicewarner-Pena S.R., Freeman R.G., Reiss B.D. et al. Submicrometer metallic barcodes. *Science* 2001;294(5540):137–41.
39. Sha M.Y., Walton I.D., Norton S.M. et al. Multiplexed SNP genotyping using nanobarcode particle technology. *Anal Bioanal Chem* 2006;384(3):658–66.
40. Evans M., Sewter C., Hill E. et al. An encoded particle array tool for multiplex bioassays. *Assay Drug Dev Technol* 2003;1(1 Pt 2):199–207.
41. Moran E.J., Sarshar S., Cargill J.F. et al. Radio frequency tag encoded combinatorial library method for the discovery of tripeptide-substituted cinnamic acid inhibitors of the protein tyrosine phosphatase PTP1B. *J Am Chem Soc* 1995;117:10787–8.
42. Nicolaou K.C., Xiao X.Y., Parandoosh Z. et al. Radiofrequency Encoded Combinatorial Chemistry. *Angew Chem Int Ed* 1995;34:2289–91.
43. McHugh T.M., Miner R.C., Logan L.H. et al. Simultaneous detection of antibodies to cytomegalovirus and herpes simplex virus by using flow cytometry and a microsphere-based fluorescence immunoassay. *J Clin Microbiol* 1988;26(10):1957–61.
44. Vaino A.R., Janda K.D. Euclidean shape-encoded combinatorial chemical libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(14):7692–6.
45. Claudon A., Vergnaud P., Valverde C. et al. New automated multiplex assay for bone turnover markers in osteoporosis. *Clin Chem* 2008;54(9):1554–63.
46. Chandra P.E., Sokolove J., Hipp B.G. et al. Novel multiplex technology for diagnostic characterization of rheumatoid arthritis. *Arthr Res Ther* 2011;24;13(3):102.
47. Haab B.B., Dunham M.J., Brown P.O. Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions. *Genome Biol* 2001;2:1–13.
48. Robinson W.H., DiGennaro C., Hueber W. et al. Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses. *Nat Med* 2002;8:295–301.
49. Fodor S.P., Read J.L., Pirrung M.C. et al. Lightdirected, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* 1991;251:767–73.
50. Joos T.O., Schrenk M., Hopfl P. et al. A microarray enzyme-linked immunosorbent assay for autoimmune diagnostics. *Electrophoresis* 2000;21:2641–50.
51. Büsow K., Cahill D., Niefeld W. et al. A method for global protein expression and antibody screening on high-density filters of an arrayed cDNA library. *Nucleic Acids Res* 1998;26:5007–8.
52. Lucking A., Horn M., Eickhoff H. et al. Protein microarrays for gene expression and antibody screening. *Anal Biochem* 1999;270:103–11.
53. He M., Taussig M.J. Single step generation of protein arrays from DNA by cell-free expression and in situ immobilisation (PISA method). *Nucleic Acids Res* 2001;29:73.
54. Ge H. UPA, a universal protein array system for quantitative detection of protein-protein, protein-DNA, protein-RNA, and protein-ligand interactions. *Nucleic Acids Res* 2000;28:3i.
55. Geysen H.M., Meloan R.H., Barteling S.J. Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:3998–4002.
56. James J., Harley J. Linear epitope mapping of an Sm B/B₂ polypeptide. *J Immunol* 1992;148:2074–9.
57. Atkinson A.J., Colburn W.A., Degroot V.G. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001;69:89–95.
58. Zhang H., Liu A.Y., Loriaux P. et al. Mass spectrometric detection of tissue proteins in plasma. *Mol Cell Proteomics* 2007;6:64–71.
59. Etzioni R., Urban N., Ramsey S. et al. The case for early detection. *Nat Rev Cancer* 2003;3:243–52.
60. Rifai N., Gillette M.A., Carr S.A. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat Biotechnol* 2006;24:971–83.
61. Guo Y., Fu Z., van Eyk J.E. A proteomic primer for the clinician. *Proc Am Thorac Soc* 2007;4:9–17.
62. Anderson L. Candidate-based proteomics in the search for biomarkers of cardiovascular disease. *J Physiol (Lond)* 2005;563:23–60.
63. Issaq H.J., Xiao Z., Veenstra T.D. Serum and plasma proteomics. *Chem Rev* 2007;107:3601–20.
64. Ye X., Blonder J., Veenstra T. Briefings in functional genomics and proteomics. *Brief Funct Genom* 2009;8(2):126–35.
65. Zolotarjova N., Martosella J., Nicol G. et al. Differences among techniques for high-abundant protein depletion. *Proteomics* 2005;5:3304–13.
