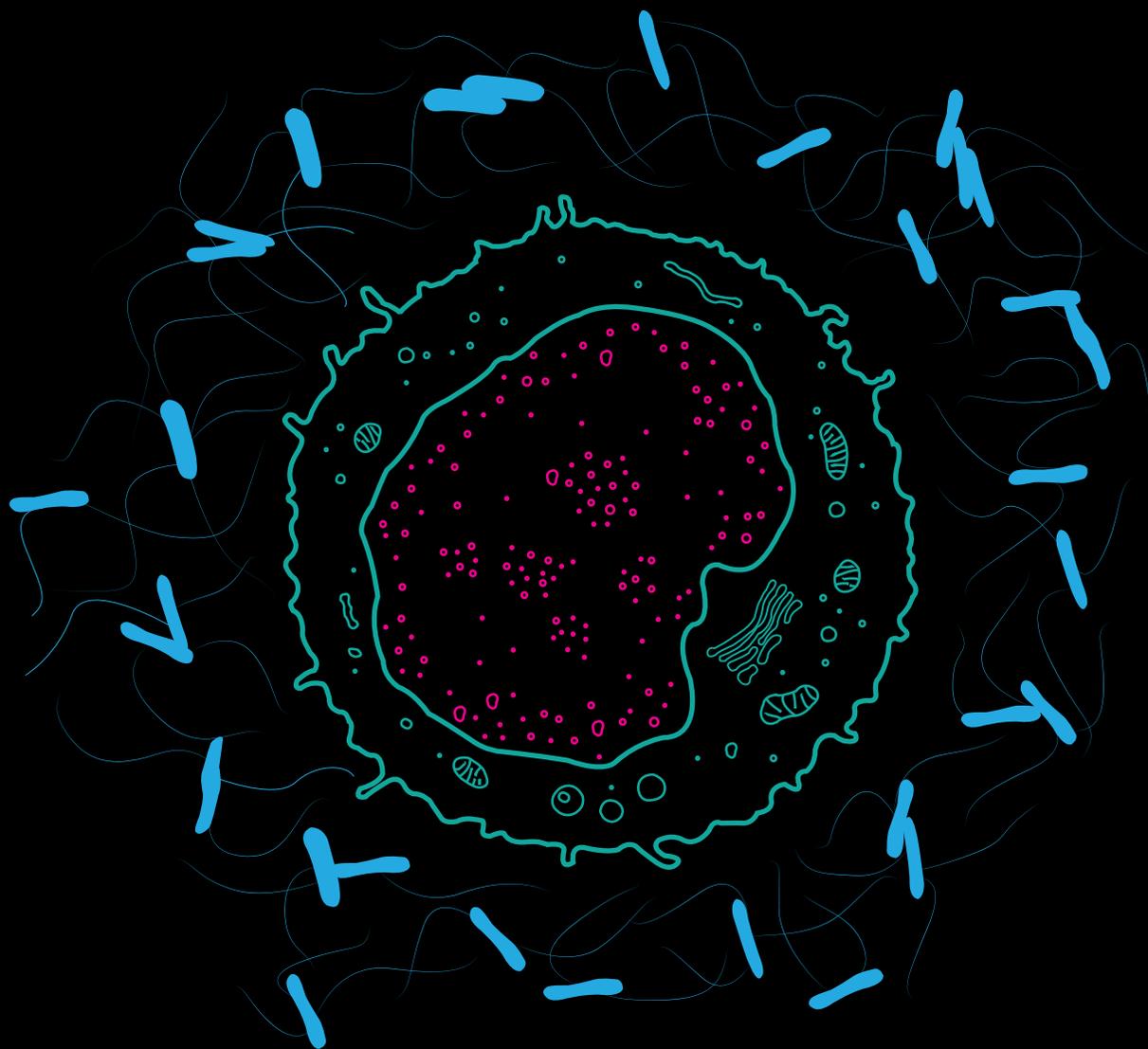


ВЕСТНИК РГМУ

ЯНВАРЬ–ФЕВРАЛЬ 2016(1) ISSN 2070-7320

VESTNIKRGMU.RU



АМИЛОИДЫ МИКРООРГАНИЗМОВ ОБЗОР

СТАТЬЯ Болезнь Альцгеймера

14

Изучена роль фрагмента (25–35) β -амилоидного пептида в механизме нейродегенерации

СТАТЬЯ Ишемическая болезнь сердца

25

Выявлен полиморфизм гена Т-кадгерина *CDH13*, ассоциированный с характером манифестации ИБС

ВЕСТНИК РОССИЙСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО МЕДИЦИНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

Научный медицинский журнал Российского национального
исследовательского медицинского университета
имени Н. И. Пирогова

BULLETIN OF RUSSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

Scientific Medical Journal of Pirogov Russian National
Research Medical University

Главный редактор

Editor-in-chief

Денис Ребриков, д. б. н.

Denis Rebrikov, DSc

Заместитель главного редактора

Deputy editor-in-chief

Александр Эттингер, д. м. н.

Alexander Oettinger, DSc

Руководитель редакции

Editorial manager

Елена Куликова

Elena Kulikova

Ведущий редактор

Senior editor

Ирина Бабенкова, к. м. н.

Irina Babenkova, CSc

Редакторы

Editors

Екатерина Малеванная

Ekaterina Malevannaya

Лилия Егорова

Liliya Egorova

Корректор

Proof-reader

Виталия Чагина

Vitaliya Chagina

Переводчик

Translator

Екатерина Третьякова

Ekaterina Tretiayakova

Дизайн и верстка

Design and layout

Марина Доронина

Marina Doronina

Журнал входит в Перечень ведущих научных
журналов и изданий ВАК.

Журнал доступен в Google Scholar.

IF РИНЦ 2014: 0,139.

Номер подписан в печать 25.02.2016

Адрес редакции: 117997, г. Москва,
ул. Островитянова, д. 1.

Для подачи публикаций: editor@vestnikrgmu.ru

По вопросам сотрудничества: manager@vestnikrgmu.ru

Редакционная коллегия

Editorial board

Г. П. Арутюнов, д. м. н.

G. P. Arutyunov, DSc

Ю. В. Бальякин, д. м. н.

Yu. V. Balyakin, DSc

М. Р. Богомильский*, д. м. н.

M. R. Bogomilskiy, DSc

Л. В. Ганковская, д. м. н.

L. V. Gankovskaya, DSc

Ю. Э. Доброхотова, д. м. н.

Yu. E. Dobrokhotova, DSc

Л. И. Ильенко, д. м. н.

L. I. Ilyenko, DSc

О. А. Кисляк, д. м. н.

O. A. Kislyak, DSc

В. И. Лапочкин, д. м. н.

V. I. Lapochkin, DSc

А. В. Матюшкин, д. м. н.

A. V. Matyushkin, DSc

А. Г. Пашинян, д. м. н.

A. G. Pashinyan, DSc

* член-корреспондент РАН

corresponding member of RAS

Редакционный совет

Editorial council

Е. И. Гусев, академик РАН, д. м. н.

E. I. Gusev, member of RAS, DSc

И. И. Затевахин, академик РАН, д. м. н.

I. I. Zatevakhin, member of RAS, DSc

Ю. Ф. Исаков, академик РАН, д. м. н.

Yu. F. Isakov, member of RAS, DSc

Ю. М. Лопухин, академик РАН, д. м. н.

Yu. M. Lopukhin, member of RAS, DSc

Г. М. Савельева, академик РАН, д. м. н.

G. M. Savelyeva, member of RAS, DSc

С. Б. Петерсон, д. м. н.

S. B. Peterson, DSc

Н. В. Полунина*, д. м. н.

N. V. Polunina, DSc

Б. А. Поляев, д. м. н.

B. A. Polyayev, DSc

Г. В. Порядин*, д. м. н.

G. V. Poryadin, DSc

Н. Г. Потешкина, д. м. н.

N. G. Poteshkina, DSc

С. В. Свиридов, д. м. н.

S. V. Sviridov, DSc

А. В. Скороглядов, д. м. н.

A. V. Skoroglyadov, DSc

В. А. Стаханов, д. м. н.

V. A. Stakhanov, DSc

Е. В. Старых, д. м. н.

E. V. Starykh, DSc

И. З. Шишков, д. ф. н.

I. Z. Shishkov, DSc

Ю. К. Скрипкин, академик РАН, д. м. н.

Yu. K. Skripkin, member of RAS, DSc

В. И. Стародубов, академик РАН, д. м. н.

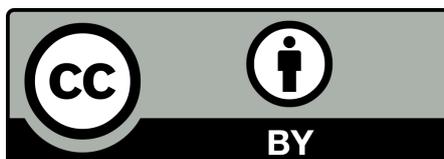
V. I. Starodubov, member of RAS, DSc

Г. И. Сторожаков, академик РАН, д. м. н.

G. I. Storozhakov, member of RAS, DSc

А. И. Федин, д. м. н.

A. I. Fedin, DSc



Журнал распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International

www.creativecommons.org

Свидетельство о регистрации средства массовой информации № 012769 от 29 июля 1994 г.

Подписной индекс по каталогу «Роспечать»: 46826

Отпечатано в типографии «ПРЕМИУМ ПРИНТ»

www.premium-print.ru

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

ОБЗОР	Амилоидные белки поверхности микроорганизмов: структура, свойства и значение для медицины В. В. Рекстина, А. А. Горковский, Е. Е. Безсонов, Т. С. Калебина Cell surface amyloid proteins of microorganisms: structure, properties and significance in medicine Rekstina VV, Gorkovskii AA, Bezsonov EE, Kalebina TS	4
СТАТЬЯ	Нейродегенеративные изменения, вызванные введением фрагмента (25–35) β-амилоидного пептида в гиппокамп, связаны с активацией NGF-сигналинга М. Ю. Степаничев, А. Д. Иванов, Н. А. Лазарева, Ю. В. Моисеева, Н. В. Гуляева Neurodegenerative changes induced by injection of β-amyloid peptide fragment (25-35) in hippocampus are associated with NGF-signalling activation Stepanichev MYu, Ivanov AD, Lazareva NA, Moiseeva YuV, Gulyaeva NV	14
СТАТЬЯ	Уточнение статуса некоторых мутаций, считающихся патогенными, с помощью признаков безвредных мутаций Д. И. Борисевич, Л. В. Шаталова, Д. О. Коростин, В. В. Ильинский Clarification of the status of some mutations considered pathogenic, by harmless mutations attributes Borisevich DI, Shatalova LV, Korostin DO, Ilinsky VV	20
СТАТЬЯ	Полиморфизм гена Т-кадгерина (CDH13) ассоциирован с характером манифестации ишемической болезни сердца А. В. Балацкий, Ф. Р. Чотчаева, Ю. С. Пиневиц, Л. М. Самоходская, В. А. Ткачук T-cadherin gene polymorphism is associated with ischemic heart disease manifestations Balatskiy AV, Chotchaeva FR, Pinevich YuS, Samokhodskaya LM, Tkachuk VA	25
СТАТЬЯ	Диагностические преимущества многосуточного холтеровского мониторирования электрокардиограммы перед стандартным 24-часовым исследованием Ю. Н. Горожанцев Diagnostic advantages of a long-term Holter ECG monitoring compared to a standard 24-hour monitoring Gorozhantsev YuN	32
ОБЗОР	Биометрическая идентификация, основанная на ЭКГ: некоторые современные подходы А. А. Астапов, Д. В. Давыдов, А. И. Егоров, Д. В. Дроздов, Е. М. Глуховский ECG-based biometric identification: some modern approaches Astapov AA, Davydov DV, Egorov AI, Drozdov DV, Glukhovskij EM	38
СТАТЬЯ	Поверхностный фенотип лимфоцитов крови у детей с осевой миопией средней степени при наличии и отсутствии вторичного иммунодефицита Н. В. Хамнагдаева, Л. Ю. Семенова, С. А. Обрубов, Ж. М. Салмаси, Г. В. Порядин, И. В. Рогожина, А. Н. Казимирский Surface phenotype of blood lymphocytes in children with medium axial myopia in the presence or absence of secondary immunodeficiency Khamnagdaeva NV, Semenova LYu, Obrubov SA, Salmasi JM, Poryadin GV, Rogozhina IV, Kazimirskii AN	44
СТАТЬЯ	Содержание витаминов в организме городских и сельских школьников и особенности свободнорадикальных реакций в их сыворотке крови Н. П. Сетко, С. И. Красиков, Е. В. Булычева Vitamin status of urban and rural school children and specifics of free radical reactions in their blood serum Setko NP, Krasikov SI, Bulycheva EV	48

МЕТОД	<p>Тканевая хемилюминесценция как метод оценки супероксид радикал-продуцирующей способности митохондрий А. А. Джатдоева, А. М. Полимова, Е. В. Проскурнина, Ю. А. Владимиров</p> <p>Tissue chemiluminescence as a method of evaluation of superoxide radical producing ability of mitochondria Dzhatdоеva AA, Polimova AM, Proskurnina EV, Vladimirov YuA</p>	54
ОБЗОР	<p>Сывороточный альбумин как источник и мишень свободных радикалов в патологии М. М. Созарукова, Е. В. Проскурнина, Ю. А. Владимиров</p> <p>Serum albumin as a source of and a target for free radicals in pathology Sozarukova MM, Proskurnina EV, Vladimirov YuA</p>	61
СТАТЬЯ	<p>Два HMG-домена митохондриального белка дрожжей Abf2p обладают различным сродством к ДНК А. В. Курашенко, Е. О. Самойлова, М. В. Балева, И. В. Чичерин, Д. Ю. Петров, П. А. Каменский, С. А. Левицкий</p> <p>Two HMG domains of yeast mitochondrial protein Abf2p have different affinity to DNA Kurashenko AV, Samoilova EO, Baleva MV, Chicherin IV, Petrov DYu, Kamenski PA, Levitskii SA</p>	68
СТАТЬЯ	<p>Стабильность гадолинийсодержащих магнитно-резонансных контрастных средств в присутствии ионов цинка и кальция в различных средах В. Г. Харламов, В. Н. Кулаков, А. А. Липенгольц, Н. Л. Шимановский</p> <p>Stability of gadolinium-based contrast agents in the presence of zinc and calcium ions in different media Kharlamov VG, Kulakov VN, Lipengolts AA, Shimanovskii NL</p>	73
МНЕНИЕ	<p>Подходы к усовершенствованию противотуберкулезной помощи больным ВИЧ-инфекцией и критерии ее оценки О. П. Фролова, И. В. Щукина, О. А. Новоселова, В. А. Стаханов, А. Б. Казенный</p> <p>Approaches to improving tuberculosis care in HIV-infected patients and criteria for its evaluation Frolova OP, Schukina IV, Novoselova OA, Stakhanov VA, Kazennyi AB</p>	79
ОБЗОР	<p>Сравнительный анализ современного российского и зарубежного подходов к оценке деятельности научных организаций в сфере здравоохранения А. С. Анискевич, Р. А. Хальфин, Л. В. Татарина</p> <p>Comparative analysis of modern approaches to the performance assessment of scientific medical organizations in russia and abroad Aniskevich AS, Halfin RA, Tatarinova LV</p>	83

АМИЛОИДНЫЕ БЕЛКИ ПОВЕРХНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ: СТРУКТУРА, СВОЙСТВА И ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ МЕДИЦИНЫ

В. В. Рекстина¹, А. А. Горковский², Е. Е. Безсонов², Т. С. Калебина¹✉

¹ Кафедра молекулярной биологии, биологический факультет,
Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

² Лаборатория биохимии и генетики,
Национальный институт диабета, заболеваний ЖКТ и почек, Национальный институт здоровья, Бетесда, Мэриленд, США

В обзоре суммированы данные, посвященные описанию свойств амилоидных белков поверхности клеток микроорганизмов. Определены понятия «амилоид» и «функциональный амилоид» микроорганизмов. Приведены многочисленные примеры исследований, в которых убедительно показано наличие амилоидных свойств у белков клеточной поверхности микроорганизмов. Рассмотрены работы, демонстрирующие важную роль пилей, курлей, тафи и некоторых других фибриллярных белков бактерий в колонизации организма хозяина. Обобщены данные об амилоидных белках поверхности клеток дрожжей, их свойствах и возможной роли в развитии кандидозов. Обзор также призван привлечь внимание специалистов в области медицины и биологии ко все более активно обсуждаемому в литературе вопросу о возможном участии амилоидов внеклеточного матрикса бактерий, а также амилоидных белков поверхности эукариотических микроорганизмов, в первую очередь дрожжей, в развитии амилоидозов животных и человека.

Ключевые слова: клеточная поверхность микроорганизмов, амилоид микроорганизмов, функциональный амилоид, пили, курли, тафи, фенол-растворимый модулин, адгезин, гидрофобин класса I, амилоидоз

Финансирование: работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14-04-01187 А).

✉ **Для корреспонденции:** Татьяна Сергеевна Калебина
119899, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12; kalebina@genebee.msu.ru

Статья получена: 30.09.2015 **Статья принята в печать:** 07.10.2015

CELL SURFACE AMYLOID PROTEINS OF MICROORGANISMS: STRUCTURE, PROPERTIES AND SIGNIFICANCE IN MEDICINE

Rekstina VV¹, Gorkovskii AA², Bezsonov EE², Kalebina TS¹✉

¹ Faculty of Biology, Department of Molecular Biology,
Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Laboratory of Biochemistry and Genetics,
National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA

This review summarizes data which describe properties of microbial cell surface amyloids proteins. Definitions of amyloids and microbial functional amyloids are given. The review provides numerous examples of research in which the presence of amyloid-like properties in microbial cell surface proteins is demonstrated convincingly. Studies of the important role of pili, curli, tafi and some other bacterial fibrillar proteins in host colonization are reviewed. Data on amyloid proteins of yeast cell surface, their properties and potential association with candidiasis development are summarized. This review also appeals to experts in biology and medicine in an attempt to draw their attention to the issue which is increasingly discussed in scientific work at present, namely to a possible role of bacterial extracellular matrix amyloids and amyloid proteins of eukaryotic microorganism surface, yeast in the first place, in the development of amyloidosis in animals and humans.

Keywords: microbial cell surface, microbial amyloid, functional amyloid, pili, curli, tafi, phenol soluble modulin, adhesin, class I hydrophobin, amyloidosis

Funding: this study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant no. 14-04-01187 A).

✉ **Correspondence should be addressed:** Tatiana Kalebina
Leninskie gory, d. 2, str. 12, Moscow, Russia, 119899; kalebina@genebee.msu.ru

Received: 30.09.2015 **Accepted:** 07.10.2015

Микробиом человека составляет в среднем 10^{14} клеток микроорганизмов [1], многие из которых имеют на своей поверхности амилоидные белки. Некоторые исследования последних лет позволяют выдвинуть гипотезу о том, что наличие таких белков может способствовать возникнове-

нию многих заболеваний, в том числе развитию системных амилоидозов высших животных и человека, туберкулеза, болезни Альцгеймера [2–6].

Анализ и глубокое знание процессов и молекулярных механизмов, лежащих в основе сборки амилоидных струк-

тур клеток про- и эукариотических микроорганизмов, имеют большие перспективы с медицинской точки зрения. В первую очередь сказанное актуально для разработки методов защиты организма человека и животных от неблагоприятного воздействия амилоидов микроорганизмов. Важно понимание того, как можно наиболее эффективно препятствовать формированию или разрушить уже сформированные патогенными микроорганизмами бактериальные биопленки и как снизить эффект индукции процесса амилоидобразования клетками человека и животных при воздействии амилоидов микроорганизмов.

Амилоиды — это белковые фибриллы, обладающие кросс- β -структурой. Они состоят из мономеров и представляют собой протяженные β -листы, в которых β -тяжи лежат перпендикулярно продольной оси фибриллы и могут располагаться параллельно и антипараллельно друг другу. Расстояние между главными цепями внутри β -листа составляет 0,47 нм, между соседними β -листами — 0,8–1,2 нм [7, 8]. В стабилизации структуры амилоидных фибрилл играют важную роль водородные связи, образующиеся между пептидными остовами соседних β -тяжей. В стабилизацию структуры амилоидов также, по-видимому, вносят вклад взаимодействия между боковыми группами аминокислотных остатков соседних полипептидов (гидрофобные взаимодействия, солевые мостики, стэкинг-взаимодействия). Для амилоидов характерна высокая устойчивость к изменениям таких параметров окружающей среды, как гидрофобность, концентрация соли, pH, температура, давление, влияние денатурирующих агентов и протеиназ, что обусловлено большим числом взаимодействий, вовлеченных в стабилизацию их структуры [2, 9–12].

Поскольку амилоиды являются причиной многих широко распространенных неизлечимых патологий (амилоидозов), их давно и активно изучают у человека и животных. Пили (*pili*, от лат. *pilus* — волос) были описаны в середине прошлого века у грамотрицательных и грамположительных бактерий [13]. Только совсем недавно, однако, стало понятно, что многие структуры на поверхности микроорганизмов представляют собой амилоидные фибриллы. К настоящему моменту курли (*curli*, от англ. *curl* — завиток) или тафи (*tafi*, от англ. *thin aggregative fimbriae* — тонкие агрегирующие нити) охарактеризованы у таких родов бактерий, как *Escherichia*, *Neisseria*, *Yersinia*, *Shigella* и *Salmonella* [2, 3, 10, 11, 14–17]. Пили охарактеризованы также у бактерий рода *Streptococcus*, в частности *S. agalactiae*, *S. pyogenes* и *S. pneumoniae*, у *Mycobacterium tuberculosis* и у многих других грамположительных бактерий. Процессы сборки этих структур и их роль в колонизации организма хозяина описаны достаточно подробно [13].

Хорошо известно о наличии амилоидов, так называемых гидрофобинов класса I, на поверхности мицелиальных грибов, например *Aspergillus fumigatus* [18]. Амилоиды встречаются у микроорганизмов среди структурных молекул, адгезинов и токсинов. Растущий список охарактеризованных амилоидов, помимо упомянутых выше структур, включает в себя фенол-растворимые модулины *Staphylococcus aureus* [12, 19], адгезины у *Candida albicans* [20, 21], амилоиды, формируемые белком TasA у *Bacillus subtilis* [22–24].

В процессе изучения амилоидных белков поверхности клеток микроорганизмов возникло понятие «функциональные амилоиды» [25], т. е. белки, формирующие амилоиды, не сопряженные с патологией микробов и выполняющие полезные для их клеток функции. В ряде опубликованных работ указано на формирование функциональных

амилоидов не только среди микроорганизмов и высказано предположение, что они существуют во всех доменах живого мира и участвуют в самых различных процессах: от образования биопленок в микробных сообществах до регуляции долговременной памяти у животных [7]. В обзоре мы рассмотрим некоторые примеры участия амилоидных белков поверхности микроорганизмов в развитии заболеваний животных и человека и приведем данные, характеризующие структуру этих амилоидов и условия их формирования.

Амилоиды, принимающие участие в формировании межклеточного матрикса бактерий

Основным белковым компонентом, необходимым для формирования межклеточного матрикса, являются курли или тафи. Они присутствуют на поверхности многих грамотрицательных бактерий, в т. ч. ряда штаммов *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* и других *Enterobacteriaceae* [10, 11, 14–17]. Курли *E. coli* связываются со многими белками человека, в частности с фибронектином, ламинином, коллагеном I типа, молекулами главного комплекса гистосовместимости I класса, плазминогеном и некоторыми другими [26–29], и способствуют патогенезу, облегчая микроорганизму последующее внедрение в организм хозяина [14, 30–32]. Курли представляют собой фибриллярные структуры, одним концом закрепленные на внешней мембране бактерий. Их длина может достигать нескольких микрометров, а ширина составляет 3–4 нм, при этом курли склонны агрегировать латерально, образуя пучки диаметром до 60 нм [33]. Фибриллы курлей обладают высокой устойчивостью к действию денатурирующих агентов и протеиназ, однако они могут быть деполимеризованы после кратковременной обработки концентрированной муравьиной кислотой [10, 11, 34]. Данные спектроскопии кругового дихроизма (КД-спектроскопии) свидетельствуют, что вторичная структура фибрилл курли богата β -слоями [11], также они взаимодействуют со специфичными для амилоида красителями — конго красным (КК) и тиофлавином T (ТТ) [11, 27]. Все это позволило классифицировать курли как амилоидные фибриллы [11].

Курли необходимы для формирования бактериальных биопленок и являются основным белковым компонентом образующегося при этом внеклеточного матрикса [33, 35]. Было показано, что гены курли лучше всего экспрессируются при температуре ниже 30 °С, низкой концентрации питательных веществ, низком осмотическом давлении и на стационарной стадии роста, т. е. в условиях, с которыми *E. coli* и другие энтеробактерии сталкиваются вне организма хозяина. В этих условиях формирование биопленок может способствовать выживанию бактерий [33]. Курли опосредуют присоединение бактерий к множеству поверхностей, включая клетки растений [36, 37], нержавеющей сталь [38], стекло и пластик [33], а также могут существенно усиливать устойчивость клеток микроорганизма к хлору [38] и соединениям двухвалентной ртути [39].

Сборка курлей — строго регулируемый клеткой процесс [14, 40], в котором участвуют белки, кодируемые как минимум двумя оперонами: у *E. coli* они носят название *csgABC* и *csgDEFG* [41]. Курли состоят из двух гомологичных белков — CsgA и CsgB, при этом основным структурным компонентом фибрилл является белок CsgA [27]. Очищенный CsgA *in vitro* в отсутствие каких-либо других белков формирует амилоидные фибриллы, однако β -тяжи

в них уложены не в β -слои, а в β -спирали. *In vivo* для сборки амилоидных фибрилл CsgA необходимо присутствие CsgB [11, 27, 42]. CsgA, секретируемый клетками *E. coli* с делецией гена *csgB*, может полимеризоваться на поверхности клеток, продуцирующих CsgB [11, 14, 27]. Это явление носит название «межбактериальная комплементация» и широко используется в мутационных исследованиях, направленных на выявление генов белков, участвующих в формировании курлей [11, 43]. Межбактериальная комплементация подтверждает, что CsgB является нуклеатором полимеризации CsgA [11].

Большая часть CsgB локализована на бактериальной поверхности, что указывает на верность предположения о нуклеаторной функции CsgB [44]. CsgF обеспечивает правильное сворачивание и локализацию белка-нуклеатора CsgB, вероятно, представляя собой шапероноподобный белок [43]. Периплазматический белок CsgE, по-видимому, участвует в секреции CsgA, а также ингибирует полимеризацию CsgA *in vitro* [45] за счет прямого взаимодействия между молекулами CsgE и CsgA [46]. Поэтому CsgE можно рассматривать как CsgA-специфичный шаперон. Одним из следствий развития представлений о нуклеаторных способностях белков клеточной поверхности микроорганизмов в процессе формирования амилоидов является то, что некоторые авторы рассматривают амилоидные белки микробного происхождения как реальную опасность для развития амилоидозов и болезни Альцгеймера [47].

Большинство экспериментальных исследований по биогенезу и функциям курлей были выполнены на *E. coli* и *Salmonella spp.* Биоинформатический анализ выявил гомологов курлей среди представителей родов *Bacteroidetes*, *Firmicutes* и *Thermodesulfobacteria* [48]. Опероны *csgEFG* были найдены у большинства бактерий вышеуказанных родов с потенциальными гомологами CsgA и CsgB, в то время как белки CsgC и CsgD часто отсутствовали. Несмотря на то что многие биоинформатические исследования ждут экспериментального подтверждения, есть основания предполагать, что сходные с курлями структуры могут быть более широко распространены у бактерий, формирующих биопленки, чем считали ранее [49].

Адгезин P1, располагающийся на клеточной поверхности микроорганизма *Streptococcus mutans*, вызывающего зубной кариес, является амилоидным белком [50]. Данный адгезин индуцировал сдвиг в спектре поглощения красителя КК, зеленое двулучепреломление в окрашенном КК препарате и специфическую флуоресценцию ТТ. Микроскопическими методами в препарате этого адгезина были обнаружены фибриллы, что в совокупности с результатами спектрофотометрического анализа подтверждало его амилоидную природу [50]. Получены данные, свидетельствующие, что P1 — не единственный белок клеточной поверхности *S. mutans*, способный формировать амилоиды, поскольку колонии бактерий, лишенных данного адгезина, тем не менее индуцировали зеленое двулучепреломление при окрашивании КК [50].

Пили *Mycobacterium tuberculosis* — еще один пример того, какую роль, возможно, играют амилоиды внеклеточного матрикса микроорганизмов в патогенезе. Данный микроорганизм вызывает туберкулез, за год уносящий жизни почти трех миллионов человек во всем мире [2]. Пили на поверхности грамположительных *M. tuberculosis* нерастворимы в смеси хлороформ/метанол (2 : 1), а также в буфере, содержащем додецилсульфат натрия (ДСН), и, кроме того, взаимодействуют с амилоид-специфичным красителем КК, что свидетельствует об их ами-

лоидной природе [2]. Мутанты, лишенные гена, кодирующего белок пилей *M. tuberculosis*, проявляли пониженную вирулентность [2]. Исследователи объясняют это тем, что пили способны связываться с белком внеклеточного матрикса ламинином, способствуя тем самым прочному закреплению микроорганизма в тканях хозяина. Таким образом, *M. tuberculosis* используют эти амилоидные белки для успешной колонизации организма [2]. В сыворотке пациентов, больных туберкулезом, присутствует высокий титр антител, взаимодействующих с пилиями *M. tuberculosis* [2].

Другие грамположительные микроорганизмы, которые могут колонизовать различные органы и ткани человека, — кокки *S. aureus* — способны вызывать различные заболевания, от небольших инфекций кожи до бактеремии и сепсиса. Многие из этих заболеваний связаны с формированием биопленок в организме хозяина [20]. В составе биопленок *S. aureus* были идентифицированы внеклеточные амилоидные фибриллы, состоящие из коротких пептидов, называемых фенол-растворимыми модулинами (PSMs) [12].

У PSMs *S. aureus* или *S. epidermidis* множество функций [51–54]. PSMs в фибриллярной форме необходимы *S. aureus* для обеспечения устойчивости биопленок к различным диспергирующим (разрушающим биопленку) агентам, а также к механическому воздействию [12]. Авторы считают, что перспективным направлением исследований для борьбы с заболеваниями, вызванными патогенными стафилококками, является ингибирование экспорта фенол-растворимых модулинов. Поиск малых молекул — ингибиторов полимеризации амилоидов — один из путей, который может привести к разработке средств для уничтожения стафилококков на этапе формирования биопленок [49].

Пили *Bacillus subtilis* — важный компонент внеклеточного матрикса биопленок, формируемых бактериями на твердой поверхности и на поверхности раздела фаз между водой и воздухом [55]. Этот микроорганизм не является патогеном, однако широко распространен, встречается в почве, воде, воздухе, продуктах питания. Основная белковая субъединица пилей *B. subtilis* — это белок TasA [22, 56]. Фибриллы, формируемые TasA *in vitro*, практически не отличаются по морфологии от пилей *B. subtilis* [22], при этом взаимодействуют с амилоид-специфичными красителями КК и ТТ, обогащены β -слоями по данным КД-спектроскопии и деполимеризуются лишь после инкубации в присутствии муравьиной кислоты [22]. Следует отметить, что TasA был впервые идентифицирован как секретируемый белок и белок поверхности спор *B. subtilis*, обладающий выраженными антибактериальными свойствами [57, 58]. Антитела, используемые в диагностике нейродегенеративных заболеваний, узнают как метастабильные интермедиаты, возникающие при формировании амилоидных фибрилл, так и олигомеры TasA, что позволяет авторам говорить о возможном сходстве структуры этих двух типов олигомеров [22, 59, 60].

Амилоиды, формирующие амфипатические мембраны на поверхности клеток микроорганизмов

Гифы, споры и плодовые тела многих грибов покрыты амфипатическими (т. е. одновременно имеющими гидрофильные и гидрофобные области) родлет-слоями, которые представляют собой мозаику из параллельно уложенных фибрилл толщиной 5–12 нм [18]. Указанные амфипатиче-

ские слои не растворяются при кипячении в присутствии 2 % ДСН и 1 М NaOH и диссоциируют на мономеры только при обработке муравьиной или трифторуксусной кислотами [9]. Основной и, по-видимому, единственный компонент родлет-слоев грибов — это белки гидрофобины класса I [61, 62]. Процесс полимеризации гидрофобин наиболее эффективен в области интерфаз с высоким поверхностным натяжением (например, граница раздела жидкость–воздух), а агенты, уменьшающие поверхностное натяжение, уменьшают и скорость полимеризации гидрофобин *in vitro* [63].

Гидрофобины — это большое семейство секретируемых низкомолекулярных (7–9 кДа) белков у грибов [61]. Семейство получило свое название благодаря высокому содержанию гидрофобных аминокислотных остатков [9]. Гены, кодирующие гидрофобины, обнаружены у многих грибов. Гидрофобины класса I — типичные функциональные амилоиды, поскольку играют роль в формировании спор и плодового тела, также они важны для прикрепления к поверхности клеток организма хозяина и защиты от его иммунной системы [18, 64]. Так, при инфекции, вызываемой мицелиальными грибами *Arthroderma benhamiae* (дерматофиты — возбудители поверхностных микозов человека и животных), гидрофобин НурА выполняет маскирующую функцию, защищая микроорганизм от иммунной системы хозяина. Делеция гена этого гидрофобина приводит к быстрому смачиванию мицелия и конидий гриба, что вызывает повышенную активацию гранулоцитов, нейтрофилов и дендритных клеток и сопровождается увеличением в крови титра интерлейкинов IL-6, -8, -10 и фактора некроза опухоли TNF- α [65]. Развитию инфекции с участием другого мицелиального гриба *Aspergillus fumigatus*, приводящего к инвазивному аспергиллезу, способствует компонент родлет-слоя гидрофобин RodA, покрывающий споры патогена. В экспериментах на животных споры штамма дикого типа с удаленным с поверхности RodA или мутанта $\Delta laeA$, содержащего на 60 % меньше этого гидрофобина, подвергались фагоцитозу макрофагами [66].

Амилоиды, входящие в состав клеточных стенок дрожжей: адгезины и глюкантрансфераза Bgl2p

В научной литературе давно известен, хотя и мало обсуждается, факт развития системного амилоидоза у мышей, инъецированных лиофилизированными клетками *Candida sp.* [67]. Авторы статьи особо отмечали, что отложения амилоидов могут возникать в ответ на введение экспериментальным животным казеина, альбумина, бактерий или эндотоксина *E. coli* [68–71], однако при этом после прекращения инъекций амилоидные отложения постепенно уменьшались или исчезали [72, 73]. В случае инъецирования мышей лиофилизированными клетками *Candida sp.* лабораторные животные умирали от системного амилоидоза спустя весьма длительный период (через 400 дней) после последней инъекции [67]. Отдельно проведенные эксперименты показали, что введение мышам внутриклеточного содержимого *Candida sp.* амилоидоза не вызывало. На основании этого авторы сделали вывод, что развитие амилоидоза стимулируют компоненты клеточных стенок [67].

Биоинформатический анализ протеома дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* выявил наибольшую представленность амилоидогенных белков в клеточной стенке [74]. Примером достаточно хорошо охарактеризованных белков клеточной поверхности дрожжей, обладающих амилоидными свойствами, являются белки Als (от англ. agglutinin-like

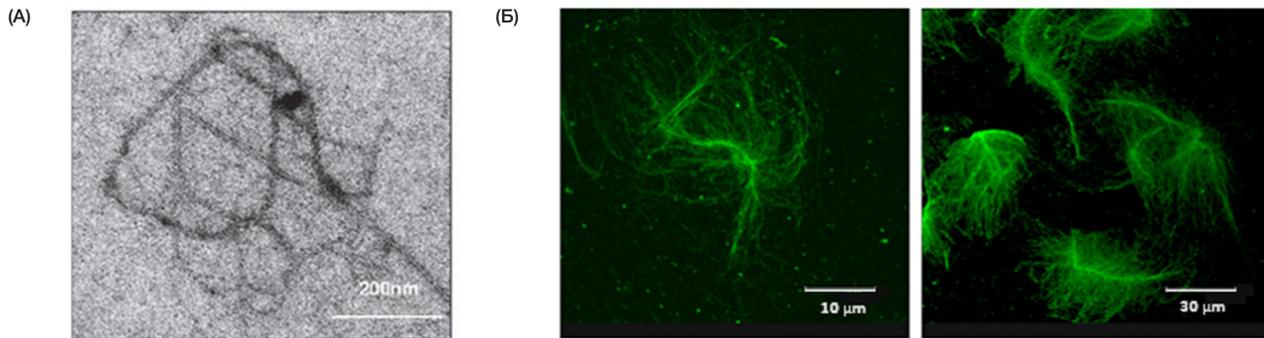
sequence) [20, 21, 75]. В геноме *C. albicans* было обнаружено восемь генов ALS, каждый из которых кодирует белок, состоящий из сигнальной последовательности, необходимой для секреции белка, трех tandemных доменов иммуноглобулин (Ig)-подобного типа, богатого треонинами домена (Т-домен), разного числа гликозилированных tandemных повторов (TR) длиной 36 аминокислот, высокогликозилированного стеблевого домена и сигнальной последовательности присоединения гликозилфосфатидилинозитольного якоря, который обеспечивает ковалентное закрепление белка за глюкан клеточной стенки [76]. Ig-подобный домен обеспечивает связывание с субстратом; Т-домен необходим для правильного сворачивания Ig-подобного домена и секреции; TR повышает афинность Ig-подобной области к лигандам и может обеспечивать агрегацию дрожжей, не зависящую от Ig-подобной области; благодаря наличию стеблевого домена активные области отстают от поверхности клеточной стенки на значительное расстояние [76].

Несмотря на наличие сильного гликозилирования, белки семейства Als имеют низкую растворимость, а в очищенном виде образуют амилоидные фибриллы даже при низких концентрациях [20]. Была изучена конформация N-концевых частей белков Als1p (Ig-фрагмент) и Als5p (Ig-фрагмент) в растворе [76]. Полученные данные свидетельствовали о том, что в обоих случаях β -слои были превалирующим элементом вторичной структуры анализируемого полипептида [76]. Показано также, что Als5p, Als1p и Als3p содержат в своем составе высококонсервативный потенциально амилоидогенный участок (ПАУ) в Т-домене [20].

Интересно отметить, что ПАУ были обнаружены не только в аминокислотных последовательностях Als-белков, но и в аминокислотных последовательностях дрожжевых адгезинов из других семейств [75]. Пептиды, содержавшие эти ПАУ, формировали фибриллы, взаимодействовавшие с амилоид-специфичными красителями, и согласно данным КД-спектроскопии обладали обогащенной β -слоями вторичной структурой [75]. Вероятно, амилоидообразование может быть весьма широко распространенным явлением [75].

Опportunистический дрожжевой патоген *Candida albicans* формирует биопленки, облегчающие колонизацию тканей организма хозяина и делающие клетки *C. albicans* чрезвычайно устойчивыми к антимикробным препаратам [77, 78]. Важную роль в патогенезе и формировании биопленок играют описанные выше Als-адгезины, наряду с множеством других адгезинов, продуцируемых *C. albicans* [78, 79]. Некоторые Als-адгезины формируют амилоидные структуры [20, 21, 75], что, вероятно, способствует взаимодействию клеток *C. albicans* с белками внеклеточного матрикса (фибронектином, ламинином, коллагеном IV типа) и другими пептидными лигандами млекопитающих, клетками других видов дрожжей, клетками бактерий, а также автоагрегации клеток *C. albicans* [76, 78]. Способность клеток *Candida sp.* удерживаться за счет поверхностных адгезинов на слизистых поверхностях различных органов и синтетических материалах является важным фактором патогенности этих грибов и содействует развитию инфекции. Наиболее выражена данная способность у дрожжей *C. albicans* [80, 81].

Глюкантрансфераза Bgl2p — еще один белок клеточной стенки дрожжей с наличием амилоидных свойств. Это небольшой (31,5–34 кДа в зависимости от вида дрожжей), консервативный, мажорный нековалентно закрепленный белок, присутствие которого в клеточной стенке показано для многих видов дрожжей, таких как *S. cerevisiae*,



Микрофотографии препаратов глюкантрансферазы Bgl2p из клеточных стенок дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. (А) Электронная микроскопия. Негативное окрашивание [86]. (Б) Флуоресцентная микроскопия. Окрашивание антителами против Bgl2p [87]

C. albicans, *A. fumigatus* [82–84]. Bgl2p из *S. cerevisiae* проявляет высокую гомологию по отношению к Bgl2p из *C. albicans*. Антитела против Bgl2p *S. cerevisiae* реагируют с Bgl2p *C. albicans* [82, 85]. Bgl2p устойчив к гидролизу трипсином и протеиназой К в составе клеточной стенки, а также не может быть экстрагирован из нее с помощью 1 % раствора ДСН в воде при 37 °С, в отличие от всех других нековалентно закрепленных в полисахаридном каркасе белков клеточной стенки [86].

Bgl2p, выделенный из клеточной стенки *S. cerevisiae*, способен образовывать структуры, которые имеют фибриллярную морфологию [86, 87], отчетливо выявляемую при микроскопических исследованиях (рисунок). Выделенный из клеточной стенки белок Bgl2p индуцировал специфическую флуоресценцию ТТ и демонстрировал спектр кругового дихроизма, характерный для белка, обогащенного β-структурой [86, 88], что тоже свидетельствовало об амилоидной природе формируемых Bgl2p структур. Изучали также рН-зависимость способности Bgl2p фибриллизироваться с использованием как выделенного белка, так и модели на основе синтетических пептидов, соответствующих по последовательности предсказанным биоинформатически потенциально амилоидогенным участкам Bgl2p [87]. Было показано, что при нейтральных и слабощелочных значениях рН-среды выделенный из клеточной стенки Bgl2p фибриллизуется, тогда как уже при слабощелочных значениях рН данный белок теряет способность формировать амилоидные фибриллы [87]. Механизм амилоидообразования Bgl2p в клеточной стенке, равно как и физиологическую роль этого процесса для функционирования дрожжей, еще только предстоит выяснить [89].

Bgl2p, вероятно, играет определяющую роль в вирулентности патогенных видов дрожжей, поскольку делеция гена *BGL2* снижает способность этих микроорганизмов к заражению [82]. Дженг и соавт. обнаружили, что Bgl2p *C. albicans* также выполняет роль адгезина, обеспечивающего связь клеток с иммобилизованными компонен-

тами слюны [85]. Было показано, что антитела к Bgl2p *C. albicans* являются диагностическим биомаркером системного кандидоза, а их высокий уровень коррелирует со снижением вероятности летального исхода, что связано, по-видимому, с защитной ролью данных антител [90].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Описывая амилоидные белки поверхности микроорганизмов, мы не рассматривали статьи, посвященные таким амилоидам, как чаплины, микроцины и харпины, поскольку к настоящему моменту их роль в патогенезе человека и животных либо не выявлена, либо малоизучена. Тем не менее исследование структуры и механизмов формирования этих и других амилоидов, активно ведущиеся в ряде крупных научных центров и лабораторий как у нас в стране, так и за рубежом, позволяют ожидать новых важных результатов в данной области исследований.

Мы полагаем, что необходимо уделять внимание анализу возможной роли амилоидов и других компонентов поверхности клеток микроорганизмов при изучении развития заболеваний с неясной этиологией. У многих вышших эукариот, и в том числе человека, микроорганизмы присутствуют в большом количестве. Можно сказать, что для значительного числа животных микроорганизмы являются их неотъемлемой составляющей. Количество клеток микроорганизмов может значительно превышать количество клеток организма хозяина [1]. Компоненты клеточной поверхности микроорганизмов, включая амилоидные белки, находятся в постоянном контакте с клетками и жидкостями организма хозяина. Недальновидно недооценивать потенциальную роль этих молекул, локализованных на поверхности микроорганизмов как про-, так и эукариотического происхождения, в метаболизме животных и человека, и в том числе в процессах, ведущих к их заболеванию.

Литература

1. Lei YM, Nair L, Alegre ML. The interplay between the intestinal microbiota and the immune system. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2015 Feb; 39 (1): 9–19.
2. Alteri CJ, Xicohtencatl-Cortes J, Hess S, Caballero-Olín G, Girón JA, Friedman RL. Mycobacterium tuberculosis produces pili during human infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Mar 20; 104 (12): 5145–50.
3. Ramsugit S, Guma S, Pillay B, Jain P, Larsen MH, Danaviah S, et al. Pili contribute to biofilm formation in vitro in Mycobacterium tuberculosis. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2013 Nov; 104 (5): 725–35.
4. Hill JM, Bhattacharjee S, Pogue AI, Lukiw WJ. The gastrointestinal tract microbiome and potential link to Alzheimer's disease. *Front Neurol*. 2014 Apr 4; 5: 43.
5. Hill JM, Clement C, Pogue AI, Bhattacharjee S, Zhao Y, Lukiw WJ. Pathogenic microbes, the microbiome, and Alzheimer's disease (AD). *Front Aging Neurosci*. 2014 Jun 16; 6: 127.

6. Shoemark DK, Allen SJ. The microbiome and disease: reviewing the links between the oral microbiome, aging, and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2015; 43 (3): 725–38.
7. Нижников А. А., Антонец К. С., Инге-Вечтомов С. Г. Амилоиды: от патогенеза к функции. *Биохимия*. 2015; 80 (9): 1356–75.
8. Hamley IW. Peptide fibrillization. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2007; 46 (43): 8128–47.
9. Wessels J, De Vries O, Asgeirsdottir SA, Schuren F. Hydrophobin Genes Involved in Formation of Aerial Hyphae and Fruit Bodies in *Schizophyllum*. *Plant Cell*. 1991 Aug; 3 (8): 793–9.
10. Collinson SK, Doig PC, Doran JL, Clouthier S, Trust TJ, Kay WW. Thin, aggregative fimbriae mediate binding of *Salmonella enteritidis* to fibronectin. *J Bacteriol*. 1993 Jan; 175 (1): 12–8.
11. Chapman MR, Robinson LS, Pinkner JS, Roth R, Heuser J, Hammar M, et al. Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science*. 2002 Feb 1; 295 (5556): 851–5.
12. Schwartz K, Syed AK, Stephenson RE, Rickard AH, Boles BR. Functional amyloids composed of phenol soluble modulins stabilize *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog*. 2012; 8 (6): e1002744.
13. Danne C, Dramsi S. Pili of gram-positive bacteria: roles in host colonization. *Res Microbiol*. 2012 Nov–Dec; 163 (9–10): 645–58.
14. Barnhart MM, Chapman MR. Curli biogenesis and function. *Annu Rev Microbiol*. 2006; 60: 131–47.
15. Gibson DL, White AP, Rajotte CM, Kay WW. AgfC and AgfE facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in *Salmonella enteritidis*. *Microbiology*. 2007 Apr; 153 (Pt 4): 1131–40.
16. Jonas K, Tomenius H, Kader A, Normark S, Römling U, Belova LM, et al. Roles of curli, cellulose and BapA in *Salmonella* biofilm morphology studied by atomic force microscopy. *BMC Microbiol*. 2007 Jul 24; 7: 70.
17. Lapidot A, Yaron S. Transfer of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from contaminated irrigation water to parsley is dependent on curli and cellulose, the biofilm matrix components. *J Food Prot*. 2009 Mar; 72 (3): 618–23.
18. Wösten HA, de Vocht ML. Hydrophobins, the fungal coat unraveled. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Sep 18; 1469 (2): 79–86.
19. Schwartz K, Ganesan M, Payne DE, Solomon MJ, Boles BR. Extracellular DNA facilitates the formation of functional amyloids in *Staphylococcus aureus* biofilms. *Mol Microbiol*. 2016 Jan; 99 (1): 123–34.
20. Otoo HN, Lee KG, Qiu W, Lipke PN. *Candida albicans* Als adhesins have conserved amyloid-forming sequences. *Eukaryot Cell*. 2008 May; 7 (5): 776–82.
21. Garcia M, Lipke P, Klotz S. Pathogenic microbial amyloids: Their function and the host response. *OA Microbiol*. 2013 Dec 1; 1 (1). pii: 2.
22. Romero D, Aguilar C, Losick R, Kolter R. Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Feb 2; 107 (5): 2230–4.
23. Romero D, Vlamakis H, Losick R, Kolter R. An accessory protein required for anchoring and assembly of amyloid fibres in *B. subtilis* biofilms. *Mol Microbiol*. 2011 Jun; 80 (5): 1155–68.
24. Romero D, Vlamakis H, Losick R, Kolter R. Functional analysis of the accessory protein TapA in *Bacillus subtilis* amyloid fiber assembly. *J Bacteriol*. 2014 Apr; 196 (8): 1505–13.
25. Fowler DM, Koulov AV, Balch WE, Kelly JW. Functional amyloid — from bacteria to humans. *Trends Biochem Sci*. 2007 May; 32 (5): 217–24.
26. Sjöbring U, Pohl G, Olsén A. Plasminogen, absorbed by *Escherichia coli* expressing curli or by *Salmonella enteritidis* expressing thin aggregative fimbriae, can be activated by simultaneously captured tissue-type plasminogen activator (t-PA). *Mol Microbiol*. 1994 Nov; 14 (3): 443–52.
27. Hammar M, Arnqvist A, Bian Z, Olsén A, Normark S. Expression of two csg operons is required for production of fibronectin- and congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol*. 1995 Nov; 18 (4): 661–70.
28. Ben Nasr A, Olsén A, Sjöbring U, Müller-Esterl W, Björck L. Assembly of human contact phase proteins and release of bradykinin at the surface of curli-expressing *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 1996 Jun; 20 (5): 927–35.
29. Olsén A, Wick MJ, Mörgelin M, Björck L. Curli, fibrous surface proteins of *Escherichia coli*, interact with major histocompatibility complex class I molecules. *Infect Immun*. 1998 Mar; 66 (3): 944–9.
30. Uhlich GA, Keen JE, Elder RO. Variations in the csgD promoter of *Escherichia coli* O157:H7 associated with increased virulence in mice and increased invasion of HEp-2 cells. *Infect Immun*. 2002 Jan; 70 (1): 395–9.
31. Gebbink MF, Claessen D, Bouma B, Dijkhuizen L, Wösten HA. Amyloids — a functional coat for microorganisms. *Nat Rev Microbiol*. 2005 Apr; 3 (4): 333–41.
32. Kanamaru S, Kurazono H, Terai A, Monden K, Kumon H, Mizunoe Y, et al. Increased biofilm formation in *Escherichia coli* isolated from acute prostatitis. *Int J Antimicrob Agents*. 2006 Aug; 28 Suppl 1: S21–5.
33. Prigent-Combaret C, Prensier G, Le Thi TT, Vidal O, Lejeune P, Dorel C. Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environ Microbiol*. 2000 Aug; 2 (4): 450–64.
34. Sitaras C, Naghavi M, Herrington MB. Sodium dodecyl sulfate-agarose gel electrophoresis for the detection and isolation of amyloid curli fibers. *Anal Biochem*. 2011 Jan 15; 408 (2): 328–31.
35. Vidal O, Longin R, Prigent-Combaret C, Dorel C, Hooreman M, Lejeune P. Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new ompR allele that increases curli expression. *J Bacteriol*. 1998 May; 180 (9): 2442–9.
36. Barak JD, Gorski L, Naraghi-Arani P, Charkowski AO. *Salmonella enterica* virulence genes are required for bacterial attachment to plant tissue. *Appl Environ Microbiol*. 2005 Oct; 71 (10): 5685–91.
37. Jeter C, Matthyse AG. Characterization of the binding of diarrheagenic strains of *E. coli* to plant surfaces and the role of curli in the interaction of the bacteria with alfalfa sprouts. *Mol Plant Microbe Interact*. 2005 Nov; 18 (11): 1235–42.
38. Ryu JH, Beuchat LR. Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and Curli production on its resistance to chlorine. *Appl Environ Microbiol*. 2005 Jan; 71 (1): 247–54.
39. Hidalgo G, Chen X, Hay AG, Lion LW. Curli produced by *Escherichia coli* PHL628 provide protection from Hg(II). *Appl Environ Microbiol*. 2010 Oct; 76 (20): 6939–41.
40. Epstein EA, Chapman MR. Polymerizing the fibre between bacteria and host cells: the biogenesis of functional amyloid fibres. *Cell Microbiol*. 2008 Jul; 10 (7): 1413–20.
41. Arnqvist A, Olsén A, Pfeifer J, Russell DG, Normark S. The Crl protein activates cryptic genes for curli formation and fibronectin binding in *Escherichia coli* HB101. *Mol Microbiol*. 1992 Sep; 6 (17): 2443–52.
42. Hammer ND, Schmidt JC, Chapman MR. The curli nucleator protein, CsgB, contains an amyloidogenic domain that directs CsgA polymerization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jul 24; 104 (30): 12494–9.
43. Nennering AA, Robinson LS, Hultgren SJ. Localized and efficient curli nucleation requires the chaperone-like amyloid assembly protein CsgF. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jan 20; 106 (3): 900–5.
44. Bian Z, Normark S. Nucleator function of CsgB for the assembly of adhesive surface organelles in *Escherichia coli*. *EMBO J*. 1997 Oct 1; 16 (19): 5827–36.
45. Nennering AA, Robinson LS, Hammer ND, Epstein EA, Badtke MP, Hultgren SJ, et al. CsgE is a curli secretion specificity factor that prevents amyloid fibre aggregation. *Mol Microbiol*. 2011 Jul; 81 (2): 486–99.
46. Andersson EK, Bengtsson C, Evans ML, Chorell E, Sellstedt M, Lindgren AE, et al. Modulation of curli assembly and pellicle biofilm formation by chemical and protein chaperones. *Chem Biol*. 2012 Oct 24; 20 (10): 1245–54.
47. Zhao Y, Dua P, Lukiw WJ. Microbial Sources of Amyloid and Relevance to Amyloidogenesis and Alzheimer's Disease (AD). *J Alzheimers Dis Parkinsonism*. 2015 Mar; 5 (1): 177.
48. Dueholm MS, Albertsen M, Otzen D, Nielsen PH. Curli functional amyloid systems are phylogenetically widespread and display large diversity in operon and protein structure. *PLoS One*. 2012; 7 (12): e51274.
49. Hogley L, Harkins C, MacPhee CE, Stanley-Wall NR. Giving

- structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. *FEMS Microbiol Rev.* 2015 Sep; 39 (5): 649–69.
50. Oli MW, Otoo HN, Crowley PJ, Heim KP, Nascimento MM, Ramsook CB, et al. Functional amyloid formation by *Streptococcus mutans*. *Microbiology.* 2012 Dec; 158 (Pt 12): 2903–16.
 51. Wang R, Braughton KR, Kretschmer D, Bach TL, Queck SY, Li M, et al. Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat Med.* 2007 Dec; 13 (12): 1510–4.
 52. Marchand A, Verdon J, Lacombe C, Crapart S, Héchard Y, Berjeaud JM. Anti-Legionella activity of staphylococcal hemolytic peptides. *Peptides.* 2011 May; 32 (5): 845–51.
 53. Periasamy S, Chatterjee SS, Cheung GY, Otto M. Phenol-soluble modulins in staphylococci: What are they originally for? *Commun Integr Biol.* 2012 May 1; 5 (3): 275–7.
 54. Chatterjee SS, Joo HS, Duong AC, Dieringer TD, Tan VY, Song Y, et al. Essential *Staphylococcus aureus* toxin export system. *Nat Med.* 2013 Mar; 19 (3): 364–7.
 55. Branda SS, González-Pastor JE, Ben-Yehuda S, Losick R, Kolter R. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Sep 25; 98 (20): 11621–6.
 56. Branda SS, Chu F, Kearns DB, Losick R, Kolter R. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Mol Microbiol.* 2006 Feb; 59 (4): 1229–38.
 57. Stöver AG, Driks A. Secretion, localization, and antibacterial activity of TsaA, a *Bacillus subtilis* spore-associated protein. *J Bacteriol.* 1999 Mar; 181 (5): 1664–72.
 58. Serrano M, Zilhão R, Ricca E, Ozin AJ, Moran CP Jr, Henriques AO. A *Bacillus subtilis* secreted protein with a role in endospore coat assembly and function. *J Bacteriol.* 1999 Jun; 181 (12): 3632–43.
 59. Kayed R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW, et al. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science.* 2003 Apr 18; 300 (5618): 486–9.
 60. Valincius G, Heinrich F, Budvytyte R, Vanderah DJ, McGillivray DJ, Sokolov Y, et al. Soluble amyloid beta-oligomers affect dielectric membrane properties by bilayer insertion and domain formation: implications for cell toxicity. *Biophys J.* 2008 Nov 15; 95 (10): 4845–61.
 61. Wessels JG. Hydrophobins: proteins that change the nature of the fungal surface. *Adv Microb Physiol.* 1997; 38: 1–45.
 62. Askolin S, Linder M, Scholtmeijer K, Tenkanen M, Penttilä M, de Vocht ML, et al. Interaction and comparison of a class I hydrophobin from *Schizophyllum commune* and class II hydrophobins from *Trichoderma reesei*. *Biomacromolecules.* 2006 Apr; 7 (4): 1295–301.
 63. Morris VK, Ren Q, Macindoe I, Kwan AH, Byrne N, Sunde M. Recruitment of class I hydrophobins to the air:water interface initiates a multi-step process of functional amyloid formation. *J Biol Chem.* 2011 May 6; 286 (18): 15955–63.
 64. Aimanianda V, Latgé JP. Fungal hydrophobins form a sheath preventing immune recognition of airborne conidia. *Virulence.* 2010 May–Jun; 1 (3): 185–7.
 65. Heddergott C, Bruns S, Nietzsche S, Leonhardt I, Kurzai O, Kniemeyer O, et al. The *Arthroderma benhamiae* hydrophobin HypA mediates hydrophobicity and influences recognition by human immune effector cells. *Eukaryot Cell.* 2012 May; 11 (5): 673–82.
 66. Dagenais TR, Giles SS, Aimanianda V, Latgé JP, Hull CM, Keller NP. *Aspergillus fumigatus* LaeA-mediated phagocytosis is associated with a decreased hydrophobin layer. *Infect Immun.* 2010 Feb; 78 (2): 823–9.
 67. Mann SJ, Blank F. Systemic amyloidosis in mice inoculated with lyophilized *Candida* cells. *Infect Immun.* 1975 Jun; 11 (6): 1371–4.
 68. Bailey CH. The production of amyloid disease and chronic nephritis in rabbits by repeated intravenous injections of living colon bacilli. *J Exp Med.* 1916 Jun 1; 23 (6): 773–90.
 69. Barth WF, Gordon JK, Willerson JT. Amyloidosis induced in mice by *Escherichia coli* endotoxin. *Science.* 1968 Nov 8; 162 (3854): 694–5.
 70. Janigan DT. Experimental amyloidosis: Studies with a modified casein method, casein hydrolysate and gelatin. *Am J Pathol.* 1965 Jul; 47: 159–71.
 71. Kirkpatrick JB, Sorenson GD. Murine amyloidosis induced by egg albumin. *Lab Invest.* 1964; 13: 954.
 72. Dick GF, Leiter L. Some factors in the development, localization and reabsorption of experimental amyloidosis in the rabbit. *Am J Pathol.* 1941 Sep; 17 (5): 741–54.
 73. DeLellis RA, Sri Ram J, Glenner GG. Amyloid. IX. Further kinetic studies on experimental murine amyloidosis. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1970; 37 (2): 175–83.
 74. Tartaglia GG, Caffisch A. Computational analysis of the *S. cerevisiae* proteome reveals the function and cellular localization of the least and most amyloidogenic proteins. *Proteins.* 2007 Jul 1; 68 (1): 273–8.
 75. Ramsook CB, Tan C, Garcia MC, Fung R, Soybelman G, Henry R, et al. Yeast cell adhesion molecules have functional amyloid-forming sequences. *Eukaryot Cell.* 2010 Mar; 9 (3): 393–404.
 76. Sheppard DC, Yeaman MR, Welch WH, Phan QT, Fu Y, Ibrahim AS, et al. Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*. *J Biol Chem.* 2004 Jul 16; 279 (29): 30480–9.
 77. Nobile CJ, Mitchell AP. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cell Microbiol.* 2006 Sep; 8 (9): 1382–91.
 78. Nobile CJ, Johnson AD. *Candida albicans* biofilms and human disease. *Annu Rev Microbiol.* 2015; 69: 71–92.
 79. Hoyer LL, Green CB, Oh SH, Zhao X. Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family — a sticky pursuit. *Med Mycol.* 2008 Feb; 46 (1): 1–15.
 80. Modrzewska B, Kurnatowski P. Adherence of *Candida* sp. to host tissues and cells as one of its pathogenicity features. *Ann Parasitol.* 2015; 61 (1): 3–9.
 81. Alves CT, Wei XQ, Silva S, Azeredo J, Henriques M, Williams DW. *Candida albicans* promotes invasion and colonisation of *Candida glabrata* in a reconstituted human vaginal epithelium. *J Infect.* 2014 Oct; 69 (4): 396–407.
 82. Sarthy AV, McGonigal T, Coen M, Frost DJ, Meulbroek JA, Goldman RC. Phenotype in *Candida albicans* of a disruption of the BGL2 gene encoding a 1,3-beta-glucosyltransferase. *Microbiology.* 1997 Feb; 143 (Pt 2): 367–76.
 83. Mouyna I, Hartland RP, Fontaine T, Diaquin M, Simenel C, Delepierre M, et al. A 1,3-beta-glucanase isolated from the cell wall of *Aspergillus fumigatus* is a homologue of the yeast Bgl2p. *Microbiology.* 1998 Nov; 144 (Pt 11): 3171–80.
 84. Mouyna I, Hartl L, Latgé JP. β -1,3-glucan modifying enzymes in *Aspergillus fumigatus*. *Front Microbiol.* 2013 Apr 17; 4: 81.
 85. Jeng HW, Holmes AR, Cannon RD. Characterization of two *Candida albicans* surface mannoprotein adhesins that bind immobilized saliva components. *Med Mycol.* 2005 May; 43 (3): 209–17.
 86. Kalebina TS, Plotnikova TA, Gorkovskii AA, Selyakh IO, Galzitskaya OV, Bezsonov EE, et al. Amyloid-like properties of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall glucantransferase Bgl2p: prediction and experimental evidences. *Prion.* 2008 Apr–Jun; 2 (2): 91–6.
 87. Bezsonov EE, Groenning M, Galzitskaya OV, Gorkovskii AA, Semisotnov GV, Selyakh IO, et al. Amyloidogenic peptides of yeast cell wall glucantransferase Bgl2p as a model for the investigation of its pH-dependent fibril formation. *Prion.* 2013 Mar–Apr; 7 (2): 175–84.
 88. Безсонов Е. Е., Калебина Т. С., Горковский А. А., Кудряшова И. Б., Семисотнов Г. В., Кулаев И. С. Температурно-индуцированные конформационные переходы глюкантрансферазы Bgl2p, выделенной из клеточных стенок дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. *Мол. биол.* 2010; 44 (3): 551–4.
 89. Горковский А. А., Безсонов Е. Е., Плотникова Т. А., Калебина Т. С., Кулаев И. С. Обнаружение тиофлавинов Т-связывающих белков в клеточной стенке дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. *Биохимия.* 2009; 74 (11): 1219–24.
 90. Pitarch A, Jiménez A, Nombela C, Gil C. Decoding serological response to *Candida* cell wall immunome into novel diagnostic, prognostic, and therapeutic candidates for systemic candidiasis by proteomic and bioinformatic analyses. *Mol Cell Proteomics.* 2006 Jan; 5 (1): 79–96.

References

- Lei YM, Nair L, Alegre ML. The interplay between the intestinal microbiota and the immune system. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2015 Feb; 39 (1): 9–19.
- Alteri CJ, Xicohténcatl-Cortes J, Hess S, Caballero-Olín G, Girón JA, Friedman RL. Mycobacterium tuberculosis produces pili during human infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Mar 20; 104 (12): 5145–50.
- Ramsugit S, Guma S, Pillay B, Jain P, Larsen MH, Danaviah S, et al. Pili contribute to biofilm formation in vitro in Mycobacterium tuberculosis. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2013 Nov; 104 (5): 725–35.
- Hill JM, Bhattacharjee S, Pogue AI, Lukiw WJ. The gastrointestinal tract microbiome and potential link to Alzheimer's disease. *Front Neurol*. 2014 Apr 4; 5: 43.
- Hill JM, Clement C, Pogue AI, Bhattacharjee S, Zhao Y, Lukiw WJ. Pathogenic microbes, the microbiome, and Alzheimer's disease (AD). *Front Aging Neurosci*. 2014 Jun 16; 6: 127.
- Shoemark DK, Allen SJ. The microbiome and disease: reviewing the links between the oral microbiome, aging, and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2015; 43 (3): 725–38.
- Nizhnikov AA, Antonets KS, Inge-Vechtomov SG. Amiloidy: ot patogenezu k funktsii. *Biokhimiia*. 2015; 80 (9): 1356–75. Russian.
- Hamley IW. Peptide fibrillization. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2007; 46 (43): 8128–47.
- Wessels J, De Vries O, Asgeirsdottir SA, Schuren F. Hydrophobin Genes Involved in Formation of Aerial Hyphae and Fruit Bodies in Schizophyllum. *Plant Cell*. 1991 Aug; 3 (8): 793–9.
- Collinson SK, Doig PC, Doran JL, Clouthier S, Trust TJ, Kay WW. Thin, aggregative fimbriae mediate binding of Salmonella enteritidis to fibronectin. *J Bacteriol*. 1993 Jan; 175 (1): 12–8.
- Chapman MR, Robinson LS, Pinkner JS, Roth R, Heuser J, Hammar M, et al. Role of Escherichia coli curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science*. 2002 Feb 1; 295 (5556): 851–5.
- Schwartz K, Syed AK, Stephenson RE, Rickard AH, Boles BR. Functional amyloids composed of phenol soluble modulins stabilize Staphylococcus aureus biofilms. *PLoS Pathog*. 2012; 8 (6): e1002744.
- Danne C, Dramsi S. Pili of gram-positive bacteria: roles in host colonization. *Res Microbiol*. 2012 Nov–Dec; 163 (9–10): 645–58.
- Barnhart MM, Chapman MR. Curli biogenesis and function. *Annu Rev Microbiol*. 2006; 60: 131–47.
- Gibson DL, White AP, Rajotte CM, Kay WW. AgfC and AgfE facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in Salmonella enteritidis. *Microbiology*. 2007 Apr; 153 (Pt 4): 1131–40.
- Jonas K, Tomenius H, Kader A, Normark S, Römling U, Belova LM, et al. Roles of curli, cellulose and BapA in Salmonella biofilm morphology studied by atomic force microscopy. *BMC Microbiol*. 2007 Jul 24; 7: 70.
- Lapidot A, Yaron S. Transfer of Salmonella enterica serovar Typhimurium from contaminated irrigation water to parsley is dependent on curli and cellulose, the biofilm matrix components. *J Food Prot*. 2009 Mar; 72 (3): 618–23.
- Wösten HA, de Vocht ML. Hydrophobins, the fungal coat unravelled. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Sep 18; 1469 (2): 79–86.
- Schwartz K, Ganesan M, Payne DE, Solomon MJ, Boles BR. Extracellular DNA facilitates the formation of functional amyloids in Staphylococcus aureus biofilms. *Mol Microbiol*. 2016 Jan; 99 (1): 123–34.
- Otoo HN, Lee KG, Qiu W, Lipke PN. Candida albicans Als adhesins have conserved amyloid-forming sequences. *Eukaryot Cell*. 2008 May; 7 (5): 776–82.
- Garcia M, Lipke P, Klotz S. Pathogenic microbial amyloids: Their function and the host response. *OA Microbiol*. 2013 Dec 1; 1 (1): pii: 2.
- Romero D, Aguilar C, Losick R, Kolter R. Amyloid fibers provide structural integrity to Bacillus subtilis biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Feb 2; 107 (5): 2230–4.
- Romero D, Vlamakis H, Losick R, Kolter R. An accessory protein required for anchoring and assembly of amyloid fibres in B. subtilis biofilms. *Mol Microbiol*. 2011 Jun; 80 (5): 1155–68.
- Romero D, Vlamakis H, Losick R, Kolter R. Functional analysis of the accessory protein TapA in Bacillus subtilis amyloid fiber assembly. *J Bacteriol*. 2014 Apr; 196 (8): 1505–13.
- Fowler DM, Koulov AV, Balch WE, Kelly JW. Functional amyloid — from bacteria to humans. *Trends Biochem Sci*. 2007 May; 32 (5): 217–24.
- Sjöbring U, Pohl G, Olsén A. Plasminogen, absorbed by Escherichia coli expressing curli or by Salmonella enteritidis expressing thin aggregative fimbriae, can be activated by simultaneously captured tissue-type plasminogen activator (t-PA). *Mol Microbiol*. 1994 Nov; 14 (3): 443–52.
- Hammar M, Arnqvist A, Bian Z, Olsén A, Normark S. Expression of two csg operons is required for production of fibronectin- and congo red-binding curli polymers in Escherichia coli K-12. *Mol Microbiol*. 1995 Nov; 18 (4): 661–70.
- Ben Nasr A, Olsén A, Sjöbring U, Müller-Esterl W, Björck L. Assembly of human contact phase proteins and release of bradykinin at the surface of curli-expressing Escherichia coli. *Mol Microbiol*. 1996 Jun; 20 (5): 927–35.
- Olsén A, Wick MJ, Mörgelin M, Björck L. Curli, fibrous surface proteins of Escherichia coli, interact with major histocompatibility complex class I molecules. *Infect Immun*. 1998 Mar; 66 (3): 944–9.
- Uhlich GA, Keen JE, Elder RO. Variations in the csgD promoter of Escherichia coli O157:H7 associated with increased virulence in mice and increased invasion of HEP-2 cells. *Infect Immun*. 2002 Jan; 70 (1): 395–9.
- Gebbink MF, Claessen D, Bouma B, Dijkhuizen L, Wösten HA. Amyloids — a functional coat for microorganisms. *Nat Rev Microbiol*. 2005 Apr; 3 (4): 333–41.
- Kanamaru S, Kurazono H, Terai A, Monden K, Kumon H, Mizunoe Y, et al. Increased biofilm formation in Escherichia coli isolated from acute prostatitis. *Int J Antimicrob Agents*. 2006 Aug; 28 Suppl 1: S21–5.
- Prigent-Combaret C, Prensier G, Le Thi TT, Vidal O, Lejeune P, Dorel C. Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing Escherichia coli strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environ Microbiol*. 2000 Aug; 2 (4): 450–64.
- Sitaras C, Naghavi M, Herrington MB. Sodium dodecyl sulfate-agarose gel electrophoresis for the detection and isolation of amyloid curli fibers. *Anal Biochem*. 2011 Jan 15; 408 (2): 328–31.
- Vidal O, Longin R, Prigent-Combaret C, Dorel C, Hooreman M, Lejeune P. Isolation of an Escherichia coli K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new ompR allele that increases curli expression. *J Bacteriol*. 1998 May; 180 (9): 2442–9.
- Barak JD, Gorski L, Naraghi-Arani P, Charkowski AO. Salmonella enterica virulence genes are required for bacterial attachment to plant tissue. *Appl Environ Microbiol*. 2005 Oct; 71 (10): 5685–91.
- Jeter C, Matthyse AG. Characterization of the binding of diarrheagenic strains of E. coli to plant surfaces and the role of curli in the interaction of the bacteria with alfalfa sprouts. *Mol Plant Microbe Interact*. 2005 Nov; 18 (11): 1235–42.
- Ryu JH, Beuchat LR. Biofilm formation by Escherichia coli O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and Curli production on its resistance to chlorine. *Appl Environ Microbiol*. 2005 Jan; 71 (1): 247–54.
- Hidalgo G, Chen X, Hay AG, Lion LW. Curli produced by Escherichia coli PHL628 provide protection from Hg(II). *Appl Environ Microbiol*. 2010 Oct; 76 (20): 6939–41.
- Epstein EA, Chapman MR. Polymerizing the fibre between bacteria and host cells: the biogenesis of functional amyloid fibres. *Cell Microbiol*. 2008 Jul; 10 (7): 1413–20.
- Arnqvist A, Olsén A, Pfeifer J, Russell DG, Normark S. The Crl protein activates cryptic genes for curli formation and fibronectin binding in Escherichia coli HB101. *Mol Microbiol*. 1992 Sep; 6 (17): 2443–52.
- Hammer ND, Schmidt JC, Chapman MR. The curli nucleator protein, CsgB, contains an amyloidogenic domain that directs CsgA polymerization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jul 24; 104 (30): 12494–9.
- Nenninger AA, Robinson LS, Hultgren SJ. Localized and efficient curli nucleation requires the chaperone-like amyloid assembly protein CsgF. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jan 20; 106 (3): 900–5.

44. Bian Z, Normark S. Nucleator function of CsgB for the assembly of adhesive surface organelles in *Escherichia coli*. *EMBO J*. 1997 Oct 1; 16 (19): 5827–36.
45. Nenninger AA, Robinson LS, Hammer ND, Epstein EA, Badtke MP, Hultgren SJ, et al. CsgE is a curli secretion specificity factor that prevents amyloid fibre aggregation. *Mol Microbiol*. 2011 Jul; 81 (2): 486–99.
46. Andersson EK, Bengtsson C, Evans ML, Chorell E, Sellstedt M, Lindgren AE, et al. Modulation of curli assembly and pellicle biofilm formation by chemical and protein chaperones. *Chem Biol*. 2012 Oct 24; 20 (10): 1245–54.
47. Zhao Y, Dua P, Lukiw WJ. Microbial Sources of Amyloid and Relevance to Amyloidogenesis and Alzheimer's Disease (AD). *J Alzheimers Dis Parkinsonism*. 2015 Mar; 5 (1): 177.
48. Dueholm MS, Albertsen M, Otzen D, Nielsen PH. Curli functional amyloid systems are phylogenetically widespread and display large diversity in operon and protein structure. *PLoS One*. 2012; 7 (12): e51274.
49. Hobley L, Harkins C, MacPhee CE, Stanley-Wall NR. Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. *FEMS Microbiol Rev*. 2015 Sep; 39 (5): 649–69.
50. Oli MW, Otoo HN, Crowley PJ, Heim KP, Nascimento MM, Ramsook CB, et al. Functional amyloid formation by *Streptococcus mutans*. *Microbiology*. 2012 Dec; 158 (Pt 12): 2903–16.
51. Wang R, Braughton KR, Kretschmer D, Bach TL, Queck SY, Li M, et al. Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat Med*. 2007 Dec; 13 (12): 1510–4.
52. Marchand A, Verdon J, Lacombe C, Crapart S, Hécharde Y, Berjeaud JM. Anti-Legionella activity of staphylococcal hemolytic peptides. *Peptides*. 2011 May; 32 (5): 845–51.
53. Periasamy S, Chatterjee SS, Cheung GY, Otto M. Phenol-soluble modulins in staphylococci: What are they originally for? *Commun Integr Biol*. 2012 May 1; 5 (3): 275–7.
54. Chatterjee SS, Joo HS, Duong AC, Dieringer TD, Tan VY, Song Y, et al. Essential *Staphylococcus aureus* toxin export system. *Nat Med*. 2013 Mar; 19 (3): 364–7.
55. Branda SS, González-Pastor JE, Ben-Yehuda S, Losick R, Kolter R. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 25; 98 (20): 11621–6.
56. Branda SS, Chu F, Kearns DB, Losick R, Kolter R. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Mol Microbiol*. 2006 Feb; 59 (4): 1229–38.
57. Stöver AG, Driks A. Secretion, localization, and antibacterial activity of TasA, a *Bacillus subtilis* spore-associated protein. *J Bacteriol*. 1999 Mar; 181 (5): 1664–72.
58. Serrano M, Zilhão R, Ricca E, Ozin AJ, Moran CP Jr, Henriques AO. A *Bacillus subtilis* secreted protein with a role in endospore coat assembly and function. *J Bacteriol*. 1999 Jun; 181 (12): 3632–43.
59. Kayed R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW, et al. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science*. 2003 Apr 18; 300 (5618): 486–9.
60. Valincius G, Heinrich F, Budvytyte R, Vanderah DJ, McGillivray DJ, Sokolov Y, et al. Soluble amyloid beta-oligomers affect dielectric membrane properties by bilayer insertion and domain formation: implications for cell toxicity. *Biophys J*. 2008 Nov 15; 95 (10): 4845–61.
61. Wessels JG. Hydrophobins: proteins that change the nature of the fungal surface. *Adv Microb Physiol*. 1997; 38: 1–45.
62. Askolin S, Linder M, Scholtmeijer K, Tenkanen M, Penttilä M, de Vocht ML, et al. Interaction and comparison of a class I hydrophobin from *Schizophyllum commune* and class II hydrophobins from *Trichoderma reesei*. *Biomacromolecules*. 2006 Apr; 7 (4): 1295–301.
63. Morris VK, Ren Q, Macindoe I, Kwan AH, Byrne N, Sunde M. Recruitment of class I hydrophobins to the air:water interface initiates a multi-step process of functional amyloid formation. *J Biol Chem*. 2011 May 6; 286 (18): 15955–63.
64. Aimaganianda V, Latgé JP. Fungal hydrophobins form a sheath preventing immune recognition of airborne conidia. *Virulence*. 2010 May–Jun; 1 (3): 185–7.
65. Heddergott C, Bruns S, Nietzsche S, Leonhardt I, Kurzai O, Kniemeyer O, et al. The *Arthroderma benhamiae* hydrophobin HypA mediates hydrophobicity and influences recognition by human immune effector cells. *Eukaryot Cell*. 2012 May; 11 (5): 673–82.
66. Dagenais TR, Giles SS, Aimaganianda V, Latgé JP, Hull CM, Keller NP. *Aspergillus fumigatus* LaeA-mediated phagocytosis is associated with a decreased hydrophobin layer. *Infect Immun*. 2010 Feb; 78 (2): 823–9.
67. Mann SJ, Blank F. Systemic amyloidosis in mice inoculated with lyophilized *Candida* cells. *Infect Immun*. 1975 Jun; 11 (6): 1371–4.
68. Bailey CH. The production of amyloid disease and chronic nephritis in rabbits by repeated intravenous injections of living colon bacilli. *J Exp Med*. 1916 Jun 1; 23 (6): 773–90.
69. Barth WF, Gordon JK, Willerson JT. Amyloidosis induced in mice by *Escherichia coli* endotoxin. *Science*. 1968 Nov 8; 162 (3854): 694–5.
70. Janigan DT. Experimental amyloidosis: Studies with a modified casein method, casein hydrolysate and gelatin. *Am J Pathol*. 1965 Jul; 47: 159–71.
71. Kirkpatrick JB, Sorenson GD. Murine amyloidosis induced by egg albumin. *Lab Invest*. 1964; 13: 954.
72. Dick GF, Leiter L. Some factors in the development, localization and reabsorption of experimental amyloidosis in the rabbit. *Am J Pathol*. 1941 Sep; 17 (5): 741–54.
73. DeLellis RA, Sri Ram J, Glenner GG. Amyloid. IX. Further kinetic studies on experimental murine amyloidosis. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1970; 37 (2): 175–83.
74. Tartaglia GG, Caffisch A. Computational analysis of the *S. cerevisiae* proteome reveals the function and cellular localization of the least and most amyloidogenic proteins. *Proteins*. 2007 Jul 1; 68 (1): 273–8.
75. Ramsook CB, Tan C, Garcia MC, Fung R, Soybelman G, Henry R, et al. Yeast cell adhesion molecules have functional amyloid-forming sequences. *Eukaryot Cell*. 2010 Mar; 9 (3): 393–404.
76. Sheppard DC, Yeaman MR, Welch WH, Phan QT, Fu Y, Ibrahim AS, et al. Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*. *J Biol Chem*. 2004 Jul 16; 279 (29): 30480–9.
77. Nobile CJ, Mitchell AP. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cell Microbiol*. 2006 Sep; 8 (9): 1382–91.
78. Nobile CJ, Johnson AD. *Candida albicans* biofilms and human disease. *Annu Rev Microbiol*. 2015; 69: 71–92.
79. Hoyer LL, Green CB, Oh SH, Zhao X. Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family — a sticky pursuit. *Med Mycol*. 2008 Feb; 46 (1): 1–15.
80. Modrzewska B, Kurnatowski P. Adherence of *Candida* sp. to host tissues and cells as one of its pathogenicity features. *Ann Parasitol*. 2015; 61 (1): 3–9.
81. Alves CT, Wei XQ, Silva S, Azeredo J, Henriques M, Williams DW. *Candida albicans* promotes invasion and colonisation of *Candida glabrata* in a reconstituted human vaginal epithelium. *J Infect*. 2014 Oct; 69 (4): 396–407.
82. Sarthy AV, McGonigal T, Coen M, Frost DJ, Meulbroek JA, Goldman RC. Phenotype in *Candida albicans* of a disruption of the BGL2 gene encoding a 1,3-beta-glucosyltransferase. *Microbiology*. 1997 Feb; 143 (Pt 2): 367–76.
83. Mouyna I, Hartland RP, Fontaine T, Diaquin M, Simenel C, Delepierre M, et al. A 1,3-beta-glucanase isolated from the cell wall of *Aspergillus fumigatus* is a homologue of the yeast Bgl2p. *Microbiology*. 1998 Nov; 144 (Pt 11): 3171–80.
84. Mouyna I, Hartl L, Latgé JP. β -1,3-glucan modifying enzymes in *Aspergillus fumigatus*. *Front Microbiol*. 2013 Apr 17; 4: 81.
85. Jeng HW, Holmes AR, Cannon RD. Characterization of two *Candida albicans* surface mannoprotein adhesins that bind immobilized saliva components. *Med Mycol*. 2005 May; 43 (3): 209–17.
86. Kalebina TS, Plotnikova TA, Gorkovskii AA, Selyakh IO, Galzitskaya OV, Bezsonov EE, et al. Amyloid-like properties of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall glucantransferase Bgl2p: prediction and experimental evidences. *Prion*. 2008 Apr–Jun; 2 (2): 91–6.
87. Bezsonov EE, Groenning M, Galzitskaya OV, Gorkovskii AA, Semisotnov GV, Selyakh IO, et al. Amyloidogenic peptides of yeast

- cell wall glucantransferase Bgl2p as a model for the investigation of its pH-dependent fibril formation. *Prion*. 2013 Mar–Apr; 7 (2): 175–84.
88. Bezsonov EE, Kalebina TS, Gorkovskii AA, Kudriashova IB, Semisotnov GV, Kulaev IS. [Temperature-induced conformational transitions of glucantransferase Bgl2p isolated from *Saccharomyces cerevisiae* yeast cell walls]. *Mol Biol (Mosk)*. 2010 May–Jun; 44 (3): 551–4. Russian.
89. Gorkovskii AA, Bezsonov EE, Plotnikova TA, Kalebina TS, Kulaev IS. Revealing of *Saccharomyces cerevisiae* yeast cell wall proteins capable of binding thioflavin T, a fluorescent dye specifically interacting with amyloid fibrils. *Biochemistry (Mosc)*. 2009; 74 (11): 1219–24.
90. Pitarch A, Jiménez A, Nombela C, Gil C. Decoding serological response to *Candida* cell wall immunome into novel diagnostic, prognostic, and therapeutic candidates for systemic candidiasis by proteomic and bioinformatic analyses. *Mol Cell Proteomics*. 2006 Jan; 5 (1): 79–96.

НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ, ВЫЗВАННЫЕ ВВЕДЕНИЕМ ФРАГМЕНТА (25–35) β -АМИЛОИДНОГО ПЕПТИДА В ГИППОКАМП, СВЯЗАНЫ С АКТИВАЦИЕЙ NGF-СИГНАЛИНГА

М. Ю. Степаничев , А. Д. Иванов, Н. А. Лазарева, Ю. В. Моисеева, Н. В. Гуляева

Лаборатория функциональной биохимии нервной системы,
Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва

В механизме нейродегенерации при болезни Альцгеймера важную роль играет β -амилоидный пептид (А β). В работе исследовали влияние интрагиппокампальной инъекции фрагмента А β (25–35) на систему сигналинга фактора роста нервов (NGF). Крысам вводили агрегированный А β (25–35) в область дорзального гиппокампа. Контрольной группе проводили инъекции пептида с обратной аминокислотной последовательностью и растворителя. Показано, что А β (25–35) вызывал гибель нейронов в гиппокампе крыс. Нейродегенеративные процессы сопровождалась достоверным ($p < 0,05$) увеличением экспрессии рецептора нейротрофинов p75NTR у всех животных, получавших экзогенные пептиды, и повышением уровня NGF в гиппокампе только тех крыс, которым делали инъекцию А β (25–35). Результаты исследования демонстрируют, что вызванные А β (25–35) изменения в гиппокампе сопровождаются усилением NGF-сигналинга. Данное усиление в определенной степени подтверждает имеющиеся данные клинических наблюдений у пациентов с болезнью Альцгеймера. Указанные изменения несут компенсаторный характер, однако конечным результатом может быть как репарация повреждения, так и дальнейшее усиление дегенеративного процесса.

Ключевые слова: β -амилоидный пептид, гиппокамп, фактор роста нервов, рецептор p75NTR, нейродегенерация, болезнь Альцгеймера

Финансирование: работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 13-04-01019а и 16-04-01054а).

 **Для корреспонденции:** Михаил Юрьевич Степаничев
117485, г. Москва, ул. Бултерова, д. 5А; mikhail_stepanichev@yahoo.com

Статья поступила: 14.02.2016 **Статья принята к печати:** 19.02.2016

NEURODEGENERATIVE CHANGES INDUCED BY INJECTION OF β -AMYLOID PEPTIDE FRAGMENT (25–35) IN HIPPOCAMPUS ARE ASSOCIATED WITH NGF-SIGNALING ACTIVATION

Stepanichev MYu , Ivanov AD, Lazareva NA, Moiseeva YuV, Gulyaeva NV

Functional Biochemistry of Nervous System Laboratory,
Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

β -amyloid peptide (A β) is an important component of the neurodegeneration mechanism in Alzheimer's disease. This work investigates the effect of intrahippocampal injection of A β (25–35) fragment on nerve growth factor (NGF) signalling. Aggregated A β (25–35) was injected into rat dorsal hippocampus. Rats in the control group received injections of the peptide with an inverted amino acid sequence and a solvent. It was shown that A β (25–35) induces neuron death in rat hippocampus. Neurodegeneration was accompanied by a statistically significant increase ($p < 0.05$) in p75NTR neurotrophin receptor expression in all animals who had received exogenous peptides, and by an increased level of NGF in the hippocampus of those rats who had been injected with A β (25–35). The study results demonstrate that changes in the hippocampus induced by A β (25–35) are accompanied by increased NGF signalling, which, to some extent, supports the current clinical data obtained from patients with Alzheimer's. The changes mentioned above are compensatory. However, both damage repair and further degenerative processes can be the ultimate outcome.

Keywords: β -amyloid peptide, hippocampus, nerve growth factor, p75NTR receptor, neurodegeneration, Alzheimer's disease

Funding: this study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grants no. 13-04-01019a and 16-04-01054a).

 **Correspondence should be addressed:** Mikhail Stepanichev
ul. Butlerova, d. 5A, Moscow, Russia, 117485; mikhail_stepanichev@yahoo.com

Received: 14.02.2016 **Accepted:** 19.02.2016

Один из основных участников патогенеза болезни Альцгеймера — β -амилоидный пептид (А β). Он состоит из 40–42 аминокислот и является внутримембранным фрагментом большого трансмембранного белка-предшественника. А β образуется в результате протеолиза этого белка по так называемому амилоидогенному пути. Хотя окончательная

роль А β до сих пор не ясна, его накопление в мозге пациентов в виде растворимых агрегатов и нерастворимых депозитов является важнейшим маркером болезни Альцгеймера. Поскольку А β проявляет токсичность в отношении нейронов, интрацеребральные инъекции этого пептида животным позволяют моделировать некоторые аспекты

сложной картины патогенеза болезни Альцгеймера. Токсичность характерна как для полноразмерного Аβ пептида, так и для некоторых его укороченных фрагментов, в частности ундекапептида Аβ(25–35), который часто рассматривают как функциональный домен Аβ, ответственный также за его агрегационные свойства [1, 2].

Нейротоксичность Аβ(25–35) при его введении в гиппокамп была показана Rush и соавт. [3]. Инъекция Аβ(25–35) приводила к разрушению близлежащей ткани и дегенерации нейронов [3]. Тем не менее другие авторы [4] не обнаружили нейротоксического действия Аβ(25–35) при его введении в область вентрального бледного шара и безымянной субстанции. Они наблюдали лишь образование полостей, содержащих белковые агрегаты, которые окрашивались конго красным. Агрегированный Аβ(25–35) вызывал более выраженные повреждения пирамидного слоя поля СА1 гиппокампа по сравнению с пептидом, который был синтезирован из тех же аминокислот в обратной последовательности — Аβ(35–25) [5–8]. Дегенерирующие нейроны были также обнаружены в височной коре после инъекции Аβ(25–35) в крупноклеточное базальное ядро мозга крыс [9]. Следует отметить, что введение ундекапептида в отдельные структуры мозга может вызывать развитие транссинаптических нарушений цитоскелета и активации астроглии, которые наблюдаются не только в месте непосредственного введения, но и распространяются к более отдаленным областям мозга. Такие изменения наблюдали, например, в гиппокампе после введения Аβ(25–35) в миндалину [10]. В нашей предыдущей работе Аβ(25–35) также вызывал активацию астроцитов и микроглии в гиппокампе при его введении в эту структуру [8].

Активация нейроглии в очаге повреждения может иметь двоякое значение. С одной стороны, как непосредственные участники нейровоспаления, активированные астроциты и микроглиоциты способствуют дегенерации. Механизмы нейровоспаления, будучи инициированными, могут сами по себе приводить к дисфункции и гибели нейронов, что вызывает дополнительное усиление воспаления. Тем самым замыкается порочный круг, в котором нейровоспаление выступает причиной нейродегенерации [11]. С другой стороны, активация глии является выраженным компенсаторным ответом ткани, при котором микроглия активно фагоцитирует патоген, вызвавший повреждение ткани, например введенный Аβ или компоненты амилоидных бляшек, а астроциты могут способствовать лучшему обеспечению нейронов веществами, необходимыми для репарации, такими как нейротрофины.

Один из важнейших нейротрофинов в мозге млекопитающих — это фактор роста нервов (nerve growth factor, NGF). NGF является главным нейротрофином, обеспечивающим поддержку и функционирование холинергических нейронов в мозге взрослых млекопитающих [12, 13]. Он синтезируется и выделяется во внеклеточную среду клетками гиппокампа и неокортекса — мишенями холинергических нейронов базальных ядер. В свою очередь холинергические нейроны в мозге молодых, взрослых и стареющих животных экспрессируют высокоаффинный рецептор TrkA и низкоаффинный — p75NTR для NGF [14], что демонстрирует зависимость метаболизма этих клеток от уровня нейротрофинов не только в развивающемся, но и в зрелом мозге. Особое значение сигнальный каскад, запускаемый NGF, приобретает в условиях развития болезни Альцгеймера. На начальных этапах болезни (при мягком когнитивном снижении) происходит уменьшение уровня NGF [15], тогда как более поздние стадии с выраженной деменцией свя-

заны с его увеличением [15, 16]. Учитывая специфическую роль, которую Аβ может играть на разных стадиях заболевания, вероятно, что он прямо или косвенно вовлечен в регуляцию метаболизма NGF при болезни Альцгеймера.

Целью настоящей работы было исследование изменений в системе сигналинга NGF в гиппокампе крысы после введения агрегированного Аβ(25–35).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты с животными выполнены в соответствии с требованиями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза от 22.09.2010 и Приказа Минздрава России от 19.06.2003 № 267 в области защиты и использования животных в экспериментальных исследованиях. Протокол эксперимента утвержден Этической комиссией Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН.

Работа проведена на самцах крыс линии Wistar из питомника «Столбовая» Научного центра биомедицинских технологий ФМБА (Московская обл., Россия) массой 290–350 г. Крыс содержали по пять особей в пластмассовых клетках в условиях вивария при искусственном 12-часовом (8:00 — 20:00) световом режиме и свободном доступе к воде и пище.

Крыс анестезировали внутривенной инъекцией хлоралгидрата (350 мг/кг). Введение водных растворов Аβ(25–35), контрольного пептида, синтезированного из тех же аминокислот в обратной последовательности Аβ(35–25) и растворителя (стерильной воды) проводили в стереотаксисе Model 900 (David Kopf Instruments, США) билатерально в гиппокамп по следующим координатам: расстояние от брегмы AP –3,8 мм; L ± 2,0 мм; DV +3,8 мм [17]. Крысам вводили по 3 нмоль предварительно агрегированного Аβ(25–35) или Аβ(35–25) (Bachem, Switzerland) в объеме 2 мкл (1,5 нмоль/мкл), контрольным крысам — равный объем стерильной воды. Введение веществ осуществляли со скоростью 1 мкл/мин. Иглу шприца оставляли на месте инъекции в течение 5 мин для распределения введенного препарата и предотвращения его обратного вытекания. Агрегацию пептида проводили, как описано в работе [18].

Через 7 дней после операции крыс декапитировали, мозг вынимали, промывали в ледяном 0,9 % растворе NaCl и на льду выделяли гиппокамп и кору больших полушарий. Структуры мозга замораживали и хранили при –85 °С до анализа. Для измерения содержания NGF ткань гомогенизировали в соотношении 1 : 10 (масса/объем) в буфере, состоявшем из 100 mM Tris-HCl, pH 7,0, 2 % бычьего сывороточного альбумина, 1 M NaCl, 4 mM Na₂EDTA, 2 % Triton X-100, 0,1 % Na₃N и ингибиторов протеаз — 157 мкг/мл бензамидина, 0,1 мкг/мл пепстатина А и 17 мкг/мл PMSF.

Общее содержание NGF оценивали с помощью набора реактивов для твердофазного иммуноферментного анализа ChemiKine Nerve Growth Factor Sandwich ELISA Kit (Merck Millipore, США) согласно инструкции производителя. Измерения проводили на многофункциональном ридере Wallac VICTOR 1420 (PerkinElmer, Финляндия). Концентрацию белка в ткани измеряли с помощью красителя кумасси ярко-синего G-250. Содержание NGF выражали в пг/мг белка.

Для гистологического или иммуногистохимического анализа крыс реанестезировали хлоралгидратом (450 мг/кг). После этого мозг фиксировали интракарди-

альной перфузией 4 % раствора параформальдегида в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4). Мозг дофиксировали в том же фиксаторе в течение 24 ч. Фронтальные срезы толщиной 50 мкм изготавливали на вибрационном микротоме VT1200 S (Leica Biosystems, Германия) и хранили при -20°C в криопротекторе. Срезы окрашивали крезил-виолетом (Merck, Германия) по методу Ниссля. Экспрессию рецептора р75NTR определяли на свободно плавающих срезах иммуногистохимически с использованием поликлональных антител кролика (Sigma-Aldrich, США) в разведении 1 : 100. Связывание антител выявляли с помощью антител козы к IgG кролика, конъюгированных с биотином (Sigma-Aldrich, США) в разведении 1 : 800, и авидин-биотинового комплекса с пероксидазой хрена VECTASTAIN Elite ABC Kit (Vector Laboratories, США). В качестве хромогена использовали диаминобензидин (SIGMA Fast kit; Sigma-Aldrich, США).

Количественную оценку степени повреждения проводили на снимках, полученных с помощью фотокамеры Camedia C-4000 (Olympus, Япония) со срезов, окрашенных по методу Ниссля. На снимках всех уровней в программе Image-J (NIH, США) измеряли длину пораженного участка зубчатой фасции и поля CA1 гиппокампа. На основании полученных значений длины и толщины срезов была вычислена общая площадь поражения поля CA1, как мы подробно описывали ранее [19]. Экспрессию р75NTR оценивали по площади окрашивания на трех срезах, включавших область максимального повреждения гиппокампа, расположенных на расстоянии 500 мкм друг от друга. Результаты усредняли и получали оценку уровня экспрессии у данного животного, выраженную в пикселях (pxl).

В работе использованы реактивы фирмы Sigma-Aldrich (США), если не указано иначе.

Данные представлены в виде среднего арифметического по группе (M) \pm стандартная ошибка (SEM). Оценку влияния пептидов на размер повреждения проводили с использованием метода Крускала–Уоллиса. Различия между группами определяли по критерию Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование структурных изменений проводили на животных (n = 5), которые получали инъекцию 3 нмоль агрегированного $\text{A}\beta(25-35)$ в дорзальную часть гиппокампа левого полушария, через 7 дней после введения пептида. В дорзальный гиппокамп правого полушария мозга этих же животных вводили 3 нмоль пептида $\text{A}\beta(35-25)$. Для оценки эффектов растворителя отдельной контрольной группе животных (n = 5) вводили эквивалентный объем стерильной воды в гиппокамп левого полушария, а в гиппокамп правого — стерильный 0,9 % раствор NaCl. Большинство нейронов на исследованных срезах мозга контрольных животных имели нормальные морфологические характеристики. Изредка отмечены хроматофильные нейроны в неокортексе и первичной обонятельной коре. Введение изотонического раствора не вызывало существенных повреждений в гиппокампе крыс. Небольшие повреждения в непосредственной близости от места инъекции, связанные с проникновением иглы шприца, наблюдали после введения растворителя в поле CA1 гиппокампа. Единичные хроматофильные клетки были обнаружены в поле CA3. В то же время наблюдали выраженные структурные изменения зубчатой фасции (ЗФ). Прежде всего это отражалось в существенной гибели клеток верхней ветви ЗФ. Следует отметить, что повреждения максимально были выражены

в месте инъекции и постепенно уменьшались по мере удаления от места введения вещества. Эти данные в целом согласуются с результатами предыдущих работ [8, 20].

Введение нетоксичного $\text{A}\beta(35-25)$ в гиппокамп приводило к возникновению явных кавитационных повреждений в данном отделе мозга. Наряду с этим происходило существенное повреждение верхней, а иногда и нижней ветви ЗФ. Степень повреждения поля CA1 гиппокампа была сравнима с таковой в мозге контрольных животных, которым вводили стерильную воду. В отличие от $\text{A}\beta(35-25)$ введение токсичного агрегированного пептида $\text{A}\beta(25-35)$ вызывало наряду с указанными изменениями достоверно (p < 0,05) более выраженное повреждение в поле CA1 (рис. 1). Дисперсионный анализ показал зависимость размера поврежденной области в поле CA1 от действия $\text{A}\beta(25-35)$ [H (2,15) = 8,9; p < 0,02]. Размер поврежденного участка поля CA1 после введения $\text{A}\beta(25-35)$ был достоверно (p < 0,05) больше как по сравнению с гиппокампом контрольных крыс, которым вводили воду, так и по сравнению с полушарием, в которое вводили нетоксичный пептид. Зависимости размера повреждения в ЗФ от воздействия введенного пептида [H (2,15) = 4,0; p = 0,1] не наблюдали (рис. 2). Таким образом, показана большая чувствительность нейронов поля CA1 к токсическому действию $\text{A}\beta(25-35)$ в сравнении с нейронами ЗФ.

Развитие нейродегенеративных процессов, индуцированных введением $\text{A}\beta(25-35)$ в гиппокамп, сопровождается существенными изменениями в системе нейротрофического обеспечения. Так, в гиппокампе крыс наблюдали достоверное (p < 0,05) изменение экспрессии рецептора р75NTR. При этом достоверное увеличение площади

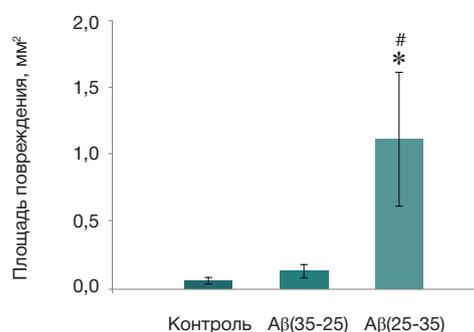


Рис. 1. Влияние введения амилоидных пептидов на размер повреждения в поле CA1 гиппокампа крыс

Для краткости здесь и на рис. 2–4 опытные группы обозначены наименованием инъектируемого животным фрагмента $\text{A}\beta$. * — p < 0,05 при сравнении с группой контроля (инъекция растворителя), # — p < 0,05 при сравнении с группой, инъектированной $\text{A}\beta(35-25)$; критерий Манна–Уитни.

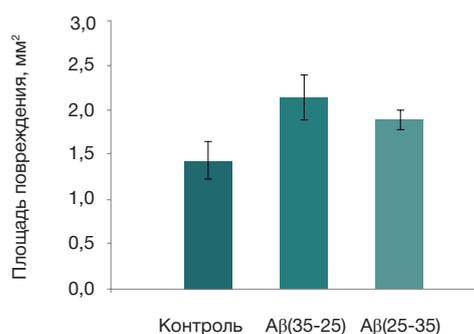


Рис. 2. Влияние введения амилоидных пептидов на размер повреждения в зубчатой фасции крыс

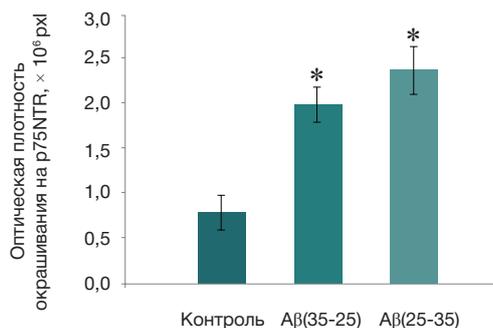


Рис. 3. Влияние введения амилоидных пептидов на экспрессию рецептора p75NTR в гиппокампе крыс

* — $p < 0,05$ при сравнении с группой контроля (инъекция растворителя); критерий Манна-Уитни.

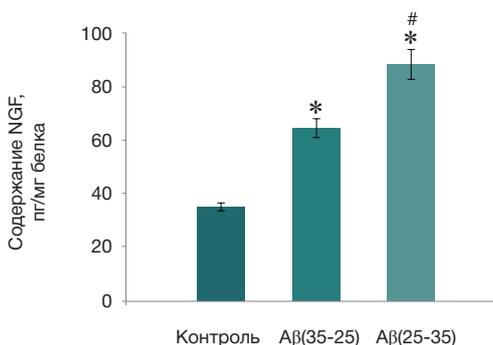


Рис. 4. Влияние введения амилоидных пептидов на содержание NGF в гиппокампе крыс

* — $p < 0,05$ при сравнении с группой контроля (инъекция растворителя), # — $p < 0,05$ при сравнении с группой, инъецированной A β (35-25); критерий Манна-Уитни.

окраски специфическими антителами к белку p75NTR происходило как после введения пептида A β (35-25), так и после действия токсичного A β (25-35) (рис. 3). Специфического влияния A β (25-35) на этот показатель обнаружено не было. Введение пептидов в гиппокамп вызывало также увеличение содержания NGF в этом отделе мозга (рис. 4). Вместе с тем введение токсичного A β (25-35) оказывало достоверно более выраженный эффект на уровень NGF по сравнению с A β (35-25).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В представленной работе показано, что введение A β (25-35) в гиппокамп приводит к нейродегенерации, которая наиболее выражена в пирамидном слое клеток поля CA1. Повреждение и гибель клеток в основном локализовались вблизи места инъекции, при том что площадь повреждения пирамидного слоя была достоверно большей у крыс, получавших инъекцию A β (25-35), но не контрольного пептида с обратной последовательностью аминокислот или растворителя (стерильной воды). Следует отметить, что повреждение ЗФ наблюдали в гиппокампе животных всех групп, за исключением тех, которым вводили стерильный изотонический раствор NaCl. Вероятно, повреждение этой структуры вызвано тем, что острие шприца в соответствии с координатами стереотаксического атласа приходилось на границу латеральной ветви ЗФ и гранулярные клетки подвергались осмотическому шоку.

Нейродегенеративные процессы протекали на фоне увеличения экспрессии рецептора нейротрофинов p75NTR, которое наблюдали в гиппокампе животных, получавших и A β (25-35), и A β (35-25). Функция этого рецептора в мозге весьма разнообразна [21]. Он может способствовать выживанию поврежденных нейронов, усиливая эффективность функционирования рецепторов Trk, запускать апоптоз поврежденных клеток для снижения воспалительного ответа, обеспечивать поддержание микроокружения, создающего условия для регенерации, контролировать нейровоспаление. Известно, что экспрессия этого рецептора значительно возрастает в гиппокампе пациентов с болезнью Альцгеймера, где A β может взаимодействовать с p75NTR, способствуя клеточной гибели [22]. В культуре клеток нейробластомы SH-SY5Y была показана способность A β (25-35) наряду с полноразмерным пептидом A β (1-42) связываться с этим рецептором [23]. В то же время пептид с обратной последовательностью A β (42-1) не демонстрировал подобных свойств. Следует отметить, что механизмы, с помощью которых A β запускает экспрессию p75NTR, окончательно не выяснены. Более того, общепринята точка зрения, что в гиппокампе p75NTR экспрессируется только на окончаниях афферентов холинергических нейронов базальных ядер [22].

Некоторые авторы указывают, что p75NTR может присутствовать в мембранах нейробластов субгранулярной области [24] и дендритных шипиков и афферентных терминалей пирамидных клеток поля CA1 [25]. Помимо этого, астроциты гиппокампа способны активно экспрессировать p75NTR в ответ, например, на введение антагонистов NMDA-рецепторов [26]. Клетки микроглии также экспрессируют этот рецептор [27]. Введение экзогенных пептидов в гиппокамп крыс, аналогичное тому, что было использовано в представленной работе, вызывало значительную активацию астроцитов и микроглии [8, 19]. Вероятно, именно увеличением экспрессии астроцитов и микроглии в ответ на инъекцию A β (25-35) и A β (35-25) можно объяснить отсутствие существенной разницы в уровне p75NTR.

При введении A β (25-35) происходило накопление NGF в гиппокампе, причем более выраженное, чем при инъекции пептида с обратной последовательностью. Патогенез болезни Альцгеймера связан с колебаниями в синтезе NGF. Поздние этапы заболевания, на которых у больных диагностируют и деменцию, и нейродегенерацию, характеризуются повышенным содержанием NGF в структурах мозга [15, 16]. В отличие от ранних этапов онтогенеза накопление NGF в мозге в условиях патологии может иметь двойные последствия. С одной стороны, NGF является основным нейротрофином, обеспечивающим выживание холинергических нейронов базальных ядер благодаря взаимодействию его зрелой формы и рецепторов TrkA и p75NTR [28]. С другой стороны, связывание проформы NGF с рецептором p75NTR может запускать гибель нейронов [29]. Применяемый в настоящей работе иммуноферментный метод оценки содержания NGF в ткани не позволил отдельно определить уровень проформы и зрелой формы NGF. Опираясь на данные других исследователей, можно предположить, что после воздействия A β (25-35) преобладающей молекулой NGF в гиппокампе будет его проформа [30]. Поэтому, вероятно, что интенсификация взаимодействия проформы NGF с большим числом p75NTR рецепторов будет способствовать усилению гибели нервных клеток в гиппокампе и увеличению размера повреждения.

ВЫВОДЫ

Полученные в настоящем исследовании данные показывают, что введение агрегированного Aβ(25–35) в гиппокамп крыс приводит к дегенерации нейронов в поле CA1, которую сопровождает увеличение содержания NGF. Экспрессия рецептора p75NTR возрастает у всех живот-

ных, которым вводили экзогенные пептиды Aβ(25–35) или Aβ(35–25). Можно предположить, что Aβ(25–35) вызывает активацию сигналинга NGF, который способствует увеличению размера повреждения пирамидного слоя клеток гиппокампа. Дальнейшие исследования необходимы для уточнения молекулярных механизмов развивающейся нейродегенерации.

Литература

- Kaminsky YG, Marlatt MW, Smith MA, Kosenko EA. Subcellular and metabolic examination of amyloid-beta peptides in Alzheimer disease pathogenesis: evidence for Abeta(25–35). *Exp Neurol.* 2010 Jan; 221 (1): 26–37.
- Gulyaeva NV, Stepanichev MYu. Abeta(25–35) as proxyholder for amyloidogenic peptides: in vivo evidence. *Exp Neurol.* 2010 Mar; 222 (1): 6–9.
- Rush DK, Aschmies S, Merriman MC. Intracerebral β-amyloid(25–35) produces tissue damage: is it neurotoxic? *Neurobiol Aging.* 1992 Sep–Oct; 13 (5): 591–4.
- Sigurdsson EM, Hejna MJ, Lee JM, Lorens SA. beta-Amyloid 25–35 and/or quinolinic acid injections into the basal forebrain of young male Fischer-344 rats: behavioral, neurochemical and histological effects. *Behav Brain Res.* 1995 Dec 14; 72 (1–2): 141–56.
- Степаничев М. Ю., Онуфриев М. В., Моисеева Ю. В., Яковлев А. А., Лазарева Н. А., Гуляева Н. В. Влияние фактора некроза опухоли-альфа и бета-амилоидного пептида (25–35) на показатели свободнорадикального окисления и активность каспазы-3 в мозге крыс. *Нейрохимия.* 2006; 23 (3): 217–22.
- Arias C, Montiel T, Quiroz-Báez R, Massieu L. β-Amyloid neurotoxicity is exacerbated during glycolysis inhibition and mitochondrial impairment in the rat hippocampus in vivo and in isolated nerve terminals: implications for Alzheimer's disease. *Exp Neurol.* 2002 Jul; 176 (1): 163–74.
- Montiel T, Quiroz-Baez R, Massieu L, Arias C. Role of oxidative stress on β-amyloid neurotoxicity elicited during impairment of energy metabolism in the hippocampus: protection by antioxidants. *Exp Neurol.* 2006 Aug; 200 (2): 496–508.
- Stepanichev MYu, Zdobnova IM, Yakovlev AA, Onufriev MV, Lazareva NA, Zarubenko II, et al. Effects of tumor necrosis factor-alpha central administration on hippocampal damage in rat induced by amyloid beta-peptide (25–35). *J Neurosci Res.* 2003 Jan 1; 71 (1): 110–20.
- Манухина Е. Б., Пшеничкова М. Г., Горячева А. В., Хоменко И. П., Машина С. И., Покидышев Д. А. и др. Роль оксида азота в предупреждении когнитивных нарушений при нейродегенеративном повреждении мозга у крыс. *Бюл. экспер. биол. и мед.* 2008; 146 (4): 391–5.
- Sigurdsson EM, Lorens SA, Hejna MJ, Dong XW, Lee JM. Local and distant histopathological effects of unilateral amyloid-beta 25–35 injections into the amygdala of young F344 rats. *Neurobiol Aging.* 1996 Nov–Dec; 17 (6): 893–901.
- Steardo L Jr, Bronzuoli MR, Iacomino A, Esposito G, Steardo L, Scuderi C. Does neuroinflammation turn on the flame in Alzheimer's disease? Focus on astrocytes. *Front Neurosci.* 2015 Jul 29; 9: 259.
- Niewiadomska G, Mietelska-Porowska A, Mazurkiewicz M. The cholinergic system, nerve growth factor and the cytoskeleton. *Behav Brain Res.* 2011 Aug 10; 221 (2): 515–26.
- Mesulam M. Cholinergic aspects of aging and Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry.* 2012 May 1; 71 (9): 760–1.
- Zhou Y, Lu TJ, Xiong ZQ. NGF-dependent retrograde signaling: survival versus death. *Cell Res.* 2009 May; 19 (5): 525–6.
- Schaub RT, Anders D, Golz G, Göhringer K, Hellweg R. Serum nerve growth factor concentration and its role in the preclinical stage of dementia. *Am J Psychiatry.* 2002 Jul; 159 (7): 1227–9.
- Counts SE, He B, Prout JG, Michalski B, Farotti L, Fahnestock M, et al. Cerebrospinal fluid proNGF: A putative biomarker for early Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* Epub 2016 Jan 28. PubMed PMID: 26825093.
- Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* Sydney: Academic Press; 1982.
- Maurice T, Lockhart BP, Privat A. Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. *Brain Res.* 1996 Jan 15; 706 (2): 181–93.
- Степаничев М. Ю., Флегонтова О. В., Лазарева Н. А., Егорова Л. К., Гуляева Н. В. Влияние противовоспалительного цитокина интерлейкина-4 на нейродегенерацию у крыс, вызванную бета-амилоидным пептидом. *Нейрохимия.* 2006; 23 (1): 67–72.
- Miguel-Hidalgo JJ, Cacabelos R. Beta-amyloid(1–40)-induced neurodegeneration in the rat hippocampal neurons of the CA1 subfield. *Acta Neuropathol.* 1998 May; 95 (5): 455–65.
- Meeker RB, Williams KS. The p75 neurotrophin receptor: at the crossroad of neural repair and death. *Neural Regen Res.* 2015 May; 10 (5): 721–5.
- Armato U, Chakravarthy B, Pacchiana R, Whitfield JF. Alzheimer's disease: an update of the roles of receptors, astrocytes and primary cilia (review). *Int J Mol Med.* 2013 Jan; 31 (1): 3–10.
- Chakravarthy B, Gaudet C, Ménard M, Atkinson T, Brown L, Laferla FM, et al. Amyloid-beta peptides stimulate the expression of the p75(NTR) neurotrophin receptor in SHSY5Y human neuroblastoma cells and AD transgenic mice. *J Alzheimers Dis.* 2010; 19 (3): 915–25.
- Woo NH, Teng HK, Siao CJ, Chiaruttini C, Pang PT, Milner TA, et al. Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat Neurosci.* 2005 Aug; 8 (8): 1069–77.
- Bernabeu RO, Longo FM. The p75 neurotrophin receptor is expressed by adult mouse dentate progenitor cells and regulates neuronal and non-neuronal cell genesis. *BMC Neurosci.* 2010 Oct 20; 11: 136.
- Yu W, Zhu H, Wang Y, Li G, Wang L, Li H. Reactive transformation and increased BDNF signaling by hippocampal astrocytes in response to MK-801. *PLoS One.* 2015 Dec 23; 10 (12): e0145651.
- Wong I, Liao H, Bai X, Zaknic A, Zhong J, Guan Y, et al. ProBDNF inhibits infiltration of ED1+ macrophages after spinal cord injury. *Brain Behav Immun.* 2010 May; 24 (4): 585–97.
- Niewiadomska G, Komorowski S, Baksalerska-Pazera M. Amelioration of cholinergic neurons dysfunction in aged rats depends on the continuous supply of NGF. *Neurobiol Aging.* 2002 Jul–Aug; 23 (4): 601–13.
- Ichim G, Tauszig-Delamasure S, Mehlen P. Neurotrophins and cell death. *Exp Cell Res.* 2012 Jul 1; 318 (11): 1221–8.
- Iulita MF, Cuello AC. Nerve growth factor metabolic dysfunction in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Trends Pharmacol Sci.* 2014 Jul; 35 (7): 338–48.