66. Tambor V., Fucikova A., Lenco J. et al. Application of proteomics in biomarker discovery: a primer for the clinician. *Physiol Res* 2010;59:471–97.
67. Wener M. Multiplex, megaplex, index, and complex: the present and future of laboratory diagnostics in rheumatology. *Arthr Res Ther* 2011;13:134.
68. Zhou X., Fragala M.S., McElhaney J. et al. Conceptual and methodological issues relevant to cytokine and inflammatory marker measurements in clinical research. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010;13(5):541–7.
69. Bossuyt P.M. The thin line between hope and hype in biomarker research. *JAMA* 2011;305:2229–30.
70. Katz M.H. Multivariable analysis: a primer for readers of medical research. *Ann Intern Med* 2003;138:644–50.
71. Miossec P., Verweij C.L., Klareskog L. et al. Biomarkers and personalized medicine in rheumatoid arthritis: a proposal for interactions between academia, industry and regulatory bodies. *Ann Rheum Dis* 2011;70(10):1713–8.
72. Gibson D.S., Rooney M.E., Finnegan S. et al. Biomarkers in rheumatology, now and in the future. *Rheumatology (Oxford)* 2012;51(3):423–33.
73. Zhang X., Jin M., Wu H. et al. Biomarkers of lupus nephritis determined by serial urine proteomics. *Kidney Int* 2008;74:799–807.
74. Wu T.F., Fu Y., Brekken D. et al. Urine proteome scans uncover total urinary protease, prostaglandin D synthase, serum amyloid P, and superoxide dismutase as potential markers of lupus nephritis. *J Immunol* 2010;184:2183–93.
75. Rovin B.H., Zhang X. Biomarkers for lupus nephritis: the quest continues. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4:1858–65.
76. Hjelmervik T.O., Jonsson R., Bolstad A.I. The minor salivary gland proteome in Sjogren's syndrome. *Oral Dis* 2009;15:342–53.
77. Grau S., Richards P.J., Kerr B. et al. The role of human HtrA1 in arthritic disease. *J Biol Chem* 2006;281:6124–9.
78. Chamberland A., Wang E., Jones A.R. et al. Identification of a novel HtrA1-susceptible cleavage site in human aggrecan: evidence for the involvement of HtrA1 in aggrecan proteolysis in vivo. *J Biol Chem* 2009;284:27352–9.
79. Tallheden T., Karlsson C., Brunner A. et al. Gene expression during redifferentiation of human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2004;12:525–35.
80. Blain E.J., Gilbert S.J., Hayes A.J. et al. Disassembly of the vimentin cytoskeleton disrupts articular cartilage chondrocyte homeostasis. *Matrix Biol* 2006;25:398–408.
81. Naishiro Y., Suzuki C., Kimura M. et al. Plasma analysis of rheumatoid arthritis by SELDI. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 2007;30:145–50.
82. Zheng X., Wu S.L., Hincapie M. et al. Study of the human plasma proteome of rheumatoid arthritis. *J Chromatogr A* 2009;1216:3538–45.
83. Jin E.H., Shim S.C., Kim H.G. et al. Polymorphisms of COTL1 gene identified by proteomic approach and their association with autoimmune disorders. *Exp Mol Med* 2009;41:354–61.

84. Mallya R.K., Vergani D., Tee D.E. et al. Correlation in rheumatoid arthritis of concentrations of plasma C3d, serum rheumatoid factor, immune complexes and C-reactive protein with each other and with clinical features of disease-activity. *Clin Exp Immunol* 1982;48:747–53.
85. Chang X., Cui Y., Zong M. et al. Identification of proteins with increased expression in rheumatoid arthritis synovial tissues. *J Rheumatol* 2009;36:872–80.
86. Trocme C., Marotte H., Baillet A. et al. Apolipoprotein A-I and platelet factor 4 are biomarkers for infliximab response in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2009;68:1328–33.
87. Doherty N.S., Littman B.H., Reilly K. et al. Analysis of changes in acute-phase plasma proteins in an acute inflammatory response and in rheumatoid arthritis using two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 1998;19(2):355–63.
88. Scott L.J., Evans E.L., Dawes P.T. et al. Comparison of IgA-alpha1-antitrypsin levels in rheumatoid arthritis and seronegative oligoarthritis: complex formation is not associated with inflammation per se. *Br J Rheumatol* 1998;37:398–404.
89. Tilleman K., van Beneden K., Dhondt A. et al. Chronically inflamed synovium from spondyloarthropathy and rheumatoid arthritis investigated by protein expression profiling followed by tandem mass spectrometry. *Proteomics* 2005;5:2247–57.