References

- Kaminsky YG, Marlatt MW, Smith MA, Kosenko EA. Subcellular and metabolic examination of amyloid-beta peptides in Alzheimer disease pathogenesis: evidence for Abeta(25–35). *Exp Neurol.* 2010 Jan; 221 (1): 26–37.
- Gulyaeva NV, Stepanichev MYu. Abeta(25–35) as proxyholder for amyloidogenic peptides: in vivo evidence. *Exp Neurol.* 2010 Mar; 222 (1): 6–9.
- Rush DK, Aschmies S, Merriman MC. Intracerebral β-amyloid(25–35)

- produces tissue damage: is it neurotoxic? *Neurobiol Aging*. 1992 Sep–Oct; 13 (5): 591–4.
4. Sigurdsson EM, Hejna MJ, Lee JM, Lorens SA. beta-Amyloid 25–35 and/or quinolinic acid injections into the basal forebrain of young male Fischer-344 rats: behavioral, neurochemical and histological effects. *Behav Brain Res*. 1995 Dec 14; 72 (1–2): 141–56.
 5. Stepanichev MYu, Onufriev MV, Moiseeva YuV, Yakovlev AA, Lazareva NA, Gulyaeva NV. Vliyanie faktora nekroza opukholi-al'fa i beta-amiloidnogo peptida (25–35) na pokazateli svobodno-radikal'nogo oksileniya i aktivnost' kaspazy-3 v mozge krysa. *Neirokhimiya*. 2006; 23 (3): 217–22. Russian.
 6. Arias C, Montiel T, Quiroz-Báez R, Massieu L. β -Amyloid neurotoxicity is exacerbated during glycolysis inhibition and mitochondrial impairment in the rat hippocampus in vivo and in isolated nerve terminals: implications for Alzheimer's disease. *Exp Neurol*. 2002 Jul; 176 (1): 163–74.
 7. Montiel T, Quiroz-Baez R, Massieu L, Arias C. Role of oxidative stress on β -amyloid neurotoxicity elicited during impairment of energy metabolism in the hippocampus: protection by antioxidants. *Exp Neurol*. 2006 Aug; 200 (2): 496–508.
 8. Stepanichev MYu, Zdobnova IM, Yakovlev AA, Onufriev MV, Lazareva NA, Zarubenko II, et al. Effects of tumor necrosis factor- α central administration on hippocampal damage in rat induced by amyloid beta-peptide (25–35). *J Neurosci Res*. 2003 Jan 1; 71 (1): 110–20.
 9. Manukhina EB, Pshennikova MG, Goryacheva AV, Khomenko IP, Mashina SI, Pokidyshev DA, et al. Role of nitric oxide in prevention of cognitive disorders in neurodegenerative brain injuries in rats. *Bull Exp Biol Med*. 2008 Oct; 146 (4): 391–5.
 10. Sigurdsson EM, Lorens SA, Hejna MJ, Dong XW, Lee JM. Local and distant histopathological effects of unilateral amyloid-beta 25–35 injections into the amygdala of young F344 rats. *Neurobiol Aging*. 1996 Nov–Dec; 17 (6): 893–901.
 11. Steardo L Jr, Bronzuoli MR, Iacomino A, Esposito G, Steardo L, Scuderì C. Does neuroinflammation turn on the flame in Alzheimer's disease? Focus on astrocytes. *Front Neurosci*. 2015 Jul 29; 9: 259.
 12. Niewiadomska G, Mietelska-Porowska A, Mazurkiewicz M. The cholinergic system, nerve growth factor and the cytoskeleton. *Behav Brain Res*. 2011 Aug 10; 221 (2): 515–26.
 13. Mesulam M. Cholinergic aspects of aging and Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*. 2012 May 1; 71 (9): 760–1.
 14. Zhou Y, Lu TJ, Xiong ZQ. NGF-dependent retrograde signaling: survival versus death. *Cell Res*. 2009 May; 19 (5): 525–6.
 15. Schaub RT, Anders D, Golz G, Göhringer K, Hellweg R. Serum nerve growth factor concentration and its role in the preclinical stage of dementia. *Am J Psychiatry*. 2002 Jul; 159 (7): 1227–9.
 16. Counts SE, He B, Prout JG, Michalski B, Farotti L, Fahnestock M, et al. Cerebrospinal fluid proNGF: A putative biomarker for early Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. Epub 2016 Jan 28. PubMed PMID: 26825093.
 17. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Sydney: Academic Press; 1982.
 18. Maurice T, Lockhart BP, Privat A. Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. *Brain Res*. 1996 Jan 15; 706 (2): 181–93.
 19. Stepanichev MYu, Flegontova OV, Lazareva NA, Egorova LK, Gulyaeva NV. Vliyanie protivovospalitel'nogo tsitokina interleikina-4 na neurodegeneratsiyu u krysa, vyzvannuyu beta-amiloidnym peptidom. *Neirokhimiya*. 2006; 23 (1): 67–72. Russian.
 20. Miguel-Hidalgo JJ, Cacabelos R. Beta-amyloid(1–40)-induced neurodegeneration in the rat hippocampal neurons of the CA1 subfield. *Acta Neuropathol*. 1998 May; 95 (5): 455–65.
 21. Meeker RB, Williams KS. The p75 neurotrophin receptor: at the crossroad of neural repair and death. *Neural Regen Res*. 2015 May; 10 (5): 721–5.
 22. Armato U, Chakravarthy B, Pacchiana R, Whitfield JF. Alzheimer's disease: an update of the roles of receptors, astrocytes and primary cilia (review). *Int J Mol Med*. 2013 Jan; 31 (1): 3–10.
 23. Chakravarthy B, Gaudet C, Ménard M, Atkinson T, Brown L, Laferla FM, et al. Amyloid-beta peptides stimulate the expression of the p75(NTR) neurotrophin receptor in SHSY5Y human neuroblastoma cells and AD transgenic mice. *J Alzheimers Dis*. 2010; 19 (3): 915–25.
 24. Woo NH, Teng HK, Siao CJ, Chiaruttini C, Pang PT, Milner TA, et al. Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat Neurosci*. 2005 Aug; 8 (8): 1069–77.
 25. Bernabeu RO, Longo FM. The p75 neurotrophin receptor is expressed by adult mouse dentate progenitor cells and regulates neuronal and non-neuronal cell genesis. *BMC Neurosci*. 2010 Oct 20; 11: 136.
 26. Yu W, Zhu H, Wang Y, Li G, Wang L, Li H. Reactive transformation and increased BDNF signaling by hippocampal astrocytes in response to MK-801. *PLoS One*. 2015 Dec 23; 10 (12): e0145651.
 27. Wong I, Liao H, Bai X, Zaknic A, Zhong J, Guan Y, et al. ProBDNF inhibits infiltration of ED1+ macrophages after spinal cord injury. *Brain Behav Immun*. 2010 May; 24 (4): 585–97.
 28. Niewiadomska G, Komorowski S, Baksalerska-Pazera M. Amelioration of cholinergic neurons dysfunction in aged rats depends on the continuous supply of NGF. *Neurobiol Aging*. 2002 Jul–Aug; 23 (4): 601–13.
 29. Ichim G, Tauszig-Delamasure S, Mehlen P. Neurotrophins and cell death. *Exp Cell Res*. 2012 Jul 1; 318 (11): 1221–8.
 30. Iulita MF, Cuello AC. Nerve growth factor metabolic dysfunction in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Trends Pharmacol Sci*. 2014 Jul; 35 (7): 338–48.

УТОЧНЕНИЕ СТАТУСА НЕКОТОРЫХ МУТАЦИЙ, СЧИТАЮЩИХСЯ ПАТОГЕННЫМИ, С ПОМОЩЬЮ ПРИЗНАКОВ БЕЗВРЕДНЫХ МУТАЦИЙ

Д. И. Борисевич^{1,2}, Л. В. Шаталова¹, Д. О. Коростин^{1,3} ✉, В. В. Ильинский^{1,3}

¹ Отдел биоинформатической обработки данных, ООО «Генотек», Москва

² Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

³ Центр коллективного пользования отдела биологических наук РАН «Генетический полиморфизм», Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова РАН, Москва

Важной задачей современной биоинформатики является предсказание патогенности мутации и ее влияния на фенотип. Она особенно трудна для однонуклеотидных полиморфизмов, чей эффект сложнее всего предсказать. Патогенные мутации берут из курируемых баз данных, таких как Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) и The Human Gene Mutation Database (HGMD), куда включают данные из экспериментальных статей. Однако поскольку различные авторы вкладывают разный смысл в понятие «патогенность мутации», необходимо контролировать данные баз перед их использованием. Мы проанализировали качество данных базы HGMD с помощью наиболее часто используемых биоинформатических инструментов: snpEff, polyphen2 и SIFT. В исследовании мы опирались на признаки, характерные для безвредных мутаций: высокую частоту в популяции, слабое влияние на аминокислотную последовательность белка, низкую патогенность по оценке вычислительных методов. В результате среди мутаций базы нами выявлены однозначно безвредные варианты, а также варианты со спорным значением, для которых тип мутации зависит от используемых для анализа признаков и инструментов.

Ключевые слова: генетика человека, высокопроизводительное секвенирование, патогенность, популяционный анализ, поиск мутаций

✉ **Для корреспонденции:** Дмитрий Олегович Коростин
119991, г. Москва, ул. Губкина, д. 3; d.korostin@gmail.com

Статья получена: 10.02.2016 Статья принята в печать: 19.02.2016

CLARIFICATION OF THE STATUS OF SOME MUTATIONS CONSIDERED PATHOGENIC, BY HARMLESS MUTATIONS ATTRIBUTES

Borisevich DI^{1,2}, Shatalova LV¹, Korostin DO^{1,3} ✉, Ilinsky VV^{1,3}

¹ Bioinformatics Data Processing Department, Genotek Ltd., Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³ The Core Facilities Center "Genetic Polymorphism" Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Prediction of mutation pathogenicity and its effect on the phenotype is an important task of modern bioinformatics. This task is particularly difficult in regard to single nucleotide polymorphisms, as their effect is very hard to predict. Information on pathogenic mutations is provided by curated databases such as Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) and The Human Gene Mutation Database (HGMD) which include data from experimental works. However, as different authors interpret the term "mutation pathogenicity" differently, it is necessary to double-check data before using them. We have assessed HGMD database quality using the most common bioinformatic tools, namely snpEff, polyphen2 and SIFT. Our study relied on the characteristics specific for harmless mutations: high frequency in a population, weak effect on amino acid sequence of a protein, low pathogenicity as computed by the utilities used in the study. As a result, we have identified clearly harmless variants among those in the mutation database, as well as ambiguous ones in which a mutation type depends on characteristics and tools used for the analysis.

Keywords: human genetics, high-throughput sequencing, pathogenicity, population analysis, search for mutations

✉ **Correspondence should be addressed:** Dmitry Korostin
ul. Gubkina, d. 3, Moscow, Russia, 119991; d.korostin@gmail.com

Received: 10.02.2016 Accepted: 19.02.2016

Влияние однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) на фенотип труднопредсказуемо. Существующие программы,

предсказывающие патогенность мутации, имеют ряд недостатков, например низкую чувствительность и специфич-

ность, не превышающую для SNP 75–80 %. Кроме того, стоит отметить, что зачастую инсерции и делеции не аннотируются ими вовсе [1–3].

Патогенные мутации собирают в базы данных из экспериментальных статей. Примерами таких баз могут быть база Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM [4]) и The Human Gene Mutation Database (HGMD [5]). Однако термин «патогенность» имеет широкую интерпретацию, однозначного мнения по поводу его значения не существует. Это приводит к тому, что базы данных применяют разные подходы к выбору мутации для включения, и, следовательно, данные в разных базах неодинаковы и нуждаются в уточнении.

Непатогенные мутации чаще всего идентифицируют по косвенным признакам: частоте аллелей в популяции и влиянию на аминокислотную последовательность белка. По мере появления новых данных эти признаки могут помочь понять, как можно усовершенствовать существующие базы. Знание того, что мутации, описанные как патогенные, подпадают под критерии непатогенных вариантов, важно для практического использования данных из этих баз. Это знание может помочь в понимании и того, почему одни генетические варианты влияют на фенотип, а другие — нет.

Для специалистов, опирающихся в своих исследованиях на базу данных HGMD может быть неочевидно, что в настоящее время она несет помимо однозначно патогенных мутаций также безвредные, оцененные как патогенные. В рамках данной работы была проведена биоинформатическая оценка патогенности мутаций, включенных в HGMD. Мы сравнивали частоты аллелей, аннотированных в HGMD, с таковыми в Exome Aggregation Consortium 0.3 [6], а также анализировали влияние мутаций из HGMD на аминокислотную последовательность белка и предсказывали их патогенность с помощью наиболее часто используемых биоинформатических инструментов: snpEff, polyphen2 и SIFT.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве списка патогенных мутаций использовали публичную версию базы HGMD за IV квартал 2014 года, содер-

жащую 73 208 мутаций. Частоты аллелей для них вычислили с помощью snpEff 4.0. Полученные данные сопоставили с частотами аллелей в Exome Aggregation Consortium 0.3, которая содержит полноэкзомные и полногеномные данные секвенирования образцов 60 706 не связанных между собой пациентов. Частота аллелей в ExAC установлена для шести популяций: африканской, латиноамериканской, восточноазиатской, южноазиатской, финской и европейской (не включающей финскую). Все неустановленные образцы сгруппированы в популяцию, названную «Другие». Число генотипированных образцов индивидуумов для каждой аннотируемой мутации на момент обращения к базе варьировалось в различных популяциях: от порядка 500 для «Других» до 30 000 для европейцев. Сопоставление частот аллелей двух баз произвели с помощью bcftools [7].

Мутации из базы HGMD, влияющие на аминокислотную последовательность белка, были установлены с snpEff 4.0 [8]. Возможный уровень патогенности был предсказан с использованием утилит polyphen2 и SIFT. Эти утилиты являются стандартными для предсказания патогенности мутаций, и ни одна из них не использовала данные из базы HGMD как обучающую выборку.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Аннотация snpEff

Мутации из базы HGMD были проаннотированы snpEff, в результате были получены частоты каждого типа мутаций (в соответствии с классификацией snpEff). Мы обнаружили, что во многих случаях мутации имеют более чем одно предсказание, т. е. относятся к нескольким типам мутаций одновременно. Обычно это происходит из-за того, что мутация локализована внутри гена и для аннотации мутации использовались соседние гены. Мы отфильтровали типы мутаций для каждого варианта, имеющего больше чем один тип, оставляя только тот тип, который имел большее влияние в соответствии с предложенным создателями утилиты snpEff алгоритмом (таблица) [8].

Количество мутаций наиболее важных классов из базы HGMD, предсказанные snpEff

Тип мутации	Количество мутаций	Тип мутации	Количество мутаций
missense_variant	56136	sequence_feature	66
stop_gained	13513	initiator_codon_variant	61
synonymous_variant	1793	intron_variant	54
start_lost	465	non_coding_exon_variant	44
3_prime_UTR_variant	363	splice_donor_variant	39
downstream_gene_variant	245	splice_acceptor_variant	23
upstream_gene_variant	162	stop_retained_variant	4
stop_lost	136	5_prime_UTR_variant	3
splice_region_variant	99	intergenic_region	2

Примечание: названия классов приведены так, как указаны в snpEff. missense_variant — миссенс-мутации; stop_gained — нонсенс-мутации; synonymous_variant — синонимические мутации; start_lost — замена, приводящая к изменению по крайней мере одного основания канонического кодона; 3_prime_UTR_variant — замена в 3'-UTR; downstream_gene_variant — замена в последовательности, находящейся на 3'-конце гена; upstream_gene_variant — замена в последовательности, находящейся на 5'-конце гена; stop_lost — замена, при которой по крайней мере одно основание терминаторного кодона (стоп-кодона) изменено, что приводит к элонгации транскрипции; splice_region_variant — замена внутри области сайта сплайсинга, либо 1–3 основания экзона, либо 3–8 основания интрона; sequence_feature — замена на любом участке последовательности; initiator_codon_variant — замена, при которой изменяется хотя бы одно основание первого кодона транскрипта; intron_variant — замена внутри интрона; non_coding_exon_variant — замена, которая изменяет некодирующую последовательность экзона в некодирующем транскрипте; splice_donor_variant — сплайсинг, который изменяет 2 пар оснований области на 5'-конце интрона; splice_acceptor_variant — сплайсинг, который изменяет 2 п. о. области на 3'-конце интрона; stop_retained_variant — замена, при которой по крайней мере одно основание в терминаторном кодоне изменено, но при этом терминатор не теряет своей функции; 5_prime_UTR_variant — замена в 5'-UTR; intergenic_region — область, не содержащая ген, или область, в которой нет перекрытия генов, ограниченная с обеих сторон генами либо геном и концом хромосомы.

Аннотация с ExAC

18 159 (25 %) мутаций из базы HGMD описаны в ExAC.

Результаты, полученные с помощью polyphen2 и SIFT

Мы предсказали вес мутаций используя утилиты polyphen2 и SIFT. Polyphen2 имеет два вида моделей для предсказания патогенности: HumDiv и HumVar. Согласно описанию разработчиков, HumVar лучше предсказывает менделирующие заболевания, в то время как HumDiv лучше подходит для комплексных фенотипов и аллелей из категории условно патогенных [9]. Мы выбрали модель HumDiv чтобы использовать более широкое определение патогенности. Пороги отсечения патогенных и вероятно патогенных вариантов были установлены по умолчанию.

Polyphen2 проаннотировал 52 248 мутаций, из которых 39 032 (72 %) были определены как патогенные и 6 220 (11 %) — как вероятно патогенные. Утилита SIFT проаннотировала 53 097 мутаций, из которых 34 638 (65 %) были определены как патогенные и 4 358 (8 %) — как вероятно патогенные (с низкой вероятностью). Обе утилиты смогли распознать введенные в базу варианты как патогенные в 70–80 % случаев, что соотносится с их ожидаемой эффективностью [2, 3].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Использование базы ExAC в качестве ресурса, содержащего информацию о частотах аллелей

Техническое описание ресурса ExAC пока не выпущено, но известно, что база включает данные не только популяционно-генетических исследований, но также проектов секвенирования образцов пациентов с различными заболеваниями. Мы полагаем, что в таких проектах используют меньшее число образцов, чем в популяционно-генетических исследованиях, и их влияние на результирующую частоту должно быть несущественным, особенно если были проанализированы образцы большого числа индивидуумов в популяционно-генетических исследованиях. Поэтому из анализа мы исключили мутации, которые были генотипированы только у нескольких индивидуумов. За исключением этого мы считаем, что ExAC можно уверенно использовать для оценки частот в таких исследованиях, как наше. Авторы этой базы данных утверждают, что она может использоваться в качестве эталонного набора частот аллелей для изучения заболеваний.

Наличие синонимичных мутаций в базе HGMD

95 % всех мутаций из базы HGMD распределялись snpEff на две группы: миссенс-мутации и нонсенс-мутации. Однако приблизительно 2,5 % мутаций определялись как синонимичные (таблица). Хотя патогенность синонимичных вариантов описана в литературе, в большинстве случаев синонимичные мутации считаются безвредными. Мы сфокусировались на этой группе как на группе вариантов с наиболее спорной патогенностью. Утилита polyphen2 вообще не выполняет оценку патогенности синонимичных мутаций, поскольку опирается в первую очередь на влияние мутации на аминокислотную последовательность белка. Утилита SIFT позволяет выполнять оценку синонимичных мутаций на патогенность, и она определила лишь 4 из 1793 синони-

мичных мутаций как патогенные. Высока вероятность того, что остальные 1789 мутаций (~2,5 % всех мутаций в HGMD) на самом деле не являются патогенными, поскольку не имеют никаких других признаков патогенности.

Анализ синонимичных патогенных мутаций в базе HGMD

Только одна из четырех синонимичных мутаций HGMD, которые были оценены как патогенные инструментом SIFT, описана в dbSNP [10]. Это мутация NM_005228.3:c.2361G>A (NP_005219.2:p.Gln787=) с rsid rs1050171. Согласно данным Zhang и соавт. [11], эта мутация связана с раком легких, молекулярный механизм ее действия не определен. Альтернативный (мутантный) аллель A присутствует с частотой около 43 %, согласно данным проекта «1000 геномов», представленным в dbSNP. База ClinVar [12] определяет этот SNP как непатогенный [13]. Причины определения данной мутации как патогенной инструментом SIFT, видимо, связаны с консервативностью позиции, где произошла мутация. Она располагается в 3-м положении кодона, которое обычно менее консервативно, чем 1-е и 2-е положения и получает меньшую оценку. Однако для этой мутации оценка эволюционной консервативности PhyloP Vertebrate, полученная из UCSC Genome Browser [14], с оценкой 1-го и 2-го положения в близлежащих кодонах гораздо выше, чем оценка других нуклеотидов, располагающихся в 3-м положении кодона, что говорит о высокой консервативности данного нуклеотида.

В конце концов, истинную природу этой мутации определить очень сложно. С одной стороны, существуют доказательства в пользу того, что эта мутация непатогенная: данные базы ClinVar, синонимичский тип, высокая частота аллельных вариантов в популяции. С другой стороны, результаты предсказания с помощью утилиты SIFT данных базы HGMD и высокая эволюционная консервативность — доказательства в пользу патогенности этого варианта. Это пример иллюстрирует сложность предсказания патогенности мутации: даже ручной анализ не может обеспечить однозначного толкования результатов, поскольку тип мутации зависит от выбора инструмента анализа.

Варианты, в которых мутация присутствует только в гетерозиготе

Для анализа мутаций, отсутствующих в образцах в гомозиготном состоянии, мы выделили четыре мутации, каждая из которых присутствовала в гетерозиготе на уровне более 75 % и в гомозиготе на уровне менее 5 % (по крайней мере в базе ExAC):

1. chr1:1650845G>A (rs1059831, ген CDK11A, HGMD фенотип: связана с диабетом 2-го типа) [15],
2. chr2:112614429G>A (rs72936240, ген ANAPC1, HGMD фенотип: дефицит белка, связанный с риском возникновения рака) [16],
3. chr7:142458451A>T (rs111033566, ген PRSS1, HGMD фенотип: наследственный панкреатит) [17],
4. chr17:7197581G>T (rs189257850, ген YBX2, HGMD фенотип: связана с мужским бесплодием) [18].

Мутации 2 и 3 никогда не были представлены в гомозиготе ни для одной популяции, мутация 1 была представлена в гомозиготе только в одном из 8 209 образцов в южно-азиатской популяции. Для мутации 4 по непонятным причинам было генотипировано всего 203 образца, тогда как,

например, для мутаций 1–3 — приблизительно 60 000. Для мутации 4 как гомозиготы были описаны 1 человек из 52 в восточноазиатской популяции и 13 из 62 — в латиноамериканской.

Объяснение существования этих мутаций в основном в гетерозиготе, возможно, связано с тем, что данные мутации в гомозиготе приводят к летальному исходу или, по крайней мере, не могут быть унаследованы. На основе анализа фенотипов мутации 2 и 4 могут быть исключены как гомозиготы вследствие ранней смерти или бесплодия носителей. Мутация 4 является самой интересной, однако, это единственный вариант который не был широко генотипирован. Трудно понять, почему данная мутация имеет высокую частоту в одной из популяций и почему количество проанализированных индивидуумов в популяции настолько мало. Поскольку количество проанализированных лиц невелико, то, возможно, что эти данные о частоте были получены из анализа пациентов с заболеванием (см. выше описание особенностей базы ExAC), поэтому никаких предсказаний для этого варианта нельзя сделать. Мутация 2 может быть описана как летальная в состоянии

гомозиготы. Мы предполагаем, что хотя мутации 1 и 3 очевидно приводят к смерти, имеющиеся данные свидетельствуют, что эти мутации в гомозиготе приводят к смертельному исходу или к бесплодию.

ВЫВОДЫ

Определение патогенности мутации является сложной задачей. Иногда ни автоматизированный, ни ручной анализ не дают возможности отнести ее к числу однозначно патогенных или безвредных. Однако в отсутствие экспериментальных данных по изучению трансгенных организмов с изучаемой мутацией существующие базы данных все же могут быть полезны для анализа патогенности, но необходимо пользоваться ими с осторожностью. Автоматическое использование этих баз ограничено качеством данных, представленных в них. Важно вручную проверять утверждения о патогенности мутации, сделанные в экспериментальных статьях, особенно если они не согласуются с предсказанием, сделанным базой.

Литература

- Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS One*. 2012; 7 (10): e46688.
- Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat. Protoc.* 2009; 4 (7): 1073–81.
- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods*. 2010; 7 (4): 248–9.
- Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM [Интернет]. Baltimore (MD): McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University. c1996–2016. [цитировано в феврале 2016 г.]. Доступно по ссылке: <http://omim.org/>.
- The Human Gene Mutation Database, HGMD [Интернет]. Cardiff (UK): Cardiff University. c2015 – [дата обращения: февраль 2016 г.]. Доступно по ссылке: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>.
- Exome Aggregation Consortium (ExAC) [Интернет]. Cambridge (MA). [обновлено 17 января 2016 г., процитировано в феврале 2016 г.]. Доступно по ссылке: <http://exac.broadinstitute.org/>.
- Bcftools. Доступно по ссылке: <http://samtools.github.io/bcftools/>.
- Cingolani P, Platts A, Wang LL, Coon M, Nguyen T, Wang L, et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)*. 2012; 6 (2): 80–92.
- Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* 2013; Chapter 7: Unit 7.20.
- dbSNP Short Genetic Variants [Интернет]. Доступно по ссылке: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1050171.
- Zhang W, Stabile LP, Keohavong P, Romkes M, Grandis JR, Traynor AM, et al. Mutation and polymorphism in the EGFR-TK domain associated with lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* 2006; 1 (7): 635–47.
- ClinVar [Интернет]. Доступно по ссылке: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/45271/>.
- NM_005228.3(EGFR):c.2361G>A (p.Gln787=) Simple - Variation Report - ClinVar – NCBI. Доступно по ссылке: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/45271/>.
- Pollard KS, Hubisz MJ, Rosenbloom KR, Siepel A. Detection of nonneutral substitution rates on mammalian phylogenies. *Genome Res.* 2010; 20 (1): 110–21.
- Li Y, Wu G, Zuo J, Gao J, Chang Y, Fang F. Genetic variations of the CDC2L2 gene are associated with type 2 diabetes in a Han Chinese cohort. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* 2007; 23 (6): 455–61.
- He M-L, Chen Y, Chen Q, He Y, Zhao J, Wang J, et al. Multiple gene dysfunctions lead to high cancer-susceptibility: evidences from a whole-exome sequencing study. *Am. J. Cancer Res.* 2011; 1 (4): 562–73.
- Pfützer R, Myers E, Applebaum-Shapiro S, Finch R, Ellis I, Neoptolemos J, et al. Novel cationic trypsinogen (PRSS1) N29T and R122C mutations cause autosomal dominant hereditary pancreatitis. *Gut*. 2002; 50 (2): 271–2.
- Hammoud S, Emery BR, Dunn D, Weiss RB, Carrell DT. Sequence alterations in the YBX2 gene are associated with male factor infertility. *Fertil. Steril.* 2009; 91 (4): 1090–5.

References

- Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS One*. 2012; 7 (10): e46688.
- Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat. Protoc.* 2009; 4 (7): 1073–81.
- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods*. 2010; 7 (4): 248–9.
- Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM [Internet]. Baltimore (MD): McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University. c1996–2016. [cited 2016 Feb]. Available from: <http://omim.org/>.
- The Human Gene Mutation Database, HGMD [Internet]. Cardiff (UK): Cardiff University. c2015 – [cited 2016 Feb]. Available from: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>.
- Exome Aggregation Consortium (ExAC) [Internet]. Cambridge (MA). [updated 2016 Jan 17, cited 2016 Feb]. Available from: <http://exac.broadinstitute.org/>.
- Bcftools. Available from: <http://samtools.github.io/bcftools/>.

8. Cingolani P, Platts A, Wang LL, Coon M, Nguyen T, Wang L, et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)*. 2012; 6 (2): 80–92.
9. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* 2013; Chapter 7: Unit 7.20.
10. dbSNP Short Genetic Variants [Internet]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1050171.
11. Zhang W, Stabile LP, Keohavong P, Romkes M, Grandis JR, Traynor AM, et al. Mutation and polymorphism in the EGFR-TK domain associated with lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* 2006; 1 (7): 635–47.
12. ClinVar [Internet]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/45271/>.
NM_005228.3(EGFR):c.2361G>A (p.Gln787=) Simple - Variation
13. Report - ClinVar – NCBI. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/45271/>.
14. Pollard KS, Hubisz MJ, Rosenbloom KR, Siepel A. Detection of nonneutral substitution rates on mammalian phylogenies. *Genome Res.* 2010; 20 (1): 110–21.
15. Li Y, Wu G, Zuo J, Gao J, Chang Y, Fang F. Genetic variations of the CDC2L2 gene are associated with type 2 diabetes in a Han Chinese cohort. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* 2007; 23 (6): 455–61.
16. He M-L, Chen Y, Chen Q, He Y, Zhao J, Wang J, et al. Multiple gene dysfunctions lead to high cancer-susceptibility: evidences from a whole-exome sequencing study. *Am. J. Cancer Res.* 2011; 1 (4): 562–73.
17. Pfützner R, Myers E, Applebaum-Shapiro S, Finch R, Ellis I, Neoptolemos J, et al. Novel cationic trypsinogen (PRSS1) N29T and R122C mutations cause autosomal dominant hereditary pancreatitis. *Gut.* 2002; 50 (2): 271–2.
18. Hammoud S, Emery BR, Dunn D, Weiss RB, Carrell DT. Sequence alterations in the YBX2 gene are associated with male factor infertility. *Fertil. Steril.* 2009; 91 (4): 1090–5.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА Т-КАДГЕРИНА (*CDH13*) АССОЦИИРОВАН С ХАРАКТЕРОМ МАНИФЕСТАЦИИ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА

А. В. Балацкий¹✉, Ф. Р. Чотчаева², Ю. С. Пиневиц², Л. М. Самоходская¹, В. А. Ткачук²

¹ Медицинский научно-образовательный центр,
Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва

² Факультет фундаментальной медицины,
Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва

Ряд исследований показал, что белок Т-кадгерин, кодируемый геном *CDH13* и являющийся одновременно рецептором липопротеидов низкой плотности и адипоцитарного гормона адипонектина, играет роль в развитии атеросклероза и ишемической болезни сердца (ИБС). Некоторые однонуклеотидные замены в гене *CDH13* влияют на экспрессию Т-кадгерина, уровни адипонектина и липидов плазмы крови, однако связь между данными заменами и развитием ИБС не исследована. В настоящей работе изучали роль однонуклеотидных замен *rs12051272*, *rs4783244*, *rs12444338* и *rs11646213* в развитии ИБС и характере ее манифестации. В исследование включили мужчин в возрасте до 55 лет: 79 пациентов со стабильной стенокардией напряжения без инфаркта миокарда, 107 человек, перенесших инфаркт миокарда как дебют ИБС, и 99 здоровых лиц. Всем исследуемым проводили клинико-лабораторное обследование и генотипирование. Результаты генотипирования оценивали с помощью онлайн-программы SNPStats. В настоящей работе взаимосвязи полиморфизма гена *CDH13* с развитием ИБС не выявлено, однако показано, что замена *rs12051272* ассоциирована с характером дебюта заболевания: генотип GT выявили у 13 (16,5 %) пациентов со стабильной стенокардией напряжения и только у 3 (2,8 %) человек с инфарктом миокарда (отношение шансов — 7,54; 95 % доверительный интервал — 2,01–28,35). Таким образом, показано, что полиморфизм гена *CDH13* может влиять на процессы атерогенеза и характер манифестации ИБС.

Ключевые слова: Т-кадгерин, *CDH13*, генетический полиморфизм, липопротеиды низкой плотности, адипонектин, ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда

✉ Для корреспонденции: Александр Владимирович Балацкий
119192, г. Москва, Ломоносовский пр-т, д. 31, корп. 5; balatsky@fbm.msu.ru

Статья поступила: 29.12.2015 Статья принята к печати: 20.01.2016

T-CADHERIN GENE POLYMORPHISM IS ASSOCIATED WITH CORONARY HEART DISEASE MANIFESTATIONS

Balatskiy AV¹✉, Chotchaeva FR², Pinevich YuS², Samokhodskaya LM¹, Tkachuk VA²

¹ Medical Science and Education Centre,
Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Faculty of Fundamental Medicine,
Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

A number of studies have shown that a *CDH13*-encoded T-cadherin protein, which is a receptor for low density lipoproteins and adiponectin, an adipocyte hormone, is associated with atherosclerosis and coronary heart disease (CHD) development. Some single nucleotide polymorphisms in *CDH13* gene affect the expression of T-cadherin and the levels of adiponectin and blood plasma lipids, but the connection between these polymorphisms and CHD development has not been studied yet. In this work the role of *rs12051272*, *rs4783244*, *rs12444338* and *rs11646213* single nucleotide polymorphisms in CHD development and its manifestations was investigated. The study enrolled men under 55 years of age: 79 patients with stable effort angina with no prior myocardial infarction, 107 patients with prior myocardial infarction being the first manifestation of CHD, and 99 healthy subjects. All subjects were clinically examined; laboratory tests and genotyping were conducted. The results of genotyping were evaluated using SNPStats on-line software. This study has not found a connection between *CDH13* gene polymorphisms and CHD development. However, it was shown that *rs12051272* polymorphism is associated with the specifics of the disease onset: GT genotype was detected in 13 (16.5 %) patients with stable effort angina and only in 3 (2.8 %) patients with myocardial infarction (odd ratio of 7.54; 95 % confidence interval of 2.01–28.35). Thus, the study demonstrates that *CDH13* gene polymorphism can affect atherogenesis and CHD manifestations.

Keywords: T-cadherin, *CDH13*, gene polymorphism, low density lipoproteins, adiponectin, coronary heart disease, myocardial infarction

✉ Correspondence should be addressed: Alexandr Balatskiy
Lomonosovsky prospekt, d. 31, korp. 5, Moscow, Russia, 119192; balatsky@fbm.msu.ru

Received: 29.12.2015 Accepted: 20.01.2016

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) представляет собой важнейшую медико-социальную проблему. В настоящее время это заболевание — одна из главных причин смертности и инвалидности во всем мире [1].

Часто первым проявлением ИБС является острый коронарный синдром. На поверхности поврежденной атеросклеротической бляшки происходит внутрисосудистый тромбоз, приводящий к развитию инфаркта миокарда (ИМ) [2]. Средний размер стеноза инфаркт-связанной артерии составляет 48 % [3], таким образом, пациенты с нестабильными бляшками могут не испытывать стенокардии и других симптомов ишемии миокарда, однако имеют высокую вероятность развития острого ИМ. В случае, когда атеросклеротическая бляшка и ИБС развиваются постепенно, первым проявлением болезни часто становится стабильная стенокардия напряжения (ССН).

Механизм формирования нестабильной атеросклеротической бляшки изучен не в полной мере. Некоторые исследования показали, что важную роль в развитии атеросклероза и ИБС играет Т-кадгерин [4–7]. Т-кадгерин — белок с гликозилфосфатидилинозитидным якорем, относящийся к суперсемейству кадгеринов и являющийся рецептором для липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) [8], а также высокомолекулярной формы гормона жировой ткани адипонектина [9]. Во многих работах описаны антиатеросклеротические эффекты адипонектина, которые возникают благодаря увеличению образования в печени липопротеидов высокой плотности, уменьшению концентрации холестерина в атеросклеротической бляшке [10–12], а также подавлению трансформации макрофагов в пенистые клетки [13]. М. М. Joosten и соавт. в своей работе показали, что низкий уровень адипонектина ассоциирован с развитием атеросклероза: снижение концентрации адипонектина в сыворотке крови коррелировало с множественным атеросклеротическим поражением сосудов [14, 15]. В то же время Х. J. Cai и соавт. продемонстрировали, что адипонектин подавляет пролиферацию, миграцию и трансформацию адвентициальных фибробластов [16], что, вероятно, приводит к истончению покрышки атеросклеротической бляшки и повышает риск развития ИМ. Т-кадгерин функционирует и как рецептор ЛПНП [8, 17] и, таким образом, независимо от адипонектина вносит свой вклад в формирование нестабильной атеросклеротической бляшки.

В нескольких исследованиях было показано, что одонуклеотидные замены в гене Т-кадгерина (*CDH13*) могут влиять на концентрацию адипонектина в крови и тем самым принимать участие в механизме развития сердечно-сосудистых заболеваний. Тем не менее данные об ассоциации полиморфизма гена *CDH13* с ИБС и ИМ практически отсутствуют. В настоящей работе мы выбрали четыре одонуклеотидные замены в гене *CDH13* и исследовали связь между ними и развитием ИБС, а также характером дебюта данного заболевания. Установлено, что полиморфизмы *rs12051272* (G→T) и *rs4783244* (G→T) [18, 19] ассоциированы с изменением уровня адипонектина в сыворотке крови. Одонуклеотидная замена *rs12444338* (G→T), кроме того, связана с изменением активности промотора гена Т-кадгерина [20], а также с толщиной комплекса интима-медиа сонных артерий [21], что свидетельствует о возможном влиянии на атерогенез. Подобных данных касательно полиморфизма *rs11646213* (A→T) не получено [19, 22], однако аллель А ассоциирован со сниженным риском развития артериальной гипертензии (АГ) и повышенным риском развития метаболического синдрома

[22, 23]. Все исследуемые в работе полиморфизмы ассоциированы с уровнем липидов сыворотки крови [22, 24–26].

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 285 мужчин в возрасте от 26 до 55 лет. Образцы крови и клинические данные получены из биобанка факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В.Ломоносова. Все пациенты давали информированное согласие на включение в исследование в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации. Группу контроля составили 99 человек — пилотов военной авиации, не имевших АГ, дислипидемии и признаков ИБС по данным нагрузочных тестов. В группу пациентов с ИБС вошли 186 человек с дебютом заболевания в возрасте до 55 лет. В зависимости от характера дебюта болезни были выделены две подгруппы. Критерием включения в 1-ю подгруппу ($n = 79$) была ССН без ИМ, подтвержденная с помощью нагрузочных тестов или коронарной ангиографии. Во 2-ю подгруппу ($n = 107$) включали мужчин с дебютом ИБС в виде клинически, лабораторно (повышение уровня маркеров некроза миокарда) и инструментально (электро-, эхокардиография, радионуклидная диагностика) подтвержденного ИМ без предшествовавшей ему стенокардии напряжения. Данные коронарной ангиографии не служили критерием постановки диагноза ИМ, однако ее проводили пациентам с ИМ для дальнейшего лечения или при наличии сомнений во взаимосвязи ИМ с коронарным атеросклерозом. Критериями исключения из всех групп были диагностированные у пациентов нарушение толерантности к глюкозе и сахарный диабет.

У пациентов диагностировали наличие АГ при значениях артериального давления выше 140 и 90 мм рт.ст. или при проводимой антигипертензивной терапии, дислипидемию — при повышении общего холестерина крови более 5,3 ммоль/л, ЛПНП — более 3,0 ммоль/л или при проводимой на момент дебюта ИБС антигиперлипидемической терапии. Пациентов с индексом массы тела 30 и более относили к лицам с ожирением. Использовали показатели, полученные при первичном обследовании в момент постановки диагноза ИБС.

Геномную ДНК выделяли с использованием набора QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Германия) и робота для пробоподготовки QIAcube (QIAGEN, Германия) из венозной крови, стабилизированной ЭДТА. Генотипирование производили с помощью наборов TaqMan SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, США).

Достоверность различий качественных признаков между группами оценивали с использованием критерия χ^2 с поправкой Йетса. Распределение количественных признаков определяли методом Шапиро–Уилка. Признаки, чье распределение было приближено к нормальному, оценивали с помощью t-критерия Стьюдента, другие количественные признаки — с помощью U-критерия Манна–Уитни. Во всех случаях достоверными считали различия при $p < 0,05$. Данные генотипирования анализировали при помощи онлайн-программы SNPStats. Для оценки вероятности развития заболевания при том или ином генотипе рассчитывали отношения шансов (ОШ) и соответствующий им 95 % доверительный интервал (ДИ). Информационный критерий Акаике (ИКА) использовали для определения модели наследования, наиболее соответствующей полученным результатам (кодминантная, доминантная, рецессивная, сверхдоминантная и лог-аддитивная) [27].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В табл. 1 и 2 приведены основные факторы риска и их частота у лиц, включенных в исследование. Выявленные различия между группой пациентов с ИБС и контрольной группой по частоте основных факторов риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, а также по возрасту были учтены в математических моделях, описывающих полученные результаты. В то же время между подгруппами пациентов не наблюдали значимых различий по частоте основных факторов риска развития сердечно-сосудистых заболеваний.

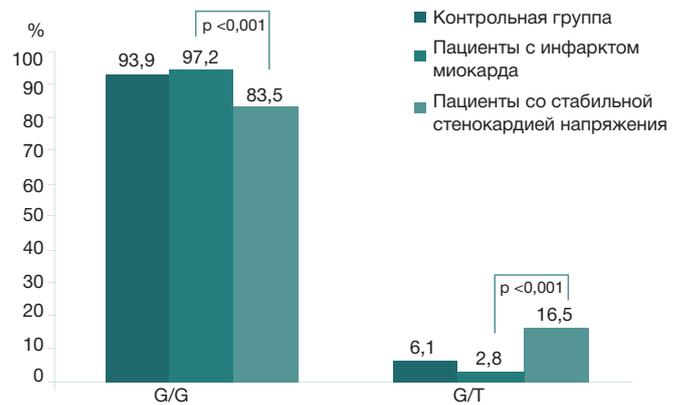
По частоте разных генотипов не было выявлено статистически значимых различий при сравнении групп пациентов с ИБС и контрольной, а также при сравнении контрольной группы с каждой из подгрупп пациентов (имеющих стабильную стенокардию напряжения и перенесших инфаркт миокарда).

Однако при сравнении контрольной группы и подгруппы пациентов с ССН без учета влияния традиционных факторов риска (возраста, ожирения, курения, дислипидемии и АГ) были выявлены различия частот генотипов полиморфизмов *rs12051272* и *rs11646213* (табл. 3, 4).

Для уточнения роли данных полиморфных маркеров было проведено сравнение подгрупп пациентов с ИМ и ССН. При введении в модель традиционных факторов риска статистически значимые различия были получены только для полиморфизма *rs12051272*, для генотипа G/T ОШ (95 % ДИ) развития стабильной стенокардии на-

пряжения составило 7,54 (2,01–28,35) (табл. 5). Для полиморфизма *rs11646213* статистически значимых различий не выявлено.

Таким образом, между группой контроля и каждой из исследуемых подгрупп статистически значимых различий не выявлено, однако была показана ассоциация полиморфизма *rs12051272* с характером манифестации ИБС (ИМ или ССН). Данные по частотам генотипов *rs12051272* суммированы на диаграмме.



Частота генотипов полиморфизма *rs12051272* гена *CDH13* в исследуемых группах

Таблица 1. Частота факторов риска в исследуемых группах

Факторы риска	Контрольная группа, n = 99	Пациенты с ИБС, n = 186
Возраст, лет*	36,0 (32,0; 39,0)	47,0 (44,0; 51,0)#
Дислипидемия	0 (0)	52 (27,96 %)#
Ожирение	7 (7,07 %)	57 (30,65 %)#
Курение	27 (27,27 %)	93 (50,00 %)#
АГ	0 (0)	116 (62,37 %)#

Примечание: * — для пациентов с ИБС указан возраст начала заболевания; приведена медиана (интерквартильный размах); # — $p < 0,001$ при сравнении с соответствующим показателем контрольной группы.

Таблица 2. Частота факторов риска у обследуемых контрольной группы и пациентов в подгруппах

Факторы риска	Контрольная группа, n = 99	Пациенты с ССН, n = 79	Пациенты с ИМ, n = 107	p^{1-2}	p^{1-3}	p^{2-3}
Возраст, лет*	36,0 (32,0; 39,0)	48,0 (43,0; 51,0)	47,0 (44,0; 52,0)	<0,001	<0,001	0,971
Дислипидемия	0 (0)	24 (30,38 %)	28 (26,17 %)	<0,001	<0,001	0,64
Ожирение	7 (7,07 %)	29 (36,71 %)	28 (26,17 %)	<0,001	<0,001	0,167
Курение	27 (27,27 %)	35 (44,30 %)	58 (54,21 %)	<0,05	<0,001	0,235
АГ	0 (0)	53 (67,09 %)	63 (58,88 %)	<0,001	<0,001	0,322

Примечание: * — для подгрупп пациентов указан возраст начала заболевания; представлена медиана (интерквартильный размах); p^{1-2} — уровень статистической значимости различий между контрольной группой и подгруппой пациентов с ССН; p^{1-3} — между контрольной группой и подгруппой пациентов с ИМ; p^{2-3} — между подгруппами пациентов.

Таблица 3. Частота генотипов полиморфизма *rs12051272* гена *CDH13* у здоровых испытуемых и у пациентов со стабильной стенокардией напряжения без учета влияния факторов риска

Генотип	Контрольная группа, n (%)	Пациенты с ССН, n (%)	ОШ (95 % ДИ)	p	ИКА
G/G	93 (93,9)	66 (83,5)	1	<0,05	243,5
G/T	6 (6,1)	13 (16,5)	3,05 (1,10–8,45)		

Таблица 4. Частота генотипов полиморфизма *rs11646213* гена *CDH13* у здоровых испытуемых и у пациентов со стабильной стенокардией напряжения без учета влияния факторов риска

Модель наследования	Генотип	Контрольная группа, n (%)	Пациенты с ССН, n (%)	ОШ (95 % ДИ)	p	ИКА
Кодоминантная	T/T	36 (36,4)	35 (44,3)	1	0,07	245,2
	A/T	44 (44,4)	38 (48,1)	0,89 (0,47–1,68)		
	A/A	19 (19,2)	6 (7,6)	0,32 (0,12–0,91)		
Доминантная	T/T	36 (36,4)	35 (44,3)	1	0,28	247,4
	A/T-A/A	63 (63,6)	44 (55,7)	0,72 (0,39–1,31)		
Рецессивная	T/T-A/T	80 (80,8)	73 (92,4)	1	0,023	243,3
	A/A	19 (19,2)	6 (7,6)	0,35 (0,13–0,91)		
Сверхдоминантная	T/T-A/A	55 (55,6)	41 (51,9)	1	0,63	248,3
	A/T	44 (44,4)	38 (48,1)	1,16 (0,64–2,10)		
Лог-аддитивная	–	–	–	0,66 (0,42–1,02)	0,058	244,9

Таблица 5. Частота генотипов полиморфизма *rs12051272* гена *CDH13* у пациентов со стабильной стенокардией напряжения и с инфарктом миокарда с учетом влияния всех рассматриваемых факторов риска

Генотип	Пациенты с ИМ, n (%)	Пациенты с ССН, n (%)	ОШ (95 % ДИ)	p	ИКА
G/G	104 (97,2)	66 (83,5)	1	<0,001	251,1
G/T	3 (2,8)	13 (16,5)	7,54 (2,01–28,35)		

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Снижение уровня Т-кадгерина в плазме крови ассоциировано с выраженностью атеросклеротического поражения коронарных артерий и развитием острого коронарного синдрома [7], что свидетельствует о возможной связи полиморфизма гена *CDH13*, влияющего на уровень белка, с развитием ИБС и характером ее манифестации. Известно, что полиморфизм *rs12444338* (G/T) связан не только с уровнем адипонектина, но и с активностью промотора гена *CDH13* [20], поэтому именно для этого маркера ожидали наличие ассоциаций с развитием ИБС.

Однако данных, подтверждающих взаимосвязь замен *rs12444338*, *rs4783244* и *rs11646213* с развитием ИБС и характером ее манифестации, получено не было. Похожие результаты представили Н. Morisaki и соавт. для *rs12444338*, не обнаружив его влияния на развитие ИМ, а также на уровни ЛПНП и адипонектина [19].

Несмотря на то, что примененные математические модели учитывали традиционные факторы сердечно-сосудистого риска (возраст, АГ, курение, ожирение и дислипидемию), особенности контрольной группы не позволили продемонстрировать ассоциацию полиморфизма гена *CDH13* с развитием ИБС. Однако была показана ее взаимосвязь с характером манифестации заболевания: частота генотипа G/T полиморфизма *rs12051272* была существенно выше в группе пациентов с ССН без ИМ (16,5 и 2,8 % соответственно; ОШ — 7,54; 95 % ДИ — 2,01–28,35). Полученные данные могут свидетельствовать о возможной протективной роли аллеля Т, что звучит парадоксально, поскольку этот аллель связан с более низким уровнем адипонектина в плазме крови [19].

Существует ряд возможных объяснений для выявленной в настоящей работе ассоциации. Во-первых, следует отметить, что определение уровня циркулирующего адипонектина у пациентов с ИМ затруднено: он аккумулируется в зоне повреждения миокарда, связываясь с Т-кадгеринном [28], таким образом, снижение уровня адипонектина при ИМ может быть вторичным [29]. Кроме того, адипонектин, возможно, оказывает ряд разнонаправленных эф-

фектов на формирование атеросклеротической бляшки и развитие ИМ. С одной стороны, высокий уровень адипонектина предотвращает развитие ИМ посредством нормализации липидного профиля [10] и подавления трансформации макрофагов в пенные клетки [13]. С другой стороны, в некоторых работах показано, что адипонектин подавляет миграцию фибробластов и их трансформацию в миофибробласты [16]. По такому механизму адипонектин может приводить к истончению фиброзной капсулы уже сформировавшейся атеросклеротической бляшки, что в конечном итоге приводит к ее разрыву, возникновению атеротромбоза и развитию ИМ. Следует отметить, что изменение уровня Т-кадгерина само по себе способно влиять на чувствительность к инсулину, активность эндотелиальной синтазы оксида азота, миграцию эндотелиальных клеток и ангиогенез [30], сократительную активность гладкомышечных клеток сосудов и организацию внеклеточного матрикса [31]. Все это способно изменить характер течения атеросклероза.

Имеются данные, что уровень Т-кадгерина (по крайней мере, в плазме крови) отрицательно коррелирует с уровнем адипонектина у молодых мужчин, тогда как у женщин выявлена положительная корреляция [32]. Ограничением проведенного исследования было включение в него только лиц мужского пола.

ВЫВОДЫ

Показано, что генетически обусловленные изменения в экспрессии Т-кадгерина ассоциированы с характером дебюта ИБС — инфарктом миокарда или стабильной стенокардией напряжения. Это свидетельствует о том, что Т-кадгерин участвует в процессах атерогенеза и способен влиять на стабильность атеросклеротических поражений. Механизм данного влияния может быть связан с действием адипонектина или ЛПНП и требует дальнейшего изучения. Полученные результаты потенциально имеют практическое значение для оценки риска возникновения инфаркта миокарда и прогнозирования характера развития начальных атеросклеротических изменений.

Литература

1. Finegold JA, Asaria P, Francis DP. Mortality from ischaemic heart disease by country, region, and age: statistics from World Health Organisation and United Nations. *Int J Cardiol.* 2013 Sep 30; 168 (2): 934–45. doi: 10.1016/j.ijcard.2012.10.046. PubMed PMID: 23218570; PubMed Central PMCID: PMC3819990.
2. Zaman AG, Helft G, Worthley SG, Badimon JJ. The role of plaque rupture and thrombosis in coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2000 Apr; 149 (2): 251–66. PubMed PMID: 10729375.
3. Ambrose JA, Tannenbaum MA, Alexopoulos D, Hjelm Dahl-Monsen CE, Leavy J, Weiss M, et al. Angiographic progression of coronary artery disease and the development of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 1988 Jul; 12 (1): 56–62. PubMed PMID: 3379219.
4. Kostopoulos CG, Spiroglou SG, Varakis JN, Apostolakis E, Papadaki HH. Adiponectin/T-cadherin and apelin/APJ expression in human arteries and periadventitial fat: implication of local adipokine signaling in atherosclerosis? *Cardiovasc Pathol.* 2014 May–Jun; 23 (3): 131–8. doi: 10.1016/j.carpath.2014.02.003. PubMed PMID: 24675084.
5. Ivanov D, Philippova M, Antropova J, Gubaeva F, Ilijinskaya O, Tararak E, et al. Expression of cell adhesion molecule T-cadherin in the human vasculature. *Histochem Cell Biol.* 2001 Mar; 115 (3): 231–42. doi: 10.1007/s004180100252. PubMed PMID: 11326751.
6. Philippova M, Suter Y, Toggweiler S, Schoenenberger AW, Joshi MB, Kyriakakis E, et al. T-cadherin is present on endothelial microparticles and is elevated in plasma in early atherosclerosis. *Eur Heart J.* 2011 Mar; 32 (6): 760–71. doi: 10.1093/eurheartj/ehq206. PubMed PMID: 20584775.
7. Pfaff D, Schoenenberger AW, Dasen B, Erne P, Resink TJ, Philippova M. Plasma T-cadherin negatively associates with coronary lesion severity and acute coronary syndrome. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care.* 2015 Oct; 4 (5): 410–8. doi: 10.1177/2048872614557229. PubMed PMID: 25344491.
8. Kuzmenko YS, Stambolsky D, Kern F, Bochkov VN, Tkachuk VA, Resink TJ. Characteristics of smooth muscle cell lipoprotein binding proteins (p105/p130) as T-cadherin and regulation by positive and negative growth regulators. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 May 19; 246 (2): 489–94. doi: 10.1006/bbrc.1998.8645. PubMed PMID: ISI:000073796900037.
9. Hug C, Wang J, Ahmad NS, Bogan JS, Tsao TS, Lodish HF. T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jul 13; 101 (28): 10308–13. doi: 10.1073/pnas.0403382101. PubMed PMID: 15210937; PubMed Central PMCID: PMC478568.
10. Matsuura F, Oku H, Koseki M, Sandoval JC, Yuasa-Kawase M, Tsubakio-Yamamoto K, et al. Adiponectin accelerates reverse cholesterol transport by increasing high density lipoprotein assembly in the liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Jul 13; 358 (4): 1091–5. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.05.040. PubMed PMID: 17521614.
11. Nawrocki AR, Hofmann SM, Teupser D, Basford JE, Durand JL, Jelicks LA, et al. Lack of association between adiponectin levels and atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010 Jun; 30 (6): 1159–65. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.195826. PubMed PMID: 20299691; PubMed Central PMCID: PMC2896306.
12. Okamoto Y, Folco EJ, Minami M, Wara AK, Feinberg MW, Sukhova GK, et al. Adiponectin inhibits the production of CXC receptor 3 chemokine ligands in macrophages and reduces T-lymphocyte recruitment in atherogenesis. *Circ Res.* 2008 Feb 1; 102 (2): 218–25. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.164988. PubMed PMID: 17991878.
13. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Nishida M, Matsuyama A, Okamoto Y, et al. Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation.* 2001 Feb 27; 103 (8): 1057–63. doi: 10.1161/01.cir.103.8.1057. PubMed PMID: 11222466.
14. Ho DY, Cook NR, Britton KA, Kim E, Creager MA, Ridker PM, et al. High-molecular-weight and total adiponectin levels and incident symptomatic peripheral artery disease in women: a prospective investigation. *Circulation.* 2011 Nov 22; 124 (21): 2303–11. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.045187. PubMed PMID: 22025604; PubMed Central PMCID: PMC3256987.
15. Joosten MM, Joshipura KJ, Pai JK, Bertolia ML, Rimm EB, Mittleman MA, et al. Total adiponectin and risk of symptomatic lower extremity peripheral artery disease in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013 May; 33 (5): 1092–7. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.301089. PubMed PMID: 23448969; PubMed Central PMCID: PMC3685180.
16. Cai XJ, Chen L, Li L, Feng M, Li X, Zhang K, et al. Adiponectin inhibits lipopolysaccharide-induced adventitial fibroblast migration and transition to myofibroblasts via AdipoR1-AMPK-iNOS pathway. *Mol Endocrinol.* 2010 Jan; 24 (1): 218–28. doi: 10.1210/me.2009-0128. PubMed PMID: 19889816.
17. Tkachuk VA, Bochkov VN, Philippova MP, Stambolsky DV, Kuzmenko ES, Sidorova MV, et al. Identification of an atypical lipoprotein-binding protein from human aortic smooth muscle as T-cadherin. *FEBS Lett.* 1998 Jan 16; 421 (3): 208–12. PubMed PMID: 9468307.
18. Chung CM, Lin TH, Chen JW, Leu HB, Yang HC, Ho HY, et al. A genome-wide association study reveals a quantitative trait locus of adiponectin on CDH13 that predicts cardiometabolic outcomes. *Diabetes.* 2011 Sep; 60 (9): 2417–23. doi: 10.2337/db10-1321. PubMed PMID: 21771975; PubMed Central PMCID: PMC3161336.
19. Morisaki H, Yamanaka I, Iwai N, Miyamoto Y, Kokubo Y, Okamura T, et al. CDH13 gene coding T-cadherin influences variations in plasma adiponectin levels in the Japanese population. *Hum Mutat.* 2012 Feb; 33 (2): 402–10. doi: 10.1002/humu.21652. PubMed PMID: 22065538.
20. Jee SH, Sull JW, Lee JE, Shin C, Park J, Kimm H, et al. Adiponectin concentrations: a genome-wide association study. *Am J Hum Genet.* 2010 Oct 8; 87 (4): 545–52. doi: 10.1016/j.ajhg.2010.09.004. PubMed PMID: 20887962; PubMed Central PMCID: PMC2948810.
21. Lee JH, Shin DJ, Park S, Kang SM, Jang Y, Lee SH. Association between CDH13 variants and cardiometabolic and vascular phenotypes in a Korean population. *Yonsei Med J.* 2013 Nov; 54 (6): 1305–12. doi: 10.3349/ymj.2013.54.6.1305. PubMed PMID: 24142632; PubMed Central PMCID: PMC3809859.
22. Fava C, Danese E, Montagnana M, Sjögren M, Almgren P, Guidi GC, et al. A variant upstream of the CDH13 adiponectin receptor gene and metabolic syndrome in Swedes. *Am J Cardiol.* 2011 Nov 15; 108 (10): 1432–7. doi: 10.1016/j.amjcard.2011.06.068. PubMed PMID: 21872196.
23. Org E, Eyheramendy S, Juhanson P, Gieger C, Lichtner P, Klopp N, et al. Genome-wide scan identifies CDH13 as a novel susceptibility locus contributing to blood pressure determination in two European populations. *Hum Mol Genet.* 2009 Jun 15; 18 (12): 2288–96. doi: 10.1093/hmg/ddp135. PubMed PMID: 19304780; PubMed Central PMCID: PMC2685752.
24. Putku M, Kals M, Inno R, Kasela S, Org E, Kožich V, et al. CDH13 promoter SNPs with pleiotropic effect on cardiometabolic parameters represent methylation QTLs. *Hum Genet.* 2015 Mar; 134 (3): 291–303. doi: 10.1007/s00439-014-1521-6. PubMed PMID: 25543204; PubMed Central PMCID: PMC4318987.
25. Gao H, Kim YM, Chen P, Igase M, Kawamoto R, Kim MK, et al. Genetic variation in CDH13 is associated with lower plasma adiponectin levels but greater adiponectin sensitivity in East Asian populations. *Diabetes.* 2013 Dec; 62 (12): 4277–83. doi: 10.2337/db13-0129. PubMed PMID: 24009259; PubMed Central PMCID: PMC3837060.
26. Teng MS, Hsu LA, Wu S, Sun YC, Juan SH, Ko YL. Association of CDH13 genotypes/haplotypes with circulating adiponectin levels, metabolic syndrome, and related metabolic phenotypes: the role of the suppression effect. *PLoS One.* 2015 Apr 13; 10 (4): e0122664. doi: 10.1371/journal.pone.0122664. PubMed PMID: 25875811; PubMed Central PMCID: PMC4395292.
27. Solé X, Guinó E, Valls J, Iñiesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool

- for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006 Aug 1; 22 (15): 1928–9. doi: 10.1093/bioinformatics/btl268. PubMed PMID: 16720584.
28. Denzel MS, Scimia MC, Zumstein PM, Walsh K, Ruiz-Lozano P, Ranscht B. T-cadherin is critical for adiponectin-mediated cardioprotection in mice. *J Clin Invest*. 2010 Dec; 120 (12): 4342–52. doi: 10.1172/JCI43464. PubMed PMID: 21041950; PubMed Central PMCID: PMC2993592.
 29. Shibata R, Sato K, Kumada M, Izumiya Y, Sonoda M, Kihara S, et al. Adiponectin accumulates in myocardial tissue that has been damaged by ischemia-reperfusion injury via leakage from the vascular compartment. *Cardiovasc Res*. 2007 Jun 1; 74 (3): 471–9. doi: 10.1016/j.cardiores.2007.02.010. PubMed PMID: 17362898.
 30. Philippova M, Joshi MB, Pfaff D, Kyriakakis E, Maslova K, Erne P, et al. T-cadherin attenuates insulin-dependent signalling, eNOS activation, and angiogenesis in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res*. 2012 Mar 1; 93 (3): 498–507. doi: 10.1093/cvr/cvs004. PubMed PMID: 22235028.
 31. Frisantiene A, Pfaff D, Frachet A, Coen M, Joshi MB, Maslova K, et al. Regulation of contractile signaling and matrix remodeling by T-cadherin in vascular smooth muscle cells: constitutive and insulin-dependent effects. *Cell Signal*. 2014 Sep; 26 (9): 1897–908. doi: 10.1016/j.cellsig.2014.05.001. PubMed PMID: 24815187.
 32. Schoenenberger AW, Pfaff D, Dasen B, Frisantiene A, Erne P, Resink TJ, et al. Gender-Specific Associations between Circulating T-Cadherin and High Molecular Weight-Adiponectin in Patients with Stable Coronary Artery Disease. *PLoS One*. 2015 Jun 17; 10 (6): e0131140. doi: 10.1371/journal.pone.0131140. PubMed PMID: 26083608; PubMed Central PMCID: PMC4470588.

References

1. Finegold JA, Asaria P, Francis DP. Mortality from ischaemic heart disease by country, region, and age: statistics from World Health Organisation and United Nations. *Int J Cardiol*. 2013 Sep 30; 168 (2): 934–45. doi: 10.1016/j.ijcard.2012.10.046. PubMed PMID: 23218570; PubMed Central PMCID: PMC3819990.
2. Zaman AG, Helft G, Worthley SG, Badimon JJ. The role of plaque rupture and thrombosis in coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2000 Apr; 149 (2): 251–66. PubMed PMID: 10729375.
3. Ambrose JA, Tannenbaum MA, Alexopoulos D, Hjemdahl-Monsen CE, Leavy J, Weiss M, et al. Angiographic progression of coronary artery disease and the development of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 1988 Jul; 12 (1): 56–62. PubMed PMID: 3379219.
4. Kostopoulos CG, Spiroglou SG, Varakis JN, Apostolakis E, Papadaki HH. Adiponectin/T-cadherin and apelin/APJ expression in human arteries and periaortic fat: implication of local adipokine signaling in atherosclerosis? *Cardiovasc Pathol*. 2014 May–Jun; 23 (3): 131–8. doi: 10.1016/j.carpath.2014.02.003. PubMed PMID: 24675084.
5. Ivanov D, Philippova M, Antropova J, Gubaeva F, Ilijinskaya O, Tararak E, et al. Expression of cell adhesion molecule T-cadherin in the human vasculature. *Histochem Cell Biol*. 2001 Mar; 115 (3): 231–42. doi: 10.1007/s004180100252. PubMed PMID: 11326751.
6. Philippova M, Suter Y, Toggweiler S, Schoenenberger AW, Joshi MB, Kyriakakis E, et al. T-cadherin is present on endothelial microparticles and is elevated in plasma in early atherosclerosis. *Eur Heart J*. 2011 Mar; 32 (6): 760–71. doi: 10.1093/eurheartj/ehq206. PubMed PMID: 20584775.
7. Pfaff D, Schoenenberger AW, Dasen B, Erne P, Resink TJ, Philippova M. Plasma T-cadherin negatively associates with coronary lesion severity and acute coronary syndrome. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*. 2015 Oct; 4 (5): 410–8. doi: 10.1177/2048872614557229. PubMed PMID: 25344491.
8. Kuzmenko YS, Stambolsky D, Kern F, Bochkov VN, Tkachuk VA, Resink TJ. Characteristics of smooth muscle cell lipoprotein binding proteins (p105/p130) as T-cadherin and regulation by positive and negative growth regulators. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 May 19; 246 (2): 489–94. doi: 10.1006/bbrc.1998.8645. PubMed PMID: ISI:000073796900037.
9. Hug C, Wang J, Ahmad NS, Bogan JS, Tsao TS, Lodish HF. T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jul 13; 101 (28): 10308–13. doi: 10.1073/pnas.0403382101. PubMed PMID: 15210937; PubMed Central PMCID: PMC478568.
10. Matsuura F, Oku H, Koseki M, Sandoval JC, Yuasa-Kawase M, Tsubakio-Yamamoto K, et al. Adiponectin accelerates reverse cholesterol transport by increasing high density lipoprotein assembly in the liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Jul 13; 358 (4): 1091–5. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.05.040. PubMed PMID: 17521614.
11. Nawrocki AR, Hofmann SM, Teupser D, Basford JE, Durand JL, Jelicks LA, et al. Lack of association between adiponectin levels and atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010 Jun; 30 (6): 1159–65. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.195826. PubMed PMID: 20299691; PubMed Central PMCID: PMC2896306.
12. Okamoto Y, Folco EJ, Minami M, Wara AK, Feinberg MW, Sukhova GK, et al. Adiponectin inhibits the production of CXC receptor 3 chemokine ligands in macrophages and reduces T-lymphocyte recruitment in atherogenesis. *Circ Res*. 2008 Feb 1; 102 (2): 218–25. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.164988. PubMed PMID: 17991878.
13. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Nishida M, Matsuyama A, Okamoto Y, et al. Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation*. 2001 Feb 27; 103 (8): 1057–63. doi: 10.1161/01.cir.103.8.1057. PubMed PMID: 11222466.
14. Ho DY, Cook NR, Britton KA, Kim E, Creager MA, Ridker PM, et al. High-molecular-weight and total adiponectin levels and incident symptomatic peripheral artery disease in women: a prospective investigation. *Circulation*. 2011 Nov 22; 124 (21): 2303–11. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.045187. PubMed PMID: 22025604; PubMed Central PMCID: PMC3256987.
15. Joosten MM, Joshipura KJ, Pai JK, Bertola ML, Rimm EB, Mittleman MA, et al. Total adiponectin and risk of symptomatic lower extremity peripheral artery disease in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013 May; 33 (5): 1092–7. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.301089. PubMed PMID: 23448969; PubMed Central PMCID: PMC3685180.
16. Cai XJ, Chen L, Li L, Feng M, Li X, Zhang K, et al. Adiponectin inhibits lipopolysaccharide-induced adventitial fibroblast migration and transition to myofibroblasts via AdipoR1-AMPK-iNOS pathway. *Mol Endocrinol*. 2010 Jan; 24 (1): 218–28. doi: 10.1210/me.2009-0128. PubMed PMID: 19889816.
17. Tkachuk VA, Bochkov VN, Philippova MP, Stambolsky DV, Kuzmenko ES, Sidorova MV, et al. Identification of an atypical lipoprotein-binding protein from human aortic smooth muscle as T-cadherin. *FEBS Lett*. 1998 Jan 16; 421 (3): 208–12. PubMed PMID: 9468307.
18. Chung CM, Lin TH, Chen JW, Leu HB, Yang HC, Ho HY, et al. A genome-wide association study reveals a quantitative trait locus of adiponectin on CDH13 that predicts cardiometabolic outcomes. *Diabetes*. 2011 Sep; 60 (9): 2417–23. doi: 10.2337/db10-1321. PubMed PMID: 21771975; PubMed Central PMCID: PMC3161336.
19. Morisaki H, Yamanaka I, Iwai N, Miyamoto Y, Kokubo Y, Okamura T, et al. CDH13 gene coding T-cadherin influences variations in plasma adiponectin levels in the Japanese population. *Hum Mutat*. 2012 Feb; 33 (2): 402–10. doi: 10.1002/humu.21652. PubMed PMID: 22065538.
20. Jee SH, Sull JW, Lee JE, Shin C, Park J, Kimm H, et al. Adiponectin concentrations: a genome-wide association study. *Am J Hum Genet*. 2010 Oct 8; 87 (4): 545–52. doi: 10.1016/j.ajhg.2010.09.004. PubMed PMID: 20887962; PubMed Central PMCID: PMC2948810.

21. Lee JH, Shin DJ, Park S, Kang SM, Jang Y, Lee SH. Association between CDH13 variants and cardiometabolic and vascular phenotypes in a Korean population. *Yonsei Med J.* 2013 Nov; 54 (6): 1305–12. doi: 10.3349/ymj.2013.54.6.1305. PubMed PMID: 24142632; PubMed Central PMCID: PMC3809859.
22. Fava C, Danese E, Montagnana M, Sjögren M, Almgren P, Guidi GC, et al. A variant upstream of the CDH13 adiponectin receptor gene and metabolic syndrome in Swedes. *Am J Cardiol.* 2011 Nov 15; 108 (10): 1432–7. doi: 10.1016/j.amjcard.2011.06.068. PubMed PMID: 21872196.
23. Org E, Eyheramendy S, Juhanson P, Gieger C, Lichtner P, Klopp N, et al. Genome-wide scan identifies CDH13 as a novel susceptibility locus contributing to blood pressure determination in two European populations. *Hum Mol Genet.* 2009 Jun 15; 18 (12): 2288–96. doi: 10.1093/hmg/ddp135. PubMed PMID: 19304780; PubMed Central PMCID: PMC2685752.
24. Putku M, Kals M, Inno R, Kasela S, Org E, Kožich V, et al. CDH13 promoter SNPs with pleiotropic effect on cardiometabolic parameters represent methylation QTLs. *Hum Genet.* 2015 Mar; 134 (3): 291–303. doi: 10.1007/s00439-014-1521-6. PubMed PMID: 25543204; PubMed Central PMCID: PMC4318987.
25. Gao H, Kim YM, Chen P, Igase M, Kawamoto R, Kim MK, et al. Genetic variation in CDH13 is associated with lower plasma adiponectin levels but greater adiponectin sensitivity in East Asian populations. *Diabetes.* 2013 Dec; 62 (12): 4277–83. doi: 10.2337/db13-0129. PubMed PMID: 24009259; PubMed Central PMCID: PMC3837060.
26. Teng MS, Hsu LA, Wu S, Sun YC, Juan SH, Ko YL. Association of CDH13 genotypes/haplotypes with circulating adiponectin levels, metabolic syndrome, and related metabolic phenotypes: the role of the suppression effect. *PLoS One.* 2015 Apr 13; 10 (4): e0122664. doi: 10.1371/journal.pone.0122664. PubMed PMID: 25875811; PubMed Central PMCID: PMC4395292.
27. Solé X, Guinž E, Valls J, Iñiesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics.* 2006 Aug 1; 22 (15): 1928–9. doi: 10.1093/bioinformatics/btl268. PubMed PMID: 16720584.
28. Denzel MS, Scimia MC, Zumstein PM, Walsh K, Ruiz-Lozano P, Ranscht B. T-cadherin is critical for adiponectin-mediated cardioprotection in mice. *J Clin Invest.* 2010 Dec; 120 (12): 4342–52. doi: 10.1172/JCI43464. PubMed PMID: 21041950; PubMed Central PMCID: PMC2993592.
29. Shibata R, Sato K, Kumada M, Izumiya Y, Sonoda M, Kihara S, et al. Adiponectin accumulates in myocardial tissue that has been damaged by ischemia-reperfusion injury via leakage from the vascular compartment. *Cardiovasc Res.* 2007 Jun 1; 74 (3): 471–9. doi: 10.1016/j.cardiores.2007.02.010. PubMed PMID: 17362898.
30. Philippova M, Joshi MB, Pfaff D, Kyriakakis E, Maslova K, Erne P, et al. T-cadherin attenuates insulin-dependent signalling, eNOS activation, and angiogenesis in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 2012 Mar 1; 93 (3): 498–507. doi: 10.1093/cvr/cvs004. PubMed PMID: 22235028.
31. Frisantiene A, Pfaff D, Frachet A, Coen M, Joshi MB, Maslova K, et al. Regulation of contractile signaling and matrix remodeling by T-cadherin in vascular smooth muscle cells: constitutive and insulin-dependent effects. *Cell Signal.* 2014 Sep; 26 (9): 1897–908. doi: 10.1016/j.cellsig.2014.05.001. PubMed PMID: 24815187.
32. Schoenenberger AW, Pfaff D, Dasen B, Frisantiene A, Erne P, Resink TJ, et al. Gender-Specific Associations between Circulating T-Cadherin and High Molecular Weight-Adiponectin in Patients with Stable Coronary Artery Disease. *PLoS One.* 2015 Jun 17; 10 (6): e0131140. doi: 10.1371/journal.pone.0131140. PubMed PMID: 26083608; PubMed Central PMCID: PMC4470588.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ПРЕИМУЩЕСТВА МНОГОСУТОЧНОГО ХОЛТЕРОВСКОГО МОНИТОРИРОВАНИЯ ЭЛЕКТРОКАРДИОГРАММЫ ПЕРЕД СТАНДАРТНЫМ 24-ЧАСОВЫМ ИССЛЕДОВАНИЕМ

Ю. Н. Горожанцев

Научно-исследовательский институт – Краевая клиническая больница № 1 имени профессора С. В. Очаповского, Краснодар

Повышение диагностической ценности холтеровского мониторинга ЭКГ при увеличении длительности исследования убедительно доказано в основном в отношении пароксизмальной фибрилляции предсердий. Цель исследования — изучение диагностической эффективности метода многосуточного мониторинга ЭКГ в выявлении различных видов аритмий, оценка неравномерности распределения аритмий между различными сутками наблюдения. Обследованы 27 пациентов (13 мужчин, 14 женщин, средний возраст — $42,8 \pm 10,8$ года) с жалобами, вызывающими подозрение на наличие различных видов тахи- и брадиаритмии. В исследовании использованы малогабаритные кардиорегастраторы и оригинальное программное обеспечение. Длительность регистрации ЭКГ составила 5–7 сут. С использованием предложенных количественных критериев, характеризующих степень неравномерности межсуточного распределения аритмий, подтверждены преимущества многосуточных исследований перед 24-часовым наблюдением в отношении таких аритмий, как паузы более 2,5 с, АВ-блокада II степени, пароксизмальная суправентрикулярная тахикардия, одиночные желудочковые экстрасистолы, парные и групповые желудочковые экстрасистолы, желудочковая тахикардия.

Ключевые слова: холтеровское мониторирование, многосуточное мониторирование ЭКГ, аритмия

Благодарности: автор благодарит Дмитрия Дроздова из Российского университета дружбы народов (Москва) за ценные советы и замечания, высказанные им в ходе проведения исследования и подготовки рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Юрий Николаевич Горожанцев
350029, г. Краснодар, ул. 1 Мая, д. 167; ygsoft2002@rambler.ru

Статья поступила: 11.09.2015 **Статья принята к печати:** 24.10.2015

DIAGNOSTIC ADVANTAGES OF A LONG-TERM HOLTER ECG MONITORING COMPARED TO A STANDARD 24-HOUR MONITORING

Gorozhantsev YuN

S. V. Ochapovsky Scientific Research Institute – Regional Clinical Hospital No. 1, Krasnodar, Russia

Longer observation periods have been proven to increase the diagnostic value of Holter ECG monitoring for paroxysmal atrial fibrillation mainly. The aim of this work was to study the diagnostic efficacy of a long-term ECG monitoring in detecting various types of arrhythmias and to assess the uneven distribution of arrhythmias over different observation days. In this study 27 patients were examined, including 13 men and 14 women with a mean age of 42.8 ± 10.8 years, their complaints suggesting various types of tachy- and bradyarrhythmias. Compact recorders and original software were used. ECG recording time was 5-7 days. Using quantity criteria characterizing the level of uneven inter-day distribution of arrhythmias, advantages of long-term observations over a 24-hour monitoring were confirmed for such arrhythmias as sinus pauses over 2.5 seconds, a second degree AV block, paroxysmal supraventricular tachycardia, single and paired ventricular extrasystoles, ventricular salvos, ventricular tachycardia.

Keywords: Holter monitoring, long-term ECG monitoring, arrhythmia

Acknowledgments: the author is grateful to Dmitry Drozdov from Peoples' Friendship University of Russia for his precious advice and comments that he expressed during the course of this work and this article preparation.

✉ **Correspondence should be addressed:** Yuriy Gorozhantsev
ul. 1 Maya, d.167, Krasnodar, Russia, 350029; ygsoft2002@rambler.ru

Received: 11.09.2015 **Accepted:** 24.10.2015

В настоящее время предположение о повышении информативности мониторинга ЭКГ при увеличении его длительности подтверждено в работах различных авторов. Так, G. Senatore и соавт. [1] поставили целью сравнить вероятность выявления бессимптомных рецидивов фибрилляции предсердий (ФП) у пациентов, которым была выполнена

радиочастотная катетерная абляция, при использовании непрерывного транстелефонного мониторинга ЭКГ в течение 90 дней, при регистрации стандартной ЭКГ через 12, 24 и 36 ч и на 14, 30 и 120-й дни после абляции и при анализе данных 24-часового холтеровского мониторинга на 30-й и 120-й дни после абляции. Было показано,

что долгосрочное транстелефонное мониторирование ЭКГ позволяет получить больше диагностической информации, и по его результатам только 72 % абляций являлись успешными, тогда как для двух других методов этот показатель составил 86 %.

N. Dagres и соавт. [2] изучали влияние продолжительности холтеровского мониторирования ЭКГ на эффективность обнаружения рецидивов ФП после абляции и установили, что 24-часовое наблюдение выявило бы 59 %, 48-часовое — 67 %, 72-часовое — 80 %, а 4-дневная запись — 91 % от того числа пациентов, которое было определено по завершении всех 7 дней наблюдения. T. Hanke и соавт. [3] сравнивали эффективность и точность оценки сердечного ритма пациентов после радиочастотной катетерной абляции при выполнении стандартного холтеровского мониторирования ЭКГ и длительного мониторирования с помощью имплантируемого устройства (IMD — Implantable Medical Devices) Reveal XT 9525 (Medtronic Inc., США) в течение 3 мес. Синусовый ритм в процессе 24-часового исследования был зафиксирован в 53 случаях, но с помощью IMD этот факт нашел подтверждение только в 34 случаях. D. Jabaudon и соавт. [4] показали, что 7-дневное амбулаторное мониторирование ЭКГ с помощью петлевого регистратора позволяет обнаружить эпизоды ФП с большей эффективностью, чем обычная ЭКГ и стандартное холтеровское мониторирование. Эффективность стандартной процедуры записи ЭКГ составляла 2,7 %; холтеровское мониторирование позволило дополнительно выявить еще 5 % пациентов среди тех, у которых не получено диагностически значимых результатов при анализе обычной ЭКГ; исследование с помощью петлевого регистратора позволило обнаружить еще 5,7 % пациентов с ФП среди тех, кто имел нормальные показатели ЭКГ и 24-часового холтеровского исследования. D. Andresen и соавт. [5] продемонстрировали преимущества длительного мониторинга ЭКГ в обнаружении сложных желудочковых тахикардий.

Положительный диагностический опыт применения непрерывного многосуточного мониторирования ЭКГ в отношении выявления различных видов аритмий описан рядом отечественных исследователей [6–9]. Метод длительного мониторирования ЭКГ с успехом применяется при подборе антиаритмической терапии [10, 11].

Следует отметить, что большинство ранее проведенных исследований касались такого вида аритмии, как пароксизмальная ФП. В меньшей степени рассматривались другие виды аритмий, в том числе клинически значимые. Мало внимания уделено также изучению явления неравномерности межсуточного распределения аритмий. Недостаточно разработаны количественные критерии, демонстрирующие преимущества длительных исследований.

Цель исследования — изучение диагностических преимуществ многосуточного холтеровского мониторирования перед 24-часовым стандартным исследованием в отношении выявления различных видов аритмий (за исключением ФП), а также неравномерности распределения аритмий между различными сутками наблюдения.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Обследованы 27 пациентов (13 мужчин, 14 женщин), средний возраст составил $42,8 \pm 10,8$ года. Критерии включения в исследование: жалобы на редкие, 1–4 раза в неделю, субъективные проявления аритмии, такие как внезапные приступы сердцебиения, резко выраженные ощущения

перебоев в работе сердца, потери сознания, внезапные кратковременные головокружения высокой интенсивности. Все пациенты дали письменное согласие на использование их личных данных в исследовании.

Для проведения многосуточного мониторирования ЭКГ были использованы малогабаритные 3-канальные регистраторы «Махаон-03» («Альтоника», Россия), позволяющие производить 7-суточную запись без смены элемента питания. Обработку полученных записей осуществляли с использованием оригинального, разработанного нами программного обеспечения. Оно позволяет обрабатывать и анализировать 3-канальную запись длительностью до 7 сут одномоментно (в один проход), без разделения ее на отдельные 24-часовые фрагменты. Предварительно программное обеспечение было протестировано на базе данных ЭКГ MIT-BIH [12–14] по общепринятой методике [15]. Показатели точности автоматического обнаружения зубцов R составили: чувствительность (SE) — 99,56 % и ценность положительного результата (+P) — 98,67 %. Проведено также тестирование на базе данных Российского общества холтеровского мониторирования и неинвазивной электрофизиологии [16] со следующими показателями точности определения зубцов R: чувствительность (SE) — 99,8 % и ценность положительного результата (+P) — 99,5 %.

Распределение пациентов по длительности регистрации ЭКГ: 21 пациент — 7 сут, 5 — 6 сут, 1 пациент — 5 сут. Средняя длительность проведенных исследований составила 6 сут 17 ч (161 ч).

Анализировали семь видов аритмий: паузы более 2,5 с, АВ-блокада II степени, суправентрикулярные экстрасистолы (включая парные и групповые), пароксизмальная суправентрикулярная тахикардия, одиночные желудочковые экстрасистолы, парные и групповые желудочковые экстрасистолы, желудочковая тахикардия.

В каждом случае длительность исследования условно разделяли на 24-часовые отрезки, затем подсчитывали в них количество тех или иных нарушений ритма и проводимости. Далее анализировали степень неоднородности возникновения аритмий по дням наблюдения на основе различий их количества в каждом из суточных отрезков, составляющих время наблюдения.

Для количественной оценки полученных результатов использовали следующие, предложенные нами показатели:

– КП1-положительное количество пациентов — число пациентов, у которых данный вид аритмии обнаруживался только в один из 24-часовых отрезков, в то время как в течение остальных суточных участков данная аритмия не обнаруживалась вовсе;

– доля КП1-положительного количества пациентов — процентная доля пациентов, имеющих всего один диагностически значимые сутки, от числа всех пациентов, у которых данный вид аритмии был обнаружен. Например, анализируемый вид аритмии был обнаружен у 7 пациентов, при этом у 2 из них аритмия была только в течение одних суток из всего времени наблюдения. Тогда доля КП1-положительного количества пациентов составит 28,5 %;

– КП1-негативное количество пациентов — число пациентов, у которых данный вид аритмии не регистрировался в течение хотя бы одних суток, но был документирован в другие дни;

– доля КП1-негативного количества пациентов — процентная доля пациентов, имеющих хотя бы одни сутки, свободные от данного вида аритмии, от числа всех пациентов, у которых данный вид аритмии был обнаружен. Например,

Характеристики обнаружения различных видов аритмий при длительном исследовании

Показатели	Суправентрикулярные экстрасистолы	Одиночные желудочковые экстрасистолы	Пароксизмальная суправентрикулярная тахикардия	Паузы более 2,5 с	АВ-блокада II степени	Парные и групповые желудочковые экстрасистолы	Желудочковая тахикардия	Среднее по всем видам аритмий
Количество пациентов с данным видом аритмии	27	26	15	3	3	13	5	-
КП1-положительное количество пациентов	0	2	7	2	1	8	3	-
Доля КП1-положительного количества пациентов, %	0	7,7	46,7	66,7	33,3	61,5	60	39,4
КП1-негативное количество пациентов	3	15	13	2	3	12	5	-
Доля КП1-негативного количества пациентов, %	11,1	57,7	86,7	66,7	100,0	92,3	100,0	73,5
ВО24, % (средняя величина)	98,4	71,2	39,8	29,4	55,6	33,2	31,9	51,4
КВ, средняя величина	61,4	106,7	181,8	203,3	147,5	198,5	199	156,9

изучаемая аритмия обнаружена у 8 пациентов, при этом у 5 из них были хотя бы одни сутки, в течение которых эта аритмия не регистрировалась. Доля КП1-негативного количества пациентов составит 62,5 %;

– ВО24 — вероятность обнаружения данного вида аритмии в том случае, если бы исследование проводилось в течение только 24 ч. Значение показателя для каждого пациента вычислялось как процентное отношение числа дней, в которые аритмия была обнаружена, к общему числу дней наблюдения. Например, если аритмия обнаруживалась только в трех из шести 24-часовых отрезков (6-суточное исследование), то ВО24 составит 50 %;

– КВ — коэффициент вариации, показатель неоднородности. Рассчитывался как отношение стандартного отклонения количества аритмий в каждый из дней к среднесуточному их количеству у данного пациента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты анализа данных, полученных при непрерывном многосуточном холтеровском мониторинге ЭКГ, представлены в таблице.

Использование предложенных нами количественных показателей позволило продемонстрировать диагностические преимущества многосуточной записи ЭКГ перед традиционным 24-часовым наблюдением. Из таблицы видно, что при стандартном диагностическом исследовании возможны отрицательные результаты в отношении выявления потенциально опасных аритмий.

При обобщении результатов по всем анализируемым видам аритмий были получены следующие усредненные показатели. Вероятность обнаружения аритмии в течение 24-часового наблюдения составила 51,4 % по отношению к многосуточным исследованиям. Доля случаев, когда аритмия обнаруживалась только в одни сутки из всего времени наблюдения, составила 39,4 %. В 73,5 % случаев обнаруживались хотя бы одни сутки, когда искомая аритмия полностью отсутствовала.

Коэффициент вариации количества аритмий составил в среднем 156,9, что пятикратно превышает общепринятый уровень порога данного показателя для равномерного процесса.

Отдельные наблюдения иллюстрируют неравномерность распределения аритмических эпизодов между сутками.

Пациент С., 46 лет, обратился к кардиологу ККБ № 1 с жалобами на эпизоды внезапного сердцебиения продолжительностью от нескольких секунд до нескольких минут, возникающие с периодичностью 1–2 раза в неделю преимущественно в вечернее и ночное время суток. Данные жалобы беспокоили пациента примерно в течение года. Несмотря на то что, кроме ощущения сердцебиения, других нарушений самочувствия во время приступа не наблюдалось, данные симптомные эпизоды вызывали у пациента значительный психологический дискомфорт. Было заподозрено наличие желудочковых нарушений ритма. Накануне пациенту выполнялось 24-часовое исследование, во время которого были зарегистрированы лишь единичные суправентрикулярные экстрасистолы. Пациенту было выполнено 7-суточное холтеровское мониторирование. При анализе записи на 4-е сутки исследования обнаружен единственный за все 7 сут наблюдения пароксизм суправентрикулярной тахикардии с ЧСС до 145 в минуту длительностью 5 с (рис. 1), который совпал с субъективными ощущениями пациента. В результате удалось доказать низкую опасность аритмических эпизодов у данного пациента, что позволило отказаться от запланированной агрессивной антиаритмической терапии.

Пациент Л., 32 года, обратился к кардиологу ККБ № 1 с жалобами на периодические кратковременные эпизоды головокружений и предобморочных состояний, возникающие внезапно примерно 1 раз в неделю. На 6-е сутки 7-суточного исследования у пациента возникло ощущение внезапного головокружения высокой интенсивности, что совпало с обнаруженным в процессе анализа записи эпизодом, состоящим из двух следующих друг за другом пауз ритма продолжительностью 2,8 и 3,1 с (рис. 2). Этот эпизод угнетения активности синусового узла оказался единственным случаем брадикардии на протяжении всей 7-суточной записи. По результатам исследования пациент направлен к хирургам для решения вопроса о целесообразности имплантации ЭКС.

Пациентка П., 62 года, обратилась к кардиологу ККБ № 1 с жалобами на периодические кратковременные возникающие внезапно ощущения толчков, дискомфор-

та и давления в груди без связи с физической нагрузкой. Указанные жалобы беспокоили пациентку в течение нескольких месяцев с периодичностью 1–2 раза в месяц, но на момент обращения участились до 2–3 раз в неделю. Для исключения связи жалоб с заболеваниями сердечно-сосудистой системы выполнено 7-суточное исследование, в процессе которого на 4-е сутки документирован единственный эпизод желудочковой тахикардии (рис. 3), подтвержденный жалобами пациентки. Пациентка направлена к кардиологу для назначения антиаритмической терапии.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Повышение диагностической ценности мониторинга ЭКГ при увеличении его длительности описано в работах различных авторов. Увеличение длительности наблюдения достигалось различными способами, но все они приводили к положительным результатам и повышению информативности исследований. Вместе с тем недостаточное внимание уделялось изучению степени выраженности явления межсуточной неравномерности распределения аритмий. Полученные результаты, по нашему мнению, свидетельствуют о том, что у пациентов с редкими клиническими проявлениями нарушений ритма сердца распределение аритмий по суткам наблюдения характеризуется выраженной неравномерностью. При этом достаточно большую долю составляют случаи полного отсутствия искомых аритмий в течение нескольких суток наблюдения, а также случаи, когда нарушения ритма фиксировались в течение только одних суток из всего времени мониторинга.

Столь выраженная степень неравномерности указывает на весьма высокую вероятность ложноотрицательных диагностических результатов у этой группы пациентов в том случае, если в качестве диагностического мероприятия будет проведено только однократное 24-часовое холтеровское мониторирование.

Увеличение длительности исследования до 7 сут значительно повышает вероятность обнаружения различного рода аритмий. Учитывая полученные нами данные, можно утверждать, что это касается не только пароксизмальной ФП, но и других видов аритмий. Однако надо отметить, что с экономической точки зрения длительное исследование требует больших затрат по сравнению с 24-часовым наблюдением. По этой причине, по-видимому, нельзя рекомендовать 7-суточный мониторинг в качестве рутинного исследования — для использования во всех случаях вместо 24-часового.

Проведение исследований увеличенной длительности (до 7 сут) может быть целесообразно в случаях неинформативности 24-часового мониторирования у пациентов с типичными, ярко выраженными жалобами и редкими (1–4 раза в неделю) проявлениями нарушений ритма и проводимости.

Неинвазивное 7-суточное исследование, безусловно, уступает имплантируемым устройствам в длительности регистрации, но при этом имеет ряд преимуществ по другим характеристикам: не требует операции для установки имплантируемого регистратора, намного дешевле с экономической точки зрения, регистратор является многократным, есть возможность осуществлять непрерывную, а не фрагментарную запись ЭКГ.



Рис. 1. Единственный пароксизм суправентрикулярной тахикардии на 4-е сутки 7-суточного исследования



Рис. 2. Следующие друг за другом паузы длительностью 2,8 и 3,1 с вследствие угнетения активности синусового узла



Рис. 3. Единственный пароксизм желудочковой тахикардии на 4-е сутки 7-суточного исследования

ВЫВОДЫ

Предложенные нами количественные критерии позволяют достаточно объективно оценить межсуточное распределение аритмий и наглядно демонстрируют неравномерность проявления аритмий.

У пациентов с редкими симптомами аритмии имеет место значительная неравномерность распределения аритмий между различными днями наблюдения. Как оказалось, это касается не только пароксизмальной фибрилляции предсердий, но и других видов аритмий.

В процессе проведения сверхдлительных 5-, 6-, 7-суточных холтеровских исследований появляется возможность

извлечения значительно большего объема диагностической информации по сравнению с мониторингом ЭКГ в течение 24 ч. Существенно повышается вероятность обнаружения аритмий в случае их редкого проявления (1–4 раза в неделю). В особенности это касается клинически значимых видов аритмий, таких как паузы более 2,5 с, АВ-блокада II степени, пароксизмальная суправентрикулярная тахикардия, парные и групповые желудочковые экстрасистолы, желудочковая тахикардия. При этом диагностические преимущества в отношении суправентрикулярной экстрасистолы представляются сомнительными.

Литература

1. Senatore G, Stabile G, Bertaglia E, Donnici G, De Simone A, Zoppo F, et al. Role of transtelephonic electrocardiographic monitoring in detecting short-term arrhythmia recurrences after radiofrequency ablation in patients with atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol.* 2005; 45 (6): 873–6.
2. Dages N, Kottkamp H, Piorkowski C, Weis S, Arya A, Sommer P, et al. Influence of the duration of Holter monitoring on the detection of arrhythmia recurrences after catheter ablation of atrial fibrillation: implications for patient follow-up. *Int J Cardiol.* 2010; 139 (3): 305–6.
3. Hanke T, Charitos EI, Stierle U, Karluss A, Kraatz E, Graf B, et al. Twenty-four-hour Holter monitor follow-up does not provide accurate heart rhythm status after surgical atrial fibrillation ablation therapy: up to 5 months experience with a novel permanently implantable heart rhythm monitor device. *Circulation.* 2009; 120 (11 Suppl): S177–84.
4. Jabaudon D, Sztajzel J, Sievert K, Landis T, Sztajzel R. Usefulness of ambulatory 7-day ECG monitoring for the detection of atrial fibrillation and flutter after acute stroke and transient ischemic attack. *Stroke.* 2004; 35 (7): 1647–51.
5. Andresen D, von Leitner ER, Wegscheider K, Schröder R. [Demonstration of complex ventricular tachy-arrhythmias by long-term ECG monitoring: relationship to duration of monitoring]. *Dtsch Med Wochenschr.* 1982; 107 (15): 571–4. German.
6. Горожанцев Ю. Н. Опыт применения непрерывного холтеровского мониторинга ЭКГ длительностью до 7 суток. *Функцион. диагност.* 2010; (4): 18–24.
7. Шубик Ю. В., Медведев М. М., Апарина И. В., Гордеева М. В. Различные способы регистрации электрокардиосигнала в диагностике симптомных аритмий. *Вестн. аритмол.* 2011; 64: 71–80.
8. Тихоненко В. М., Попов С. В., Цуринова Е. А., Трешкур Т. В. Многосуточное мониторирование ЭКГ с телеметрией — новый метод диагностики редко возникающих симптомных аритмий и синкопальных состояний. *Вестн. аритмол.* 2013; 73: 58–63.
9. Попов С. В., Цуринова Е. А., Тихоненко В. М. Применение

- многосуточного мониторирования электрокардиограммы в ведении беременной с желудочковыми аритмиями. *Вестн. аритмол.* 2015; 81: 60–5.
10. Цуринова Е. А., Попов С. В., Бернгардт Э. Р., Ананьева Н. И., Тихоненко В. М., Трешкур Т. В. Подбор антиаритмической терапии с помощью нового метода многосуточного телемониторирования электрокардиограммы. *Вестн. аритмол.* 2014; 75: 29–34.
11. Шубик Ю. В., Апарина И. В., Лондоно О. Многосуточное мониторирование ЭКГ при подборе антиаритмической терапии у больных с ИБС и желудочковой экстрасистолией. В сборнике: Научно-практическая конференция «Новые медицинские технологии в кардиологии», посвященная памяти академика РАМН В. А. Алмазова: тез. докл.; 30 мая–1 июня 2001 г.; Санкт-Петербург: СПб., 2001. С. 4–5.
12. MIT-BIH Arrhythmia Database [Internet]. National Institute of General Medical Sciences, National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering. [cited 2016 February 4] Available from: <http://physionet.org/physiobank/database/mitdb/>. doi: 10.13026/C2F305.
13. Moody GB, Mark RG. The impact of the MIT-BIH arrhythmia database. *IEEE Eng Med Biol Mag.* 2001; 20 (3): 45–50. PMID: 11446209.
14. Goldberger AL, Amaral LA, Glass L, Hausdorff JM, Ivanov PC, Mark RG, et al. PhysioBank, PhysioToolkit, and PhysioNet: components of a new research resource for complex physiologic signals. *Circulation.* 2000; 101 (23): e215–20.
15. Schluter PS, Mark RG, Moody GB, Olson WH, Peterson SK. Performance measures for arrhythmia detectors. In: *Computers in cardiology.* Los Alamitos: IEEE Computer Society Press; 1980. p. 267–270.
16. База данных РОХМИНЭ [Интернет]. М.: Российское общество холтеровского мониторирования и неинвазивной электрофизиологии. с2015 – [дата обращения: 4 февраля 2016 г.]. Доступно по ссылке: <http://www.rohmine.org/baza-dannykh-rokhmine/>.

References

1. Senatore G, Stabile G, Bertaglia E, Donnici G, De Simone A, Zoppo F, et al. Role of transtelephonic electrocardiographic monitoring in detecting short-term arrhythmia recurrences after radiofrequency ablation in patients with atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol.* 2005; 45 (6): 873–6.
2. Dages N, Kottkamp H, Piorkowski C, Weis S, Arya A, Sommer P, et al. Influence of the duration of Holter monitoring on the detection of arrhythmia recurrences after catheter ablation of atrial fibrillation: implications for patient follow-up. *Int J Cardiol.* 2010; 139 (3): 305–6.
3. Hanke T, Charitos EI, Stierle U, Karluss A, Kraatz E, Graf B, et al. Twenty-four-hour Holter monitor follow-up does not provide accurate heart rhythm status after surgical atrial fibrillation ablation therapy: up to 5 months experience with a novel permanently

- implantable heart rhythm monitor device. *Circulation.* 2009; 120 (11 Suppl): S177–84.
4. Jabaudon D, Sztajzel J, Sievert K, Landis T, Sztajzel R. Usefulness of ambulatory 7-day ECG monitoring for the detection of atrial fibrillation and flutter after acute stroke and transient ischemic attack. *Stroke.* 2004; 35 (7): 1647–51.
5. Andresen D, von Leitner ER, Wegscheider K, Schröder R. [Demonstration of complex ventricular tachy-arrhythmias by long-term ECG monitoring: relationship to duration of monitoring]. *Dtsch Med Wochenschr.* 1982; 107 (15): 571–4. German.
6. Gorozhantsev YN. Opyt primeneniya nepreryvnogo kholterovskogo monitorirovaniya EKG dlitel'nost'yu do 7 sutok. *Funktsion. diagnost.* 2010; (4): 18–24. Russian.

7. Shubik YV, Medvedev MM, Aparina IV, Gordeeva MV. Razlichnye sposoby registratsii elektrokardiosignala v diagnostike simptomnykh aritmiy. *Vestn. aritmol.* 2011; 64: 71–80. Russian.
8. Tikhonenko VM, Popov SV, Tsurinova EA, Treshkur TV. Mnogosutochnoe monitorirovanie EKG s telemetriy — novyy metod diagnostiki redko voznikayushchikh simptomnykh aritmiy i sinkopal'nykh sostoyaniy. *Vestn. aritmol.* 2013; 73: 58–63. Russian.
9. Popov SV, Tsurinova EA, Tikhonenko VM. Primenenie mnogosutochnogo monitorirovaniya elektrokardiogrammy v vedenii beremennoy s zheludochkovymi aritmiyami. *Vestn. aritmol.* 2015; 81: 60–5. Russian.
10. Tsurinova EA, Popov SV, Bergardt ER, Anan'eva NI, Tikhonenko VM, Treshkur TV. Podbor antiaritmicheskoy terapii s pomoshch'yu novogo metoda mnogosutochnogo telemonitorirovaniya elektrokardiogrammy. *Vestn. aritmol.* 2014; 75: 29–34. Russian.
11. Shubik YV, Aparina IV, Londono O. Mnogosutochnoe monitorirovanie EKG pri podbore antiaritmicheskoy terapii u bol'nykh s IBS i zheludochkovoy ekstrasistoliey. In: Nauchno-prakticheskaya konferentsiya «Novye meditsinskie tekhnologii v kardiologii», posvyashchennaya pamyati akademika RAMN V. A. Almazova: tez. dokl.; 2001 May 30 — Jun 1; St. Peterburg; SPb., 2001. p. 4–5. Russian.
12. MIT-BIH Arrhythmia Database [Internet]. National Institute of General Medical Sciences, National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering. [cited 2016 February 4] Available from: <http://physionet.org/physiobank/database/mitdb/>. doi: 10.13026/C2F305.
13. Moody GB, Mark RG. The impact of the MIT-BIH arrhythmia database. *IEEE Eng Med Biol Mag.* 2001; 20 (3): 45–50. PMID: 11446209.
14. Goldberger AL, Amaral LA, Glass L, Hausdorff JM, Ivanov PC, Mark RG, et al. PhysioBank, PhysioToolkit, and PhysioNet: components of a new research resource for complex physiologic signals. *Circulation.* 2000; 101 (23): e215–20.
15. Schluter PS, Mark RG, Moody GB, Olson WH, Peterson SK. Performance measures for arrhythmia detectors. In: *Computers in cardiology.* Los Alamitos: IEEE Computer Society Press; 1980. p. 267–270.
16. Database ROKhMINE [Internet]. Moscow: Russian society of Holter monitoring and non-invasive electrophysiology. c2015 – [cited 2016 February 4]. Available from: <http://www.rokhmine.org/baza-dannykh-rokhmine/>

БИОМЕТРИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ, ОСНОВАННАЯ НА ЭКГ: НЕКОТОРЫЕ СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ

А. А. Астапов¹, Д. В. Давыдов², А. И. Егоров¹, Д. В. Дроздов², Е. М. Глуховский¹

¹ Лаборатория медицинского приборостроения,

Московский физико-технический институт (государственный университет), Московская область, Долгопрудный

² ООО «Альтомедика», Москва

Уникальность электрической активности сердца каждого человека побуждает использовать электрокардиограмму в качестве биометрического параметра в различных системах безопасности и аутентификации в связи с легкостью и дешевизной извлечения сигнала, а также сложностью его подделки и недобровольного извлечения. На данный момент применяют различные подходы к исследованию возможности идентификации человека по ЭКГ. Режим идентификации включает в себя следующие стадии: сбор данных, обработка, извлечение характерных признаков, классификация. На каждом из этих этапов группы исследователей используют различные математические алгоритмы: метод главных компонент, вейвлеты, нейронные сети и т. п. В статье рассмотрены наиболее значимые исследования в области идентификации человека по ЭКГ. Проведено сравнение результатов и точности концептуальных подходов.

Ключевые слова: ЭКГ, идентификация, классификация, биометрия

✉ **Для корреспонденции:** Артём Александрович Астапов
МФТИ, НОЦ (Биофармкорпус), лаборатория медицинского приборостроения;
141700, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский пер., д. 9, стр. 7; artem.astapov@phystech.edu

Статья поступила: 07.12.2015 **Статья принята к печати:** 31.12.2015

ECG-BASED BIOMETRIC IDENTIFICATION: SOME MODERN APPROACHES

Astapov AA¹, Davydov DV², Egorov AI¹, Drozdov DV², Glukhovskij EM¹

¹ Laboratory of Medical Instrumentation Engineering,

Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny, Moscow oblast, Russia

² ООО Altomedika, Moscow, Russia

The uniqueness of electrical activity of every human heart prompts us to use the ECG as a biometric parameter in various security and authentication systems as it is easy and cheap to extract the signal and difficult to fake it or obtain nonconsensually. At the moment various approaches to researching a possibility of human identification by ECG are used. Identification mode includes the following stages: data collection, procession, feature extraction, classification. Researchers use different mathematical algorithms at every stage: principal component analysis, wavelets, neural networks, etc. This article reviews the most significant studies of ECG based human identification and compares their results and accuracy of conceptual approaches.

Keywords: ECG, identification, classification, biometrics

✉ **Correspondence should be addressed:** Artem Astapov
Moscow Institute of Physics and Technology, REC (Biopharmaceutical Campus), Laboratory of Medical Instrumentation Engineering;
Institutskiy per. 9, str. 7, Dolgoprudny, Moscow oblast, Russia, 141700, artem.astapov@phystech.edu

Received: 07.12.2015 **Accepted:** 31.12.2015

В современную эпоху технологической оснащенности проблема безопасности имеет особенное значение. Рост различных областей индустрии, сетевой интеграции, бурное развитие информационных технологий заставляют искать новые, в том числе направленные на личность человека способы охраны информации.

Различным приложениям часто необходимо идентифицировать человека — отождествить неизвестную личность с известной из базы данных, сравнить «один ко многим», а также верифицировать человека, т. е. проверить, является ли этот человек тем, за кого себя выдает, сравнить «один к одному» с определенным образцом. Такие задачи встречаются повсеместно, начиная от компьютерных систем и оканчивая системами предоставления различного уровня допуска на закрытых или корпоративных объектах.

Отдельный интерес представляют бытовые задачи идентификации членов семьи. Традиционные парольные и идентификационные системы имеют ряд недостатков. Пароль можно забыть, выведать, такие системы легко взломать. Идентификационный «ключ» нужно всегда носить с собой. Подобное неудобство использования в совокупности с высокими шансами для злоумышленника завладеть паролем или физическим идентификатором и, кроме того, невозможность идентифицировать человека без определенных физических носителей заставляют искать новые подходы к данной проблематике.

Биометрия (с греч. «измерение жизни») предполагает систему распознавания человека по одной или нескольким физиологическим или поведенческим чертам [1]. Биометрическими характеристиками могут выступать различные

черты, которые в той или иной степени удовлетворяют следующим параметрам: универсальность, уникальность, постоянство, измеряемость, производительность, приемлемость, устранение (простота использования замены) [2].

В настоящее время используют такие биометрические характеристики, как отпечаток пальца, лицо, радужная оболочка, геометрия ладони, голос, ДНК, термограмма лица, подпись, походка, форма губ и т. д. [3–12]. Преимущества и недостатки данных характеристик связаны с параметрами, перечисленными выше [13]. Так, например, при идентификации или верификации по ДНК почти невозможно совершить ошибку, а образцы можно использовать и в криминалистике, однако этот метод требует специального лабораторного оборудования. Аналогично с отпечатками пальцев: несмотря на то, что прибор для регистрации может быть достаточно миниатюрным в отличие от используемого при определении по ДНК, отпечатки со временем или под действием других факторов могут измениться. Таким образом, применение различных биометрических идентификаторов определяется в первую очередь целями, а также ограничениями и ресурсами в рамках конкретной задачи.

В последнее время ученые сосредоточены на разработке нового вида биометрического распознавания, а именно на такой физиологической характеристике человека, как электрическая активность сердца. В частности, электрокардиограмма (ЭКГ) становится подходящим методом для приложений, требующих защиты средней степени, в связи с простотой получения сигнала и его дешевизной, а также сложностью подделки и недобровольного извлечения. Индивидуальность ЭКГ складывается под влиянием различных физиологических факторов, таких как анатомия сердца, вес, пол, размер грудной клетки, возраст, состояние здоровья и других. Со временем или под действием болезней сердца его электрическая активность меняется, и в качестве долгосрочного биометрического параметра использовать ЭКГ не представляется разумным. Так, например, канадская компания Bioput анонсировала разработку электронного браслета Numi, который будет снимать электрокардиограмму с пользователя каждый день, верифицировать его и допускать до определенных объектов инфраструктуры (мобильный телефон, компьютер, номер в отеле, машина и т. п.). В целях идентификации наиболее вероятно применение ЭКГ при работе с различными базами данных — развитие телемедицинских технологий позволяет накапливать огромные массивы информации, в том числе данных ЭКГ пациентов. В случаях, когда операторы или врачи некорректно заполняют данные о пациенте (неточно указывают фамилию, год рождения и т. д.), идентификация подобных записей позволила бы лучше следить за динамикой болезни пациентов.

Еще одна возможная сфера применения находится на пересечении небольшого и постоянного числа пользователей определенных приборов для снятия ЭКГ: например, в различных медицинских учреждениях для удобства пациентам достаточно будет просто снять ЭКГ, а идентификационная система сама решит, кто именно сделал запись. Идентификация также способна облегчить пользование приборами для снятия ЭКГ дома: на рынок уже вышли гаджеты в виде чехла к телефону, способные снимать электрическую активность сердца пациента и отправлять ее врачу по сети Интернет.

Ниже будут рассмотрены основные принципы построения биометрических идентификационных систем, различные подходы к идентификации человека по ЭКГ. Описано

разнообразие математических аппаратов. Представлены результаты основных работ.

Формирование сигнала ЭКГ

Электрокардиограмма — кривая изменения во времени суммарного электрического потенциала, возникающего в сердечной мышце за счет движения ионов через мышечную мембрану [3]. В практической медицине метод ЭКГ относят к одному из самых распространенных, что объясняется не только количеством сердечно-сосудистых заболеваний, но и высокой степенью информативности и верного диагностирования заболевания.

В кардиологической практике ЭКГ чаще всего измеряется в нескольких отведениях, которые несут информацию о разности потенциалов между двумя определенными точками электрического поля сердца с установленными в них электродами. Каждое из отведений преимущественно отражает состояние участков сердечной мышцы определенной локализации.

Основные принципы построения систем идентификации человека по ЭКГ

Процессу идентификации присущи следующие стадии:

- сбор исходных данных;
- предобработка сигнала (фильтрация и т. д.);
- извлечение характерных признаков, их обработка и создание шаблона;
- сравнение поступающего шаблона с базой данных сформированных шаблонов.

После этого принимают решение об идентификации, используя разнообразные алгоритмы классификации.

Однако самая трудная проблема при идентификации — это выделение признаков, которые действительно характеризуют объект. Именно здесь исследователи используют различные подходы. Основной метод состоит в том, что множество таких признаков (дескрипторов) формирует вектор, который можно сравнивать с другими, используя различные математические методы.

Существуют подходы, основанные на выделении таких параметров, как амплитуды, углы, вертикальные и горизонтальные составляющие сегментов ЭКГ-сигнала [15, 16].

Другой подход связан с выделением аналитических признаков, в качестве которых выступают коэффициенты разложения сигнала в различных базисах: Фурье [17], вейвлеты, коэффициенты линейного предсказания [18] и т. д.

На самом этапе идентификации применяют стандартные методы классификации. Самый простой из них — метод «к ближайшему центру». Он помечает новый входной вектор признаков меткой того класса, который дает минимальное расстояние до центра этого класса. Другой распространенный метод — «К-ближайших соседей» — основан на принципе присвоения объекта самому распространенному классу среди соседей данного элемента. Для распознавания также часто используют метод опорных векторов и нейронные сети [19].

Сравнение и результаты

Одной из первых научных работ, показавшей возможность использования ЭКГ в целях идентификации, стала статья

коллектива авторов под руководством L. Biel [15]. В ходе экспериментов на 20 здоровых испытуемых было продемонстрировано, что для качественной идентификации при снятии ЭКГ достаточно использовать одно отведение из стандартных двенадцати.

В качестве основы для анализа ЭКГ-сигнала взяли 30 параметров, характеризующих форму сигнала, которые обычно используют для диагностики заболеваний. Было проанализировано, насколько каждый из них коррелирует друг с другом, что позволило сократить число параметров и выбрать наиболее индивидуальные. Самой успешной признали комбинацию, где каждого индивидуума характеризовал (классифицировал) набор (вектор) из восьми показателей (переменных) (рис. 1). Для учета вариативности изменения параметров у каждого человека наборы этих показателей брали в различное время.

Для идентификации использовали так называемый метод формального независимого моделирования аналогий классов SIMCA (Soft Independent Modeling of Class Analogy), широко используемый, например, в хемометрике для классификации спектроскопических данных, а также позволяющий работать с большим числом параметров [20]. Задачи и алгоритмы классификации часто перекликаются с задачами идентификации, если представить требуемый для идентификации объект некоторым классом.

Первым шагом в SIMCA служит еще более распространенный метод главных компонент PCA (Principal Component Analysis), который, по сути, является математическим способом понижения размерности или сжатия данных [21]. В результате перехода от большого количества переменных к новому представлению со значительно меньшей размерностью часто удается упростить данные на порядки, например от 1000 переменных перейти всего к двум. При этом не происходит потери данных, все переменные учитываются. В то же время несущественная для анализа часть данных определяется и отделяется как шум. Найденные главные компоненты дают представление о скрытых переменных, управляющих устройством данных. Таким образом, пространство из показателей ЭКГ, характеризующее каждого человека, проецируется на направление главных компонент, в данной работе — на плоскость, каждая точка которой соотносится с определенным индивидуумом или, используя математический язык, классом. В этом пространстве уже можно проводить классификацию.

По методу SIMCA после построения PCA-декомпозиции вычисляют расстояния между классами, а также расстояния от каждого класса до нового объекта. В качестве таких метрик используют две величины. Расстояние

от объекта до класса рассчитывают как среднеквадратичное значение остатков, возникающих при проецировании объекта на класс. Вторая величина определяет расстояние от объекта до центра класса и вычисляется как размах (квадрат расстояния Махаланобиса). В этом пространстве задают классификационное правило, и появляется возможность для идентификации.

Результаты идентификации человека по ЭКГ в ходе работы L. Biel зависели от числа параметров ЭКГ, которые брали для исследования. В среднем ученые достигали 49 верных идентификаций из 50.

Следующей работой стало исследование S. A. Israel совместно с коллегами [16]. Было установлено, что психологическое состояние испытуемых не влияло на результат идентификации. Примечательно, что в качестве метода редуцирования пространства исследуемых параметров авторы использовали алгоритм линейного дискриминантного анализа LDA (Linear Discriminant Analysis). Работу алгоритма LDA в сравнении с алгоритмом метода главных компонент, а также в их комбинации, исследовал Y. Wang с коллегами [22].

В своей работе Y. Wang также использовал координатные параметры ЭКГ (амплитуды, углы, расстояния) в качестве основы для классификации, однако отличительной особенностью было выравнивание каждого комплекса по R-пику (рис. 2).

Метод LDA — один из старейших статистических методов [23], который применяют для нахождения линейных комбинаций признаков, наилучшим образом разделяющих два объекта или более. Как и PCA, его часто используют в качестве классификатора или сокращения размерности. Изначально Y. Wang исследовал, какой из методов наиболее эффективен в качестве алгоритма, понижающего число характеристик ЭКГ-сигнала в разрезе двух простейших классификаторов: метод «K-ближайших соседей» (класс классифицируемого объекта — это класс, наиболее часто встречающийся среди K-ближайших соседей) и метод «к ближайшему центру» (чем ближе классифицируемый объект расположен к «центру тяжести» группы объектов известного класса, тем вероятнее он принадлежит данному классу). Было показано, что наилучший результат дает использование алгоритма главных компонент при классификации методом «K-ближайших соседей». При совместном иерархическом применении алгоритмов LDA и PCA Y. Wang достиг 98,9 % точности распознавания. В экспериментах участвовали 13 испытуемых, идентификацию проводили несколько раз в разное время и в различных условиях.

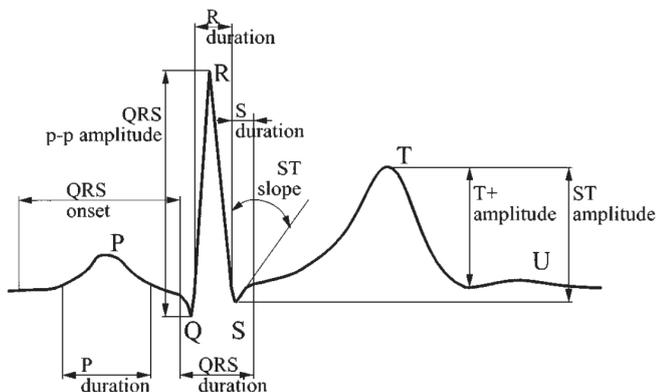


Рис. 1. Комбинация параметров ЭКГ [15]

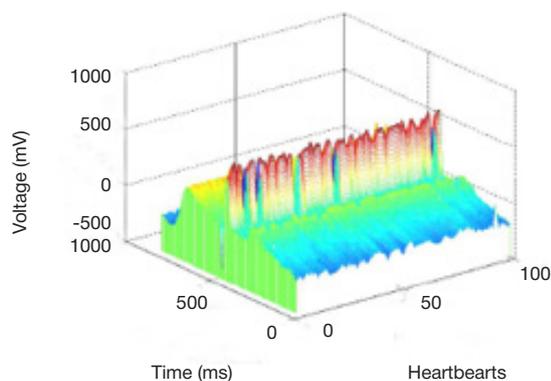


Рис. 2. Сигнал, выравненный по R-пику [22]

Отдельный интерес представляют методы, основанные на выделении аналитических признаков, а также классификация посредством нейронных сетей. Такое исследование было проведено в 2010 г. группой ученых под руководством J. L. Ch. Loong [18]. У 15 испытуемых регистрировали ЭКГ в одном грудном отведении. Алгоритмами для аналитического представления сигналов ЭКГ и дальнейшего сравнения их работы между собой выступали два базиса: вейвлеты и коэффициенты линейного предсказания.

В основании алгоритма декомпозиции вейвлет-пакетов WPD (Wavelet Packet Decomposition) лежит термин «вейвлет», который ввели А. Гроссман и Ж. Морле в середине 80-х гг. прошлого века в связи с анализом свойств сейсмических и акустических сигналов [24]. Алгоритмы, основанные на вейвлет-преобразованиях (wavelet transform), также используют для анализа электрокардиограмм. Вейвлет-преобразование является инструментом, разбивающим данные на составляющие с разными частотами. Каждую из частот затем изучают с необходимым разрешением. Таким образом, вейвлет-преобразование — это инструмент для частотно-временной локализации особенностей сигнала. К достоинствам метода WPD относят высокую скорость декомпозиции, универсальность и возможность менять уровень декомпозиции. Однако метод не поддается автоматизации: для нахождения наилучшей декомпозиции необходимо вручную рассматривать несколько уровней WPD. Другой недостаток связан с основой вейвлет-анализа — необходимостью выбора базисного вейвлета в зависимости от характера исходного временного ряда.

J. L. Ch. Loong и соавт., используя метод WPD, подвергли сигнал 5-кратной обработке вейвлетами Добеши 4-го порядка, получив в общей сложности 50 параметров, которые использовали в качестве набора признаков для идентификации.

Алгоритм кодирования с линейным предсказанием LPC (Linear Predictive Coding) обычно применяют при моделировании различных параметров человеческой речи, которые передаются вместо отсчетов или их разности, требующих значительно большей пропускной способности

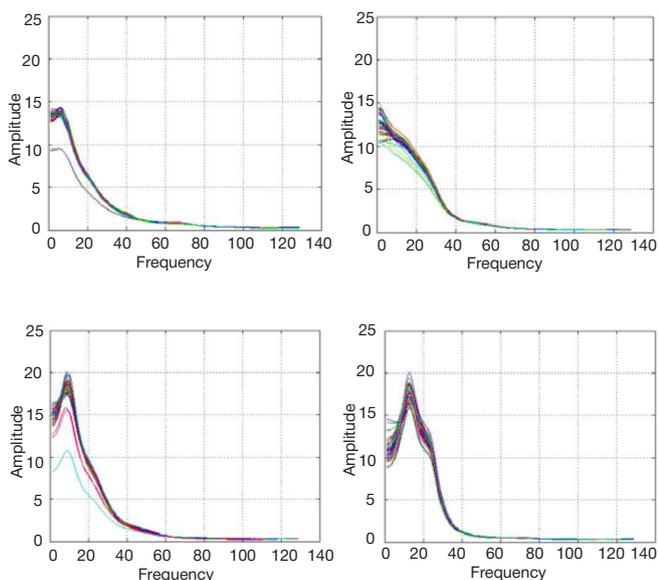


Рис. 3. LPC-спектры различных испытуемых [18]

канала [14]. Алгоритмы LPC исторически используют для изучения работы сигнала речевого тракта, т. е. анализа, распознавания и обработки человеческой речи. Коэффициенты LPC позволяют непосредственно предсказать значения параметров сигнала как линейную функцию предыдущих сегментов. В целях идентификации по ЭКГ к сигналу применяли алгоритмы LPC и в качестве точек для дальнейшего исследования брали первые 40 параметров спектра LPC. Различия такого спектра, взятого по электрокардиограмме, для 4 человек представлены на рис. 3. В качестве классификатора использовали искусственную нейронную сеть (ИНС) с помощью метода обратного распространения ошибки. Идея ИНС возникла как попытка описать процессы восприятия информации, происходящие в мозге человека. Как и мозг человека, ИНС состоит из множества соединенных друг с другом элементов — нейронов, которые имитируют нейроны головного мозга. На рис. 4 представлена базовая структура такой сети.