90. Sinz A., Bantscheff M., Mikkat S. et al. Mass spectrometric proteome analyses of synovial fluids and plasmas from patients suffering from rheumatoid arthritis and comparison to reactive arthritis or osteoarthritis. *Electrophoresis* 2002;23:3445–56.
91. Drynda S., Ringel B., Kekow M. et al. Proteome analysis reveals disease-associated marker proteins to differentiate RA patients from other inflammatory joint diseases with the potential to monitor anti-TNFalpha therapy. *Pathol Res Pract* 2004;200:165–71.
92. Raza K., Falciani F., Curnow S.J. et al. Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin. *Arthr Res Ther* 2005;7:R784–R795.
93. Hueber W., Tomooka B.H., Zhao X. et al. Proteomic analysis of secreted proteins in early rheumatoid arthritis: anti-citrulline autoreactivity is associated with up regulation of proinflammatory cytokines. *Ann Rheum Dis* 2007;66:712–9.
94. Syversen S.W., Goll G.L., Haavardsholm E.A. et al. A high serum level of eotaxin (CCL 11) is associated with less radiographic progression in early rheumatoid arthritis patients. *Arthr Res Ther* 2008;10:R28.
95. Jager W., Hoppireijs E.P.A.H., Wulfraat N.M. et al. Blood and synovial fluid cytokines signatures in patients with juvenile idiopathic arthritis a cross-sectional study. *Ann Rheum Dis* 2007;66:589–98.
96. Cavet G., Centola M., Shen Y. et al. Development of a multi-biomarker test for rheumatoid arthritis (RA) disease activity. *Ann Rheum Dis* 2010;69(Suppl 3):148.
97. Liao H., Wu J., Kuhn E. et al. Use of mass spectrometry to identify protein biomarkers of disease severity in the synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis. *Arthr Rheum* 2004;50:3792–803.
98. Katano M., Okamoto K., Arito M. et al. Implication of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induced neutrophil gelatinase-associated lipocalin in pathogenesis of rheumatoid arthritis revealed by proteome analysis. *Arthr Res Ther* 2009;11:R3.
99. Bo G.P., Zhou L.N., He W.F. et al. Analyses of differential proteome of human synovial fibroblasts obtained from arthritis. *Clin Rheumatol* 2009;28(2):191–9.
100. Scott L.J., Evans E.L., Dawes P.T. et al. Two-dimensional electrophoretic analysis of disease-associated proteins in human cerebrospinal fluid from patients with rheumatoid arthritis. *J Electrophoresis* 2005;49:23–7.
101. Wu J., Liu W., Bemis A. et al. Comparative proteomic characterization of articular cartilage tissue from normal donors and patients with osteoarthritis. *Arthr Rheum* 2007;56:3675–84.
102. Guo D., Tan W., Wang F. et al. Proteomic analysis of human articular cartilage: identification of differentially expressed proteins in knee osteoarthritis. *Joint Bone Spine* 2008;75:439–44.
103. Ruiz-Romero C., Calamia V., Mateos J. et al. Mitochondrial dysregulation of osteoarthritic human articular chondrocytes analyzed by proteomics: a decrease in mitochondrial superoxide dismutase points to a redox imbalance. *Mol Cell Proteomics* 2009;8:172–89.
104. Lambrecht S., Verbruggen G., Verdonk P.C. et al. Differential proteome analysis of normal and osteoarthritic chondrocytes reveals distortion of vimentin network in osteoarthritis. *Osteoarthr Cartilage* 2008;16:163–73.
105. Liu J., Zhu P., Peng J. et al. Identification of disease-associated proteins by proteomic approach in ankylosing spondylitis. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;357:531–6.
106. Wright C., Edelmann M., di Gleria K. et al. Ankylosing spondylitis monocytes show upregulation of proteins involved in inflammation and the ubiquitin proteasome pathway. *Ann Rheum Dis* 2009;68:1626–32.
107. Giusti L., Baldini C., Bazzichi L. et al. Proteome analysis of whole saliva: a new tool for heumatic diseases-the example of Sjogren's syndrome. *Proteomics* 2007;7:1634–43.
108. Fleissig Y., Deutsch O., Reichenberg E. et al. Different proteomic protein patterns in saliva of Sjogren's syndrome patients. *Oral Dis* 2009;15:61–8.
109. Peluso G., De Santis M., Inzitari R. et al. Proteomic study of salivary peptides and proteins in patients with Sjogren's syndrome before and after pilocarpine treatment. *Arthr Rheum* 2007;56:2216–22.