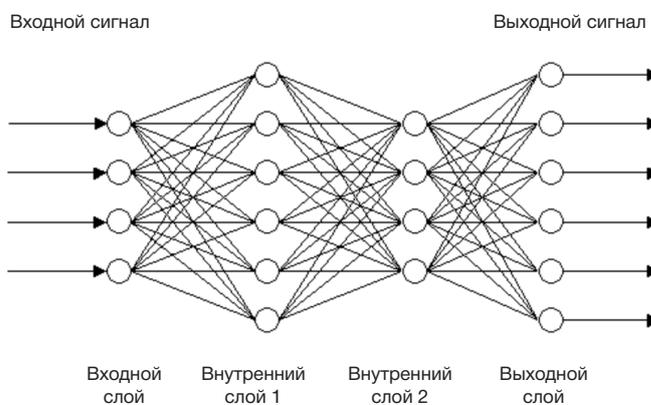


Рис. 4. Структура нейронной сети

Каждый нейрон в нейронной сети осуществляет преобразование входных сигналов в выходной и связан с другими нейронами. Входные нейроны формируют так называемый интерфейс нейронной сети. Информация вводится в нейронную сеть через входной слой, принимающий сигналы. Все слои нейронной сети обрабатывают сигналы до тех пор, пока они не достигнут выходного слоя, генерирующего выходные сигналы.

Задача ИНС — преобразование информации требуемым образом. Для этого сеть предварительно обучается. При обучении используют идеальные (эталонные) значения пар «входы-выходы» или «учителя», который оценивает поведение нейронной сети. Для обучения используют так называемый обучающий алгоритм. Ненастроенная нейронная сеть не способна отображать желаемого поведения. Обучающий алгоритм модифицирует отдельные нейроны сети и веса ее связей таким образом, чтобы поведение сети соответствовало желаемому поведению. Основная идея метода, применявшегося в исследовании, состоит в распространении сигналов ошибки от выходов сети к ее входам в направлении, обратном прямому распространению сигналов в обычном режиме работы.

При сравнении работы двух вышеописанных подходов алгоритм кодирования с линейным предсказанием показал лучшие результаты против метода вейвлет-декомпозиции со значениями точности распознавания 99,5 и 91,5 % соответственно [18].

Обобщение результатов рассмотренных в обзоре исследований идентификации человека по ЭКГ

Исследование	Число испытуемых	Признаки, характеризующие ЭКГ-сигнал, тип (число)	Алгоритм обработки данных	Классификатор	Результат, %
L. Biel, et al. ECG Analysis: A New Approach in Human Identification [15]	20	параметры формы сигнала (8)	РСА (метод главных компонент)	SIMCA (формальное независимое моделирование аналогий классов)	98,00 (49 успешных идентификаций из 50)
Y. Wang, et al. Integrating Analytic and Appearance Attributes for Human Identification from ECG Signal [22]	13	параметры формы сигнала (15)	РСА (метод главных компонент)	К-NN (метод «К-ближайших соседей»)	95,55
			LDA (метод линейного дискриминантного анализа)	К-NN (метод «К-ближайших соседей»)	93,01
			Иерархический алгоритм LDA/РСА	К-NN (метод «К-ближайших соседей»)	98,90
J. L. Ch. Loong, et al. A New Approach to ECG Biometric Systems: A Comparative Study between LPC and WPD Systems [18]	15	аналитические признаки (50)	WPD (вейвлетная пакетная декомпозиция)	нейронная сеть	91,52
		аналитические признаки (40)	LPC (кодирование с линейным предсказанием)	нейронная сеть	99,52

ВЫВОДЫ

Возможности идентификации человека по ЭКГ пока недостаточно изучены, однако в настоящее время исследования в данной области продолжают активно проводиться. Возрастающее число подобных экспериментов по всему миру позволяет считать такой биометрический параметр,

как электрическая активность сердца, перспективным для исследования. В различных подходах в основном широко изучается область выделения индивидуальных характеристик ЭКГ; единые стандарты и наиболее эффективные методы еще предстоит разработать. Однако имеющиеся исследования демонстрируют весьма обнадеживающие результаты для продолжения работы в рассматриваемой области.

Литература

- Jain AK, Ross A, Prabhakar S. An introduction to biometric systems. IEEE Trans Circuits Syst Video Technol. 2004; 14: 4–20.
- Jain AK, Hong L, Pankanti S. Biometric identification. Commun ACM. 2000; 43 (2): 91–8.
- Heckle RR, Patrick AS, Ozok A. Perception and acceptance of fingerprint biometric technology. Proceedings of the 3rd Symposium on Usable Privacy and Security; 2007 Jul 18–20; Pittsburgh, USA. Ontario: NRC Publications Archive, National Research Council of Canada; 2007. p. 153–4.
- Hong L, Jain AK. Integrating faces and fingerprints for personal identification. IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell. 1998; 20: 1295–307.
- Daugman J. Recognizing persons by their Iris patterns. In: Jain AK, Bolle R, Pankanti S, editors. Biometrics: Personal Identification in a Networked Society. New York: Springer Science & Business Media; 1999. p. 103–21.
- Lu G, Zhang D, Wang K. Palmprint recognition using eigenpalms features. Pattern Recognit Lett. 2003; 24: 1463–7.
- den Os E, Jongbloed H, Stijsiger A, Boves L. Speaker verification as a user-friendly access for the visually impaired. Proceedings of the 6th European Conference on Speech Communication and Technology, EUROSPEECH; 1999 Sep 5–9; Budapest, Hungary [Internet]. DBLP: computer science bibliography [cited 2016 Jan 18]. Available from: <http://dblp.uni-trier.de/db/conf/interspeech/eurospeech1999.html#OsJSB99>.
- Hashiyada M. Development of biometric DNA ink for authentication security. Tohoku J Exp Med. 2004 Oct; 204 (2): 109–17.
- Prokoski FK. Disguise detection and identification using infrared imagery. Proceedings of SPIE 0339, Optics and Images in Law Enforcement II, 27 (June 23, 1983). p. 27–31. doi: 10.1117/12.933650.
- Nalwa VS. Automatic on-line signature verification. Proc IEEE. 1997 Feb; 85 (2): 215–39. doi: 10.1109/5.554220.
- Lee L, Grimson WEL. Gait Analysis for Recognition and Classification. Proceedings of the 5th IEEE International Conference on Automatic Face and Gesture Recognition; 2002 May 20–21; Washington, USA. p. 148–55. doi: 10.1109/AFGR.2002.1004148.
- Choras M. The lip as a biometric. Pattern Anal Appl. 2009; 13 (1): 105–12.
- Saini R, Rana N. Comparison of various biometric methods. Int J Adv Sci Technol (IJAST). 2014; 2 (1): 24–30.
- Мурашко В. В., Струтынский А. В. Электрокардиография. Москва: МЕДпресс-информ; 1998. 313 с.
- Biel L, Pettersson O, Philipson L, Wide P. ECG analysis: a new approach in human identification. IEEE Trans Instrum Meas. 2001; 50 (3): 808–12.
- Israel SA, Irvine JM, Cheng A, Wiederhold MD, Wiederhold BK. ECG to identify individuals. Pattern Recognit. 2005; 38 (1): 133–42.
- Saechia S, Koseeyaporn J, Wardkein P. Human identification system based ECG signal. Proceedings of the Tencon 2005 — 2005 IEEE Region 10; 2005 Nov 21–24; Melbourne, Australia. p. 1–4. doi: 10.1109/TENCON.2005.300986.
- Loong JLCh, Subari KhS, Besar R, Abdullah MK. A New Approach to ECG Biometric Systems: A Comparative Study between LPC and WPD Systems. World Acad Sci Eng Technol. 2010; 44: 769–74.
- Сегаран Т. Программируем коллективный разум. СПб: Символ-Плюс; 2008. 368 с.
- Flaten GR, Grung B, Kvalheim OM. A method for validation of reference sets in SIMCA modelling. Chemometr Intell Lab Syst. 2004; 72: 101–9.
- Wold S, Esbensen K, Geladi P. Principal component analysis Chemometr Intell Lab Syst. 1987; 2: 37–52.
- Wang Y, Plataniotis KN, Hatzinakos D. Integrating analytic and appearance attributes for human identification from ECG signal. Proceedings of Biometrics Symposiums; 2006 Aug 21 — Sept 19; Baltimore, USA. p. 1–6. doi: 10.1109/BCC.2006.4341627.

23. Fisher RA. The Use of Multiple Measurements in Taxonomic Problems. *Ann Eugen.* 1936; 7: 179–88.
24. Meyer Y. *Wavelets and Operators*. Cambridge Studies in Advanced Mathematics (No. 37). New York: Cambridge University

- Press; 1993. doi: <http://dx.doi.org/10.1017/CBO9780511623820>.
25. Li D, O'Shaughnessy D. *Speech processing: a dynamic and optimization-oriented approach*. New York: Marcel Dekker Inc.; 2003. p. 41–8.

References

1. Jain AK, Ross A, Prabhakar S. An introduction to biometric systems. *IEEE Trans Circuits Syst Video Technol.* 2004; 14: 4–20.
2. Jain AK, Hong L, Pankanti S. Biometric identification. *Commun ACM.* 2000; 43 (2): 91–8.
3. Heckle RR, Patrick AS, Ozok A. Perception and acceptance of fingerprint biometric technology. *Proceedings of the 3rd Symposium on Usable Privacy and Security*; 2007 Jul 18–20; Pittsburgh, USA. Ontario: NRC Publications Archive, National Research Council of Canada; 2007. p. 153–4.
4. Hong L, Jain AK. Integrating faces and fingerprints for personal identification. *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell.* 1998; 20: 1295–307.
5. Daugman J. Recognizing persons by their Iris patterns. In: Jain AK, Bolle R, Pankanti S, editors. *Biometrics: Personal Identification in a Networked Society*. New York: Springer Science & Business Media; 1999. p. 103–21.
6. Lu G, Zhang D, Wang K. Palmprint recognition using eigenpalms features. *Pattern Recognit Lett.* 2003; 24: 1463–7.
7. den Os E, Jongebloed H, Stijssiger A, Boves L. Speaker verification as a user-friendly access for the visually impaired. *Proceedings of the 6th European Conference on Speech Communication and Technology, EUROSPEECH*; 1999 Sep 5–9; Budapest, Hungary [Internet]. DBLP: computer science bibliography [cited 2016 Jan 18]. Available from: <http://dblp.uni-trier.de/db/conf/interspeech/eurospeech1999.html#OsJSB99>.
8. Hashiyada M. Development of biometric DNA ink for authentication security. *Tohoku J Exp Med.* 2004 Oct; 204 (2): 109–17.
9. Prokoski FK. Disguise detection and identification using infrared imagery. *Proceedings of SPIE 0339, Optics and Images in Law Enforcement II*, 27 (June 23, 1983). p. 27–31. doi: 10.1117/12.933650.
10. Nalwa VS. Automatic on-line signature verification. *Proc IEEE.* 1997 Feb; 85 (2): 215–39. doi: 10.1109/5.554220.
11. Lee L, Grimson WEL. Gait Analysis for Recognition and Classification. *Proceedings of the 5th IEEE International Conference on Automatic Face and Gesture Recognition*; 2002 May 20–21; Washington, USA. p. 148–55. doi: 10.1109/AFGR.2002.1004148.
12. Choras M. The lip as a biometric. *Pattern Anal Appl.* 2009; 13 (1): 105–12.
13. Saini R, Rana N. Comparison of various biometric methods. *Int J Adv Sci Technol (IJAST).* 2014; 2 (1): 24–30.
14. Murashko VV, Strutyanskiy AV. *Elektrokardiografiya*. Moscow: MEDpress-inform; 1998. 313 p. Russian.
15. Biel L, Pettersson O, Philipson L, Wide P. ECG analysis: a new approach in human identification. *IEEE Trans Instrum Meas.* 2001; 50 (3): 808–12.
16. Israel SA, Irvine JM, Cheng A, Wiederhold MD, Wiederhold BK. ECG to identify individuals. *Pattern Recognit.* 2005; 38 (1): 133–42.
17. Saechia S, Koseeyaporn J, Wardkein P. Human identification system based ECG signal. *Proceedings of the Tencon 2005 — 2005 IEEE Region 10; 2005 Nov 21–24; Melbourne, Australia.* p. 1–4. doi: 10.1109/TENCON.2005.300986.
18. Loong JLCh, Subari KhS, Besar R, Abdullah MK. A New Approach to ECG Biometric Systems: A Comparative Study between LPC and WPD Systems. *World Acad Sci Eng Technol.* 2010; 44: 769–74.
19. Segaran T. *Programmiruem kolektivnyi razum*. St. Petersburg: Simvol-Plyus; 2008. 368 p. Russian.
20. Flaten GR, Grung B, Kvalheim OM. A method for validation of reference sets in SIMCA modelling. *Chemometr Intell Lab Syst.* 2004; 72: 101–9.
21. Wold S, Esbensen K, Geladi P. Principal component analysis. *Chemometr Intell Lab Syst.* 1987; 2: 37–52.
22. Wang Y, Plataniotis KN, Hatzinakos D. Integrating analytic and appearance attributes for human identification from ECG signal. *Proceedings of Biometrics Symposiums*; 2006 Aug 21 — Sept 19; Baltimore, USA. p. 1–6. doi: 10.1109/BCC.2006.4341627.
23. Fisher RA. The Use of Multiple Measurements in Taxonomic Problems. *Ann Eugen.* 1936; 7: 179–88.
24. Meyer Y. *Wavelets and Operators*. Cambridge Studies in Advanced Mathematics (No. 37). New York: Cambridge University Press; 1993. doi: <http://dx.doi.org/10.1017/CBO9780511623820>.
25. Li D, O'Shaughnessy D. *Speech processing: a dynamic and optimization-oriented approach*. New York: Marcel Dekker Inc.; 2003. p. 41–8.

ПОВЕРХНОСТНЫЙ ФЕНОТИП ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ У ДЕТЕЙ С ОСЕВОЙ МИОПИЕЙ СРЕДНЕЙ СТЕПЕНИ ПРИ НАЛИЧИИ И ОТСУТСТВИИ ВТОРИЧНОГО ИММУНОДЕФИЦИТА

Н. В. Хамнагдаева¹✉, Л. Ю. Семенова¹, С. А. Обрубов², Ж. М. Салмаси¹, Г. В. Порядин¹, И. В. Рогожина³, А. Н. Казимирский¹

¹ Кафедра патофизиологии и клинической патофизиологии, лечебный факультет, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

² Кафедра офтальмологии, педиатрический факультет, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

³ Консультативно-диагностическое отделение, Детский медицинский центр Управления делами Президента РФ, Москва

Изучение влияния вторичного иммунодефицита на развитие близорукости у детей — перспективное направление исследований. Нами был изучен поверхностный фенотип лимфоцитов крови у здоровых детей и детей с осевой миопией средней степени при наличии и отсутствии клинических признаков вторичного иммунодефицита. Средний возраст участников исследования составил $16 \pm 0,25$ года. В контрольную группу и в каждую из двух опытных подгрупп включили по 8 детей. Изучали экспрессию антигенов CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD20, CD72, CD38, CD25, CD71, HLA-DR, CD95, mIgM, mIgG, ICAM-1 методом непрямой иммунофлуоресценции. Для детей с близорукостью и вторичным иммунодефицитом выявили лишь одно достоверное ($p < 0,05$) отличие от показателей контрольной группы — сниженную экспрессию антигена CD4. Для детей с близорукостью и без вторичного иммунодефицита отметили достоверное ($p < 0,05$) усиление экспрессии антигена CD20 и снижение экспрессии антигена ICAM-1.

Ключевые слова: близорукость, миопия, осевая миопия средней степени, вторичный иммунодефицит, лимфоциты, поверхностный фенотип лимфоцитов, антигены

✉ Для корреспонденции: Надежда Вениаминовна Хамнагдаева
117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1; lyssa_ash@mail.ru

Статья получена: 03.11.2015 Статья принята к печати: 20.01.2016

SURFACE PHENOTYPE OF BLOOD LYMPHOCYTES IN CHILDREN WITH MEDIUM AXIAL MYOPIA IN THE PRESENCE OR ABSENCE OF SECONDARY IMMUNODEFICIENCY

Khamnagdaeva NV¹✉, Semenova LYu¹, Obrubov SA², Salmasi JM¹, Poryadin GV¹, Rogozhina IV³, Kazimirskii AN¹

¹ Faculty of General Medicine, Department of Pathophysiology and Clinical Pathophysiology, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

² Faculty of Pediatrics, Department of Ophthalmology, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³ Diagnostic and Consultative Unit, Children's Medical Centre of the Administrative Directorate of the President of the Russian Federation, Moscow, Russia

Investigating the role of secondary immunodeficiency in the development of myopia in children is a promising research area. We studied the surface phenotype of blood lymphocytes in healthy children and children with medium axial myopia in the presence or absence of secondary immunodeficiency clinical manifestations. The mean age of study participants was 16 ± 0.25 years. The control group and each of the two experimental subgroups included 8 children. Using indirect immunofluorescence, the expression of CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD20, CD72, CD38, CD25, CD71, HLA-DR, CD95, CD54, mIgM, mIgG, ICAM-1 antigens was studied. For children with myopia and secondary immunodeficiency, only one statistically significant ($p < 0.05$) difference from the control group was detected, namely, a reduced expression of CD4 antigen. For children with myopia and without secondary immunodeficiency, a statistically significant ($p < 0.05$) increase in CD20 antigen expression and a reduced ICAM-1 antigen expression were observed.

Keywords: nearsightedness, myopia, medium axial myopia, secondary immunodeficiency, lymphocytes, lymphocyte surface phenotype, antigens

✉ Correspondence should be addressed: Nadezhda Khamnagdaeva
ul. Ostrovityanova, d. 1, Moscow, Russia, 117997; lyssa_ash@mail.ru

Received: 03.11.2015 Accepted: 20.01.2016

Близорукость является не только самым распространенным видом нарушения рефракции, но и занимает первое место в общей структуре глазной патологии [1]. Распространенность миопии растет: согласно литературным данным, в 2000 году близорукость различной степени была диагностирована у 1,6 млрд человек, а к 2020 году исследователи прогнозируют, что таких людей станет уже 2,5 млрд [2]. Важно, что распространенность патологии растет среди детей [3, 4], и прогрессирование заболевания часто наблюдается в школьном возрасте [5, 6].

Считается, что миопия является полиэтиологическим заболеванием, но до сих пор некоторые причины, вызывающие его, до конца не изучены. Одно из перспективных направлений исследований — изучение влияния иммунных нарушений на развитие близорукости [5–9]. Дети с миопией имеют клинические признаки вторичного иммунодефицита чаще, чем их сверстники с другими видами нарушения клинической рефракции [5, 7–9].

Целью нашего исследования являлось изучение поверхностного фенотипа лимфоцитов крови у детей с эмметропией и осевой миопией средней степени при наличии или отсутствии клинических признаков вторичного иммунодефицита.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование было проведено в 2013–2015 гг. В нем участвовали 24 ребенка в возрасте от 10 до 18 лет (средний возраст — $16 \pm 0,25$ года), учащиеся школ г. Москвы: 16 мальчиков и 8 девочек. В контрольную группу включили 8 детей (16 глаз) с эмметропией, без хронических заболеваний и заболеваемостью ОРЗ менее пяти раз в год, а в опытную — 16 детей (32 глаза). Опытная группа была разделена на две подгруппы. В первую подгруппу (далее — группа I) включили 8 детей с диагнозом осевая миопия средней степени и клиническими признаками вторичной иммунной недостаточности (ВИН). У этих детей была отмечена повышенная заболеваемость ОРЗ (более семи раз в год). Критерием исключения являлось наличие аутоиммунных

заболеваний. Во вторую подгруппу (далее — группа II) включили 8 детей с осевой миопией средней степени, но без клинических признаков ВИН, с заболеваемостью ОРЗ менее пяти раз в год и отсутствием ОРЗ в течение двух месяцев до участия в исследовании. Диагноз верифицировали в консультативно-диагностическом отделении Детского медицинского центра Управления делами Президента РФ, наличие или отсутствие ВИН определяли по данным диспансерного учета.

Все дети проходили стандартное офтальмологическое обследование, включающее визометрию (проектор знаков ОАП-250, Carl Zeiss, Германия), авторефрактометрию (автокераторефрактометр KR-8900, Торсон, Япония), биомикроскопию (щелевая лампа SL 120, Carl Zeiss, Германия), определение запасов относительной аккомодации по методике Э. С. Аветисова [10], офтальмоскопию и эхобиометрию (сканер HiScan, OPTICON, Италия).

Лимфоциты из периферической крови выделяли в одноступенчатом градиенте плотности по методу A. Boyum [11]. Оценку экспрессии антигенов CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD20, CD72, CD38, CD25, CD71, HLA-DR, CD95, mlgM, mlgG, ICAM-1 с использованием моноклональных антител серий ИКО и ЛТ методом непрямой иммунофлюоресценции под микроскопом «Люмам И-3» («ЛОМО», Россия).

Статистическую обработку результатов провели с помощью программного пакета Statistica, достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты исследования представлены в таблице. У детей из группы I (с признаками ВИН) было отмечено снижение экспрессии антигенов CD3, CD4 и CD8 в сравнении с контрольной группой, однако разность была достоверной лишь для лимфоцитов с поверхностным фенотипом CD4⁺ ($p < 0,05$). У детей из группы II (без признаков ВИН), наоборот, количество лимфоцитов, экспрессирующих антигены CD3, CD4, CD8, было выше, чем в контрольной группе, но

Количество лимфоцитов с различным поверхностным фенотипом в периферической крови детей опытных и контрольной групп, % от общего количества лимфоцитов

Поверхностные маркеры	Группа I	Группа II	Контрольная группа
CD3 ⁺	39,97 ± 2,01	58,47 ± 1,96	56,33 ± 3,35
CD4 ⁺	29,81 ± 4,38*	44,73 ± 4,76	38,03 ± 0,87
CD8 ⁺	22,66 ± 2,49	32,02 ± 2,63	26,48 ± 0,98
CD16 ⁺	19,01 ± 3,12	25,74 ± 4,51	23,01 ± 3,07
CD56 ⁺	18,28 ± 4,62	19,88 ± 3,52	18,06 ± 1,65
CD20 ⁺	14,54 ± 2,36	29,21 ± 2,84*	19,87 ± 2,15
CD72 ⁺	15,08 ± 1,63	24,805 ± 4,07	19,23 ± 2,27
CD38 ⁺	16,17 ± 3,16	25,93 ± 5,41	22,89 ± 2,08
CD25 ⁺	17,11 ± 2,13	19,52 ± 2,22	17,92 ± 4,23
CD71 ⁺	18,73 ± 4,14	21,17 ± 2,99	17,8 ± 2,84
HLA-DR ⁺	22,27 ± 2,06	24,63 ± 3,88	21,45 ± 2,20
CD95 ⁺	15,88 ± 2,68	20,97 ± 2,46	15,73 ± 1,87
IgM ⁺	10,69 ± 1,73	27,19 ± 5,79	15,84 ± 1,07
IgG ⁺	16,29 ± 3,67	20,49 ± 3,23	20,49 ± 3,23
ICAM-1 ⁺	6,69 ± 0,70	22,905 ± 6,42*	11,93 ± 1,40

Примечание: * — $p < 0,05$ при сравнении с контрольной группой.

для всех из них разность была недостоверной. Различия в экспрессии антигенов CD16 и CD56, выявленные для обеих групп в сравнении с контролем, статистически также не подтвердились.

Содержание лимфоцитов с поверхностным фенотипом CD20⁺ у детей из группы I составило $14,54 \pm 2,36\%$, что ниже значения аналогичного показателя в группе здоровых детей ($19,87 \pm 2,15\%$), но разность была недостоверной. Было отмечено достоверное усиление экспрессии этого антигена у детей из группы II. Различия, выявленные по лимфоцитам с поверхностными фенотипами CD72, CD38, CD25, CD71, HLA-DR, CD95, mIgM и mIgC, статистически не подтвердились.

Достоверное ($p < 0,05$) снижение уровня экспрессии антигена ICAM-1 наблюдалось в группе II: количество лимфоцитов соответствующего фенотипа составило $6,69 \pm 0,70\%$ по сравнению $11,93 \pm 1,40\%$ в контрольной группе.

Таким образом, у детей с осевой миопией средней степени и клиническими признаками ВИН была отмечена сниженная экспрессия антигена CD4 в сравнении со здоровыми детьми. У детей с тем же диагнозом, но без клинических признаков ВИН — достоверное усиление экспрессии антигена CD20 и снижение экспрессии антигена ICAM-1.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на то, что большая часть выявленных различий статистически недостоверна, нельзя отрицать, что имеется тенденция к снижению показателей иммунитета у детей

с осевой миопией средней степени и клиническими признаками ВИН. Скорее всего, необходимо обследование большего числа пациентов. Однако снижение количества основных субпопуляций Т-лимфоцитов и NK-клеток по сравнению со здоровыми детьми имеется и у часто болеющих детей.

Увеличение экспрессии молекул адгезии у детей с миопией может быть связано с влиянием перекисных соединений на лимфоциты [12, 13]. Известно, что транс-ретинол, который является продуктом изомеризации цис-ретинола в светозависимом процессе зрительного цикла, способствует активации перекисного окисления липидов [14]. Также развитие близорукости связывают с токсическим эффектом перекисных соединений на склеру и увеличением продольных размеров яблока [15].

ВЫВОДЫ

Тенденция к угнетению экспрессии антигенов, характеризующих субпопуляции лимфоцитов при миопии у детей с клиническими признаками ВИН, отражает вовлеченность иммунной системы в патологический процесс и, по-видимому, не связана с близорукостью.

У детей с осевой близорукостью средней степени без клинических признаков ВИН отмечается повышение содержания в крови лимфоцитов, экспрессирующих антигены ICAM-1 на мембране лейкоцитов, что может быть связано с продукцией свободных радикалов, которые генерируются в ходе зрительного акта одним из активных метаболитов витамина А.

Литература

- Pizzarello L, Abiose A, Ffytche T, Duerkesen R, Thulasiraj R, Taylor H, et al. VISION 2020: The Right to Sight: a global initiative to eliminate avoidable blindness. *Arch Ophthalmol*. 2004 Apr; 122 (4): 615–20.
- Kempner JH, Mitchell P, Lee KE, Tielsch JM, Broman AT, Taylor HR, et al. The prevalence of refractive errors among adults in the United States, Western Europe, and Australia. *Arch Ophthalmol*. 2004 Apr; 122 (4): 495–505.
- Нероев В. В. Организация офтальмологической помощи населению Российской Федерации. *Вестн. офтальмол.* 2014; 130 (6): 8–12.
- Волков В. В. О вероятных механизмах миопизации глаза в школьные годы. *Офтальмол. журн.* 1988; (3): 129–132.
- Петров С. А. Клинико-функциональные и иммунопатогенетические механизмы формирования усиления рефракции [диссертация]. М.: Российский государственный медицинский университет, 2009.
- Обрубов С. А., Румянцев А. Г., Демидова М. Ю., Беспалюк Ю. Г., Бограш Г. И., Иванова А. О. и др. Частота близорукости и структура сочетанной с ней экстраокулярной патологии у детей общеобразовательного учреждения. *Рос. педиатр. офтальмол.* 2008; (4): 5–7.
- Сахарова С. В. Клинико-иммунологическая характеристика прогрессирующей близорукости средней и высокой степени при различных состояниях иммунной системы [диссертация]. Тюмень: Тюменская государственная медицинская академия, 2006.
- Рабаданова М. Г. Вопросы патогенеза прогрессирующей миопии, выбор методов лечения. В сборнике: *Труды междуна-*
- родного симпозиума «Близорукость, нарушение рефракции, аккомодации и глазодвигательного аппарата»; 18–20 декабря 2001 г.; М.; 2001. С. 69–70.
- Петров С. А., Суховой Ю. Г. Иммунологические аспекты в патогенезе миопии. В сборнике: *Труды международного симпозиума «Близорукость, нарушение рефракции, аккомодации и глазодвигательного аппарата»; 18–20 декабря 2001 г.; М.; 2001. С. 65–66.*
- Аветисов Э. С. Близорукость. М.: Медицина; 2002. 285 с.
- Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand J Clin Lab Investig.* 1968; 97(21): 1–9.
- Tyagi S, Nicholson-Weller A, Barbashov SF, Tas SW, Klickstein LB. Intercellular adhesion molecule 1 and beta2 integrins in C1q-stimulated superoxide production by human neutrophils: an example of a general regulatory mechanism governing acute inflammation. *Arthritis Rheum.* 2000 Oct; 43 (10): 2248–59.
- Свирчевский И. В. Обоснование и эффективность новых технологий лечения часто болеющих детей с сопутствующей близорукостью и нарушениями аккомодации [диссертация]. М.: Российский государственный медицинский университет, 2011.
- Карпова Н. В. Состояние иммунной и цитокиновой систем у часто болеющих детей и методы коррекции выявленных нарушений [диссертация]. М.: Московский НИИ эпидемиологии и эмбриологии им. Г. Н. Габричевского, 2008.
- Viita H, Sen CK, Roy S, Siljamäki T, Nikkari T, Ylä-Herttua S. High expression of human 15-lipoxygenase induces NF-kappa B-mediated expression of vascular cell adhesion molecule 1, intercellular adhesion molecule 1, and T-cell adhesion on human endothelial cells. *Antioxid Redox Signal.* 1999 Spring; 1 (1): 83–96.

References

- Pizzarello L, Abiose A, Fytche T, Duerkesen R, Thulasiraj R, Taylor H, et al. VISION 2020: The Right to Sight: a global initiative to eliminate avoidable blindness. *Arch Ophthalmol.* 2004 Apr; 122 (4): 615–20.
- Kempen JH, Mitchell P, Lee KE, Tielsch JM, Broman AT, Taylor HR, et al. The prevalence of refractive errors among adults in the United States, Western Europe, and Australia. *Arch Ophthalmol.* 2004 Apr; 122 (4): 495–505.
- Neroev VV. Organizatsiya oftal'mologicheskoy pomoshchi naseleniyu Rossiyskoy Federatsii. *Vestn. oftal'mol.* 2014; 130 (6): 8–12. Russian.
- Volkov VV. O veroyatnykh mekhanizmax miopizatsii glaza v shkol'nye gody. *Oftal'mol. zhurn.* 1988; (3): 129–132. Russian.
- Petrov SA. Kliniko-funktsional'nye i immunopatogeneticheskie mekhanizmy formirovaniya usileniya refraktsii [dissertation]. M.: Rossiyskiy gosudarstvennyy meditsinskiy universitet, 2009. Russian.
- Obrubov SA, Rumyantsev AG, Demidova MYu, Bepalyuk YuG, Bogrash GI, Ivanova AO, et al. Chastota blizorukosti i struktura sochetannoy s ney ekstraokulyarnoy patologii u detey obshche-obrazovatel'nogo uchrezhdeniya. *Ros. pediater. oftal'mol.* 2008; (4): 5–7. Russian.
- Sakharova SV. Kliniko-immunologicheskaya kharakteristika progressiruyushchey blizorukosti sredney i vysokoy stepeni pri razlichnykh sostoyaniyakh immunnoy sistemy [dissertation]. Tyumen': Tyumenskaya gosudarstvennaya meditsinskaya akademiya, 2006. Russian.
- Rabadanova MG. Voprosy patogeneza progressiruyushchey miopii, vybor metodov lecheniya. In: *Trudy mezhdunarodnogo simpoziuma «Blizorukost', narushenie refraktsii, akkomodatsii i glazodvigatel'nogo apparata»*; December 18–20 2001; M.; 2001. p. 69–70. Russian.
- Petrov SA, Sukhovey YuG. Immunologicheskie aspekty vpatogeneze miopii. In: *Trudy mezhdunarodnogo simpoziuma «Blizorukost', narushenie refraktsii, akkomodatsii i glazodvigatel'nogo apparata»*; December 18–20 2001; M.; 2001. p. 65–66. Russian.
- Avetisov ES. *Blizorukost'*. M.: Meditsina; 2002. 285 p. Russian.
- Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand J Clin Lab Investig.* 1968; 97(21): 1–9.
- Tyagi S, Nicholson-Weller A, Barbashov SF, Tas SW, Klickstein LB. Intercellular adhesion molecule 1 and beta2 integrins in C1q-stimulated superoxide production by human neutrophils: an example of a general regulatory mechanism governing acute inflammation. *Arthritis Rheum.* 2000 Oct; 43 (10): 2248–59.
- Svirchevskiy IV. Obosnovanie i effektivnost' novykh tekhnologiy lecheniya chasto boleyushchikh detey s soputstvuyushchey blizorukost'yu i narusheniyami akkomodatsii [dissertation]. M.: Rossiyskiy gosudarstvennyy meditsinskiy universitet, 2011. Russian.
- Karpova NV. Sostoyanie immunnoy i tsitokinovoy sistem u chasto boleyushchikh detey i metody korrektsii vyyavlennykh narusheniy [dissertation]. M.: Moskovskiy NII epidemiologii i embriologii imeni G. N. Gabricheskogo, 2008. Russian.
- Viita H, Sen CK, Roy S, Siljamäki T, Nikkari T, Ylä-Herttuala S. High expression of human 15-lipoxygenase induces NF-kappa B-mediated expression of vascular cell adhesion molecule 1, intercellular adhesion molecule 1, and T-cell adhesion on human endothelial cells. *Antioxid Redox Signal.* 1999 Spring; 1 (1): 83–96.

СОДЕРЖАНИЕ ВИТАМИНОВ В ОРГАНИЗМЕ ГОРОДСКИХ И СЕЛЬСКИХ ШКОЛЬНИКОВ И ОСОБЕННОСТИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ В ИХ СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Н. П. Сетко¹, С. И. Красиков², Е. В. Булычева¹ ✉

¹ Кафедра гигиены и эпидемиологии, Институт профессионального образования, Оренбургский государственный медицинский университет, Оренбург

² Кафедра химии и фармацевтической химии, фармацевтический факультет, Оренбургский государственный медицинский университет, Оренбург

Уровень свободнорадикальных реакций в организме является одним из маркеров стресса. Способность организма противостоять окислительным процессам определяется различными факторами, в том числе витаминной обеспеченностью. Витамины А, Е, С и витамины группы В прямо или косвенно влияют на степень антиоксидантной защиты. Нами была изучена витаминная обеспеченность городских (n = 250) и сельских (n = 200) школьников в возрасте 12–17 лет и уровень свободнорадикальных реакций в их сыворотке крови (методом индуцированной хемилюминесценции). Дефицит витаминов А и Е, обладающих антиоксидантными свойствами, был выявлен у учащихся как городских, так и сельских школ, однако у первых он был выше. Это согласуется с данными хемилюминесцентного анализа: значения всех показателей хемилюминесценции у городских школьников были в 2,2–7,6 раза выше, чем у сельских, что свидетельствует о более высокой интенсивности окислительных процессов в их организме. Также был выявлен недостаток витаминов группы В в организме сельских школьников за исключением рибофлавина в возрастной подгруппе 15–17 лет.

Ключевые слова: витаминная обеспеченность, ретинол, токоферол, аскорбиновая кислота, тиамин, рибофлавин, пиридоксин, антиоксиданты, окислительный стресс, свободнорадикальные реакции, школьники

✉ **Для корреспонденции:** Екатерина Владимировна Булычева
460000, г. Оренбург, ул. Советская, д. 6; e-sosnina@mail.ru

Статья получена: 25.09.2015 Статья принята в печать: 09.12.2015

VITAMIN STATUS OF URBAN AND RURAL SCHOOL CHILDREN AND SPECIFICS OF FREE RADICAL REACTIONS IN THEIR BLOOD SERUM

Setko NP¹, Krasikov SI², Bulycheva EV¹ ✉

¹ Institute of Professional Education, Hygiene and Epidemiology Department,

² Pharmaceutical Faculty, Chemistry and Pharmaceutical Chemistry Department, Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia

The rate of free radical reactions is one of stress markers. The ability of the organism to resist oxidation is determined by various factors, including vitamin supply. Vitamins A, E, C and group B vitamins directly or indirectly affect the degree of antioxidant protection. We have studied vitamin supply in school children aged 12 to 17 in urban (n = 250) and rural areas (n = 200) and the rate of free radical reactions in their blood serum by induced chemiluminescence. Deficiency of vitamins A and E, which have antioxidant properties, was detected in both urban and rural school children; however, the former had a higher deficiency level. This corresponds to the chemiluminescence assay data: all chemiluminescence assay values in urban school children were 2.2–7.6 times higher than in rural school children, which indicates a higher intensity oxidation in their bodies. A deficiency of group B vitamins was also detected in rural school children, riboflavin being an exception in a subgroup of 15 to 17 year old subjects.

Keywords: vitamin supply, retinol, tocopherol, ascorbic acid, thiamine, riboflavin, pyridoxine, antioxidants, oxidative stress, free radical reactions, school children

✉ **Correspondence should be addressed:** Ekaterina Bulycheva
ul. Sovetskaya, d. 6, Orenburg, Russia, 460000; e-sosnina@mail.ru

Received: 25.09.2015 Accepted: 09.12.2015

Изменение параметров гомеостаза, в частности уровня свободнорадикальных реакций в организме, может служить индикатором развития стресса у современных школьников — учащихся как городских, так и сельских образовательных учреждений [1–5]. Известно, что при стрессе происходит активация систем нейрогуморальной регуляции под влиянием «первичного медиатора» [6], роль

которого выполняют свободные радикалы и продукты перекисного окисления липидов [7].

Изменение редокс-баланса запускает комплекс защитно-приспособительных реакций в организме, в которых принимают участие витамины с антиоксидантными свойствами [8]. Витамины А (ретинол), Е (токоферол) и С (аскорбиновая кислота) — классические антиоксиданты [9–12].

В частности, токоферол является универсальным протектором клеточных мембран, занимая в них такое положение, которое препятствует контакту кислорода с ненасыщенными жирными кислотами мембранных липидов и липопероксидации. Благодаря наличию двойных связей в молекуле ретинол способен взаимодействовать с различными активными формами кислорода. Антиоксидантная функция аскорбиновой кислоты обусловлена ее способностью легко отдавать два атома водорода, которые необходимы для обезвреживания свободных радикалов, и в высоких концентрациях этот витамин весьма эффективен [13]. Витамины группы В могут косвенно оказывать влияние на процессы свободнорадикального окисления и работу антиоксидантной системы. Это предположение основано на том, что антиоксидантная система организма включает различные защитные механизмы [14]. К ним относятся и ферменты: супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза и др., — для работы которых важен правильный обмен аминокислот, регулируемый в том числе тиамин (витамин В₁), рибофлавином (витамин В₂) и пиридоксином (витамин В₆).

Цель исследования заключалась в сравнительном анализе витаминной обеспеченности организма городских и сельских школьников и уровней свободнорадикальных реакций в их сыворотке крови.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Были сформированы две опытные группы: в одну включили городских школьников, проживающих в г. Оренбурге (n = 250), в другую — сельских, проживающих в селах, расположенных на территории Оренбургского района (n = 200). В каждой из них выделили возрастные подгруппы: 12–14 лет (n = 150 и n = 100 среди городских и сельских школьников соответственно) и 15–17 лет (n = 100 в обеих группах). В исследование включали учащихся в возрасте 12–17 лет, без хронических заболеваний, не болевших в течение месяца до проведения исследования и проживающих на территории с одинаковой антропогенной нагрузкой (внутри группы). Критериями исключения являлось нежелание школьников или их родителей участвовать в исследовании. Исследование было одобрено этическим комитетом Оренбургского государственного медицинского университета, родители школьников дали письменное согласие на участие детей в эксперименте. Материал для исследования был получен в двух группах одновременно через три месяца после начала занятий в школе.

В качестве биологического материала для исследования использовали венозную кровь и мочу. Кровь отбирали утром натощак в объеме 10 мл в вакуумные пробирки Vacuette (BD, США) без антикоагулянта. Время доставки в лабораторию составляло 2 ч, транспортировку и хранение осуществляли при температуре 18–25 °С. Мочу отбирали утром после сна или не ранее чем через 2–3 ч. после предыдущего мочеиспускания в сухой стерильный флакон в объеме не менее 20 мл. Время транспортировки и хранения составляло 3 ч, транспортировали и хранили биоматериал при температуре 18–25 °С.

Методом индуцированной хемилюминесценции (активация железом) определяли уровень свободнорадикальных реакций в сыворотке крови. Для этого кровь школьников после забора выдерживали в течение 30 мин и затем центрифугировали при 1500 об/мин в течение 15 мин. Полученную сыворотку разводили фосфатным буфером

(2,72 г КН₂РO₄ и 7,82 г КСl на 1 л дистиллированной воды, рН 7,4). Полученный раствор титровали насыщенным раствором КОН до достижения рН 7,45. Регистрацию хемилюминесценции проводили по методике Р. Р. Фархутдинова [15] на приборе «Хемилюминометр–3» («Люмэкс», Россия). Чувствительность прибора составляет ~200 фотонов/с. Калибровку прибора выполняли перед началом работы по эталонному источнику света (люминесцирующее урановое стекло ЖС–19). Определяли высоту быстрой вспышки, светосумму медленной вспышки (S) и тангенс угла наклона заднего фронта импульса излучения хемилюминесценции. Значения показателей привели в относительных единицах, рассчитав их соотношение для опытных и «холостых» проб.

Определяли уровень экскреции витаминов группы В и витамина С в моче и содержание витаминов А и Е — в сыворотке крови.

Анализ проб на содержание ретинола и токоферола проводили с помощью анализатора биожидкостей «Флюорат 02–АБЛФ» («Люмэкс», Россия). Пробы готовили следующим образом. В одну пробирку для центрифугирования помещали 1 мл сыворотки крови и 1 мл этанола, во вторую — 1 мл дистиллированной воды и 1 мл этанола (калибровочный образец). Обе пробирки встряхивали в аппарате Vortex в течение 30 с, затем добавляли 5 мл гексана и снова встряхивали в течение 1 мин. После встряхивания пробирки центрифугировали в течение 10 мин при 1500 об/мин. Отделившийся гексановый слой (экстракт) использовали для флуориметрического анализа. Содержание витамина А или Е (X, мкг/мл) в сыворотке крови вычисляли по формуле:

$$X = \frac{C_{\text{изм}} \times V_{\text{э}} \times Q}{V_{\text{с}}}$$

где $C_{\text{изм}}$ — концентрация витамина в экстракте, мкг/мл; $V_{\text{э}}$ — объем экстракта, мл; $V_{\text{с}}$ — объем сыворотки крови, взятой для анализа, мл; Q — коэффициент, учитывающий разбавление экстракта.

Содержание аскорбиновой кислоты и витаминов группы В определяли по уровню их экскреции с мочой. Для витамина С использовали метод визуального титрования с реактивом Тильманса (2,6–дихлорфенолиндофенолят натрия). В две конические колбы отмеряли по 10 мл мочи, 10 мл дистиллированной воды и 1 мл 10 %-го раствора НСl. Содержимое каждой колбы перемешивали и титровали 0,001 н раствором реактива Тильманса до появления розовой окраски, не исчезающей в течение 30 с. Содержание витамина С (X, мг/ч) рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{0,088 \times A \times B}{B}$$

где 0,088 — коэффициент, отражающий количество аскорбиновой кислоты, эквивалентное 1 мл 0,001 н раствора 2,6–дихлорфенолиндофенолята натрия (в мг); А — средняя арифметическая результатов титрования 0,001 н раствором 2,6–дихлорфенолиндофенолята натрия двух проб мочи (в мл); В — объем мочи, взятый для титрования (в мл); В — среднесуточное количество мочи (для мужчин — 1 500 мл, для женщин — 1 200 мл).

Экскрецию тиамина с мочой определили по методу Ванга и Харриса, рибофлавина — по методу Е. М. Масленниковой и Л. Г. Гвоздевой, пиридоксина — флуориметрическим методом [16].

Оценку фактического питания школьников проводили методом 24-часового воспроизведения питания с

помощью опросника [17] с последующим определением биологической ценности рационов по таблицам химического состава пищевых продуктов И. М. Скурихина и В. А. Тутельяна [18] и сопоставлением полученных данных для каждой возрастной группы с физиологическими нормами [19].

Объем выборки рассчитывали по формуле Д. Санетлиева (1968):

$$n = \frac{t^2 \times p \times q}{\Delta^2},$$

где n — число наблюдений, t — доверительный коэффициент, p — показатель распространенности, $q = 100\% - p$, Δ — доверительный интервал.

Учитывая, что в медицинских исследованиях минимальной доверительной вероятностью является 95%, чему соответствует доверительный коэффициент $t = 1,96$, мы взяли p , равное q , то есть 50%, чтобы произведение p и q было максимальным, а доверительный интервал (Δ) приняли за 100%. Рассчитанный таким образом объем минимальной выборки, обеспечивающей репрезентативность, составил: $n = 100$. Для выявления статистически значимых различий в опытных группах использовали критерий Стьюдента с последующим расчетом достоверности (p). Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программного пакета Statistica 5.0 с автоматическим расчетом средних значений, стандартного отклонения, стандартной ошибки среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Содержание ретинола и токоферола в сыворотке крови городских школьников 12–14 лет было меньше физио-

логической нормы (здесь и далее сравнивали с нижней границей) на 26,7 и 12,8%, а школьников 15–17 лет — на 20,0 и 9,8% соответственно (табл. 1). Содержание ретинола и токоферола в сыворотке крови сельских школьников было несколько выше, но также меньше физиологической нормы: на 6,7 и 6,8% для ребят 12–14 лет и на 10,0 и 9,8% — для ребят 15–17 лет соответственно. Экскреция витамина С с мочой городских школьников обеих возрастных подгрупп соответствовало нижней границе физиологической нормы, а у сельских школьников этот показатель был ниже нормы на 14,8 и 12,1% для участников исследования 12–14 и 15–17 лет соответственно.

Низкий уровень экскреции тиамин с мочой в сравнении с нормой был установлен только для сельских школьников обеих возрастных подгрупп (табл. 2). Недостаточность экскреции с мочой рибофлавина была отмечена у всех школьников, кроме сельских в возрасте 15–17 лет ($14,2 \pm 0,24$ мкг/ч — соответствие нижней границе физиологической нормы), пиридоксина — только у сельских школьников: в группе ребят 12–14 лет экскреция витамина B_6 была ниже нормы на 5,2%, 15–17 лет — на 6,5%.

Анализ суточных рационов школьников показал, что в рационах городских и сельских школьников особенно велик недостаток витаминов А и Е (табл. 3). В возрастной подгруппе 12–14 лет содержание ретинола в рационе было ниже нормы на 88,3 и 66,7% у городских и сельских школьников соответственно, а в возрастной подгруппе 15–17 лет — на 78,0 и 83,0%. Дефицит токоферола составил 59,2 и 71,7% у городских и сельских школьников в возрасте 12–14 лет и 66,0 и 70,7% — в возрасте 15–17 лет. Содержание аскорбиновой кислоты в рационах всех групп было в пределах нормы. Недостаток тиамин был выявлен у городских и сельских школьников 15–17 лет, рибофлавина — во всех группах, кроме группы городских

Таблица 1. Содержание витаминов А и Е в сыворотке крови и экскреция витамина С с мочой у городских и сельских школьников, $M \pm m$

Группы школьников		Витамины		
		А	Е	С
		Физиологическая норма		
		0,3–0,7 мкг/мл	8,0–12,0 мкг/мл	0,7–1,0 мг/ч
12–14 лет	городские	0,22 ± 0,01	6,98 ± 0,16	0,72 ± 0,01
	сельские	0,28 ± 0,01*	7,46 ± 0,09*	0,60 ± 0,02*
15–17 лет	городские	0,24 ± 0,01	7,22 ± 0,17	0,71 ± 0,01
	сельские	0,27 ± 0,01*	7,22 ± 0,08	0,62 ± 0,01*

Примечание: физиологические нормы приведены по «Нормам биохимического анализа» [20]. * — $p < 0,05$ при сравнении показателей городских и сельских школьников внутри каждой возрастной группы.

Таблица 2. Экскреция витаминов группы В с мочой у городских и сельских школьников, $M \pm m$

Группы школьников		Витамины		
		B_1	B_2	B_6
		Физиологическая норма		
		15–35 мкг/мл	14–30 мкг/мл	40–60 мкг/ч
12–14 лет	городские	20,42 ± 0,49	12,34 ± 0,37	41,11 ± 0,80
	сельские	12,58 ± 0,25*	13,68 ± 0,32*	37,92 ± 0,57*
15–17 лет	городские	21,3 ± 0,39	12,76 ± 0,41	40,33 ± 0,64
	сельские	13,19 ± 0,20*	14,2 ± 0,24*	37,40 ± 0,37*

Примечание: физиологические нормы приведены по «Нормам биохимического анализа» [20]. * — $p < 0,05$ при сравнении показателей городских и сельских школьников внутри каждой возрастной группы.

Таблица 3. Содержание витаминов в суточном рационе питания исследуемых школьников, М ± m

Витамин	Группы школьников					
	12–14 лет			15–17 лет		
	городские	сельские	ФН	городские	сельские	ФН
Витамин А, мкг	100,0 ± 2,0	200,0 ± 4,0*	600	220,0 ± 5,0	170,0 ± 3,0*	1000
Витамин Е, мкг	4,9 ± 0,7	3,4 ± 0,6*	12	5,1 ± 2,3	4,4 ± 1,1	15
Витамин С, мкг	59,1 ± 13,8	63,1 ± 12,3*	60,0–70,0	99,4 ± 24,8	89,6 ± 21,0	70,0–90,0
Витамин В ₁ , мкг	2,7 ± 0,3	1,4 ± 0,1*	1,3	0,9 ± 0,2	0,81 ± 0,1	1,3–1,5
Витамин В ₂ , мкг	2,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1*	1,5	0,4 ± 0,08	0,65 ± 0,09*	1,5–1,8
Витамин В ₆ , мкг	1,2 ± 0,1	0,9 ± 0,1*	1,6–1,7	0,9 ± 0,14	0,99 ± 0,15	1,6–2,0

Примечание: ФН — физиологическая норма потребления витамина для данной возрастной группы [19]. * — $p < 0,05$ при сравнении показателей городских и сельских школьников внутри каждой возрастной группы.

Таблица 4. Показатели хемилюминесценции сыворотки крови городских и сельских школьников, М ± m

Показатели	Группы школьников			
	12–14 лет		15–17 лет	
	городские	сельские	городские	сельские
Высота быстрой вспышки, отн. ед.	2,82 ± 0,67	0,65 ± 0,10*	3,83 ± 0,84	0,44 ± 0,04*
Светосумма, отн. ед.	4,36 ± 0,60	1,95 ± 0,19*	6,35 ± 0,78	1,51 ± 0,19*
Тангенс угла наклона заднего фронта импульса излучения хемилюминесценции, отн. ед.	1,14 ± 0,22	0,30 ± 0,07*	1,51 ± 0,25	0,20 ± 0,03*

Примечание: * — $p < 0,05$ при сравнении показателей городских и сельских школьников внутри каждой возрастной группы.

школьников 12–14 лет, пиридоксина — во всех группах.

Значения всех показателей хемилюминесценции были достоверно выше для обеих возрастных подгрупп городских школьников ($p < 0,05$). Так, значение высоты быстрой вспышки в сыворотке крови городских школьников 12–14 и 15–17 лет было соответственно в 4,3 и 5,9 раза выше в сравнении с сельскими школьниками, что свидетельствует о более высоком содержании гидроперекисей липидов в сыворотке крови городских школьников; значение светосуммы (интенсивность перекисного окисления липидов) — в 2,2 и 4,2 раза выше; значение тангенса угла наклона заднего фронта излучения хемилюминесценции (скорость окисления липидов) — в 3,8 и 7,6 раза (табл. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Пониженное содержание витаминов в организме современных школьников подтверждено и другими исследователями [21–23]. Выявленная разница в уровне свободнорадикальных реакций в сыворотке крови городских и сельских школьников согласуется с полученными данными об их витаминной обеспеченности: обеспеченность городских школьников «антиоксидантными» витаминами А и Е несколько ниже, чем сельских, и уровень свободнорадикальных реакций в их сыворотке крови выше.

Как правило, рацион городских детей более сбалансирован, чем рацион детей сельских. По данным И. Б. Ушакова и Н. В. Соколовой [5], около 70 % городских школьников употребляют в зимний период сливочное масло, сыр, мясо птицы, рыбу, сырые овощи и фрукты почти каждый

день или 2–3 раза в неделю, а среди сельских школьников доля таковых не превышает 40 %. Наличие огорода и подсобного хозяйства у сельских жителей определяет преобладание картофеля, свинины и молока в рационе подростков. Это объясняет соответствие содержания витамина С в сыворотке крови городских школьников физиологической норме и его недостаток в организме сельских школьников. В то же время, по данным О. Я. Лещенко, 53,5 % городских школьников питаются всего 1–2 раза в день (доля таковых среди сельских школьников — 35,5 %) [24]. Такая кратность приема пищи не способна обеспечить организм достаточным количеством витаминов, чем можно объяснить тот факт, что даже при более разнообразном питании обеспеченность учащихся городских школ витаминами А и Е оказалась ниже.

ВЫВОДЫ

В сыворотке крови городских и сельских школьников выявлен дефицит витаминов А и Е, но их недостаточность более выражена у городских школьников. По всей вероятности, это определило более высокое содержание продуктов окисления в их сыворотке крови, что подтверждается значениями показателей хемилюминесценции, которые в 2,2–7,6 раза выше в сравнении с таковыми у сельских школьников. Анализ рационов подтвердил полученные данные: был установлен дефицит витаминов А, Е и пиридоксина в рационах всех групп школьников, тиамин — в рационах школьников старшего возраста. Вышесказанное обуславливает необходимость корректировать питание в школах.

Литература

1. Каташинская Л. И., Губанова Л. А. Анализ факторов, оказывающих влияние на формирование здоровья городских и сельских школьников. *Современные проблемы науки и образования*. 2014; (4). Доступно по ссылке: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=14181>.
2. Макунина О. А., Якубовская И. А. Структура и динамика состояния здоровья школьников 7–17 лет. *Вестник Здоровье и образование в XXI веке*. 2015; 17 (2): 29–31.
3. Сетко Н. П., Чистякова Е. С. Некоторые аспекты влияния питания сельских школьников на уровень свободнорадикального окисления биологических молекул. В сборнике: *Экология человека и медико-биологическая безопасность населения: VI Международный симпозиум*; 24 октября – 3 ноября 2010 г.; Салоники, Греция. 2010. 156–9.
4. Сетко Н. П., Чистякова Е. С., Тришина С. П., Красиков С. И., Захарова О. В. Сравнительная характеристика биохимического статуса учащихся общеобразовательных учреждений города и села. *Гигиена и санитария*. 2011; (3): 62–5.
5. Ушаков И. Б., Соколова Н. В. Роль гигиенических факторов в формировании качества жизни городских и сельских школьников. *Экология человека*. 2005; (4): 15–8.
6. Кузьменко Е. В. Современные представления о проявлениях механизма психоэмоционального стресса. *Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского, серия «Биология, химия»*. 2013; 26/65 (2): 95–106.
7. Кидун К. А., Солодова Е. К., Угольник Т. С., Дорошенко Р. В. Стресс-индуцированные изменения антиоксидантного статуса сперматозоидов и морфологии семенников крыс. *Проблемы здоровья и экологии*. 2014; 40 (2): 125–9.
8. Резников А. Г. Эндокринологические аспекты стресса. *Международный эндокринологический журнал*. 2007; 4 (10): 11–17.
9. Балаболкин М. И., Клебанова Е. М., Креминская В. М. Лечение сахарного диабета и его осложнений: руководство для врачей. М.: Медицина; 2005. 511 с.
10. Любина Е. Н. Роль минеральных элементов в регуляции процессов свободно-радикального окисления на фоне применения препаратов витамина а и бета-каротина. *Вестник Ульяновской ГСХА*. 2015; 31 (3): 64–8.
11. Трихина В. В., Лазаревич Е. Л., Вековцев А. А. Разработка программы и методических рекомендаций для коррекции питания рабочих металлургических предприятий. *Техника и технология пищевых производств*. 2015; 36 (1): 97–102.
12. Поступаев В. В., Ковальский Ю. Г., Рябцева Е. Г. Двадцатилет-

- ний опыт изучения роли перекисидации липидов в оценке состояния здоровья населения. *Дальневосточный медицинский журнал*. 2005; 1 (3): 86–9.
13. Adachini T, Yamada H, Hara H, Futenma A, Kakumu S. Increase of urinary extracellular-superoxide dismutase level correlated with cyclic adenosine monophosphate. *FEBS Letters*. 1999; 458 (3): 370–4.
14. Ракитский В. Н., Юдина Т. В. Современные проблемы диагностики: антиоксидантный и микроэлементный статус организма. Клинические и экспериментальные исследования. *Бюллетень ВШЦ СО РАМН*. 2005; 2 (40): 222–7.
15. Фархутдинов Р. Р., Лиховских В. А. Хемилюминесцентные методы исследования свободнорадикального окисления в биологии и медицине. Уфа; 1995. 54 с.
16. Савченко А. А., Анисимова Е. Н., Борисов А. Г., Кондаков А. Е. Витамины как основа иммунометаболической терапии. Красноярск: Издательство КрасГМУ; 2011. 213 с.
17. Мартинчик А. Н. Методические рекомендации по оценке количества потребляемой пищи методом 24-часового (суточного) воспроизведения питания. М.; 1996. 28 с.
18. Скурихин И. М., Тутельян В. А., редакторы. *Химический состав российских пищевых продуктов: справочник*. М.: Делли принт; 2008. 256 с.
19. Методические рекомендации МР 2.3.1.2432–08. *Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации (18 декабря 2008 г.)*. 42 с.
20. Красиков С. И., Лебедева С. Е. *Нормы биохимического анализа*. Оренбург; 2014. 325 с.
21. Климацкая Л. Г., Шевченко И. Ю., Василевский А. М., Теппер Е. А., Лесовская М. И. Алиментарнозависимые состояния у детей Красноярья. *Журнал ГрГМУ*. 2006; 13 (1): 88–90.
22. Колесникова Л. И., Власов Б. Я., Кравцова О. В., Долгих М. И., Натяганова Л. В. Состояние показателей системы перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты у девушек-подростков разных групп здоровья. *Вестник РАМН*. 2014; (3-4): 50–4.
23. Левчук Л. В., Стенникова О. В. Витамины группы В и их влияние на состояние здоровья и интеллектуальное развитие детей. *Вопросы современной педиатрии*. 2009; 8 (3): 42–47.
24. Лещенко О. Я. Особенности питания современных старшеклассниц и студенток по материалам анкетирования. *Бюллетень ВШЦ СО РАМН*. 2012; (2–2): 83–6.

References

1. Katashinskaya LI, Gubanov LA. Analiz faktorov, okazyvayushchikh vliyaniye na formirovaniye zdorov'ya gorodskikh i sel'skikh shkol'nikov. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya*. 2014; (4). Available from: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=14181>. Russian.
2. Makunina OA, Yakubovskaya IA. Struktura i dinamika sostoyaniya zdorov'ya shkol'nikov 7–17 let. *Vestnik Zdorov'ya i obrazovanie v XXI veke*. 2015; 17 (2): 29–31. Russian.
3. Setko NP, Chistyakova ES. Nekotorye aspekty vliyaniya pitaniya sel'skikh shkol'nikov na uroven' svobodnoradikal'nogo okisleniya biologicheskikh molekul. In: *Ekologiya cheloveka i mediko-biologicheskaya bezopasnost' naseleniya: VI Mezhdunarodnyy simpozium*; October, 24 – November, 3 2010; Saloniki, Greece. 2010. 156–9. Russian.
4. Setko NP, Chistyakova ES, Trishina SP, Krasikov SI, Zakharova OV. Sravnitel'naya kharakteristika biokhimicheskogo statusa uchashchikhsya obshcheobrazovatel'nykh uchrezhdeniy goroda i sela. *Gigiena i sanitariya*. 2011; (3): 62–5. Russian.
5. Ushakov IB, Sokolova NV. Rol' gigienicheskikh faktorov v formirovani kachestva zhizni gorodskikh i sel'skikh shkol'nikov. *Ekologiya cheloveka*. 2005; (4): 15–8. Russian.
6. Kuzmenko EV. Sovremennyye predstavleniya o proyavleniyakh

- mekhanizma psikhooemotsional'nogo stressa. *Uchenye zapiski Tavricheskogo natsional'nogo universiteta im. V. I. Vernadskogo, seriya «Biologiya, khimiya»*. 2013; 26/65 (2): 95–106. Russian.
7. Kidun KA, Solodova EK, Ugolnik TS, Doroshenko RV. Stress-indutsirovannyye izmeneniya antioksidantnogo statusa spermatozoidov i morfologii semennikov krysa. *Problemy zdorov'ya i ekologii*. 2014; 40 (2): 125–9. Russian.
8. Reznikov AG. Endokrinologicheskie aspekty stressa Mezhdunarodnyy endokrinologicheskyy zhurnal. 2007; 4 (10): 11–17. Russian.
9. Balabolkin MI, Klebanova EM, Kreminskaya VM. Lechenie sakharnogo diabeta i ego oslozhneniy: rukovodstvo dlya vrachey. M.: Meditsina; 2005. 511 p. Russian.
10. Lyubina EN. Rol' mineral'nykh elementov v regulyatsii protsessov svobodno-radikal'nogo okisleniya na fone primeneniya preparatov vitamina a i beta-karotina. *Vestnik Ul'yanovskoy GSKhA*. 2015; 31 (3): 64–8. Russian.
11. Trikhina VV, Lazarevich EL, Vekovtsev AA. Razrabotka programmy i metodicheskikh rekomendatsiy dlya korrektsii pitaniya rabochikh metallurgicheskikh predpriyatiy. *Tekhnika i tekhnologiya pishchevykh proizvodstv*. 2015; 36 (1): 97–102. Russian.
12. Postupaev V, Kovalskiy YuG, Ryabtseva EG. Dvadsatiletniy

- opyt izucheniya roli peroksidatsii lipidov v otsenke sostoyaniya zdorov'ya naseleniya. Dal'nevostochnyy meditsinskiy zhurnal. 2005; 1 (3): 86–9. Russian.
13. Adachini T, Yamada H, Hara H, Futenma A, Kakumu S. Increase of urinary extracellular-superoxide dismutase level correlated with cyclic adenosine monophosphate. FEBS Letters. 1999; 458 (3): 370–4.
 14. Rakitskiy VN, Yudina TV. Sovremennye problemy diagnostiki: antioksidantnyy i mikroelementnyy status organizma. Klinicheskie i eksperimental'nye issledovaniya. Byulleten' VSNTs SO RAMN. 2005; 2 (40): 222–7. Russian.
 15. Farkhutdinov RR, Likhovskikh VA. Khemilyuminestsentnye metody issledovaniya svobodnoradikal'nogo okisleniya v biologii i meditsine. Ufa; 1995. 54 p. Russian.
 16. Savchenko AA, Anisimova EN, Borisov AG, Kondakov AE. Vitaminy kak osnova immunometabolicheskoy terapii. Krasnoyarsk: Izdatel'stvo KrasGMU; 2011. 213 p. Russian.
 17. Martinchik AN. Metodicheskie rekomendatsii po otsenke kolichestva potrebyaemoy pishchi metodom 24-chasovogo (sutochnogo) vosproizvedeniya pitaniya. M.; 1996. 28 p. Russian.
 18. Skurikhin IM, Tutelyan VA, editors. Khimicheskiy sostav rossiyskikh pishchevykh produktov: spravochnik. M.: DeLi print; 2008. 256 p. Russian.
 19. Metodicheskie rekomendatsii MR 2.3.1.2432–08. Normy fiziologicheskikh potrebnostey v energii i pishchevykh veshchestvakh dlya razlichnykh grupp naseleniya Rossiyskoy Federatsii (December, 18 2008). 42 p. Russian.
 20. Krasikov SI, Lebedeva SE. Normy biokhimicheskogo analiza. Orenburg; 2014. 325 p. Russian
 21. Klimatskaya LG, Shevchenko IYu, Vasilovskiy AM, Tepper EA, Lesovskaya MI. Alimentarnozavisimye sostoyaniya u detey Krasnoyar'ya. Zhurnal GrGMU. 2006; 13 (1): 88–90. Russian.
 22. Kolesnikova LI, Vlasov BYa, Kravtsova OV, Dolgikh MI, Natyaganova LV. Sostoyanie pokazateley sistemy perekisnogo okisleniya lipidov i antioksidantnoy zashchity u devushek-podrostkov raznykh grupp zdorov'ya. Vestnik RAMN . 2014; (3-4): 50–4. Russian.
 23. Levchuk LV, Stennikova OV. Vitaminy gruppy B i ikh vliyanie na sostoyanie zdorov'ya i intellektual'noe razvitie detey. Voprosy sovremennoy pediatrii. 2009; 8 (3): 42–47. Russian.
 24. Leshchenko OYa. Osobennosti pitaniya sovremennykh starsheklassnits i studentok po materialam anketirovaniya. Byulleten' VSNTs SO RAMN. 2012; (2–2): 83–6. Russian.

ТКАНЕВАЯ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ КАК МЕТОД ОЦЕНКИ СУПЕРОКСИД РАДИКАЛ-ПРОДУЦИРУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ МИТОХОНДРИЙ

А. А. Джатдоева , А. М. Полимова, Е. В. Проскурнина, Ю. А. Владимиров

Кафедра медицинской биофизики, факультет фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

Дисфункция митохондрий лежит в основе развития многих заболеваний человека, включая дегенеративные. Одно из следствий митохондриальной дисфункции — апоптоз функционально-активных клеток. На начальной стадии апоптоза отмечается усиление продукции супероксид анион-радикала (САР). Перспективным методом обнаружения САР в клетках и тканях является метод хемилюминесценции (ХЛ), прежде всего — в присутствии люцигенина, специфичного для САР химического активатора ХЛ. В исследовании был предложен способ усовершенствования метода, а также оценена его эффективность при определении уровня образования САР в переживающих тканях лабораторных животных при моделировании гипоксии и паркинсонизма. Предложенные для аэрации опытных образцов кислород-содержащая (O₂ — 15 %, CO₂ — 5 %, N₂ — 80 %) и бескислородная (CO₂ — 5 %, N₂ — 95 %) газовые смеси обеспечивали постоянство pH 7,4, необходимое для корректной регистрации ХЛ. С помощью изучаемого метода было показано достоверное увеличение уровня образования САР в ткани сердца крыс при циклах гипоксии длительностью 150 и 240 мин — в 1,8 и 2,0 раза. При паркинсонизме уровень образования САР в ткани мозга мышей, содержащей стриатум и черную субстанцию, через 12 ч после введения последней дозы пронеуротоксина оказался выше в 1,7 и 1,3 раза соответственно в сравнении с контролем.

Ключевые слова: митохондриальные заболевания, апоптоз, супероксид анион-радикал, супероксид радикал-продуцирующая способность, гипоксия, паркинсонизм, тканевая хемилюминесценция, люцигенин

Финансирование: работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 14-15-00375).

Благодарности: авторы благодарят Алексея Гришина, студента кафедры физиологии МГУ имени М. В. Ломоносова, за помощь в подборе состава газовых смесей.

 **Для корреспонденции:** Айшат Абдрахмановна Джатдоева
119192, г. Москва, Ломоносовский пр-т, д. 31, корп. 5; ayshatdj@gmail.com

Статья поступила: 01.10.2015 Статья принята к печати: 09.12.2015

TISSUE CHEMILUMINESCENCE AS A METHOD OF EVALUATION OF SUPEROXIDE RADICAL PRODUCING ABILITY OF MITOCHONDRIA

Dzhatdоеva AA , Polimova AM, Proskurnina EV, Vladimirov YuA

Faculty of Fundamental Medicine, Department of Medical Biophysics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Mitochondrial dysfunctions are an underlying cause of many human diseases including degenerative diseases. One of the consequences of mitochondrial dysfunctions is apoptosis of functionally active cells. During the initial stage of apoptosis, increased production of superoxide anion-radical (SAR) is observed. A promising method of SAR detection in cells and tissues is chemiluminescence (CL), primarily, in the presence of lucigenin, a SAR specific amplifier of CL. In this study a means of improving CL was proposed, and its effectiveness in detecting SAR level in living tissues of laboratory animals in hypoxia and parkinsonism models was evaluated. Aerobic (O₂ — 15 %, CO₂ — 5 %, N₂ — 80 %) and anaerobic (CO₂ — 5 %, N₂ — 95 %) gas mixtures proposed for samples aeration, maintained a constant pH of 7.4, necessary for accurate recording of CL. Using the studied method, a statistically significant increase (1.8 and 2.0 times) in SAR production level in rat heart tissue was detected with hypoxia duration of 150 to 240 minutes. In the parkinsonian model SAR production in mouse brain tissue samples of striatum and substantia nigra was 1.7 and 1.3 times higher after administration of the final dose of proneurotoxin, as compared to the control group.

Keywords: mitochondrial disorders, apoptosis, superoxide anion-radical, superoxide radical producing ability, hypoxia, parkinsonism, tissue chemiluminescence, lucigenin

Funding: this work was supported by the Russian Science Foundation (project no. 14-15-00375).

Acknowledgments: authors thank Aleksey Grishin, a student at the Department of Physiology, Lomonosov Moscow State University, for his help in choosing gas mixture components.

 **Correspondence should be addressed:** Aishat Dzhatdоеva
Lomonosovskiy prospekt, d. 31, korp. 5, Moscow, Russia, 119192; ayshatdj@gmail.com

Received: 01.10.2015 Accepted: 09.12.2015

Митохондрии, апоптоз и болезни человека

Митохондрии являются важной органеллой клетки: они выполняют множество функций, но прежде всего вырабатывают энергию путем окислительного фосфорилирования и регулируют процессы роста, старения и апоптоза клетки. Число описанных в научной литературе болезней митохондриального происхождения приближается к 400, и митохондриальная медицина получила развитие как самостоятельное научное направление.

Нарушение энергообеспечения клетки может быть причиной нейромышечных патологий [1]. Особо чувствительной к снижению энергетического обмена является нервная ткань [2]. Однако энергетическая дисфункция — возможно, не самое опасное нарушение работы митохондрий. Митохондрии являются главным источником образования внутриклеточных свободных радикалов [3], прежде всего — супероксид анион-радикала (САР). Накопление САР и его производных — активных форм кислорода — приводит к митохондриальному окислительному стрессу. Это чрезвычайно опасно для клетки, так как может запустить процесс ее запрограммированной гибели — апоптоз [4]. Существует два основных пути запуска апоптоза: внешний (рецепторный) и внутренний (митохондриальный) [5], — и большинство форм апоптоза у позвоночных реализуется по второму пути [6].

Показано, что окислительный стресс в митохондриях является этиологическим фактором или звеном патогенеза многих заболеваний: нейродегенеративных (болезнь Паркинсона [7], болезнь Альцгеймера [8], рассеянный склероз [9], боковой амиотрофический склероз и др.), нейроофтальмопатий, гломерулонефритов [10], инсулинорезистентности, — а также старения. Повышенный риск ряда заболеваний (рак, диабет [11], сердечнососудистые болезни) связывают с полиморфизмом антиоксидантных ферментов, марганец-зависимой супероксиддисмутазы (Mn-SOD) и глутатион-пероксидазы, которые купируют последствия митохондриального окислительного стресса. Также выявлена важнейшая роль дисфункции митохондрий в развитии раковых заболеваний [5].

Нарушение работы митохондрий и накопление свободных радикалов в клетке происходят под влиянием неблагоприятных факторов. Один из таких факторов — генные мутации. В отличие от других органелл митохондрии имеют собственную дезоксирибонуклеиновую кислоту (мтДНК), которая кодирует некоторые субъединицы комплексов окислительного фосфорилирования. Именно мутации в мтДНК, а также генах ядерной ДНК, кодирующих митохондриальные белки, вызывают развитие наследственной атрофии зрительных нервов Лебера [12], синдрома NARP (нейропатия, атаксия, пигментный ретинит) [13], синдрома MERRF (миоклонус эпилепсия с «рваными» красными волокнами в скелетных мышцах), синдрома MELAS (митохондриальная энцефаломиопатия, лактат-ацидоз, инсультподобные эпизоды) [14], синдрома Кернса–Сейра (пигментный ретинит, наружная офтальмоплегия, блокада сердца, птоз, мозжечковый синдром) [15], синдрома Пирсона (поражение костного мозга, панкреатическая и печеночная дисфункции) [16] и др.

Митохондрии как источники свободных радикалов при апоптозе

Во время аэробного дыхания происходит утечка 1–2 % электронов с электронной транспортной цепи митохондрий,

которые восстанавливают кислород с образованием супероксид анион-радикала [17]. Основными центрами продукции активных форм кислорода являются комплекс I и комплекс III дыхательной цепи. В норме антиоксидантная система организма нейтрализует образующиеся свободные радикалы. Однако под влиянием неблагоприятных факторов уровень содержания свободных радикалов возрастает во много раз.

Сперва в митохондриях происходит блокирование переноса электронов [18], что приводит к угнетению дыхания, снижению синтеза аденозинтрифосфата (АТФ) и, самое главное, к увеличению образования митохондриями супероксид анион-радикала [19]. Затем под действием митохондриальной супероксиддисмутазы образуется пероксид водорода в матриксе. В дальнейшем происходит образование комплекса специфического митохондриального фосфолипида — кардиолипина с цитохромом с [20]. Как было показано в модельных экспериментах, этот комплекс обладает пероксидазной активностью [4] и в присутствии пероксида водорода окисляет органические субстраты, включая полиненасыщенные жирные кислоты, в результате чего образуются свободные радикалы липидов [21] и запускается цепная реакция липопероксидации [22]. Липопероксидация в мембранах митохондрий приводит к набуханию матрикса [23], разрыву наружной мембраны или по меньшей мере образованию в ней больших пор, через которые из митохондрий выходит цитохром с. Появление цитохрома с в цитоплазме приводит к запуску реакций апоптоза [24].

Методы оценки радикал-продуцирующей способности митохондрий в живой ткани

Для оценки радикал-продуцирующей способности митохондрий в живой ткани применяют различные методы, в том числе метод хемилюминесценции (ХЛ) [25]. ХЛ позволяет регистрировать не концентрацию радикалов (которая в живых системах крайне низкая), а скорость реакции, в которой они участвуют. Недавно был разработан метод регистрации тканевой ХЛ с использованием фотоумножителя [26], имеющий ряд преимуществ перед весьма трудоемким и дорогостоящим методом японских исследователей с использованием охлаждаемой фотоматрицы [27]. Предложенный метод оценки радикал-продуцирующей способности ткани [26] заключается в том, что в условиях термостатирования (37 °С) в систему, содержащую исследуемые образцы ткани и активатор люцигенин, подают через капилляр слабый поток воздуха от перистальтического насоса (рис. 1, А). Подобранный уровень расположения капилляра и скорость аэрации позволяют регистрировать образование супероксид анион-радикалов в переживающей ткани. Однако в исследовании [26] было показано нарастание ХЛ во времени, которое затрудняет анализ полученных кривых. Возможно, дополнительное усиление ХЛ связано с увеличением pH раствора среды во времени, а не с дополнительным образованием радикалов в ткани. Как известно, интенсивность свечения люцигенина зависит от водородного показателя среды [28]. Повышение pH среды способствует образованию катиона люцигенина, который и взаимодействует с САР с последующим испусканием кванта света.

Наше исследование включало два эксперимента. Целью первого эксперимента явилось определение оптимального состава газовой смеси для поддержания

постоянного уровня рН при аэрации опытных образцов с использованием изучаемого метода, второго — оценка уровня образования супероксид анион-радикалов при гипоксии и паркинсонизме в образцах тканей сердца крыс и мозга мышей изучаемым методом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Схема установки

В опытах использовали хемилюминометр SmartLum-100 («ДИСофт», Россия), дополнительно оснащенный перистальтическим насосом Pumps 323 (Watson Marlow, Великобритания). К насосу были подключены резервуары, содержащие различные газовые смеси. Схема установки приведена на рисунке 1, А.

Расстояние от дна кюветы до кончика капилляра (l), по которому поступал газ в рабочий раствор, составляло 1,5 см (рис. 1, Б). Это способствовало быстрой диффузии газа к исследуемому образцу без нарушения его положения в пространстве. Срезы располагали на дне кюветы таким образом, чтобы сторона образца с наибольшей площадью была обращена к детектору (рис. 1, Б).

Животные и манипуляции над ними

В исследовании использовали сердце самцов белых крыс линии Wistar в возрасте 2–3 мес. и мозг мышей линии C57BL/6 в возрасте 2,5–3 мес. При работе с животными соблюдали регламент, установленный Приказом Минздрава СССР от 12.08.1977 г. № 755. Эксперименты были одобрены Комиссией по биоэтике МГУ имени М. В. Ломоносова. Животных содержали в условиях вивария, по 6 особей в стандартных клетках Т4 с регулируемым освещением (12 часов — ночь, 12 часов — день), со свободным доступом к кормам и воде.

Крысы. Все манипуляции по извлечению органов производили на глубоко наркотизированных хлоралгидратом животных (400 мг/кг). После извлечения органы

промывали в физиологическом растворе (NaCl 0,9 %). С помощью острого лезвия отрезали небольшой прямоугольный кусочек левого желудочка, не более 5 x 5 x 5 мм, и промывали его.

Мыши. Для моделирования ранней симптомной стадии паркинсонизма мышам четырехкратно с двухчасовым интервалом между инъекциями вводили подкожно пронеуротоксин 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП; Sigma, США) в дозе 12 мг/кг [29]. Контрольным животным по такой же схеме вводили физиологический раствор (NaCl 0,9 %). Через 12 ч после введения последней дозы пронеуротоксина мышам декапитировали (без наркоза) и выделяли мозг. С помощью вибратора (Vibratome 1000 Plus, США) получали тонкие фронтальные срезы толщиной 300 мкм. В срезах выделяли блоки ткани, содержащие черную субстанцию (место локализации тел дофаминергических нейронов) и стриатум (область проекции аксонов дофаминергических нейронов).

Для сохранения жизнеспособности тканей все манипуляции с ними проводили в охлажденном растворе Кребса-Рингера состава: 6,96 г NaCl, 0,36 г KCl, 0,22 г CaCl₂, 0,33 г MgSO₄•H₂O, 2,1 г NaHCO₃, 1,82 г D-глюкозы, 4,8 г HEPES, 1,0 л дистиллированной воды (с последующим доведением рН раствора до 7,4). В экспериментах использовали только свежеприготовленный раствор.

Определение оптимального состава газовой смеси для аэрации

Определение оптимального состава газовой смеси для аэрации проводили на образцах ткани сердца крыс. Для этого образец ткани помещали в кювету, содержащую 90 мкМ люцигенина в растворе Кребса-Рингера. Люцигенин был использован в качестве селективного зонда на САР. Хемилюминесценцию образцов ткани регистрировали в течение 125 мин в условиях термостатирования (37 °С) и аэрации при скорости вращения ротора насоса 6 об/мин. Такая скорость подачи газовой смеси позволяла сохранять достаточный темп насыщения раствора газами, перемешивать раствор и омывать образец, сохраняя его неподвижным на дне кюветы. Каждые 20 мин измеряли рН раствора.

Были изучены три газовых смеси следующего состава:

- атмосферный воздух: 21 % O₂, 0,03 % CO₂, 78 % N₂,
- карбоген: 95 % O₂, 5 % CO₂,
- выдыхаемый человеком воздух: 15 % O₂, 4 % CO₂, 74 % N₂, другие — 7 %.

Регистрация хемилюминесценции ткани при имитации гипоксии и при паркинсонизме

Основываясь на результатах эксперимента по определению оптимального состава газовой смеси для аэрации, приготовили технические смеси нового состава, которые использовали для регистрации хемилюминесценции при моделировании гипоксии и паркинсонизма:

- кислородсодержащая газовая смесь (КГС): 15 % O₂, 5 % CO₂, 80 % N₂,
- бескислородная газовая смесь (БГС): 5 % CO₂, 95 % N₂.

Моделирование гипоксии. Исследование проводили на образцах ткани сердца крыс с использованием трех моделей гипоксии. Для каждой модели регистрировали ХЛ одного образца. Для создания гипоксических условий

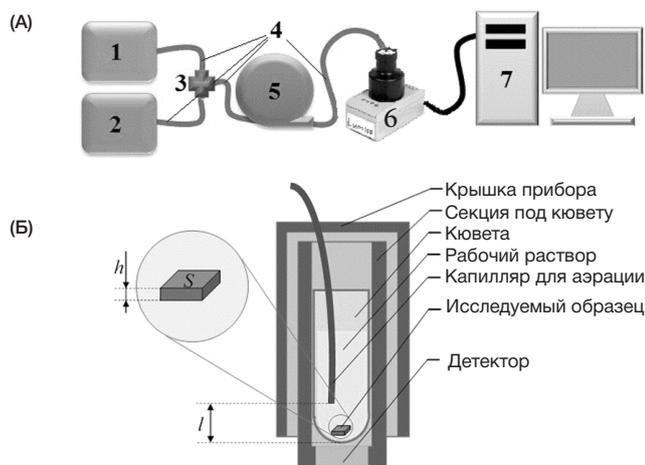


Рис. 1. (А) Схема экспериментальной установки. 1, 2 — резервуары для двух различных газовых смесей (кислородной и бескислородной); 3 — переключатель газовой смеси; 4 — трубки, по которым газовая смесь поступает в кювету хемилюминометра; 5 — перистальтический насос для подачи газовой смеси в систему; 6 — хемилюминометр SmartLum-100; 7 — персональный компьютер. (Б) Расположение исследуемого образца внутри хемилюминометра

через раствор, содержащий кусочек ткани, пропускали бескислородную газовую смесь, а для создания условий реоксигенации — кислородсодержащую газовую смесь. Было исследовано три модели гипоксии.

Модель 1 — гипоксия в течение 15 мин. Первые 30 мин регистрировали ХЛ при аэрации КГС, затем 15 мин — при аэрации БГС (гипоксия), после этого возобновляли аэрацию КГС в течение 30 мин (реоксигенация). Цикл гипоксии повторяли шесть раз. Общее время регистрации ХЛ составляло 400 мин.

Модель 2 — гипоксия в течение 150 мин. Первые 30 мин регистрировали ХЛ при аэрации КГС, затем 150 мин — при аэрации БГС (гипоксия), после этого возобновляли аэрацию КГС в течение 30 мин (реоксигенация). Циклы гипоксии повторяли дважды. Общее время регистрации ХЛ составляло 325 мин.

Модель 3 — гипоксия в течение 240 мин. Первые 30 мин регистрировали ХЛ при аэрации КГС, затем 240 мин — при аэрации БГС (гипоксия), после этого возобновляли аэрацию КГС в течение 30 мин (реоксигенация). Общее время регистрации ХЛ составляло 350 мин.

Изменение образования радикалов оценивали по параметру S/S_0 , где S — площадь под кривой ХЛ за 30 мин реоксигенации в конце эксперимента с моделью (отражает количество образовавшихся радикалов), а S_0 — площадь под кривой ХЛ за первые 30 мин регистрации свечения (отражает начальное количество радикалов). Единица измерения S — (имп/с) × мин.

Моделирование паркинсонизма. Исследование проводили на срезах мозга мышей. Регистрировали ХЛ трех срезов ткани области черной субстанции и трех срезов области стриатума мозга (как опытных, так и контрольных животных). Хемилюминесценцию регистрировали в течение 25 минут в условиях аэрации кислородсодержащей газовой смесью. Образование САР оценивали по параметру S/S_0 (за 20 мин аэрации), где S — площадь под кривой ХЛ ткани экспериментальных животных и S_0 — площадь под кривой ХЛ ткани контрольных животных.

Статистическую обработку данных проводили, используя программные пакеты Statistica 7.0 и MS Office Excel 2010. Результаты представлены в виде среднего значения и среднего квадратичного отклонения. Достоверность различия между группами определяли с помощью крите-

рия Манна–Уитни. Различия признавали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Зависимость pH от состава газовой смеси для аэрации

Было проведено исследование влияния состава трех разных газовых смесей на pH раствора, содержащего образец ткани сердца. В условиях аэрации атмосферным воздухом происходило увеличение pH с 7,4 до 9,0 (рис. 2, А). Изменение водородного показателя влияло на интенсивность люцигенин-зависимой хемилюминесценции. Зарегистрированные изменения кинетики кривой ХЛ являлись прямым следствием защелачивания среды: динамика развития ХЛ и увеличение pH совпадали во времени (рис. 2).

Наоборот, аэрация смесями газов с повышенным содержанием CO_2 (карбоген и выдыхаемый воздух) не приводила к значимому изменению pH среды в ходе эксперимента. Свечение ХЛ оставалось на постоянном уровне (рис. 2, Б).

Таким образом, содержание в газовых смесях CO_2 на уровне 4–5 % является достаточным для удержания pH на уровне физиологической нормы (7,4). Поэтому для дальнейшей регистрации ХЛ образцов тканей была подготовлена техническая смесь газов, в которой процентное содержание основных компонентов было аналогично выдыхаемому воздуху, но отсутствовали примесные газы (КГС). Для создания условий гипоксии была использована бескислородная газовая смесь с высоким содержанием CO_2 (БГС).

Образование свободных радикалов в тканях сердца крыс при гипоксии

В условиях повторяющихся циклов гипоксии длительностью 15 мин значимый рост образования супероксид анион-радикала зафиксировано только в момент реоксигенации на 300-й минуте эксперимента: количество САР увеличилось в 1,5 раза по сравнению с исходным уровнем. В условиях более длительных циклов гипоксии (150 и 240

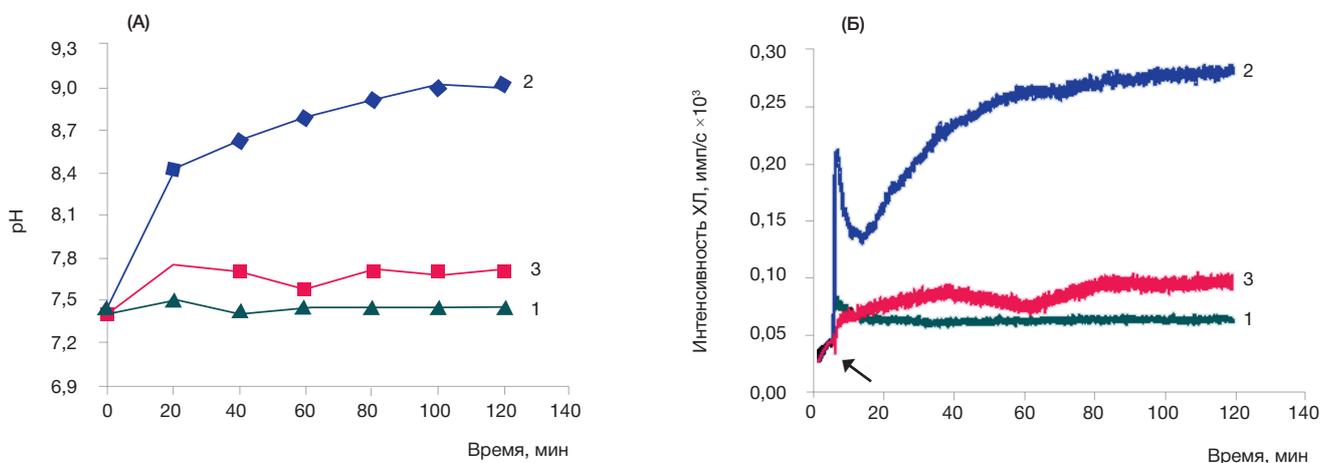


Рис. 2. (А) Изменение pH и (Б) развитие люцигенин-активированной хемилюминесценции в одном из образцов ткани сердца крыс при аэрации образцов газовыми смесями различного состава
 Обозначения: 1 — кривая для выдыхаемого воздуха (O_2 — 5 %, CO_2 — 4,3 %, N_2 — 74,0 %); 2 — кривая для атмосферного воздуха (O_2 — 21,0 %, CO_2 — 0,03 %, N_2 — 78,0 %); 3 — кривая для карбогена (O_2 — 95,0 %, CO_2 — 5,0 %). Стрелкой указан момент начала аэрации.

мин) также наблюдали достоверное увеличение ХЛ в конце эксперимента, при этом образование САР возросло в 1,8 и 2,0 раза соответственно (рис. 3, табл. 1).

Образование свободных радикалов в тканях мозга мышц при паркинсонизме

Смоделированная стадия паркинсонизма у мышей соответствует ранней симптомной стадии у людей, и на этой стадии у животных было зафиксировано увеличение образования супероксид анион-радикала. В случае со срезами ткани мозга, содержащей стриатум, произошло достоверное увеличение продукции САР в 1,7 раза. Для срезов

ткани мозга, содержащей черную субстанцию, значимых различий между опытными и контрольными животными не наблюдалось, но была выявлена тенденция к увеличению образования радикалов в 1,3 раза (рис. 4, табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Люцигенин-активированная хемилюминесценция является перспективным инструментом для измерения уровня образования САР и оценки нарушений, происходящих в отдельных клетках и ткани в целом. Однако ее применение требует поддержания постоянства pH среды, равного 7,4. При аэрации образцов атмосферным воздухом происхо-

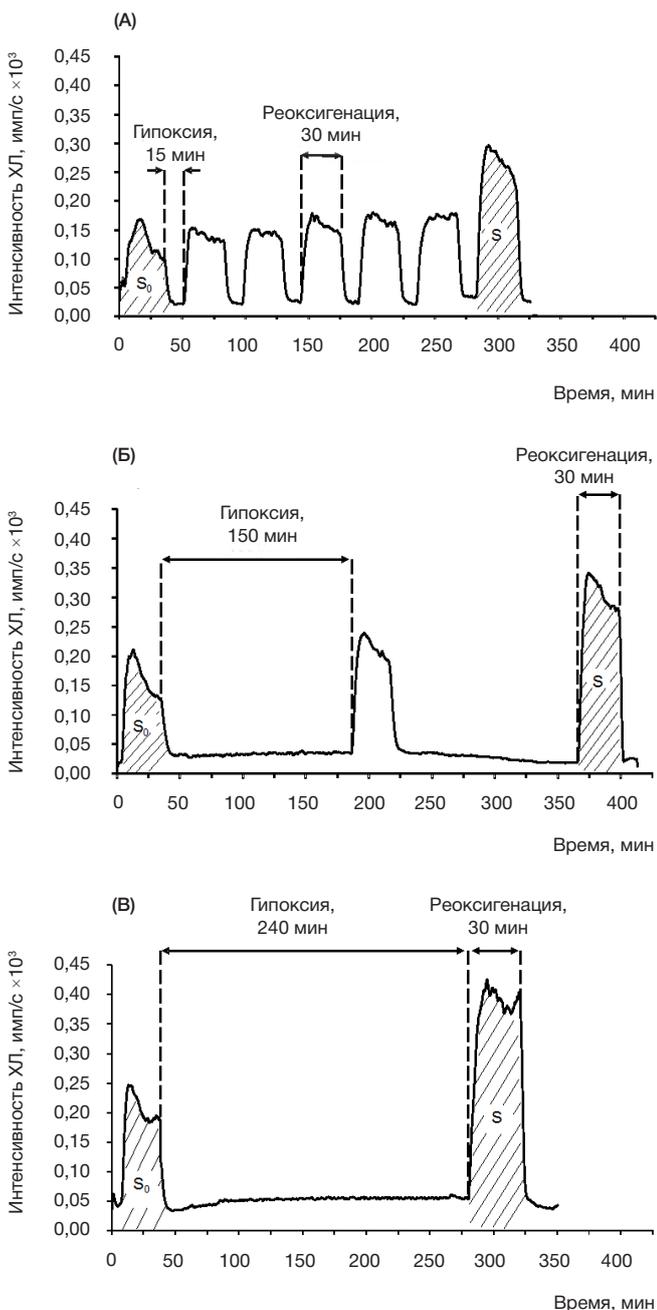


Рис. 3. Кривые люцигенин-активированной хемилюминесценции в одном из образцов ткани сердца крыс при различных моделях гипоксии. (А) Модель 1 (цикл гипоксии — 15 мин). (Б) Модель 2 (цикл гипоксии — 150 мин). (В) Модель 3 (цикл гипоксии — 240 мин)

Таблица 1. Влияние продолжительности гипоксии на образование супероксид анион-радикала в ткани сердца крыс, $M \pm m$ ($n = 5, p < 0,05$)

Показатель	Время гипоксии, мин		
	15	150	240
S/S ₀	1,49 ± 0,10	1,76 ± 0,20	2,04 ± 0,15

Таблица 2. Образование супероксид анион-радикала в ткани мозга мышей при моделировании паркинсонизма, $M \pm m$ ($n = 5, * — p < 0,05$)

Ткань	Показатель		
	S (паркинсонизм)	S ₀ (контроль)	S/S ₀
Стриатум	71,0 ± 5,0*	121,0 ± 15,0	1,7 ± 0,4
Черная субстанция	30,0 ± 10,0	40,0 ± 6,0	1,3 ± 0,5

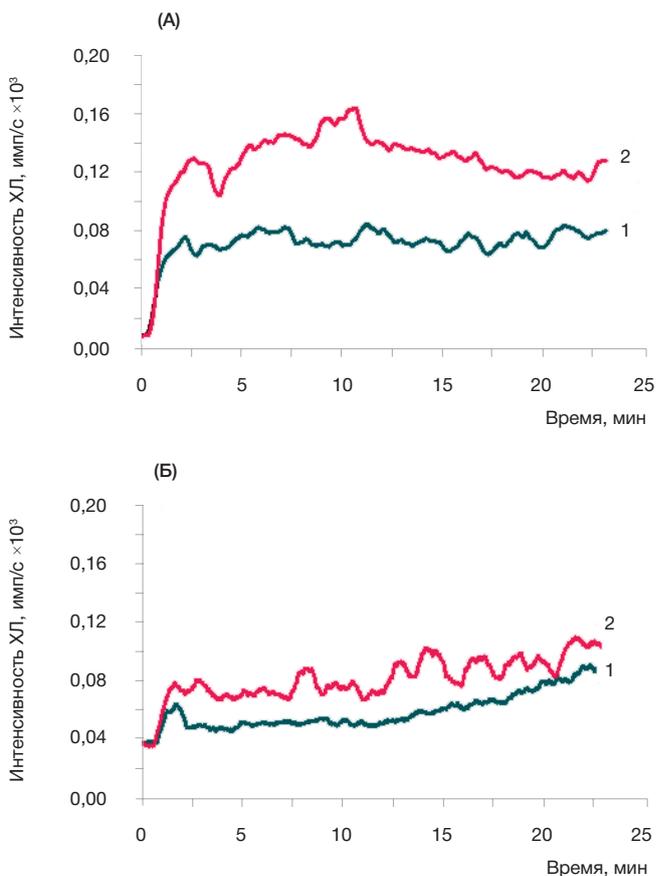
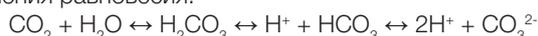


Рис. 4. Развитие люцигенин-активированной хемилюминесценции в срезах ткани мозга мышей, содержащей стриатум (А) и черную субстанцию (Б). Обозначения: 1 — кривая для контрольного образца, 2 — кривая для опытного образца.

дит изменение водородного показателя, и объема буферной системы Кребса–Рингера (2 мл на 1 мг ткани) оказывается недостаточно для стабилизации pH на уровне 7,4. С одной стороны, использование проточной системы может помочь решить выявленную проблему за счет постоянного обновления раствора, омывающего ткань. Но необходимое техническое дооснащение установки и увеличение расхода реактивов делают этот подход трудноосуществимым. С другой стороны, возможность изменения состава газовой смеси для аэрации раствора, а именно: увеличение содержания CO₂, — является более простым и доступным способом. Насыщение омывающего раствора углекислотой позволяет удерживать pH на постоянном уровне за счет растворения газа в воде и установления равновесия:



Нами было показано, что аэрация газовой смесью, содержащей 4–5 % углекислого газа, является оптимальной для использования метода.

Известно, что ключевую роль в инфарктных состояниях человека играет цикл гипоксии/реоксигенация. При этом наиболее сильные повреждения ткань получает при резком увеличении образования активных форм кислорода и гибнет после возобновления кровоснабжения. Оценка уровня образования супероксид анион-радикала при различной продолжительности гипоксии показала, что циклическое воздействие коротких периодов гипоксии приводило к меньшей продукции свободных радикалов по сравнению с более длительными периодами гипоксии.

Регистрация люцигенин-активированной ХЛ в условиях аэрации образца ткани кислородсодержащей газовой смесью показала увеличение уровня образования CAP в ткани мозга уже через 12 ч после введения последней дозы пронеуротоксина. Это свидетельствует о том, что увеличение продукции свободных радикалов, приводящее к дегенерации нервных клеток, происходит задолго до проявления первых клинических симптомов патологии.

ВЫВОДЫ

Оптимизированы условия использования метода люцигенин-активированной хемилюминесценции для оценки радикал-продуцирующей способности биологических тканей. Подобраны составы кислородсодержащей и бескислородной газовой смесей для аэрации опытного образца, позволяющие поддерживать pH омывающего раствора на уровне 7,4.

Продемонстрирована возможность использования метода для оценки уровня образования радикалов при гипоксии и паркинсонизме. Показано достоверное увеличение уровня образования радикалов в ткани сердца для циклов гипоксии длительностью 150 мин — в 1,8 раза, 240 мин — в 2,0 раза. При паркинсонизме уровень образования CAP в областях стриатума и черной субстанции через 12 ч после введения последней дозы пронеуротоксина оказался выше в 1,7 и 1,3 раза соответственно в сравнении с контролем.

Литература

- Holt IJ, Cooper JM, Morgan-Hughes JA, Harding AE: Deletions of muscle mitochondrial DNA. *Lancet*. 1988 Jun 25; 1 (8600):1462.
- DiDonato S: Multisystem manifestations of mitochondrial disorders. *Journal of neurology* 2009 May; 256 (5): 693–710.
- Kaminsky VO, Zhivotovsky B: Free radicals in cross talk between autophagy and apoptosis. *Antioxid Redox Signal*. 2014 Jul 1; 21 (1): 86–102.
- Kagan VE, Tyurin VA, Jiang J, Tyurina YY, Ritov VB, Amoscato AA, et al. Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nature chemical biology*. 2005 Sep; 1 (4): 223–32.
- Sinha K, Das J, Pal PB, Sil PC. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Archives of toxicology*. 2013; 87 (7): 1157–80.
- Льюин Б. Клетки. 9-е изд. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний; 2011. 896 с.
- Anderson G, Maes M. Neurodegeneration in Parkinson's disease: interactions of oxidative stress, tryptophan catabolites and depression with mitochondria and sirtuins. *Mol Neurobiol*. 2014; 49 (2): 771–83.
- Caldeira GL, Ferreira IL, Rego AC. Impaired transcription in Alzheimer's disease: key role in mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *J Alzheimers Dis*. 2013; 34 (1): 115–31.
- Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993 Apr 29; 362 (6423): 801–9.
- Madeo J, Zubair A, Marianne F. A review on the role of quinones in renal disorders. *Springerplus*. 2013; 2 (1): 139.
- Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation research*. 2010; 107 (9): 1058–70.
- Chang JC, Liu KH, Li YC, Kou SJ, Wei YH, Chuang GS, et al. Functional recovery of human cells harbouring the mitochondrial DNA mutation MERRF A8344G via peptide-mediated mitochondrial delivery. *Neurosignals*. 2013; 21 (3–4): 160–73.
- Sadun AA, Carelli V. The role of mitochondria in health, ageing, and diseases affecting vision. *Br J Ophthalmol*. 2006 Jul; 90 (7): 809–10.
- Betts J, Jaros E, Perry RH, Schaefer AM, Taylor RW, Abdel-All Z, et al. Molecular neuropathology of MELAS: level of heteroplasmy in individual neurones and evidence of extensive vascular involvement. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2006; 32 (4): 359–73.
- Mahato B, Jash S, Adhya S. RNA-mediated restoration of mitochondrial function in cells harboring a Kearns Sayre Syndrome mutation. *Mitochondrion*. 2011; 11 (4): 564–74.
- Zenker M, Aigner T, Wendler O, Tralau T, Muntefering H, Fenski R, et al. Human laminin beta2 deficiency causes congenital nephrosis with mesangial sclerosis and distinct eye abnormalities. *Hum Mol Genet*. 2004; 13 (21): 2625–32.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90 (17): 7915–22.
- Elias RJ, McClements DJ, Decker EA. Antioxidant activity of cysteine, tryptophan, and methionine residues in continuous phase beta-lactoglobulin in oil-in-water emulsions. *J Agric Food Chem*. 2005; 53 (26): 10248–53.
- Ruberg M, France-Lanord V, Brugg B, Lambeng N, Michel PP, Anglade P, et al. [Neuronal death caused by apoptosis in Parkinson disease]. *Revue neurologique*. 1997; 153 (8–9): 499–508. French.
- Kagan VE, Bayir HA, Belikova NA, Kapralov O, Tyurina YY, Tyurin VA, et al. Cytochrome c/cardiolipin relations in mitochondria: a kiss of death. *Free Radic Biol Med*. 2009; 46 (11): 1439–53.
- Belikova NA, Tyurina YY, Borisenko G, Tyurin V, Samhan Arias AK, Yanamala N, et al. Heterolytic reduction of fatty acid hydroperoxides by cytochrome c/cardiolipin complexes: antioxidant function in mitochondria. *J Am Chem Soc*. 2009; 131 (32): 11288–9.
- Vladimirov YA. Free radical lipid peroxidation in biomembranes: Mechanism, regulation, and biological consequences. In: Johnson JE, Jr., Walford R, Harman D, Miquel J, editors. *Free Radicals, Aging, and Degenerative Diseases*. New York: Allan R. Liss, Inc.; 1986. p.141–95.
- Vladimirov YA, Olenev VI, Suslova TB, Cheremisina ZP. Lipid peroxidation in mitochondrial membrane. *Adv Lipid Res*. 1980; (17): 173–249.

24. Skulachev VP. Mitochondria in the programmed death phenomena; a principle of biology: «it is better to die than to be wrong». IUBMB Life. 2000; 49 (5): 365–73.
25. Владимиров Ю. А., Проскурнина Е. В., Измайлов Д. Ю. Кинетическая хемилюминесценция как метод изучения реакций свободных радикалов. Биофизика. 2011; 56 (6): 1081–90.
26. Полимова А. М., Хакимова Г. Р., Владимиров Г. К., Жидкова Т. В., Измайлов Д. Ю., Проскурнина Е. В и др. Активированная хемилюминесценция как метод оценки радикалообразующей способности ткани мозга. Технологии живых систем. 2012; 9 (10): 3–12.
27. Sasaki T, Iwamoto A, Tsuboi H, Watanabe Y. Development of real-time bioradiographic system for functional and metabolic imaging in living brain tissue. Brain research. 2006; 1077 (1): 161–9.
28. Oosthuizen MM, Engelbrecht ME, Lambrechts H, Greyling D, Levy RD. The effect of pH on chemiluminescence of different probes exposed to superoxide and singlet oxygen generators. J Biolumin Chemilumin. 1997; 12 (6): 277–84.
29. Ugrumov MV, Khaindrava VG, Kozina EA, Kucheryanu VG, Bocharov EV, Kryzhanovsky GN, et al. Modeling of presymptomatic and symptomatic stages of parkinsonism in mice. Neuroscience. 2011; 181: 175–88.

References

1. Holt IJ, Cooper JM, Morgan-Hughes JA, Harding AE: Deletions of muscle mitochondrial DNA. Lancet. 1988 Jun 25; 1 (8600):1462.
2. Di Donato S: Multisystem manifestations of mitochondrial disorders. Journal of neurology 2009 May; 256 (5): 693–710.
3. Kaminsky VO, Zhivotovsky B: Free radicals in cross talk between autophagy and apoptosis. Antioxid Redox Signal. 2014 Jul 1; 21 (1): 86–102.
4. Kagan VE, Tyurin VA, Jiang J, Tyurina YY, Ritov VB, Amoscato AA, et al. Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. Nature chemical biology. 2005 Sep; 1 (4): 223–32.
5. Sinha K, Das J, Pal PB, Sil PC. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. Archives of toxicology. 2013; 87 (7): 1157–80.
6. Lyuin B. Kletki. 9th ed. M.: BINOM. Laboratoriya znaniy; 2011. 896 p. Russian.
7. Anderson G, Maes M. Neurodegeneration in Parkinson's disease: interactions of oxidative stress, tryptophan catabolites and depression with mitochondria and sirtuins. Mol Neurobiol. 2014; 49 (2): 771–83.
8. Caldeira GL, Ferreira IL, Rego AC. Impaired transcription in Alzheimer's disease: key role in mitochondrial dysfunction and oxidative stress. J Alzheimers Dis. 2013; 34 (1): 115–31.
9. Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. Nature. 1993 Apr 29; 362 (6423): 801–9.
10. Madeo J, Zubair A, Marianne F. A review on the role of quinones in renal disorders. Springerplus. 2013; 2 (1): 139.
11. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. Circulation research. 2010; 107 (9): 1058–70.
12. Chang JC, Liu KH, Li YC, Kou SJ, Wei YH, Chuang CS, et al. Functional recovery of human cells harbouring the mitochondrial DNA mutation MERRF A8344G via peptide-mediated mitochondrial delivery. Neurosignals. 2013; 21 (3–4): 160–73.
13. Sadun AA, Carelli V. The role of mitochondria in health, ageing, and diseases affecting vision. Br J Ophthalmol. 2006 Jul; 90 (7): 809–10.
14. Betts J, Jaros E, Perry RH, Schaefer AM, Taylor RW, Abdel-Ail Z, et al. Molecular neuropathology of MELAS: level of heteroplasmy in individual neurones and evidence of extensive vascular involvement. Neuropathol Appl Neurobiol. 2006; 32 (4): 359–73.
15. Mahato B, Jash S, Adhya S. RNA-mediated restoration of mitochondrial function in cells harboring a Kearns Sayre Syndrome mutation. Mitochondrion. 2011; 11 (4): 564–74.
16. Zenker M, Aigner T, Wendler O, Tralau T, Muntefering H, Fenski R, et al. Human laminin beta2 deficiency causes congenital nephrosis with mesangial sclerosis and distinct eye abnormalities. Hum Mol Genet. 2004; 13 (21): 2625–32.
17. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993; 90 (17): 7915–22.
18. Elias RJ, McClements DJ, Decker EA. Antioxidant activity of cysteine, tryptophan, and methionine residues in continuous phase beta-lactoglobulin in oil-in-water emulsions. J Agric Food Chem. 2005; 53 (26): 10248–53.
19. Ruberg M, France-Lanord V, Brugg B, Lambeng N, Michel PP, Anglade P, et al. [Neuronal death caused by apoptosis in Parkinson disease]. Revue neurologique. 1997; 153 (8–9): 499–508. French.
20. Kagan VE, Bayir HA, Belikova NA, Kapralov O, Tyurina YY, Tyurin VA, et al. Cytochrome c/cardiolipin relations in mitochondria: a kiss of death. Free Radic Biol Med. 2009; 46 (11): 1439–53.
21. Belikova NA, Tyurina YY, Borisenko G, Tyurin V, Samhan Arias AK, Yanamala N, et al. Heterolytic reduction of fatty acid hydroperoxides by cytochrome c/cardiolipin complexes: antioxidant function in mitochondria. J Am Chem Soc. 2009; 131 (32): 11288–9.
22. Vladimirov YA. Free radical lipid peroxidation in biomembranes: Mechanism, regulation, and biological consequences. In: Johnson JE, Jr., Walford R, Harman D, Miquel J, editors. Free Radicals, Aging, and Degenerative Diseases. New York: Allan R. Liss, Inc.; 1986. p.141–95.
23. Vladimirov YA, Olenev VI, Suslova TB, Cheremisina ZP. Lipid peroxidation in mitochondrial membrane. Adv Lipid Res. 1980; (17): 173–249.
24. Skulachev VP. Mitochondria in the programmed death phenomena; a principle of biology: «it is better to die than to be wrong». IUBMB Life. 2000; 49 (5): 365–73.
25. Владимиров Ю. А., Проскурнина Е. В., Измайлов Д. Ю. Кинетическая хемилюминесценция как метод изучения реакций свободных радикалов. Биофизика. 2011; 56 (6): 1081–90. Russian.
26. Полимова А. М., Хакимова Г. Р., Владимиров Г. К., Жидкова Т. В., Измайлов Д. Ю., Проскурнина Е. В и др. Активированная хемилюминесценция как метод оценки радикалообразующей способности ткани мозга. Технологии живых систем. 2012; 9 (10): 3–12. Russian.
27. Sasaki T, Iwamoto A, Tsuboi H, Watanabe Y. Development of real-time bioradiographic system for functional and metabolic imaging in living brain tissue. Brain research. 2006; 1077 (1): 161–9.
28. Oosthuizen MM, Engelbrecht ME, Lambrechts H, Greyling D, Levy RD. The effect of pH on chemiluminescence of different probes exposed to superoxide and singlet oxygen generators. J Biolumin Chemilumin. 1997; 12 (6): 277–84.
29. Ugrumov MV, Khaindrava VG, Kozina EA, Kucheryanu VG, Bocharov EV, Kryzhanovsky GN, et al. Modeling of presymptomatic and symptomatic stages of parkinsonism in mice. Neuroscience. 2011; 181: 175–88.

СЫВОРОТОЧНЫЙ АЛЬБУМИН КАК ИСТОЧНИК И МИШЕНЬ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ В ПАТОЛОГИИ

М. М. Созарукова ✉, Е. В. Проскурнина, Ю. А. Владимиров

Кафедра медицинской биофизики факультета фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

Окислительный стресс, вызванный избыточным накоплением прооксидантов и/или истощением антиоксидантов, является важным патогенетическим фактором. Он вызывает окислительную модификацию макромолекул, и одной из мишеней окислителей являются белки. Среди антиоксидантов в плазме крови человека особый интерес в качестве мишени для активных форм кислорода представляет сывороточный альбумин. В нашем кратком обзоре он рассмотрен как мишень для свободных радикалов и антиоксидант, а также как источник свободных радикалов в комплексе с ионами меди. Проанализированы возможные мишени свободных радикалов в структуре белка и последствия воздействия радикалов на них. Уделено внимание роли гликозилирования как одного из факторов, способствующих окислительной модификации белков. Приведены собственные экспериментальные данные об изменениях в структуре альбумина при разных моделях окислительного стресса, полученные спектрофлуориметрическим методом, проиллюстрировано усиление антиоксидантных свойств альбумина при физической модели окислительного стресса (ультрафиолетовое облучение).

Ключевые слова: окислительный стресс, свободные радикалы, сывороточный альбумин человека

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-15-00375).

✉ **Для корреспонденции:** Мадина Магамедовна Созарукова
117192, г. Москва, Ломоносовский просп., д. 31, корп. 5; sozarukovamsu@gmail.com

Статья поступила: 30.09.2015 **Принята к печати:** 09.12.2015

SERUM ALBUMIN AS A SOURCE OF AND A TARGET FOR FREE RADICALS IN PATHOLOGY

Sozarukova MM ✉, Proskurnina EV, Vladimirov YuA

Faculty of Fundamental Medicine, Department of Medical Biophysics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Oxidative stress caused by excessive accumulation of pro-oxidants and/or depletion of antioxidants, is an important pathogenic factor. Oxidative stress leads to oxidative modification of macromolecules. Proteins are a target for oxidizing agents. Of other antioxidants in human blood plasma, serum albumin is particularly interesting as a target for reactive oxygen species. In this brief review albumin is looked upon as a target for free radicals, an antioxidant, and a source of free radicals in its complexes with copper ions. Possible targets for free radicals in protein structure and the consequences of their exposure to free radicals attacks have been analyzed. The role of glycosylation in contributing to protein oxidative modification has been studied. The original experimental data on albumin structure changes in various models of oxidative stress obtained by a spectrofluorimetric method are presented. Increased antioxidant properties of albumin modified in a physical model of oxidative stress (UV-irradiation) have been described.

Keywords: oxidative stress, free radicals, human serum albumin

Funding: this study was supported by the Russian Science Foundation (project no. 14-15-00375).

✉ **Correspondence should be addressed:** Madina Sozarukova
Lomonosovsky prospekt, d. 31, corp. 5, Moscow, Russia, 117192; sozarukovamsu@gmail.com

Received: 30.09.2015 **Accepted:** 09.12.2015

Свободные радикалы играют важную роль в клеточном метаболизме, а при избыточном накоплении вызывают ряд неблагоприятных эффектов, выражающихся в нарушениях структурной и функциональной организации клетки вплоть до ее гибели вследствие некроза или апоптоза. Нарушение баланса между свободными радикалами (прооксидантами) и антиоксидантами в пользу первых получило название «окислительный стресс» (ОС). Факторы, вызывающие ОС, различны, но все они в итоге приводят

к окислительной модификации макромолекул — ДНК, белков, а также к перекисидации липидов. Появилось новое научное направление — исследование окислительной модификации белков (ОМБ) [1]. Накопленные знания в этой области не только имеют фундаментальное значение, но и получили широкое практическое применение. В последнее время содержание окисленных белков стали определять в клетках крови и тканях, в результате чего был собран большой фактический материал. Установлено, что ОМБ

вызывает образование в организме продуктов окисления тирозина и триптофана, включая *o*- и *m*-тирозины, 3,4-дигидроксифенилаланин (ДОФА), карбонилы и другие окисленные производные; образуются димеры (дитиозины); происходит также аутооксидативное гликозилирование белков [2].

Действию свободнорадикального окисления противостоит многокомпонентная антиоксидантная система организма, в которую входят белки плазмы крови, обладающие антиоксидантными свойствами [3]. Ключевое место среди них принадлежит сывороточному альбумину человека (САЧ). Этот белок взаимодействует со свободными радикалами, претерпевая окислительную модификацию, и защищает организм. Окислительная модификация альбумина приводит к потере или полному исчезновению его многообразной функциональной активности, что само по себе может вызвать множество эффектов. Однако при этом САЧ приобретает новые свойства и, возможно, начинает выполнять новые функции. Помимо прочего, окислительно-модифицированный альбумин может служить эффективным маркером ОС.

В связи с возросшим интересом к роли САЧ при свободнорадикальном окислении представлялось важным обобщить накопленный материал, рассмотрев данный белок с двух позиций — как источник и как мишень свободных радикалов.

Сывороточный альбумин как источник свободных радикалов

В плазме крови церулоплазмин и альбумин — два основных белка, ответственных за связывание и транспорт меди, которые одновременно предотвращают ее вредное действие на другие белки плазмы, клетки самой крови и окружающих тканей [4]. Церулоплазмин содержит медь в активном центре, и реакции с участием этого белка не сопровождаются образованием каких-либо радикалов. Второй по величине плазменный пул меди связан с САЧ, который содержит один сайт высокого сродства по отношению к ней, N-терминальный трипептид ($\text{Cu}^{2+}/\text{Ni}^{2+}$ -связывающий мотив) Asp-Ala-His [5]. В обычных условиях лишь менее 1 % общего альбумина содержит связанную медь, но этого достаточно для образования в крови большого количества радикалов. При некоторых патологических состояниях, например болезни Вильсона или артрите, уровень альбумин-связанной меди может быть значительно увеличен (в 2–5 раз) [6–8].

Вопрос о том, в каких условиях и по каким причинам может изменяться радикал-продуцирующая (то есть прооксидантная) активность комплекса САЧ с ионами меди, был подробно изучен Y. A. Gryzunov и соавт. [9]. В указанной работе исследованы, во-первых, влияние модификации аминокислотного остатка цистеин-34 (Cys-34) на каталитическую активность комплекса, а во-вторых, действие неэстерифицированных жирных кислот при их связывании альбумином. Критерием прооксидантной активности комплекса служила скорость образования радикалов аскорбиновой кислоты, определяемая методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), поскольку аскорбиновая кислота является одним из основных перехватчиков свободных радикалов в плазме крови. При соотношении меди и альбумина ниже 1 : 1 связанная медь была практически редокс-неактивной, но лишь до тех пор, пока Cys-34 был в восстановленном состоянии (назовем

неактивный комплекс Cu/CA4-SH). Алкилирование, нитрозилирование или окисление тиоловой группы приводило к появлению каталитической радикал-продуцирующей активности комплекса (Cu/CA4). Эта активность была ниже активности свободных ионов меди, не связанных с альбумином, более чем на порядок, но важно отметить, что она все-таки была. Методом ультрафильтрации было доказано, что активностью обладает именно комплекс со стехиометрией медь/белок 1 : 1, а не свободные ионы меди, случайно образовавшиеся при обработке комплекса Cu/CA4-SH.

В указанной работе [9] было также обнаружено, что комплекс Cu/CA4-SH, будучи каталитически неактивным, если альбумин не содержал примесей жирных кислот, приобретал радикал-продуцирующую активность при связывании свободных жирных кислот в результате изменения при этом конформации белка. Как изменение конформации, оцененное по флуоресценции зондов (зонды I и II на рис. 1), так и каталитическая активность достигали максимума при молярном соотношении жирной кислоты и белка 3 : 1 для олеиновой кислоты и 2 : 1 для линолевой. При этом параллельно связыванию жирных кислот и вызываемым данным процессом глубоким конформационным изменениям наблюдалось окисление SH-групп Cys-34 и одновременно — увеличение редокс-активности медь-альбуминового комплекса. Авторами сделан вывод, что жирные кислоты регулируют анти-/прооксидантные свойства комплекса Cu/CA4 путем изменения редокс-статуса Cys-34.

Последовательность событий при этом можно представить следующим образом (рис. 1):

- 1) связывание жирных кислот в доменах белка I, II и III;
- 2) изменение конформации альбумина (изменяется флуоресценция зондов I и II);
- 3) активация каталитической (редокс-) активности комплекса Cu в центре связывания;
- 4) окисление SH-группы Cys-34;
- 5) катализируемое Cu/CA4 окисление других молекул растворенным кислородом с образованием радикалов (окислительный стресс).

Таким образом, прооксидантные свойства комплекса САЧ с ионами меди реализуются лишь после окисления SH-группы белка или взаимодействия тиоловой группы с монооксидом азота (NO).

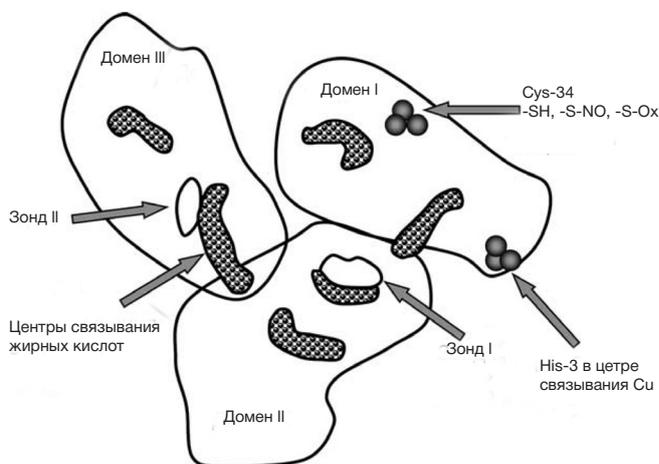


Рис. 1. Схема расположения центров связывания жирных кислот, меди, а также локализация зондов I и II в доменах I, II и III в структуре САЧ

Сывороточный альбумин как мишень свободных радикалов

Существует большое число данных о том, что САЧ обладает антиоксидантной активностью, которая обусловлена не одной, а по меньшей мере тремя причинами: 1) связыванием металлов переменной валентности, например меди; 2) реакцией со свободными радикалами (ловушка радикалов); 3) образованием при окислительной модификации продуктов, обладающих антиоксидантными свойствами.

Если добавить САЧ к липопротеинам крови, которые быстро окисляются в присутствии ионов меди, то перекисное окисление липидов в липопротеинах резко тормозится [10], однако не исчезает полностью, поскольку в комплексе с альбумином медь сохраняет каталитическую активность. Таким образом, САЧ является антиоксидантом, потому что образует комплекс с ионами меди, но этот комплекс сам по себе может быть прооксидантом, что зависит от количества связанной с альбумином меди в плазме крови и активности этого комплекса. Как уже было отмечено, связывание NO и жирных кислот, а также химическая модификация тиоловой группы Cys-34 делают комплекс Cu/САЧ каталитически активным. Напротив, нативный САЧ полностью подавляет каталитическую активность ионов меди.

Перехватчиком (ловушкой) радикалов в сывороточном альбумине служит прежде всего SH-группа Cys-34, благодаря которой САЧ составляет основную часть активных тиолов в плазме крови [11, 12]. Окисление Cys-34 приводит к образованию сульфеновой кислоты (RSOH), которая в дальнейшем окисляется до сульфиновой (RSO₂H) или сульфоновой (RSO₃H) [13]. Поскольку, как уже было сказано, SH-группы служат защитой от свободнорадикального окисления [14, 15], их концентрация в плазме крови заметно снижается при усилении ОС, в том числе при многих заболеваниях [16–18], а также при старении [19]. K. Oettl и соавт. методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с флуоресцентным детектированием исследовали редокс-состояние САЧ (Cys-34) в качестве возможного системного маркера ОС у больных с различными заболеваниями (катарактой, глаукомой, возрастной дегенерацией желтого пятна, сахарным диабетом, диабетической ретинопатией и гипертензией) с осложнениями и без осложнений и с учетом возможных возрастных последствий [20].

Другой аминокислотой, чувствительной к действию свободных радикалов, является метионин. В состав САЧ входят 6 остатков метионина. Действие самых разнообразных окислителей приводит к образованию метионинсульфоксида (MetSO). Однако изменения в свойствах САЧ, вызываемые свободными радикалами, в случае с метионином трактуются не вполне однозначно. Если спроецировать ситуацию на ферменты, то можно обратиться к работе R. Levine и соавт. [21], в которой автор на примере глутамин-синтазы установил, что предпочтительное окисление незащищенных метиониновых остатков ферментов мало сказывается на выполняемых ею биологических функциях. Вместе с тем в работе высказано предположение, что цикл окисления и восстановления метиониновых остатков в биологических системах может служить фактором защиты от активных форм кислорода и предотвращать другие функционально важные изменения в структуре белка.

Третьей мишенью для свободных радикалов в сывороточном альбумине служат ароматические аминокислоты, которые в условиях ОС могут подвергаться окислительной модификации. В состав САЧ входят 18 остатков

тирозина и 1 остаток триптофана. Результат окислительной модификации свободных тирозина и триптофана, а также альбумина — усиление защитных свойств белка, поскольку образуются продукты окисления, являющиеся антиоксидантами [22]. В частности, одним из таких продуктов в случае тирозина выступает ДОФА [22].

Таким образом, под действием свободных радикалов САЧ теряет свободную тиоловую группу цистеина, часть тирозиновых и триптофановый остаток. Чем выше уровень ОС в крови человека (по другой терминологии — системного ОС), тем сильнее степень потери тиолов и ароматических аминокислот. Оба этих критерия в настоящее время используются для оценки уровня ОС в клинической практике. Заметим при этом, что ароматические аминокислоты, входящие в состав САЧ, являются природными флуорофорами, а следовательно, изучение их окислительной деструкции можно проводить простым и чувствительным методом регистрации ультрафиолетовой (УФ) флуоресценции. Этому вопросу посвящен ряд работ. Снижение флуоресценции САЧ наблюдали при исследовании влияния гликозилирования [23] и свободных радикалов [24], моделируя сахарный диабет. Авторами была обнаружена четкая корреляция между конформационными изменениями молекулы белка и его антиоксидантными свойствами, подтверждена ключевая роль ионов меди при проявлении прооксидантных свойств альбумина. Аналогичные эффекты снижения интенсивности аналитического сигнала, представляющие полезный индекс деградации аминокислот и демонстрирующие четкую зависимость окисления и конформационных перестроек белка, были обнаружены при исследовании воздействия индивидуального гидроксильного радикала ($\bullet\text{OH}$) и его комбинации с супероксидным анион-радикалом ($\bullet\text{OH} + \bullet\text{O}^{2-}$) на белки [25]; при изучении окисления тиоловых групп и увеличения числа фруктозаминнов у пациентов, страдающих обструктивным апноэ сна [26]; при оценке структурных изменений белка, опосредованных взаимодействием с пероксинитритом (окислением триптофана и цистеина, нитрованием тирозина, формированием дитирозина, продуцированием 2,4-реактивного динитрофенилгидразина, карбониллов и фрагментацией молекулы) [27]; при моделировании «мягкого» ОС, вызванного действием аскорбата, кислорода и следовых количеств металлов [28]; наконец, при исследовании корреляции роста окислительной модификации САЧ с увеличением степени тяжести печеночной недостаточности, характеризующейся повышенным содержанием карбонильных групп и одновременно окислением Cys-34 [29].

В последнее время было показано, что окислительная модификация белков усиливается в результате их гликозилирования [30]. В работе J. V. Hunt, S. P. Wolff [30] этот факт был продемонстрирован на примере триптофана. Более того, многими наблюдениями установлено, что гликозилирование и окисление тесно связаны друг с другом: гликозилирование не только усиливает процесс окисления, но и само усиливается им (для описания этого свойства был даже введен термин «glycooxidation» — гликооксидация, от англ. glucosylation и oxidation) [31]. F. Monacelli и соавт. [31] с помощью флуоресцентной спектроскопии и метода кругового дихроизма исследовали конечные продукты окисления и гликозилирования, а также конформационные изменения САЧ после инкубации с рибозой, аскорбиновой кислотой (АК) и диэтилентриамин-пентауксусной кислотой (ДТПК) в различных комбинациях. Установлено, что рибоза вызывает значительное повышение уровня пентозидина (маркера гликозилирования), при этом АК и

ДТПК предотвращают его накопление, особенно на более поздних стадиях инкубации. Рибоза умеренно увеличивала содержание продуктов окисления белка, в то время как АК сильно ингибировала их формирование. Кроме того, рибоза в комбинации с АК способствовала дополнительному увеличению образования продуктов окисления, а ДТПК затормаживала АК-индуцированное образование продуктов окисления белка. Методом кругового дихроизма получены результаты, позволяющие утверждать, что АК и ДТПК являются сильными модификаторами α -спиральной части структуры САЧ, в то время как рибоза влияет на структуру белка только на более поздних стадиях инкубации.

На основании анализа литературы ранее в нашей лаборатории была проведена серия экспериментов по использованию САЧ в качестве маркера при различных моделях ОС с оценкой структурных изменений альбумина методом спектрофлуориметрии и его антиоксидантных свойств — методом люминол-активированной хемилюминесценции (с некоторыми модификациями) [32]. Растворы люминола $C_8H_7N_3O_2$ (Sigma-Aldrich, США, $M = 177,16$), САЧ (Sigma-Aldrich, $M = 69\ 000$), АБАП (2,2'-азобис(2-амидинопропан) дигидрохлорид, Fluka, Германия) были приготовлены растворением соответствующих навесок в фосфатном буферном растворе (KH_2PO_4 , ЧДА). Рабочую концентрацию вещества, использованного в качестве стимула нейтрофилов, — N-формил-метионин-лейцин-фенилаланина (ФМЛФ, Sigma-Aldrich) получали разбавлением исходного раствора средой (раствор Хенкса с глюкозой / HEPES). Для облучения брали образцы со значением оптической плотности не более 0,2 для обеспечения равномерного поглощения УФ во всем объеме раствора и линейности регистрации спектров флуоресценции. Нейтрофилы выделяли из крови пациентов с гранулематозом Вегенера (Клиника нефрологии, внутренних и профессиональных болезней им. Е. М. Тареева). Все измерения выполняли на спектрофлуориметре RF-5301 PC (SHIMADZU, Япония) и на хемилюминиметре Lum-5773 («ДИСофт», Россия) с программным обеспечением PowerGraph, спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Specord 200 (Jena Eng., Германия). Образцы облучали на приборе Bio-Link (Vilber Lourmat, Франция), позволяющем осуществлять дозирующее воздействие, с эффективной длиной

коротковолнового излучения 254 нм. В работе использовали следующие модели ОС: физико-химическую (термоиндуцированный распад АБАП), химическую (действие на альбумин радикалов супероксида и гидроксила, образующихся в системе Co^{2+}/H_2O_2), физическую (воздействие различных доз УФ-облучения), биологическую (образование радикалов при активации клеток-фагоцитов). Полученные экспериментальные спектры флуоресценции представлены на рис. 2. Во всех экспериментах в качестве среды был использован фосфатный буферный раствор 100 Мм, pH 7,4; длина волны возбуждения для регистрации спектров флуоресценции составляла 260 нм.

Как показывают результаты исследования, при всех моделях ОС наблюдается окислительная модификация белка, что проявляется в снижении интенсивности флуоресценции. Более подробно была рассмотрена физическая модель ОС (УФ-облучение). Полученные экспериментальные данные представлены на рис. 3. Во всех экспериментах в качестве среды был использован фосфатный буферный раствор 100 Мм, pH 7,4; длина волны возбуждения для регистрации спектров флуоресценции составляла 260 нм. Регистрацию хемилюминесценции осуществляли следующим образом: в кювете смешивали растворы АБАП и люминола, полученную смесь инкубировали 20 мин при комнатной температуре в темноте, после чего к смеси АБАП и люминола добавляли фосфатный буферный раствор, нагретый в термостате до 37 °С. Кювету устанавливали в прибор и регистрировали кривую развития хемилюминесценции с выходом на плато. После выхода кривой на стационарный уровень генерации радикалов в систему вносили аликвоту антиоксиданта (САЧ).

На рис. 3 продемонстрированы дозозависимое снижение интенсивности аналитического сигнала под действием УФ и одновременное усиление антиоксидантных свойств САЧ: увеличивается площадь «провала» (латентный период, $t_{лат}$ — время, в течение которого наблюдается тушение флуоресценции под кривой). Это можно объяснить тем, что в результате окисления ароматических аминокислот образуются продукты с антиоксидантными свойствами [22]. На рис. 4 приведена корреляция между снижением интенсивности флуоресценции и ростом антиоксидантной активности ($t_{лат}$, мин).

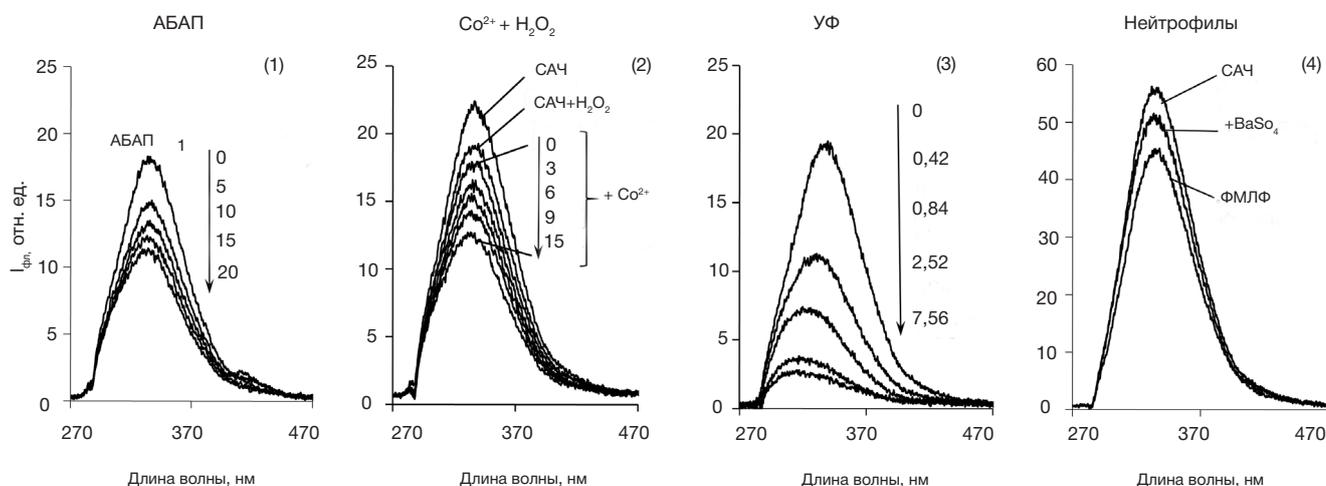


Рис. 2. Спектры флуоресценции, полученные в результате исследования. (1) САЧ (0,66 мкМ) и АБАП (2,5 мМ), цифры у кривых указывают время инкубации. (2) САЧ (0,66 мкМ), H_2O_2 (3 мМ) и Co^{2+} (0,3 мМ), цифры у кривых САЧ + H_2O_2 + Co^{2+} указывают время после добавления Co^{2+} в систему: 0, 3, 6, 9 и 15 мин. (3) САЧ (0,66 мкМ), цифры у кривых указывают дозы УФ-облучения, кДж/см². (4) САЧ (фракция, выделенная из плазмы и разбавленная в соотношении 1 : 100) и добавки нейтрофилов, стимулированных сульфатом бария и ФМЛФ

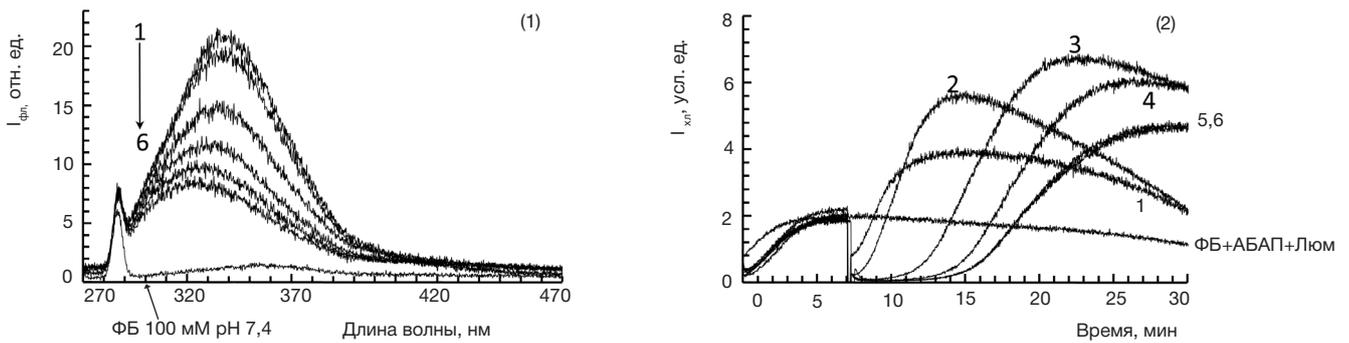


Рис. 3. Изменение флуоресцентных и антиоксидантных свойств САЧ при воздействии различных доз УФ-облучения. (1) Спектры флуоресценции САЧ (0,66 мкМ); белок подвергся действию разных доз УФ-облучения (цифры указывают дозы, Дж/см²: 0 — нативный белок, 1 — 0,050, 2 — 0,200, 3 — 0,400, 4 — 0,600, 5 — 0,800, 6 — 1,000). (2) Кривые развития хемилюминесценции САЧ (0,66 мкМ), подвергшегося действию разных доз УФ-облучения (цифры у кривых указывают дозы, Дж/см²), в системе, содержащей фосфатный буферный раствор (ФБ) (37 °С), АБАП (2,5 мМ), люминол (Люм) (2 мкМ), общий объем системы — 1,000 мл

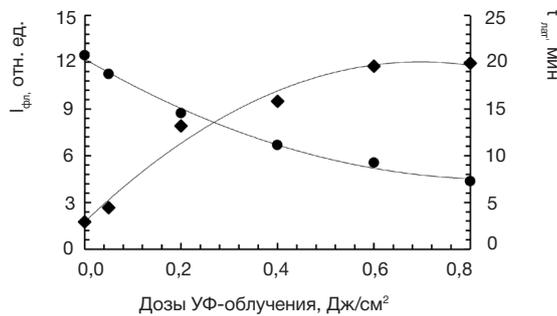


Рис. 4. Сравнение изменения флуоресценции САЧ (0,66 мкМ) ($\lambda_{\text{max}}^{340} = 337$ нм) и роста общей антиоксидантной активности ($t_{\text{ант}}$, мин) с увеличением дозы воздействия коротковолнового излучения, Дж/см²

Выводы

Проведен анализ и обобщены известные экспериментальные данные о роли альбумина как источника и одновременно мишени свободных радикалов. С альбумином связан второй по величине пул меди в плазме крови. При различных патологических состояниях уровень альбумин-связанной меди повышается. Рассмотрены механизм и условия реализации прооксидантных свойств образующегося комплекса. Вместе с тем сам по себе альбумин является основным защитным белком плазмы, и данная функция реализуется прежде всего за счет его способности перехватывать свободные радикалы. Протекторные свойства альбумина проявляются в первую очередь благодаря наличию SH-групп цистеина-34. Некоторый вклад в это могут вносить 6 остатков другой аминокислоты —

метионина, также весьма чувствительные к окислению. Наконец, за образование продуктов, обладающих выраженными антиоксидантными свойствами, ответственны ароматические аминокислоты — последний факт подкреплен собственным экспериментальным материалом. Окислительная модификация сывороточного альбумина в разных моделях окислительного стресса была оценена спектрофлуориметрическим методом, более подробно разобрана физическая модель (ультрафиолетовое облучение): показано дозозависимое снижение интенсивности аналитического сигнала при одновременном усилении антиоксидантных свойств белка, которые отслеживали с помощью метода люминол-активированной хемилюминесценции. Одним из продуктов, обладающих антиоксидантными свойствами, оказался ДОФА, образующийся в результате окисления тирозина.

Литература

1. Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med.* 2006; 10 (2): 389–406.
2. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J.* 1997; 324 (1): 1–18.
3. Gwinner W, Grone HJ. Role of reactive oxygen species in glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant.* 2000; 15 (8): 1127–32.
4. Linder MC, Wooten L, Cerveza P, Cotton S, Shulze R, Lomeli N. Copper transport. *Am J Clin Nutr.* 1998; 67 (5): 965S–71S.
5. Laussac JP, Sarkar B. Characterization of the copper(II)- and nickel(II)-transport site of human serum albumin. *Studies of copper(II) and nickel(II) binding to peptide 1–24 of human serum albumin by 13C and 1H NMR spectroscopy.* *Biochemistry.* 1984; 23 (12): 2832–8.
6. Dastyk M. Serum levels of zinc, copper and selenium in patients with Wilson's disease treated with zinc. *Vnitř Lek.* 1999; 45 (4): 217–9.
7. Rafter GW. Rheumatoid arthritis: a disturbance in copper homeostasis. *Med Hypotheses.* 1987; 22 (3): 245–9.
8. Suzuki KT, Shiobara Y, Tachibana A, Oqra Y, Matsumoto K. Copper increases in both plasma and red blood cells at the onset of acute hepatitis in LEC rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 1999; 103 (2): 189–94.
9. Gryzunov YA, Arroyo A, Vigne JL, Zhao Q, Tyurin VA, Hubel CA, et al. Binding of fatty acids facilitates oxidation of cysteine-34

- and converts copper-albumin complexes from antioxidants to prooxidants. *Arch Biochem Biophys.* 2003; 413 (1): 53–66.
10. Thomas CE. The influence of medium components on Cu(2+)-dependent oxidation of low-density lipoproteins and its sensitivity to superoxide dismutase. *Biochim Biophys Acta.* 1992; 1128 (1): 50–7.
 11. Carter DC, Ho JX. Structure of serum albumin. *Adv Protein Chem.* 1994; 45: 153–203.
 12. Schauenstein E, Dachs F. Quantification and localisation of SH-groups in human blood serum proteins. *Z Naturforsch C.* 1978; 33 (9–10): 803.
 13. Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett.* 2008; 582 (13): 1783–7.
 14. Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys.* 1990; 280 (1): 1–8.
 15. Hu ML, Louie S, Cross CE, Motchnik P, Halliwell B. Antioxidant protection against hypochlorous acid in human plasma. *J Lab Clin Med.* 1993; 121 (2): 257–62.
 16. Hayakawa A, Kuwata K, Era S, Sogami M, Shimonaka H, Yamamoto M, et al. Alteration of redox state of human serum albumin in patients under anesthesia and invasive surgery. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1997; 698 (1–2): 27–33.
 17. Kumano K, Yokota S, Go M, Suyamal K, Sakail T, Era S, et al. Quantitative and qualitative changes of serum albumin in CAPD patients. *Adv Perit Dial.* 1992; 8: 127–30.
 18. Suzuki E, Yasuda K, Takeda N, Sakata S, Era S, Kuwata K, et al. Increased oxidized form of human serum albumin in patients with diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 1992; 18 (3): 153–8.
 19. Era S, Kuwata K, Imai H, Nakamura K, Hayashi T, Sogami M. Age-related change in redox state of human serum albumin. *Biochim Biophys Acta.* 1995; 1247 (1): 12–6.
 20. Oettl K, Reibnegger G, Schmut O. The redox state of human serum albumin in eye diseases with and without complications. *Acta Ophthalmol.* 2011; 89 (2): e174–9.
 21. Levine RL, Mosoni L, Berlett BS, Stadtman E. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93 (26): 15036–40.
 22. Polimova AM, Vladimirova GA, Proskurnina EV, Vladimirov YuA. Antioxidants as aromatic amino acid oxidation products. *Biofizika.* 2011; 56 (4): 581–6.
 23. Yuan F, Liu SX, Tian JW. Advanced oxidation protein products induce reactive oxygen species production in endothelial cells. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao.* 2004; 24 (12): 1350–2.
 24. Bourdon E, Loreau N, Blache D. Glucose and free radicals impair the antioxidant properties of serum albumin. *FASEB J.* 1999; 13 (2): 233–44.
 25. Davies KJ, Delsignore ME, Lin SW. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *J Biol Chem.* 1987; 262 (20): 9902–7.
 26. Faure P, Tamisier R, Baguet JP, Favier A, Halimi S, Lévy P, et al. Impairment of serum albumin antioxidant properties in obstructive sleep apnoea syndrome. *Eur Respir J.* 2008; 31 (5): 1046–53.
 27. Han JY, Miura S, Akiba Y, Higuchi H, Kato S, Suzuki H et al. Chronic ethanol consumption exacerbates microcirculatory damage in rat mesentery after reperfusion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001; 280 (5): G939–48.
 28. Meucci E, Mordente A, Martorana GE. Metal-catalyzed oxidation of human serum albumin: conformational and functional changes. Implications in protein aging. *J Biol Chem.* 1991; 266 (8): 4692–9.
 29. Oettl K, Stadlbauer V, Petter F, Greilberger J, Putz-Bankuti C, Hallström S, et al. Oxidative damage of albumin in advanced liver disease. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1782 (7–8): 469–73.
 30. Hunt JV, Wolff SP. Oxidative glycation and free radical production: a causal mechanism of diabetic complications. *Free Radic Res Commun.* 1991; 12–13 (1): 115–23.
 31. Monacelli F, Storace D, D'Arrigo C, Sanguineti R, Borghi R, Pacini D, et al. Structural alterations of human serum albumin caused by glycative and oxidative stressors revealed by circular dichroism analysis. *Int J Mol Sci.* 2013; 14 (6): 10694–709.
 32. Алексеев А. В., Проскурнина Е. В., Владимиров Ю. А. Определение антиоксидантов методом активированной хемилиуминесценции с использованием 2, 2'-азо-бис (2-амидинопропана). *Вестник Московского университета. Серия «Химия».* 2012; 53 (3): 187–93.

References

1. Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med.* 2006; 10 (2): 389–406.
2. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J.* 1997; 324 (1): 1–18.
3. Gwinner W, Grone HJ. Role of reactive oxygen species in glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant.* 2000; 15 (8): 1127–32.
4. Linder MC, Wooten L, Cerveza P, Cotton S, Shulze R, Lomeli N. Copper transport. *Am J Clin Nutr.* 1998; 67 (5): 965S–71S.
5. Laussac JP, Sarkar B. Characterization of the copper(II)- and nickel(II)-transport site of human serum albumin. Studies of copper(II) and nickel(II) binding to peptide 1–24 of human serum albumin by ¹³C and ¹H NMR spectroscopy. *Biochemistry.* 1984; 23 (12): 2832–8.
6. Dasty M. Serum levels of zinc, copper and selenium in patients with Wilson's disease treated with zinc. *Vnitř Lek.* 1999; 45 (4): 217–9.
7. Rafter GW. Rheumatoid arthritis: a disturbance in copper homeostasis. *Med Hypotheses.* 1987; 22 (3): 245–9.
8. Suzuki KT, Shiobara Y, Tachibana A, Ogra Y, Matsumoto K. Copper increases in both plasma and red blood cells at the onset of acute hepatitis in LEC rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 1999; 103 (2): 189–94.
9. Gryzunov YA, Arroyo A, Vigne JL, Zhao Q, Tyurin VA, Hubel CA, et al. Binding of fatty acids facilitates oxidation of cysteine-34 and converts copper-albumin complexes from antioxidants to prooxidants. *Arch Biochem Biophys.* 2003; 413 (1): 53–66.
10. Thomas CE. The influence of medium components on Cu(2+)-dependent oxidation of low-density lipoproteins and its sensitivity to superoxide dismutase. *Biochim Biophys Acta.* 1992; 1128 (1): 50–7.
11. Carter DC, Ho JX. Structure of serum albumin. *Adv Protein Chem.* 1994; 45: 153–203.
12. Schauenstein E, Dachs F. Quantification and localisation of SH-groups in human blood serum proteins. *Z Naturforsch C.* 1978; 33 (9–10): 803.
13. Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett.* 2008; 582 (13): 1783–7.
14. Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys.* 1990; 280 (1): 1–8.
15. Hu ML, Louie S, Cross CE, Motchnik P, Halliwell B. Antioxidant protection against hypochlorous acid in human plasma. *J Lab Clin Med.* 1993; 121 (2): 257–62.
16. Hayakawa A, Kuwata K, Era S, Sogami M, Shimonaka H, Yamamoto M, et al. Alteration of redox state of human serum albumin in patients under anesthesia and invasive surgery. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1997; 698 (1–2): 27–33.
17. Kumano K, Yokota S, Go M, Suyamal K, Sakail T, Era S, et al. Quantitative and qualitative changes of serum albumin in CAPD patients. *Adv Perit Dial.* 1992; 8: 127–30.
18. Suzuki E, Yasuda K, Takeda N, Sakata S, Era S, Kuwata K, et al. Increased oxidized form of human serum albumin in patients with diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 1992; 18 (3): 153–8.
19. Era S, Kuwata K, Imai H, Nakamura K, Hayashi T, Sogami M. Age-

- related change in redox state of human serum albumin. *Biochim Biophys Acta*. 1995; 1247 (1): 12–6.
20. Oettl K, Reibnegger G, Schmut O. The redox state of human serum albumin in eye diseases with and without complications. *Acta Ophthalmol*. 2011; 89 (2): e174–9.
 21. Levine RL, Mosoni L, Berlett BS, Stadtman E. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93 (26): 15036–40.
 22. Polimova AM, Vladimirova GA, Proskurnina EV, Vladimirov YuA. Antioxidants as aromatic amino acid oxidation products. *Biofizika*. 2011; 56 (4): 581–6.
 23. Yuan F, Liu SX, Tian JW. Advanced oxidation protein products induce reactive oxygen species production in endothelial cells. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*. 2004; 24 (12): 1350–2.
 24. Bourdon E, Loreau N, Blache D. Glucose and free radicals impair the antioxidant properties of serum albumin. *FASEB J*. 1999; 13 (2): 233–44.
 25. Davies KJ, Delsignore ME, Lin SW. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *J Biol Chem*. 1987; 262 (20): 9902–7.
 26. Faure P, Tamisier R, Baguet JP, Favier A, Halimi S, Lévy P, et al. Impairment of serum albumin antioxidant properties in obstructive sleep apnoea syndrome. *Eur Respir J*. 2008; 31 (5): 1046–53.
 27. Han JY, Miura S, Akiba Y, Higuchi H, Kato S, Suzuki H et al. Chronic ethanol consumption exacerbates microcirculatory damage in rat mesentery after reperfusion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001; 280 (5): G939–48.
 28. Meucci E, Mordente A, Martorana GE. Metal-catalyzed oxidation of human serum albumin: conformational and functional changes. Implications in protein aging. *J Biol Chem*. 1991; 266 (8): 4692–9.
 29. Oettl K, Stadlbauer V, Petter F, Greilberger J, Putz-Bankuti C, Hallström S, et al. Oxidative damage of albumin in advanced liver disease. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1782 (7–8): 469–73.
 30. Hunt JV, Wolff SP. Oxidative glycation and free radical production: a causal mechanism of diabetic complications. *Free Radic Res Commun*. 1991; 12–13 (1): 115–23.
 31. Monacelli F, Storace D, D'Arrigo C, Sanguineti R, Borghi R, Pacini D, et al. Structural alterations of human serum albumin caused by glycativ and oxidative stressors revealed by circular dichroism analysis. *Int J Mol Sci*. 2013; 14 (6): 10694–709.
 32. Alekseev AV, Proskurnina EV, Vladimirov YuA. Opredelenie antioksidantov metodom aktivirovannoy khemilyuminestsentsii s ispol'zovaniem 2, 2'-azo-bis (2-amidinopropana). *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 'Khimiya'*. 2012; 53 (3): 187–93.

ДВА HMG-ДОМЕНА МИТОХОНДРИАЛЬНОГО БЕЛКА ДРОЖЖЕЙ ABF2P ОБЛАДАЮТ РАЗЛИЧНЫМ СРОДСТВОМ К ДНК

А. В. Курашенко¹, Е. О. Самойлова¹, М. В. Балева¹, И. В. Чичерин¹, Д. Ю. Петров², П. А. Каменский¹✉, С. А. Левицкий¹

¹ Кафедра молекулярной биологии биологического факультета, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

² Кафедра общей хирургии факультета фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

Поддержание постоянства митохондриального генома имеет большое значение в обеспечении функционирования организма в целом. Мутации в геноме митохондрий могут быть причиной развития мышечных дистрофий и нейродегенеративных заболеваний, установлена также их связь с процессом старения организма. В данной работе исследована ДНК-связывающая способность отдельных доменов митохондриального белка пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* Abf2p, участвующего в процессах гомологичной рекомбинации и репарации. Выявлено, что домен HMG1 неспецифично и слабо связывает линейную ДНК и при этом специфично взаимодействует с разветвленной структурой ДНК с константой диссоциации комплекса 510 нМ. Домен HMG2 сам по себе не обладает способностью связываться с ДНК и, вероятно, предназначен для осуществления других функций либо же проявляет ДНК-связывающую активность в составе полноразмерного белка.

Ключевые слова: митохондрия, митохондриальный геном, Abf2p, рекомбинация

Финансирование: работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14-04-31554 мол_а).

✉ **Для корреспонденции:** Петр Андреевич Каменский
119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12; piotr.kamenski@gmail.com

Статья поступила: 29.09.2015 Принята к печати: 09.12.2015

TWO HMG DOMAINS OF YEAST MITOCHONDRIAL PROTEIN ABF2P HAVE DIFFERENT AFFINITY TO DNA

Kurashenko AV¹, SamoiloVA EO¹, Baleva MV¹, Chicherin IV¹, Petrov DY², Kamenski PA¹ ✉, Levitskii SA¹

¹ Faculty of Biology, Department of Molecular Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Faculty of Fundamental Medicine, Department of General Surgery, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Maintaining mitochondrial genome integrity is essential for the viability of the whole organism. Mitochondrial genome mutations lead to muscular dystrophies, neurodegenerative diseases, and are associated with aging. In this work a baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) mitochondria model was used to investigate DNA-binding abilities of different domains of a mitochondrial Abf2p protein which participates in homologous recombination and reparation. A weak non-specific HMG1 binding to linear DNA and a specific HMG1 binding to a branched DNA with a dissociation constant of 510 nM have been discovered. The HMG2 domain itself does not bind to any DNA and either has other functions or demonstrates its DNA-binding activity in a full-length protein only.

Keywords: mitochondria, mitochondrial genome, Abf2p, recombination

Funding: this study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 14-04-31554 mol_a).

✉ **Correspondence should be addressed:** Petr Kamenski
Leninskie gory, d. 1, str. 12, Moscow, Russia, 119991; piotr.kamenski@gmail.com

Received: 29.09.2015 Accepted: 09.12.2015

Митохондрии — это внутриклеточные органеллы, играющие ключевую роль в обеспечении большинства эукариотических клеток энергией за счет синтеза аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ). Большую часть соединений, необходимых митохондриям для функционирования, они получают из цитоплазмы, однако обладают собственным аппаратом хранения и передачи генетической информации, а именно — своей ДНК и системой биосинтеза белка.

Митохондриальная ДНК (мтДНК) представлена, как правило, кольцевой замкнутой молекулой ДНК, кодирующей митохондриальные рРНК, митохондриальные тРНК и белки, участвующие в окислительном фосфорилировании.

В силу повышенной частоты повреждений мтДНК по сравнению с ядерной ДНК [1], что обусловлено высокой концентрацией активных форм кислорода в митохондриях, большое значение в поддержании нормального функ-

ционирования этих органелл имеет система репарации митохондриального генома. Одним из наиболее важных путей репарации двунитевых разрывов как ядерной, так и мтДНК является гомологичная рекомбинация. Действительно, процессы митохондриальной гомологичной рекомбинации обнаружены практически у всех основных групп эукариотических организмов (растений [2], грибов [3] и беспозвоночных [4]). Предполагается, что механизмы рекомбинации ДНК в ядре и митохондриях в целом аналогичны [5]. Особенно актуальным изучение гомологичной рекомбинации в митохондриальном геноме стало после получения доказательств существования этого процесса у млекопитающих [5] и связи накопления опосредованных рекомбинацией делеций с развитием ряда заболеваний человека (мышечных дистрофий, нейродегенеративных заболеваний), старением и процессами онкогенеза [6].

Пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* являются чрезвычайно удобным объектом для исследования процессов, проходящих в митохондриях. У данного организма они имеют значительное функциональное сходство с человеческими, при этом дрожжи могут осуществлять жизнедеятельность в отсутствие функционально полноценных митохондрий, что позволяет делетировать гены тех или иных митохондриальных белков и изучать фенотипические проявления подобных мутаций. Митохондриальный геном *S. cerevisiae* представляет собой организованную в пространстве структуру, называемую нуклеоидом, содержащую до 10 копий мтДНК, которые взаимодействуют с различными белками. Митохондриальная ДНК в составе нуклеоида имеет трехмерную организацию, тесно связанную с механизмами репликации, транскрипции и наследования. Укладка в нуклеоид также защищает ДНК от атаки активных форм кислорода, появляющихся в ходе окислительного фосфорилирования [7].

Одним из наиболее широко представленных белков, взаимодействующих с мтДНК в нуклеоидах митохондрий дрожжей, является Abf2p. Впервые в чистом виде он был получен в 1979 г. [8], а наименование Abf2p было присвоено ему в 1991 г. [9]. Этот белок содержит в своем составе два домена — HMG1 (High-Mobility Group 1) и HMG2 (High-Mobility Group 2) — и на сегодняшний день исследован наиболее полно среди прочих белков митохондриального нуклеоида дрожжей.

Abf2p — это уникальный белок с самой высокой основностью среди белков нуклеоида [10]. Он генерирует негативную суперспирализацию ДНК при контакте с кольцевой плазмидой в присутствии топоизомеразы 1 [10]. Дрожжи, мутантные по Abf2p, способны поддерживать мтДНК при росте на среде YPG, содержащей глицерин в качестве источника углерода. Однако при культивировании на средах со сбраживаемыми источниками углерода, например глюкозой, происходит постепенная потеря мтДНК [10]. Доказано также, что при мутации по гену Abf2p значительно снижается количество актов рекомбинации в митохондриях при спаривании со штаммом дикого типа [11]. Кроме того, Abf2p обеспечивает стабилизацию интермедиатов образования структуры Холлидея, что также указывает на важность этого белка в рекомбинации [12].

Несмотря на большое число работ, посвященных исследованию Abf2p, молекулярные механизмы его участия в процессах рекомбинации мтДНК остаются неизученными. Наличие в составе митохондриального ДНК-связывающего белка Abf2p двух HMG-доменов характерно для большинства белков семейства HMGb: известно, что они связываются с малой бороздкой ДНК с ограниченной

специфичностью или же полностью неспецифичной [13]. Кроме того, предполагается, что HMG-домены, входящие в состав таких белков, связывают ДНК независимо друг от друга с близкой эффективностью [13]. Однако, по всей видимости, митохондриальные HMG-белки обладают значительно более широкой функциональностью, чем их ядерные гомологи. Так, митохондриальный ДНК-связывающий белок человека, TFAM, помимо функции компактизации нуклеоида, является транскрипционным фактором и, вероятно, участвует в процессах рекомбинации и репарации мтДНК [14]. Своей многофункциональностью, а также характеристиками связывания с ДНК TFAM сходен с бактериальными HU-белками [14]. Предполагается, что Abf2p также обладает мультифункциональными свойствами, поскольку является структурным аналогом TFAM в митохондриях дрожжей.

В данной работе мы получили рекомбинантные белки, соответствующие двум доменам Abf2p — HMG1 и HMG2, и изучили ДНК-связывающую способность этих доменов по отношению к линейному ДНК-дуплексу и структуре, имитирующей поздний интермедиат гомологичной рекомбинации — структуру Холлидея.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клонирование и экспрессия генов

Участки гена *ABF2*, соответствующие доменам HMG1 (аминокислотные остатки 27–115) и HMG2 (аминокислотные остатки 112–183), амплифицировали с помощью пар праймеров abfhmg1F (GATACATATGGGTCCTAAAAGGCCACATC) / abfhmg1R (CGTCCTCGAGAGGAAGTTTTTCGTCAACTCC) и abfhmg2F (GGCGCATATGGAGTTTGACGAAAACTTCC) / abfhmg2R (GAGGCTCGAGAGCATATTATCTTGGATAGC) соответственно. В качестве матрицы использовали геномную ДНК дрожжей штамма BW303. Полученные продукты амплификации обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *NdeI* и *XhoI* (Thermo Fisher Scientific, США) и клонировали в составе экспрессионного вектора pET32a (Novagen, США). Таким способом были получены векторы pET32a_HMG1 и pET32a_HMG2. Соответствие клонированных последовательностей референсным подтверждали секвенированием по Сэнгеру в лаборатории постгеномных технологий НИИ физико-химической медицины ФМБА России. Полученными плазмидами трансформировали экспрессионный штамм *Escherichia coli* B834(DE3), отдельные колонии трансформантов переносили в жидкую среду 2xYT с 100 мкг/мл карбенициллина, культивировали при температуре 37 °C при интенсивном перемешивании до OD₆₀₀ ~ 0,6–0,8, после чего индуцировали экспрессию клонированных генов добавлением изопропил-β,D-галактопиранозида (IPTG) до концентрации 0,25 мМ, продолжали культивирование при температуре 30 °C в течение 3 ч. После этого клетки собирали центрифугированием (3000 g, 10 мин) и ресуспендировали в стартовом буфере (25 мМ Na-фосфатный буфер с pH 7,4; 500 мМ NaCl; 20 мМ имидазола). Ресуспендированные клетки разрушали ультразвуком в режиме 4 импульсов по 15 сек каждый при амплитуде 20 %, полученные клеточные лизаты центрифугировали при 17 000 g в течение 20 мин. Супернатанты, содержащие рекомбинантные белки, собирали и проводили дальнейшую очистку целевого продукта с помощью металл-хелатирующей хроматографии на колонке HisTrap объемом 1 мл, заполненной Ni-NTA сефарозой

(GE Healthcare, США), с применением системы высокоэффективной хроматографии белков АКТА Purifier (GE Healthcare, США) согласно рекомендациям производителя. За элюцией целевых белков следили по поглощению при длине волны 280 нм. Фракцию с целевым белком сразу переводили в буфер для хранения (25 мМ Трис-НСl pH 7,4; 150 мМ NaCl; 5 мМ ЭДТА) с использованием колонки HiTrap Desalting объемом 5 мл, содержавшей сефадекс G-25. За эффективным переводом белка в буфер для хранения следили по соотношению пиков поглощения при длине волны 280 нм и проводимости раствора.

Концентрацию белков определяли по поглощению при длине волны 280 нм на спектрофотометре NanoPhotometr (Implen, Германия) по известным коэффициентам молярной экстинкции ($12\ 090\ \text{M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ для обоих белков) и с учетом точных молекулярных масс: 12 632,39 Да для НМГ1 и 10 177,58 Да для НМГ2.

Сборка структур ДНК

Использованные в работе структуры (ДНК-дуплекс и структура Холлидея) были собраны из олигонуклеотидов x-FAM (FAM-AGTCTAGACTGCAGTTGAGTCCCTTGCTAGGACGGATCCCT), x-com (AGGGATCCGTCCTAGCAAGGACTCAA CTGCAGTCTAGACT), b (AGGGATCCGTCCTAGCAAGGGGC TGCTACCGGAAGCTTCT), r (AGGAATTCAACCACCGCTCAA CTCAACTGCAGTCTAGACT), h (AGAAGCTTCCGGTAGCAGC CTGAGCGGTGGTTGAATTCCT), аналогичных таковым в исследовании D. R. Duckett и D. M. Lilley [15]. Линейную двуцепочечную ДНК собирали из олигонуклеотидов x-FAM и x-com, структуру Холлидея — из олигонуклеотидов x-FAM, b, r, h. Сборку проводили следующим образом. К 20 мкл двукратного буфера (25 мМ Трис-НСl pH 7,5; 150 мМ NaCl) добавляли по 5 мкл 1 мкМ раствора меченого олигонуклеотида (x-FAM) и по 5 мкл 2 мкМ растворов остальных олигонуклеотидов, при необходимости доводя объем реакционной смеси до 40 мкл деионизованной водой. Реакционные смеси нагревали на водяной бане до температуры 95 °С, после чего пассивно охлаждали в течение 3 ч до 25 °С.

Метод задержки в геле

Каждая из реакционных смесей состояла из 2 мкл 5-кратного EMSA-буфера (100 мМ Трис-НСl pH 8,0; 1 М NaCl; 1 мг/мл BSA; 35 % глицерин), 1 мкл 100 нМ раствора ДНК-структуры и различных концентраций рекомбинантного белка. Общий объем каждой реакционной смеси составлял 10 мкл и при необходимости доводился до конечного с помощью деионизованной воды.

Реакционные смеси инкубировали в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре. После этого их наносили на 6 % полиакриламидный гель (20 × 20 см), приготовленный на буфере TBE (90 мМ Трис-борат, 2 мМ ЭДТА). Гель до нанесения образцов подвергался предварительному электрофорезу при 400 В в течение 40 мин при активном охлаждении до температуры 10 °С. Электрофоретическое разделение образцов проводили в течение 120 мин при тех же условиях. После прохождения электрофореза гель сканировали с помощью сканера Storm 860 (GE Healthcare, США) в режиме флуоресценции с возбуждением в синем канале. Полученные изображения анализировали с помощью программы ImageJ, определяя для каждой дорожки площадь и интенсивность флуорес-

ценции полос свободной и связанной ДНК. По соотношению интегральных значений интенсивности флуоресценции полосы к сумме площадей полос в треке подсчитывали концентрации свободной и связанной ДНК. Константы диссоциации вычисляли по формуле:

$$K_D = [Df] \times [P_0 - Db] / [Db],$$

где [Df] — концентрация свободной ДНК, [Db] — концентрация связанной ДНК, [P₀] — концентрация белка. Все концентрации выражались в нМ. Для каждой пары ДНК / рекомбинантный белок проводили не менее трех независимых экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение рекомбинантных белков

Для того чтобы выяснить, какую роль играет каждый из НМГ-доменов митохондриального белка Abf2p в осуществлении его функций, мы получили рекомбинантные белки, соответствующие обоим доменам. После выделения и очистки этих белков степень их чистоты оценивали с помощью денатурирующего электрофореза (рис. 1). Полученные препараты белков обладали достаточной степенью чистоты для проведения дальнейших исследований. Выход рекомбинантных белков составил 8 мг/л культуры для НМГ1 и 4,2 мг/л культуры для НМГ2.

Анализ взаимодействия отдельных НМГ-доменов с линейной и крестообразной ДНК

Как уже было отмечено, в настоящее время считается, что НМГ-домены белков семейства НМГВ связывают ДНК независимо друг от друга с близкой эффективностью. Для того чтобы проверить, верно ли это в отношении Abf2p, мы провели анализ связывания линейного дуплекса ДНК длиной 40 пар оснований (п. о.) и синтетической крестообразной структуры, имитирующей структуру Холлидея,

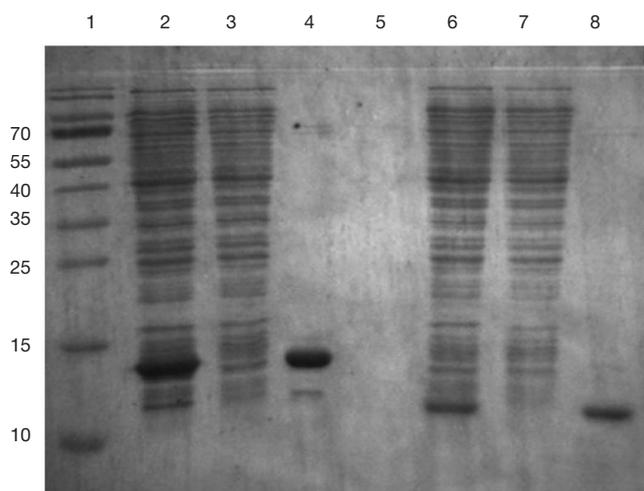


Рис. 1. Выделение и очистка рекомбинантных белков, соответствующих доменам НМГ1 и НМГ2 белка Abf2p

Очистку рекомбинантных белков проводили методом металл-аффинной хроматографии на никель-сефарозе. 1 — маркеры молекулярных масс (слева приведены молекулярные массы маркерных белков); 2, 6 — лизаты разрушенных клеток; 3, 7 — фракции, не связавшиеся с аффинной колонкой; 4, 8 — очищенные препараты рекомбинантных белков НМГ1 и НМГ2 соответственно.

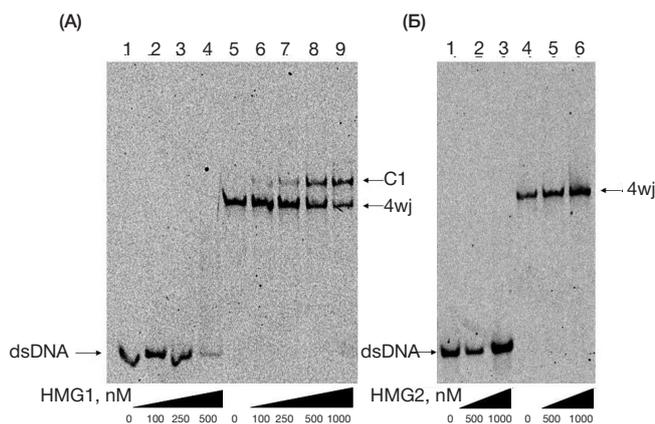


Рис. 2. Анализ связывания рекомбинантных белков, соответствующих доменам HMG1 и HMG2, с ДНК методом задержки в геле

Линейный ДНК-дуплекс (double-stranded DNA — dsDNA) и крестообразную ДНК (4-way junction — 4wj) в концентрации 10 нМ инкубировали с возрастающими концентрациями рекомбинантных белков, после чего реакционные смеси разделяли в 6% полиакриламидном геле. **(А)** Связывание с ДНК домена HMG1; 1–4 — взаимодействие с ДНК-дуплексом, 5–9 — связывание с крестообразной ДНК; C1 — образующийся комплекс. **(Б)** Связывание с ДНК домена HMG2; 1–3 — взаимодействие с ДНК-дуплексом, 4–6 — связывание с крестообразной ДНК. В нижней части рисунка приведены использованные концентрации рекомбинантных белков, нМ.

с полученными рекомбинантными белками методом задержки в геле.

Домен HMG1 в использованных нами условиях практически не взаимодействовал с линейной ДНК (рис. 2А). Лишь при высокой концентрации белка (500 нМ) наблюдалось снижение интенсивности полосы, соответствующей свободной ДНК, однако образования комплекса (который был бы виден как четкая полоса в верхней части геля) не происходило. Исходя из этого, можно заключить, что HMG1 слабо и неспецифично взаимодействует с линейной ДНК, при этом он эффективно связывал крестообразную структуру, комплексы ДНК / белок выявлялись даже при концентрации белка 100 нМ (рис. 2А, C1). По данным трех независимых экспериментов мы вычислили кажущуюся константу диссоциации комплекса HMG1 с крестообразной ДНК, равную $510 \pm 11,78$ нМ. В то же время домен HMG2 не образовывал комплексов ни с линейным дуплексом ДНК, ни с крестообразной структурой. Даже при концентрациях рекомбинантного белка 1 мкМ снижения интенсивности полосы, соответствующей свободной ДНК, не наблюдалось (рис. 2Б).

Согласно различным литературным источникам полноразмерный белок Abf2p образует комплекс с линейной ДНК с константой от 40 до 150 нМ, т. е. значительно меньшей, чем домен HMG1 [11, 15]. Мы предположили, что повышенное сродство полноразмерного белка к ДНК относительно домена HMG1 обусловлено взаимодействием обоих

доменов. Для того чтобы проверить справедливость этого предположения, мы провели эксперимент по задержке ДНК в геле после ее инкубации со смесью двух рекомбинантных белков. В результате выяснилось, что добавление домена HMG2 не влияет на характеристики связывания ДНК доменом HMG1 (данные не представлены).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исходя из полученных данных, можно заключить следующее. Домен HMG1 вносит основной вклад в осуществление ДНК-связывающей активности белка Abf2p. При этом домен HMG2 прямой ДНК-связывающей активностью в условиях *in vitro* не обладает, однако он важен для осуществления этой функции полноразмерным белком, поскольку константа диссоциации комплекса HMG1 / линейная ДНК, согласно нашим результатам, превышает 1 мкМ, а константа диссоциации аналогичного комплекса с Abf2p ниже на 1–2 порядка. Следует подчеркнуть, что HMG1 способен аналогично полноразмерному белку специфично связывать крестообразную структуру ДНК. Эта особенность характерна для многих HMGВ-белков, участвующих в процессах поддержания целостности ДНК, а именно — в репарации путем рекомбинации [14]. В литературе имеются сведения о том, что Abf2p важен для осуществления гомологичной рекомбинации митохондриальной ДНК дрожжей, и, по всей видимости, непосредственно специфичность связывания полноразмерного белка реализуется за счет HMG1 [11, 12]. Роль домена HMG2 в реализации разнообразных функций Abf2p менее очевидна. Как показывают наши данные, сам по себе HMG2 не связывается ни с линейной, ни с разветвленной ДНК в выбранных условиях эксперимента, что достаточно необычно для HMG-домена. Тем не менее, опираясь на полученные результаты, нельзя однозначно утверждать, что HMG2 в составе полноразмерного белка не будет проявлять ДНК-связывающую активность. По всей видимости, помимо усиления ДНК-связывающих свойств HMG1 второй домен может участвовать в реализации взаимодействия Abf2p с другими белками, например в привлечении ферментов, необходимых для репарации и рекомбинации.

ВЫВОДЫ

В результате проведенного исследования удалось установить, что домен HMG1 митохондриального белка дрожжей Abf2p неспецифично и слабо связывает линейную ДНК, при этом образуя специфичный комплекс с крестообразной ДНК с константой диссоциации 510 нМ. Домен HMG2 сам по себе не обладает способностью связываться с ДНК *in vitro*.

Литература

1. Brown WM, George M, Wilson AC. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979; 76 (4): 1967–71.
2. Arrieta-Montiel MP, Shedge V, Davila J, Christensen AC, Mackenzie SA. Diversity of the Arabidopsis mitochondrial genome occurs via nuclear-controlled recombination activity. *Genetics*. 2009; 183: 1261–8.
3. Dujon B, Slonimski PP, Weill L. Mitochondrial genetics IX: a model for recombination and segregation of mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 1974; 78: 415.
4. Gray MW, Burger G, Lang BF. Mitochondrial evolution. *Science*. 1999; 283: 1476–81.
5. Chen XJ. Mechanism of homologous recombination and implications for aging-related deletions in mitochondrial DNA. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2013; 77: 476–96.
6. Schon EA, DiMauro S, Hirano M. Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nat Rev Genet*. 2012; 13: 878–90.
7. Kauppila JH, Stewart JB. Mitochondrial DNA: radically free of free-radical driven mutations. *Biochim Biophys Acta*. 2015; 1847 (11): 1354–61.
8. Caron F, Jacq C, Rouvireaniv J. Characterization of a histonelike protein extracted from yeast mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979; 76: 4265–9.
9. Diffley JFX, Stillman B. A close relative of the nuclear, chromosomal highmobility group protein HMG1 in yeast mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88: 7864–8.
10. Friddle RW, Klare JE, Martin SS, Corzett M, Balhorn R, Baldwin EP, et al. Mechanism of DNA compaction by yeast mitochondrial protein Abf2p. *Biophys J*. 2004; 86 (3): 1632–9.
11. Zelenaya-Troitskaya O, Newman SM, Okamoto K, Perlman PS, Butow RA. Functions of the high mobility group protein, Abf2p, in mitochondrial DNA segregation, recombination and copy number in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 1998; 148 (4): 1763–76.
12. MacAlpine DM, Perlman PS, Butow RA. The high mobility group protein Abf2p influences the level of yeast mitochondrial DNA recombination intermediates in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 6739–43.
13. Thomas JO, Travers AA. HMG1 and 2, and related 'architectural' DNA-binding proteins. *Trends Biochem Sci*. 2001; 26: 167.
14. Ngo HB, Kaiser JT, Chan DC. The mitochondrial transcription and packaging factor Tfam imposes a U-turn on mitochondrial DNA. *Nat Struct Mol Biol*. 2011; 18: 1290–6.
15. Duckett DR, Lilley DM. The three-way DNA junction is a Y-shaped molecule in which there is no helix-helix stacking. *EMBO J*. 1990; 9 (5): 1659–64.

References

1. Brown WM, George M, Wilson AC. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979; 76 (4): 1967–71.
2. Arrieta-Montiel MP, Shedge V, Davila J, Christensen AC, Mackenzie SA. Diversity of the Arabidopsis mitochondrial genome occurs via nuclear-controlled recombination activity. *Genetics*. 2009; 183: 1261–8.
3. Dujon B, Slonimski PP, Weill L. Mitochondrial genetics IX: a model for recombination and segregation of mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 1974; 78: 415.
4. Gray MW, Burger G, Lang BF. Mitochondrial evolution. *Science*. 1999; 283: 1476–81.
5. Chen XJ. Mechanism of homologous recombination and implications for aging-related deletions in mitochondrial DNA. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2013; 77: 476–96.
6. Schon EA, DiMauro S, Hirano M. Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nat Rev Genet*. 2012; 13: 878–90.
7. Kauppila JH, Stewart JB. Mitochondrial DNA: radically free of free-radical driven mutations. *Biochim Biophys Acta*. 2015; 1847 (11): 1354–61.
8. Caron F, Jacq C, Rouvireaniv J. Characterization of a histonelike protein extracted from yeast mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979; 76: 4265–9.
9. Diffley JFX, Stillman B. A close relative of the nuclear, chromosomal highmobility group protein HMG1 in yeast mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88: 7864–8.
10. Friddle RW, Klare JE, Martin SS, Corzett M, Balhorn R, Baldwin EP, et al. Mechanism of DNA compaction by yeast mitochondrial protein Abf2p. *Biophys J*. 2004; 86 (3): 1632–9.
11. Zelenaya-Troitskaya O, Newman SM, Okamoto K, Perlman PS, Butow RA. Functions of the high mobility group protein, Abf2p, in mitochondrial DNA segregation, recombination and copy number in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 1998; 148 (4): 1763–76.
12. MacAlpine DM, Perlman PS, Butow RA. The high mobility group protein Abf2p influences the level of yeast mitochondrial DNA recombination intermediates in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 6739–43.
13. Thomas JO, Travers AA. HMG1 and 2, and related 'architectural' DNA-binding proteins. *Trends Biochem Sci*. 2001; 26: 167.
14. Ngo HB, Kaiser JT, Chan DC. The mitochondrial transcription and packaging factor Tfam imposes a U-turn on mitochondrial DNA. *Nat Struct Mol Biol*. 2011; 18: 1290–6.
15. Duckett DR, Lilley DM. The three-way DNA junction is a Y-shaped molecule in which there is no helix-helix stacking. *EMBO J*. 1990; 9 (5): 1659–64.

СТАБИЛЬНОСТЬ ГАДОЛИНИЙСОДЕРЖАЩИХ МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНЫХ КОНТРАСТНЫХ СРЕДСТВ В ПРИСУТСТВИИ ИОНОВ ЦИНКА И КАЛЬЦИЯ В РАЗЛИЧНЫХ СРЕДАХ

В. Г. Харламов¹, В. Н. Кулаков², А. А. Липенгольц^{2,3}, Н. Л. Шимановский¹ ✉

¹ Кафедра молекулярной фармакологии и радиобиологии им. академика П. В. Сергеева, медико-биологический факультет, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

² Лаборатория разработки методов и технологий лучевой терапии, Федеральный медицинский биофизический центр имени А. И. Бурназяна, Москва

³ Лаборатория радионуклидных и лучевых технологий в экспериментальной онкологии, Российский онкологический научный центр имени Н. Н. Блохина, Москва

Для повышения безопасности клинического использования гадолинийсодержащих магнитно-резонансных контрастных средств (МРКС) рекомендовано применять наиболее стабильные препараты и учитывать условия, определяющие их стабильность. Целью исследования был сравнительный анализ стабильности Gd³⁺-содержащих МРКС в присутствии ионов цинка, кальция и поливинилпирролидона в воде, фосфатном буфере и сыворотке крови с использованием метода протонной ЯМР-релаксометрии. Было показано, что макроциклический гадобутрол обладает большей стабильностью, чем все линейные МРКС. Поливинилпирролидон (10 мг/мл) способен улучшить стабильность линейных МРКС в фосфатном буфере и сыворотке крови. Ионы кальция обладают значительно менее выраженным дестабилизирующим действием на МРКС, чем ионы цинка.

Ключевые слова: гадолинийсодержащие магнитно-резонансные контрастные средства, поливинилпирролидон, ионы кальция, ионы цинка, ЯМР-релаксометрия

Финансирование: работа выполнена в рамках государственного контракта № 11411.1008700.13.081 по ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу», утвержденной постановлением Правительства Российской Федерации от 17 февраля 2011 г. № 91.

✉ **Для корреспонденции:** Николай Львович Шимановский
119435, г. Москва, ул. Большая Пироговская, д. 9А; shimannn@yandex.ru

Статья поступила: 29.09.2015 **Статья принята к печати:** 12.10.2015

STABILITY OF GADOLINIUM-BASED CONTRAST AGENTS IN THE PRESENCE OF ZINC AND CALCIUM IONS IN DIFFERENT MEDIA

Kharlamov VG¹, Kulakov VN², Lipengolts AA^{2,3}, Shimanovskii NL¹ ✉

¹ P. V. Sergeev Molecular Pharmacology and Radiobiology Department, Biomedical Faculty, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

² Laboratory of Radiotherapy Methods and Technologies Development, A. I. Burnazyan Federal Medical and Biophysical Centre, Moscow, Russia

³ Laboratory of Radionuclide and Radiation Technologies in Experimental Oncology, N. N. Blokhin Russian Cancer Scientific Centre, Moscow, Russia

To improve the safety of Gd³⁺-based contrast agents (GBCA) in clinical practice, it is recommended to use the most stable substances and to consider conditions determining their stability. The aim of this study was to compare the stability of GBCAs for magnetic resonance imaging in the presence of zinc and calcium ions and polyvinylpyrrolidone (PVP) in water, phosphate buffer solution and blood serum using proton NMR relaxometry. The study demonstrated that macrocyclic gadobutrol is more stable than all linear contrast agents. The addition of PVP (10 mg/ml) improved the stability of linear GBCAs in phosphate buffer solution and blood serum. Calcium ions have a much weaker destabilizing effect on GBCAs than zinc ions.

Keywords: gadolinium-based magnetic resonance contrast agents, polyvinylpyrrolidone, calcium ions, zinc ions, NMR relaxometry

Funding: this study was conducted within the framework of a public contract No. 11411.1008700.13.081 under the Federal Targeted Program "Development of Pharmaceutical and Medical Industries of the Russian Federation up to 2020 and beyond" approved by the resolution of the Government of the Russian Federation No. 91 dated 17 February 2011.

✉ **Correspondence should be addressed:** Nikolay Shimanovskii
ul. Bolshaya Pirogovskaya, d. 9A, Moscow, Russia, 119435; shimannn@yandex.ru

Received: 29.09.2015 **Accepted:** 12.10.2015

Известно, что при проведении магнитно-резонансных исследований широко применяют контрастные средства на основе гадолиния [1]. Хотя гадолиний находится в этих средствах в виде хелатных комплексов, нельзя забывать о том, что токсичность этого редкоземельного элемента в свободном виде сопоставима с таковой ртути и свинца [2], а стабильность магнитно-резонансных контрастных средств (МРКС), основанных на гадолинии, неодинакова и определяется двумя основными факторами: 1) химической структурой хелатора; 2) наличием в окружении ряда органических и неорганических лигандов, которые могут конкурировать за связывание с ионами Gd^{3+} или с хелатирующим соединением, способствуя высвобождению Gd^{3+} .

Для пациентов с нарушением функции почек применение нестабильного контрастного средства может обернуться фатальными последствиями, так как свободный гадолиний, накапливаясь в тканях, может приводить к развитию нефрогенного системного фиброза [3–5].

Недавние исследования показали, что на Т1-взвешенных томограммах без контрастирования у пациентов [6] или экспериментальных животных [7], которым ранее вводили линейные МРКС с низкой стабильностью, наблюдалась повышенная интенсивность сигнала в таких структурах головного мозга, как бледный шар и зубчатое ядро, что, вероятно, связано с депонированием в них ионов Gd^{3+} . После введения макроциклических МРКС с высокой стабильностью такого «остаточного» усиления сигнала не наблюдалось. Известно также, что высвобождение гадолиния из МРКС зависит от присутствия различных ионов в окружающей МРКС среде [8]. В связи с этим комплексное исследование взаимодействия указанных факторов поможет пролить свет на динамику процесса высвобождения ионов Gd^{3+} из хелатного комплекса в различных средах, а также оценить риск назначения некоторых контрастных средств пациентам с почечной недостаточностью или с состояниями, сопровождающимися повышением концентраций ионов цинка и кальция в крови. Актуальным является и вопрос увеличения стабильности этих контрастных средств, например путем добавления вещества с выраженными комплексообразующими свойствами. К таким веществам может относиться поливинилпирролидон (ПВП), который обладает комплексообразующими и дезинтоксикационными свойствами [9].

Цель исследования — провести сравнительный анализ стабильности Gd^{3+} -содержащих МРКС в присутствии ионов цинка, кальция и ПВП в воде, фосфатном буфере и сыворотке крови человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах изучали линейные Gd^{3+} -содержащие МРКС: димеглюминовую соль гадопентетовой кислоты («Магневист» 0,5 М, Bayer, Германия); гадобеновую кислоту («Мультихэнс» 0,5 М, Врассо, Италия); динатриевую соль гадопентетовой кислоты + ПВП («Дипентаст» 0,125 М, ООО «ГК «Эпидбиомед», Россия); гадопентетата- β -циклодекстрин («Циклогдопентетат» 0,125 М, ООО «ГК «Эпидбиомед», Россия), — а также макроциклическое МРКС гадобутрол («Гадовист» 1 М, Bayer, Германия).

Стабильность контрастных средств оценивали методом протонной ЯМР-релаксометрии (Minispec mq 20, Bruker, Германия). Высвобождение гадолиния из хелатного комплекса приводит к изменению времен релаксации протонов среды [10]. Мы измеряли время релаксации T_1 ,

Анализ стабильности средств проводили в дистиллированной воде (рН = 6,0), фосфатном буфере и сыворотке крови (рН = 7,4). В опытах с цинком оценивали стабильность пяти МРКС: димеглюминовой соли гадопентетовой кислоты, гадобеновой кислоты, динатриевой соли гадопентетовой кислоты с ПВП, гадопентетата- β -циклодекстрина и гадобутрола, а в опытах с кальцием — только димеглюминовой соли гадопентетовой кислоты.

Для получения 0,2 М фосфатного буфера с рН 7,4 вначале были приготовлены водные растворы NaH_2PO_4 и Na_2HPO_4 [11]. В работе использовали сыворотку крови, взятую у пациентов Государственного научного центра колопроктологии имени А. Н. Рыжих. Все доноры подписывали информированное согласие на использование их биологического материала в научных исследованиях при условии соблюдения их прав на неприкосновенность частной жизни и конфиденциальность. Кровь набирали в стерильные пробирки с активатором свертывания и разделительным гелем. Сыворотку получали путем центрифугирования крови при 1200 g в течение 10 мин, хранили в замороженном виде при температуре $-20\text{ }^\circ\text{C}$ в течение не более 10 дней. Предварительно (до замораживания) в образцах сыворотки определяли концентрацию альбумина на биохимическом анализаторе Spotchem EZ SP-4430 (Arkray Inc., Япония). Затем образцы сыворотки разбавляли фосфатным буфером до концентрации альбумина 10^{-4} М (близка к физиологической).

Для получения 200 мМ водного раствора $ZnCl_2$ («Компонент-реактив», Россия) растворяли навеску 2,7 г в 100 мл дистиллированной воды. Конечная концентрация $ZnCl_2$ в пробе составляла 2 мМ. При выборе конечной концентрации $ZnCl_2$ мы опирались на исследование М. Тауритц и соавт. [12], где самые убедительные результаты были получены именно при такой концентрации хлорида цинка.

Концентрация исходного водного раствора $CaCl_2$ («Компонент-реактив», Россия) составляла 200 мМ (2,2 г $CaCl_2$ в 100 мл дистиллированной воды), конечная концентрация в пробе была 2 мМ. Исходный водный раствор ПВП (Kollidon® 17 PF, BASF) готовили растворением 500 мг порошка ПВП в 1 мл дистиллированной воды.

Для оценки стабильности изучаемых МРКС готовили одновременно две пробы. Первая проба представляла собой раствор МРКС в концентрации 0,2 мМ. Измеряли время релаксации T_1 раствора МРКС (0,2 мМ) при температуре $40\text{ }^\circ\text{C}$ (температура в камере для образца в МР-релаксометре). Затем в пробу добавляли раствор хлорида цинка (или хлорида кальция) до конечной концентрации 2 мМ и снова измеряли время релаксации. Далее пробу инкубировали в термостате при температуре $40\text{ }^\circ\text{C}$, повторные измерения T_1 проводили через 1, 2 и 24 ч. Вторая проба была аналогична первой, но в нее после внесения хлорида цинка (или хлорида кальция) дополнительно добавляли раствор ПВП (конечная концентрация — 10 мг/мл). Измерения времени релаксации в случае второй пробы проводили в те же сроки.

Все эксперименты для повышения достоверности результатов были повторены шестикратно. С помощью пакета программ Statistica v.10 были рассчитаны средние значения и стандартные отклонения. Полученные данные имели нормальное распределение (во всех случаях проверки выборок с помощью теста Колмогорова–Смирнова величина p была значительно больше 0,05), поэтому статистическую значимость различий средних величин определяли с помощью t -критерия Стьюдента со значимым отличием при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние ионов цинка на стабильность МРКС

В дистиллированной воде в отсутствие ПВП время продольной релаксации T_1 всех линейных МРКС после добавления хлорида цинка через сутки снизилось в среднем на 23–28 % (рис. 1). В случае димеглюминовой соли гадопентетовой кислоты показатель T_1 снизился на $25,7 \pm 0,6$ %, а ее динатриевой соли — на $28,1 \pm 0,7$ %, в случае «Циклогадопентетата» (ЦГП) — на $22,0 \pm 0,5$ %, гадобеновой кислоты — на $24,8 \pm 0,4$ %. Для макроциклического гадобутрола время T_1 достоверно не изменилось.

В фосфатном буфере без ПВП при добавлении хлорида цинка величина T_1 всех линейных МРКС через сутки снизилась в среднем на 13–19 %. В пробе с димеглюминовой солью гадопентетовой кислоты отмечено снижение данного показателя на $18,1 \pm 0,7$ %, с динатриевой солью гадопентетовой кислоты и ПВП — на $19,3 \pm 0,8$ %, с ЦГП — на $12,8 \pm 0,6$ %, с гадобеновой кислотой — на $15,9 \pm 0,5$ %. В случае гадобутрола время T_1 не претерпело значимых изменений (рис. 2). Наибольшее снижение T_1 наблюдалось через 1 и 24 ч после добавления хлорида цинка, а не сразу после его добавления, как в предыдущей серии опытов, когда в качестве среды была выбрана дистиллированная вода.

После добавления ПВП к димеглюминовой соли га-

допентетовой кислоты величина T_1 снижалась всего на $7,9 \pm 0,7$ %, в случае динатриевой соли этой кислоты — на $12,3 \pm 0,7$ % (рис. 3). Таким образом, ПВП статистически значимо улучшил стабильность этих линейных МРКС в среднем на 10 и 7 % соответственно. ПВП повысил стабильность ЦГП на 13 %, при этом величина T_1 через сутки оставалась без значимых изменений. В случае гадобеновой кислоты конечные величины T_1 в присутствии и в отсутствие ПВП достоверно не различались. Не отмечено какого-либо влияния ионов цинка на время релаксации гадобутрола в фосфатном буфере в присутствии ПВП (так же, как и в его отсутствие).

В сыворотке крови без добавления ПВП величина T_1 у линейных МРКС снижалась в среднем на 31–61 %, при этом наиболее значимое снижение происходило через 1 и 24 ч после внесения в пробы хлорида цинка (рис. 4). Лучшие показатели стабильности среди линейных МРКС наблюдались у ЦГП — снижение T_1 в среднем было на $31,2 \pm 0,3$ %, худшие — у солей гадопентетовой кислоты: в случае димеглюминовой соли — на $61,2 \pm 0,6$ %, динатриевой соли — на $56,1 \pm 0,1$ %. В пробах с гадобеновой кислотой величина T_1 снизилась на $50,2 \pm 0,1$ %, а в пробах с гадобутролом достоверного снижения T_1 отмечено не было. ПВП слабо, но статистически значимо повышал стабильность гадобеновой кислоты (на 5 %), не оказывая влияния на стабильность других МРКС (рис. 5).

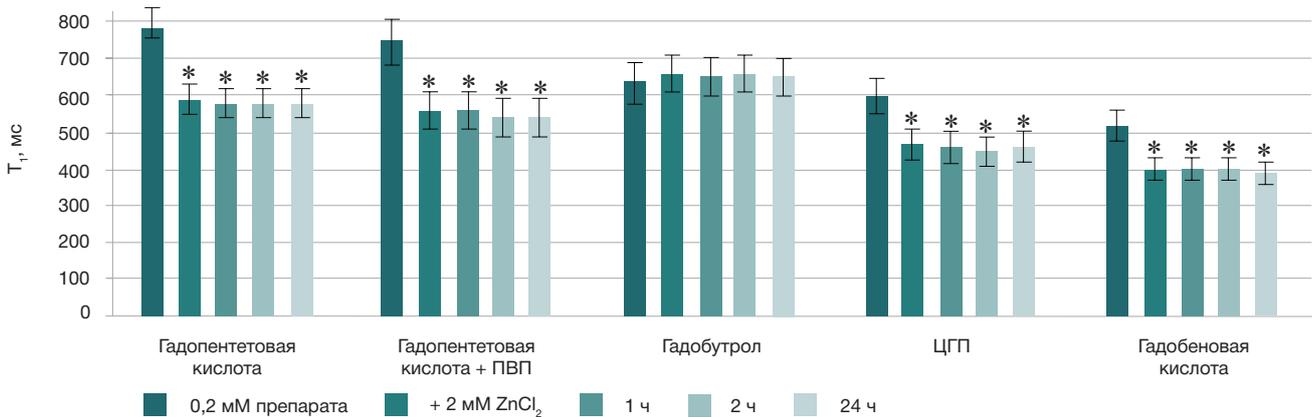


Рис. 1. Влияние ионов цинка на время релаксации протонов воды T_1 изучаемых растворов МРКС в воде (рН = 6,0) Здесь и на рис. 2–5: ЦГП — «Циклогадопентетат». * — статистически достоверное отличие от контроля (р < 0,05).

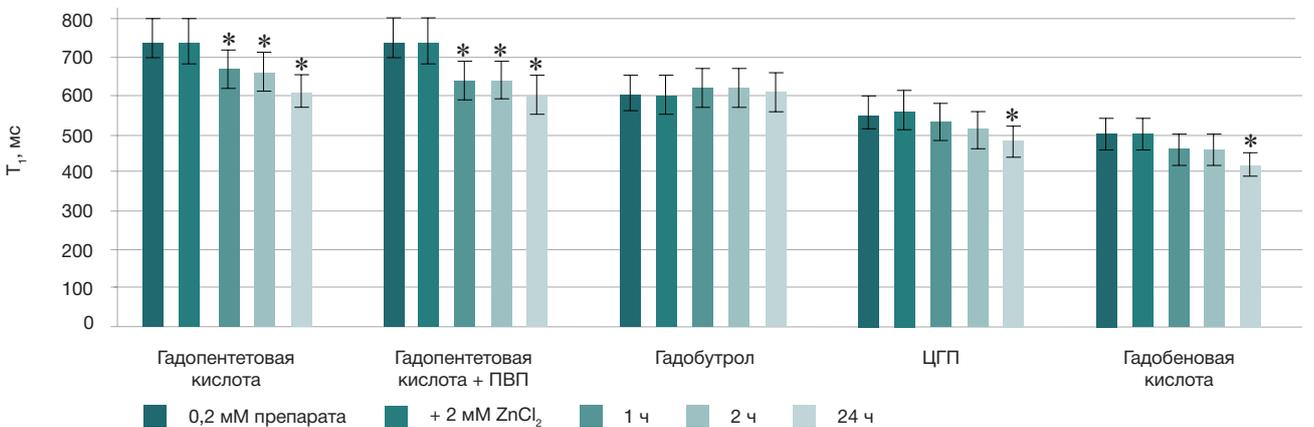


Рис. 2. Влияние ионов цинка на время релаксации протонов воды T_1 растворов МРКС в фосфатном буфере (рН = 7,4)

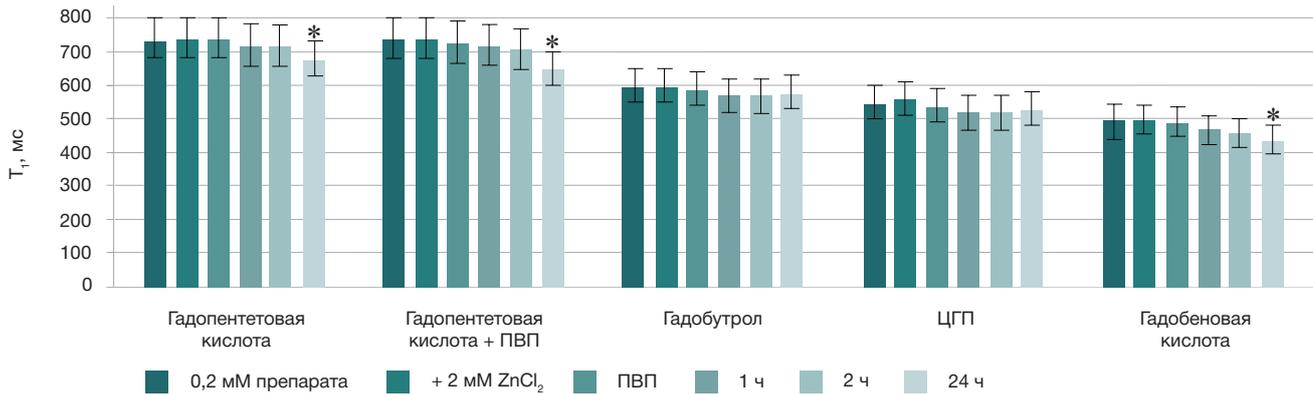


Рис. 3. Влияние ионов цинка и ПВП на время релаксации протонов воды T_1 растворов МРКС в фосфатном буфере (pH = 7,4)

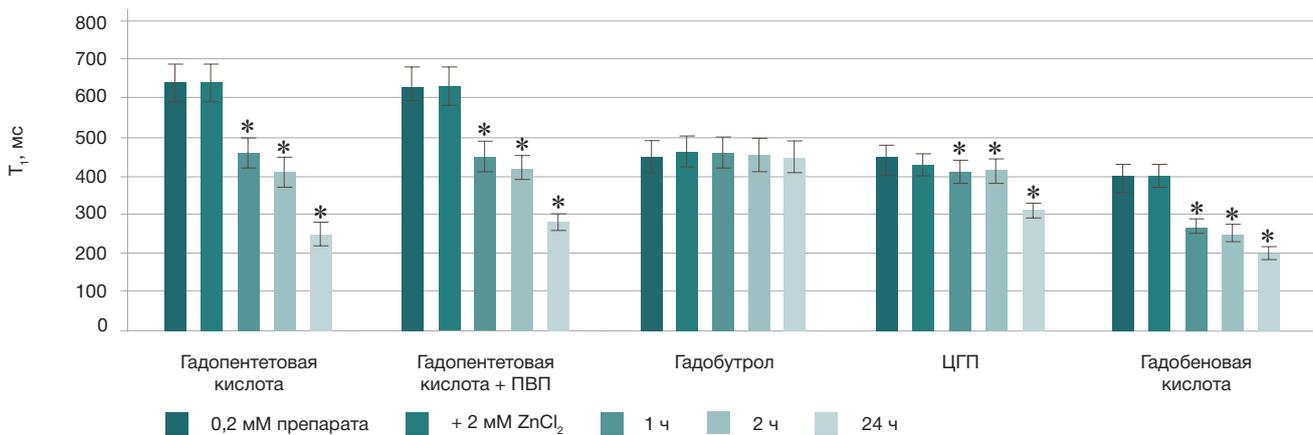


Рис. 4. Влияние ионов цинка на время релаксации протонов воды T_1 растворов МРКС в сыворотке, разбавленной фосфатным буфером (pH = 7,4)

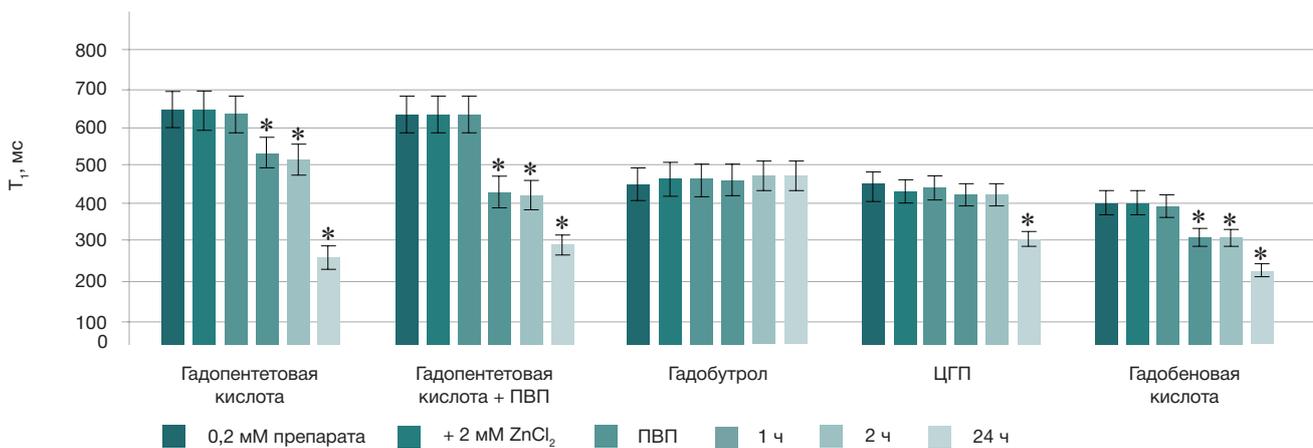


Рис. 5. Влияние ионов цинка и ПВП на время релаксации протонов воды T_1 растворов МРКС в сыворотке, разбавленной фосфатным буфером (pH = 7,4)

Влияние ионов кальция на стабильность МРКС

Под действием ионов кальция величина T_1 гадопентетата димеглюмина в отсутствие ПВП в воде достоверно не изменилась, а в фосфатном буфере и сыворотке крови снизилась на $7,8 \pm 0,7\%$ и $9,1 \pm 1,1\%$ соответственно. Добавление ПВП привело к статистически значимому улучшению стабильности гадопентетата димеглюмина в буфере и сыворотке крови. В опытах с ионами кальция стабильность гадопентетата димеглюмина в воде в присутствии ПВП не изменилась, о чем свидетельствует постоянство значения T_1 .

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Согласно полученным результатам, время продольной релаксации T_1 снижается во всех пробах с линейными МРКС при добавлении ионов цинка вне зависимости от присутствия ПВП. Уменьшение величины T_1 можно объяснить реакцией трансметаллизации между цинком и молекулой МРКС: ионы цинка замещают ионы гадолиния в хелатном комплексе, а в свободном виде ион гадолиния способен в большей степени укорачивать время релаксации протонов среды. На стабильность макроциклического гадобутрола ионы цинка не повлияли.

Наши результаты, указывающие на более высокую стабильность макроциклических МРКС, подтверждают литературные данные о диссоциации гадолиния в условиях *in vivo* при использовании линейных, но не макроциклических МРКС [13], а также данные о том, что цинк в результате трансметаллизации вызывает высвобождение гадолиния из хелатов линейных, но не макроциклических МРКС [12].

В сыворотке, разбавленной буфером до концентрации альбумина 10^{-4} М, за сутки величина T_1 снижалась в большей степени, чем в двух других средах. Видимо, это связано с тем, что в сыворотке содержится большое количество соединений, способных взаимодействовать как с положительно заряженными ионами Gd^{3+} (фосфат, цитрат, карбонат, гепарин и др.), так и с отрицательно заряженным хелатом (катионы металлов), что в итоге приводит к дестабилизации большего числа молекул МРКС и созданию большей концентрации свободного гадолиния по сравнению с другими средами. В результате в опытах с сывороткой крови T_1 снижается наиболее выражено.

Сопоставление результатов, полученных в опытах с ионами цинка и кальция, показало, что влияние последних на стабильность гадопентетата димеглюмина проявляется в меньшей степени.

В фосфатном буферном растворе ПВП в отличие от водного раствора статистически значимо увеличил стабильность трех изучаемых линейных МРКС. В связи с этим следует рассмотреть вопрос о целесообразности

включения ПВП в качестве вспомогательного компонента в состав лекарственных форм линейных МРКС.

Пациентам с почечной недостаточностью, у которых период полувыведения МРКС увеличен [14], следует избегать назначения линейных препаратов, особенно неионных, уступающих по стабильности макроциклическим. Эта рекомендация актуальна и для пациентов с состояниями, сопровождающимися повышенной концентрацией цинка и фосфатов в крови.

ВЫВОДЫ

Макроциклическое средство гадобутрол обладает большей стабильностью, чем все изученные линейные магнитно-резонансные контрастные средства, и ионы цинка не оказывают влияния на его релаксационные свойства. Линейные МРКС в присутствии ионов цинка наиболее стабильны в фосфатном буфере, наименее — в сыворотке крови. Поливинилпирролидон способен статистически значимо, но в небольшой степени улучшать стабильность линейных МРКС в фосфатном буфере (соответственно гадопентетата димеглюмина — на 10 %, динатриевой соли гадопентетовой кислоты — на 7 %, ЦГП — на 9 %) и в сыворотке крови (гадобеновой кислоты — на 5 %), но не в воде. Ионы кальция обладают значительно менее выраженным дестабилизирующим действием на гадопентетат димеглюмина, чем ионы цинка.

Литература

- Hao D, Ai T, Goerner F, Hu X, Runge VM, Tweedle M. MRI contrast agents: basic chemistry and safety. *J Magn Reson Imaging*. 2012; 36 (5): 1060–71.
- Vassallo DV, Simões MR, Furiere LB, Fiorese M, Fiorim J, Almeida EA, et al. Toxic effects of mercury, lead and gadolinium on vascular reactivity. *Braz J Med Biol Res*. 2011; 44 (9): 939–46.
- Marckmann P, Skov L, Rossen K, Dupont A, Damholt MB, Heaf JG, et al. Nephrogenic systemic fibrosis: suspected causative role of gadodiamide used for contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17 (9): 2359–62.
- Grobner T. Gadolinium — a specific trigger for the development of nephrogenic fibrosing dermopathy and nephrogenic systemic fibrosis? *Nephrol Dial Transplant*. 2006; 21 (4): 1104–8.
- Idée JM, Port M, Medina C, Lancelot E, Fayoux E, Ballet S, et al. Possible involvement of gadolinium chelates in the pathophysiology of nephrogenic systemic fibrosis: a critical review. *Toxicology*. 2008; 248 (2–3): 77–88.
- Radbruch A, Weberling LD, Kieslich PJ, Eidel O, Burth S, Kickingereder P, et al. Gadolinium retention in the dentate nucleus and globus pallidus is dependent on the class of contrast agent. *Radiology*. 2015; 275 (3): 783–91.
- Robert P, Violas X, Grand S, Lehericy S, Idée JM, Ballet S, et al. Linear gadolinium-based contrast agents are associated with brain gadolinium retention in healthy rats. *Invest Radiol*. 2016; 51 (2): 73–82.
- Шимановский Н. Л. Контрастные средства: руководство по рациональному применению. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2009. 464 с.
- Персанова Л. В., Сдобнова Е. А., Лысенко А. Н. Комплексообразующие и дезинтоксикационные свойства инфузионных растворов на основе поливинилпирролидона. *Вестн. службы крови России*. 2004; 3: 20–23.
- Laurent S, Elst LV, Copoix F, Muller RN. Stability of MRI paramagnetic contrast media: a proton relaxometric protocol for transmetallation assessment. *Invest Radiol*. 2001; 36 (2): 115–22.
- Kuo J, editor. *Methods in molecular biology*, Vol. 369: Electron microscopy: Methods and protocols. 2nd ed. Totowa, NJ: Humana Press Inc.; 2007.
- Taupitz M, Stolzenburg N, Ebert M, Schnorr J, Hauptmann R, Kratz H, et al. Gadolinium-containing magnetic resonance contrast media: investigation on the possible transchelation of $Gd(3+)$ to the glycosaminoglycan heparin. *Contrast Media Mol Imaging*. 2013; 8 (2): 108–16.
- Fretellier N, Bouzian N, Parmentier N, Bruneval P, Jestin G, Factor C, et al. Nephrogenic systemic fibrosis-like effects of magnetic resonance imaging contrast agents in rats with adenine-induced renal failure. *Toxicol Sci*. 2013; 131 (1): 259–70.
- Idée JM, Fretellier N, Robic C, Corot C. The role of gadolinium chelates in the mechanism of nephrogenic systemic fibrosis: A critical update. *Crit Rev Toxicol*. 2014; 44 (10): 895–913.

References

- Hao D, Ai T, Goerner F, Hu X, Runge VM, Tweedle M. MRI contrast agents: basic chemistry and safety. *J Magn Reson Imaging*. 2012; 36 (5): 1060–71.
- Vassallo DV, Simões MR, Furiere LB, Fiorese M, Fiorim J, Almeida EA, et al. Toxic effects of mercury, lead and gadolinium on vascular reactivity. *Braz J Med Biol Res*. 2011; 44 (9): 939–46.
- Marckmann P, Skov L, Rossen K, Dupont A, Damholt MB, Heaf JG, et al. Nephrogenic systemic fibrosis: suspected causative role of gadodiamide used for contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17 (9): 2359–62.
- Grobner T. Gadolinium — a specific trigger for the development of nephrogenic fibrosing dermopathy and nephrogenic systemic fibrosis? *Nephrol Dial Transplant*. 2006; 21 (4): 1104–8.
- Idée JM, Port M, Medina C, Lancelot E, Fayoux E, Ballet S, et al. Possible involvement of gadolinium chelates in the pathophysiology of nephrogenic systemic fibrosis: a critical review. *Toxicology*. 2008; 248 (2–3): 77–88.
- Radbruch A, Weberling LD, Kieslich PJ, Eidel O, Burth S,

- Kickingereeder P, et al. Gadolinium retention in the dentate nucleus and globus pallidus is dependent on the class of contrast agent. *Radiology*. 2015; 275 (3): 783–91.
7. Robert P, Violas X, Grand S, Lehericy S, Idée JM, Ballet S, et al. Linear gadolinium-based contrast agents are associated with brain gadolinium retention in healthy rats. *Invest Radiol*. 2016; 51 (2): 73–82.
 8. Shimanovskii NL. Kontrastnye sredstva: rukovodstvo po ratsional'nomu primeneniyu. Moscow: GEOTAR-Media; 2009. 464 p. Russian.
 9. Persanova LV, Sdobnova EA, Lysenko AN. Komplekso-obrazuyushchie i dezintoksikatsionnye svoystva infuzionnykh rastvorov na osnove polivinilpirrolidona. *Vestn. sluzhby krovii Rossii*. 2004; 3: 20–23. Russian.
 10. Laurent S, Elst LV, Copoix F, Muller RN. Stability of MRI paramagnetic contrast media: a proton relaxometric protocol for transmetallation assessment. *Invest Radiol*. 2001; 36 (2): 115–22.
 11. Kuo J, editor. *Methods in molecular biology*, Vol. 369: *Electron microscopy: Methods and protocols*. 2nd ed. Totowa, NJ: Humana Press Inc.; 2007.
 12. Taupitz M, Stolzenburg N, Ebert M, Schnorr J, Hauptmann R, Kratz H, et al. Gadolinium-containing magnetic resonance contrast media: investigation on the possible transchelation of Gd(3+) to the glycosaminoglycan heparin. *Contrast Media Mol Imaging*. 2013; 8 (2): 108–16.
 13. Fretellier N, Bouzian N, Parmentier N, Bruneval P, Jestin G, Factor C, et al. Nephrogenic systemic fibrosis-like effects of magnetic resonance imaging contrast agents in rats with adenine-induced renal failure. *Toxicol Sci*. 2013; 131 (1): 259–70.
 14. Idée JM, Fretellier N, Robic C, Corot C. The role of gadolinium chelates in the mechanism of nephrogenic systemic fibrosis: A critical update. *Crit Rev Toxicol*. 2014; 44 (10): 895–913.

ПОДХОДЫ К УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЮ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ПОМОЩИ БОЛЬНЫМ ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ И КРИТЕРИИ ЕЕ ОЦЕНКИ

О. П. Фролова¹✉, И. В. Щукина², О. А. Новоселова¹, В. А. Стаханов³, А. Б. Казенный⁴

¹ Центр противотуберкулезной помощи больным ВИЧ-инфекцией, Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова, Москва

² Управление организации медико-санитарного обеспечения, Федеральная служба исполнения наказаний России, Москва

³ Кафедра фтизиатрии, лечебный факультет, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

⁴ Противотуберкулезный диспансер, Белгород

Несмотря на различные меры по борьбе с туберкулезом, сочетанным с ВИЧ-инфекцией, эпидемиологическая ситуация по заболеванию в России продолжает ухудшаться. Нами были проанализированы данные отчетной формы № 61 за 1999-2014 гг., данные персонифицированного мониторинга больных туберкулезом, сочетанным с ВИЧ-инфекцией, за 2004-2014 гг. (личные данные) и организация противотуберкулезной помощи больным ВИЧ-инфекцией в 20 регионах. Основными причинами ухудшения эпидемиологической ситуации являются нарастание иммунодефицита среди пациентов с сочетанным туберкулезом, отсутствие разделения эпидемиологически опасных потоков пациентов (больных туберкулезом и больных ВИЧ-инфекцией) и невысокий уровень профилактической работы в специализированных медицинских учреждениях. Химиопрофилактика может быть эффективным средством борьбы с распространением туберкулеза среди больных ВИЧ-инфекцией, если она будет назначаться подготовленным врачом-фтизиатром пациентам, готовым принимать лекарства под наблюдением медицинского персонала. Иначе масштабная химиопрофилактика может вызвать рост доли пациентов с туберкулезом с лекарственной устойчивостью. Предложены критерии оценки эффективности противотуберкулезной помощи с учетом патогенеза заболевания на поздних стадиях ВИЧ-инфекции.

Ключевые слова: туберкулез, ВИЧ-инфекция, противотуберкулезная помощь, химиопрофилактика туберкулеза

Благодарности: автор благодарит Елену Белякову из Московского областного противотуберкулезного диспансера (Москва) за консультации при обсуждении вопросов организации противотуберкулезной помощи больным ВИЧ-инфекцией.

✉ **Для корреспонденции:** Ольга Петровна Фролова
127473, г. Москва, ул. Достоевского, д. 4; opfrolova@yandex.ru

Статья поступила: 06.12.2015 **Принята к печати:** 20.01.2016

APPROACHES TO IMPROVING TUBERCULOSIS CARE IN HIV-INFECTED PATIENTS AND CRITERIA FOR ITS EVALUATION

Frolova OP¹✉, Schukina IV², Novoselova OA¹, Stakhanov VA³, Kazennyi AB⁴

¹ Tuberculosis Relief Centre for HIV-infected patients, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

² Department of Health Care, Federal Penitentiary Service of the Russian Federation, Moscow, Russia

³ Therapeutic Faculty, Department of Phthiology, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

⁴ Tuberculosis Dispensary, Belgorod, Russia

Despite various anti-tuberculosis measures in the setting of HIV infection, the epidemiological situation of tuberculosis in Russia is deteriorating. We have analyzed the data of statistical report form no.61 for years 2004-2014, surveillance data on individual TB cases with HIV coinfection for years 2004-2014 (personal data) and TB care arrangements for patients with HIV in 20 regions. The main causes of the deteriorating epidemiological situation are the growing immunodeficiency in patients with TB coinfection, unseparated epidemiologically dangerous patient flows (patients with tuberculosis and HIV-infected patients) and low quality preventative measures in special care medical facilities. Chemoprophylaxis can be an effective method of controlling the spread of tuberculosis among HIV-infected patients if it is recommended by a qualified tuberculosis therapist to patients adhering to regular drug intake under supervision of medical personnel. Otherwise a large scale chemoprophylaxis can result in an increased proportion of patients with drug-resistant tuberculosis. This works suggests criteria for the evaluation of tuberculosis care effectiveness considering the pathogenesis of the disease during late stages of HIV.

Keywords: tuberculosis, HIV-infection, tuberculosis care, tuberculosis chemoprophylaxis

Acknowledgments: authors thank Elena Belyakova of Moscow Regional Tuberculosis Dispensary, Moscow, for her advice while discussing the issue of tuberculosis care arrangements for HIV-infected patients.

✉ **Correspondence should be addressed:** Olga P. Frolova
ul. Dostoevskogo, d.4, Moscow, Russia, 127473; opfrolova@yandex.ru

Received: 06.12.2015 **Accepted:** 20.01.2016

Всемирная организация здравоохранения определяет борьбу с туберкулезом среди больных ВИЧ-инфекцией как одно из приоритетных направлений в здравоохранении, и его важный аспект — качественный эпидемиологический надзор [1]. В России также разрабатывают стратегию борьбы с туберкулезом, сочетанным с ВИЧ-инфекцией [2], а эпидемиологическую ситуацию и подходы к организации противотуберкулезной помощи таким пациентам начали обсуждать еще в конце 1990-х гг. [3, 4].

В 1999 году в России был начат учет больных туберкулезом, сочетанным с ВИЧ-инфекцией, по отчетной форме № 61 Федерального статистического наблюдения «Сведения о контингентах больных ВИЧ-инфекцией». В 2001 году были опубликованы первые результаты ее анализа [5], а в 2002 году вышло первое пособие для врачей по противотуберкулезной помощи больным ВИЧ-инфекцией [6]. Позднее разработанные российскими исследователями подходы были одобрены экспертами ВОЗ и были выпущены совместные рекомендации [7, 8]. Россия стала первой и до сих пор остается единственной страной, где внедрен персонализированный мониторинг больных туберкулезом, сочетанным с ВИЧ-инфекцией [9]. В 2008 году в отчетную форму № 61 начали вносить ряд сведений о случаях туберкулеза у больных ВИЧ-инфекцией по данным персонализированного мониторинга, осуществляемого врачами в регионах. В 2004 году под эгидой Министерства здравоохранения Российской Федерации было начато обучение врачей-фтизиатров и врачей-инфекционистов, работающих с больными ВИЧ-инфекцией. В 2014 году Российское общество фтизиатров (РОФ) выпустило «Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению туберкулеза у больных ВИЧ-инфекцией», в которых расширило и модернизировало подходы к химиопрофилактике туберкулеза [10]. В настоящее время обсуждается проект инструкции по химиопрофилактике туберкулеза у больных ВИЧ-инфекцией (разослан в региональные центры по профилактике и борьбе со СПИД, есть у авторов). Но, несмотря на принимаемые меры, эпидемиологическая ситуация по заболеванию продолжает ухудшаться.

Мы проанализировали данные отчетной формы № 61 за 1999-2014 гг. и данные персонализированного мониторинга больных туберкулезом, сочетанным с ВИЧ-инфекцией, за 2004-2014 гг. (личные данные), а также организацию противотуберкулезной помощи больным ВИЧ-инфекцией и информационные материалы о заболевании, предоставляемые пациентам, в 20 регионах, чтобы выявить возможные причины неэффективности существующих подходов к организации противотуберкулезной помощи больным ВИЧ-инфекцией. На основе анализа нами были предложены некоторые меры по её совершенствованию.

Анализ эпидемиологической ситуации

По данным формы № 61, заболеваемость туберкулезом, сочетанным с ВИЧ-инфекцией, в 1999 году составила 0,2 случая на 100 тыс. человек, а в 2014 году — 9,8. Распространенность заболевания также выросла: с 0,35 до 25,8 случая на 100 тыс. человек. Туберкулез все чаще становится причиной смерти при тяжелом иммунодефиците, обусловленном ВИЧ-инфекцией: в 2008 году (начало учета показателя в форме № 61) на долю туберкулеза приходилось 75,7 % смертей больных с поздними стадиями ВИЧ-инфекции, а в 2014 году — уже 86,9 %. Учитывая патогенез туберкулеза на поздних стадиях ВИЧ-

инфекции можно предположить, что основной причиной роста заболеваемости туберкулезом в стране является именно нарастание иммунодефицита среди больных ВИЧ-инфекцией.

Другая причина ухудшения эпидемиологической ситуации — невысокий уровень профилактической работы в среде больных туберкулезом, сочетанным с ВИЧ-инфекцией. Так, в 2014 году у 7,8 % таких пациентов в семьях были другие больные ВИЧ-инфекцией, однако в информационных материалах для них мы не нашли сведений о мерах профилактики туберкулеза в семье и особенностях течения туберкулеза на поздних стадиях ВИЧ-инфекции. Результатом этого является и рост заболеваемости туберкулезом детей с ранними стадиями ВИЧ-инфекции: в 2014 году туберкулезом заболели 143 ребенка, и у 47,5 % из них была ранняя стадия ВИЧ-инфекции. Это означает, что туберкулез у этих детей развился не в связи иммунодефицитом.

Анализ организации обследования больных ВИЧ-инфекцией на туберкулез в разных регионах показал, что нередко именно на этапе обследования создаются условия для распространения туберкулеза. В частности, для исключения туберкулеза пациентов с тяжелым иммунодефицитом госпитализируют на диагностику в противотуберкулезные отделения, где могут быть больные с еще не выявленным туберкулезом с бактериовыделением. Иногда всех больных ВИЧ-инфекцией госпитализируют в одно отделение независимо от наличия бактериовыделения и показаний для госпитализации (диагностика или лечение). Такой порядок усугубляет эпидемиологическую ситуацию по туберкулезу среди больных ВИЧ-инфекцией. Например, среди больных микобактериозами (без ВИЧ-инфекции), получавших лечение в противотуберкулезном учреждении, 9 % заразились и заболели еще и туберкулезом [12].

Эффективность химиопрофилактики туберкулеза

Химиопрофилактика туберкулеза у больных ВИЧ-инфекцией, несомненно, является одним из эффективных средств предотвращения распространения заболевания, если прием препаратов контролируется врачом. Однако обеспечить такой контроль крайне трудно из-за социального неблагополучия значительной части больных ВИЧ-инфекцией. Так, в 2014 году среди больных ВИЧ-инфекцией, заболевших туберкулезом, лица трудоспособного возраста, не работающие продолжительное время, составили 75,5 %, заразившиеся при введении наркотиков — 66,2 %, находившиеся или находившиеся ранее в пенитенциарных учреждениях — 42,1 %. В связи с этим указать обеспечить охват химиопрофилактикой туберкулеза не менее 50 % больных ВИЧ-инфекцией [13] вызывает тревогу, поскольку может спровоцировать рост лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза.

Это предположение подтверждают данные проведенного нами персонализированного мониторинга: в 2011 году туберкулез с первичной множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ) к изониазиду и рифампицину был выявлен у 41 % больных, а в 2014 году — у 42,1 %. Кроме того, туберкулез с первичной лекарственной устойчивостью к другим двум и более препаратам имели еще 15,4 % больных в 2011 году и 15,9 % — в 2014. В пенитенциарных учреждениях ситуация хуже: в 2014 году первичный МЛУ-ТБ был выявлен у 55,9 % больных, а туберкулез с первичной полирезистентностью — у 16 % (очевидно,

это связано с тем, что больные в таких учреждениях крайне социально неблагополучны, а источником инфекции являются лица из этой же среды). Важно, что для названных показателей не наблюдается тенденция к снижению.

Возникает вопрос: не будет ли проведение неконтролируемой химиопрофилактики туберкулеза больным ВИЧ-инфекцией дополнительной причиной возникновения и распространения штаммов микобактерий, устойчивых к противотуберкулезным препаратам? Будет ли она эффективна даже при регулярном приеме препаратов, если в проекте инструкции по химиопрофилактике туберкулеза у больных ВИЧ-инфекцией предлагается применять рифампицин, к которому у многих заболевших уже имеется первичная лекарственная устойчивость и который не сочетается с антиретровирусными препаратами, входящими в основную схему лечения ВИЧ-инфекции? Кроме того, вызывает сомнение сама возможность охватить такое число больных ВИЧ-инфекцией (не менее 50 %), если, по нашим данным, около 30 % из них не встанут на учет в центры по профилактике и борьбе со СПИД (ЦСПИД), а более 12 % вставших на учет не проходят диспансеризацию. При этом вызывать на прием больных ВИЧ-инфекцией без их согласия с 1995 года запрещено законодательно [14].

На наш взгляд, назначать химиопрофилактику туберкулеза больным ВИЧ-инфекцией может только фтизиатр, прошедший подготовку по этой проблеме, и только пациентам, имеющим приверженность к регулярному приему препаратов. Сам прием препаратов должен осуществляться под контролем медицинского персонала в ЦСПИД или кабинете, обеспечивающем его функции на муниципальном уровне. Проведение химиопрофилактики туберкулеза больным ВИЧ-инфекцией в учреждении противотуберкулезного профиля, то есть в очаге инфекции, недопустимо.

Способы повышения качества противотуберкулезной помощи больным ВИЧ-инфекцией

Необходимо обеспечить такой порядок противотуберкулезной помощи больным ВИЧ-инфекцией, который сводил бы к минимуму вероятность контакта лиц с тяжелым иммунодефицитом и больных туберкулезом.

Лечебную помощь больным туберкулезом, сочетанным с ВИЧ-инфекцией, следует оказывать в разных противотуберкулезных отделениях в зависимости от наличия у пациентов бактериовыделения и лекарственной устойчивости микобактерий. Для их лечения при противотуберкулезном стационаре должны быть предусмотрены ставки врача-фтизиатра и врача-инфекциониста. На эти должности врачи могут быть приняты только после профессиональной переподготовки. Их число должно определяться нагрузкой (числом пациентов), и оба специалиста должны состоять в штате не отделений, а стационара, и вести больных ВИЧ-инфекцией, распределенных по отделениям.

Чтобы минимизировать вероятность контакта больных с поздними стадиями ВИЧ-инфекции и больных туберкулезом с бактериовыделением, завершать лечение туберкулеза в фазе продолжения при стойком отсутствии бактериовыделения должны врачи-фтизиатры, но на базе учреждений, оказывающих специализированную помощь больным ВИЧ-инфекцией. То же касается диспансерного наблюдения пациентов из третьей группы учета. Лечение больных ВИЧ-инфекцией с хроническими формами туберкулеза с бактериовыделением должно осуществляться только в противотуберкулезном диспансере.

Таким образом, основную работу по профилактике, выявлению, диагностике туберкулеза, а также дифференциальной диагностике туберкулеза и других вторичных заболеваний при ВИЧ-инфекции должны проводить учреждения, оказывающие помощь больным ВИЧ-инфекцией.

Критерии оценки эффективности противотуберкулезной помощи больным ВИЧ-инфекцией

Некоторые общепринятые во фтизиатрии критерии неактуальны на поздних стадиях ВИЧ-инфекции и могут дискредитировать работу фтизиатрической службы. Например, указание рассматривать выявление туберкулеза при обращении больного с жалобами как неудовлетворительную работу: у больного с тяжелым иммунодефицитом клинические проявления заболевания нередко развиваются раньше, чем появляются изменения на рентгенограмме, поэтому выявить заболевание при плановой лучевой диагностике, как правило, не удастся. Летальный исход от туберкулеза может наступить при отсутствии изменений на рентгенограмме легких. Даже при небольшой задержке обращения больного за медицинской помощью смерть наступает в результате остро прогрессирующего заболевания. Рассматривать смерть от туберкулеза в этих случаях как результат плохо организованной диагностики нельзя. Для выявления туберкулеза на поздних стадиях ВИЧ-инфекции особое значение приобретают программы информирования больных ВИЧ-инфекцией о необходимости незамедлительного обращения к фтизиатру ЦСПИД при первых симптомах болезни [15].

В связи с вышеизложенными критериями оценки эффективности противотуберкулезной помощи больным ВИЧ-инфекцией должны формироваться с учетом особенностей патогенеза туберкулеза на поздних стадиях ВИЧ-инфекции. Возможно, с этой целью целесообразно рассматривать: долю очагов туберкулеза, осмотренных медперсоналом в течение первых трех дней (из числа выявленных очагов туберкулеза, в которых проживают больные ВИЧ-инфекцией); долю детей, рожденных женщинами, больными ВИЧ-инфекцией, изолированных из очагов туберкулеза (из числа находившихся в очагах); долю расхождений между клиническим и патологоанатомическим диагнозом (если больной находился в стационаре месяц и более) с учетом частоты аутопсий в случаях смерти больных с сочетанной инфекцией; долю случаев, в которых при аутопсии у больных туберкулезом не были выявлены другие вторичные заболевания, характерные для ВИЧ-инфекции (если больной находился в стационаре месяц и более).

Заключение

Распространение туберкулеза среди больных ВИЧ-инфекцией нередко обусловлено нарушением противоэпидемиологических требований к оказанию помощи таким пациентам, в частности, отсутствием разделения эпидемиологически опасных потоков пациентов (больных туберкулезом и лиц с иммунодефицитом). Профилактика, выявление и диагностика туберкулеза у больных с поздними стадиями ВИЧ-инфекции должны осуществляться в центрах профилактики и борьбы со СПИД или в учреждениях, выполняющих их функции.

Неконтролируемая химиопрофилактика туберкулеза среди социально неблагополучных больных может спо-

способствовать распространению штаммов микобактерий туберкулеза, устойчивых к противотуберкулезным препаратам. Химиопрофилактику следует проводить тем, кто готов регулярно принимать препараты под контролем медиков. Назначать химиопрофилактику должен только специально обученный фтизиатр.

Литература

1. Залескис Р. Принципы контроля ВИЧ-ассоциированного туберкулеза в Европейском регионе Всемирной организации здравоохранения. Туберкулез и болезни легких. 2014; (6): 69–70.
2. Васильева И. А., Таран Д. В. Проект по сбору и изучению лучших примеров организации и лечения и клинического ведения больных туберкулезом, в том числе с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя и сочетанным с туберкулезом. Туберкулез и болезни легких. 2014; (1): 3–6.
3. Наркевич М. И., Фролова О. П., Кочетков Н. М. Основные пути оптимизации профилактики туберкулеза у больных ВИЧ-инфекцией. Русский журнал «ВИЧ/СПИД и родственные проблемы». 1998; 2 (1): 76–79.
4. Фролова О. П., Рахманова А. Г., Приймак А. А., Васильев А. В. Особенности течения туберкулеза у больных ВИЧ-инфекцией и меры его профилактики. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1999; (1): 67–69.
5. Фролова О. П. Эпидемическая ситуация по туберкулезу среди больных ВИЧ-инфекцией в России и система мер его профилактики. Проблемы туберкулеза. 2001; (5): 31–34.
6. Покровский В. В., Фролова О. П., Кравченко А. В. и др. Организация фтизиатрической помощи больным ВИЧ-инфекцией: пособие для врачей. М., 2002. 39 с.
7. Фролова О. П., Кравченко А. В., Батыров Ф. А. и др. Рекомендации по снижению заболеваемости туберкулезом среди населения с высокой распространенностью ВИЧ-инфекции: пособие для врачей. М.: Издательство «Триада»; 2004. 104 с.
8. Фролова О. П., Кравченко А. В., Мартынов А. А., Батыров

Общепринятые фтизиатрические критерии для оценки эффективности противотуберкулезной помощи больным с поздними стадиями ВИЧ-инфекции необъективны, и следует использовать критерии, учитывающие особенности патогенеза туберкулеза в условиях тяжелого иммунодефицита.

- Ф. А. Организация противотуберкулезной помощи больным ВИЧ-инфекцией: пособие для врачей. М.–Тверь: Издательство «Триада»; 2006. 119 с.
9. Приказ Минздрава РФ от 13.11.2013 г. №547 об утверждении учетной формы № 263/У–ТВ «Карта персонального учета на больного туберкулезом, сочетанным с ВИЧ-инфекцией».
10. Васильева И. А., Покровский В. В., Аксенова В. А., Марьяндышев А. О., Эргешов А. Э., Черноусова Л. Н. и др. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению туберкулеза у больных ВИЧ-инфекцией. Тверь: Издательство «Триада»; 2014. 55 с.
11. Фролова О. П. Туберкулез у больных ВИЧ-инфекцией: клинико-морфологические и эпидемиологические аспекты. Проблемы туберкулеза. 2002; (6): 30–33.
12. Оттен Т. Ф., Васильев А. В. Микобактериоз. СПб.: Медицинская пресса; 2005. 224 с.
13. Письмо Министерства здравоохранения Российской Федерации от 15.06.2015 г. № 17–06–3109.
14. Федеральный закон от 30 марта 1995 г. № 38–ФЗ «О предупреждении распространения в Российской Федерации заболевания, вызываемого вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ-Инфекции) (с изменениями на 30 декабря 2015 г.)». Доступно по ссылке: <http://pravo.gov.ru/proxy/ips/?docbody=&nd=102034858&intelsearch=38-%D4%C7>.
15. Фролова О. П. Профилактика туберкулеза у больных ВИЧ-инфекцией: методические рекомендации. М.: ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России; 2014. 36 с.

References

1. Zaleskis R. Printsipy kontrolya VICH-assotsirovannogo tuberkuleza v Evropeyskom regione Vsemirnoy organizatsii zdavookhraneniya. Tuberkulez i bolezni legkikh. 2014; (6): 69–70. Russian.
2. Vasil'eva I. A., Taran D. V. Proekt po sboru i izucheniyu luchshikh primerov organizatsii i lecheniya i klinicheskogo vedeniya bol'nykh tuberkulezom, v tom chisle s mnozhestvennoy lekarstvennoy ustoychivost'yu vozbuditelya i sochetannym s tuberkulezom. Tuberkulez i bolezni legkikh. 2014; (1): 3–6. Russian.
3. Narkevich M. I., Frolova O. P., Kochetkov N. M. Osnovnye puti optimizatsii profilaktiki tuberkuleza u bol'nykh VICH-infektsiy. Russkiy zhurnal «VICH/SPID i rodstvennye problemy». 1998; 2 (1): 76–79. Russian.
4. Frolova O. P., Rakhmanova A. G., Priymak A. A., Vasil'ev A. V. Osobennosti techeniya tuberkuleza u bol'nykh VICH-infektsiy i mery ego profilaktiki. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii. 1999; (1): 67–69. Russian.
5. Frolova O. P. Epidemicheskaya situatsiya po tuberkulezu sredi bol'nykh VICH-infektsiy v Rossii i sistema mer ego profilaktiki. Problemy tuberkuleza. 2001; (5): 31–34. Russian.
6. Pokrovskiy V. V., Frolova O. P., Kravchenko A. V. I dr. Organizatsiya ftiziatricheskoy pomoshchi bol'nym VICH-infektsiy: posobie dlya vrachey. M., 2002. 39 p. Russian.
7. Frolova O. P., Kravchenko A. V., Batyrov F. A. i dr. Rekomendatsii po snizheniyu zaboлеваemosti tuberkulezom sredi naseleniya s vysokoy rasprostranennost'yu VICH-infektsii: posobie dlya vrachey. M.: Izdatel'stvo "Triada"; 2004. 104 p. Russian.
8. Frolova O. P., Kravchenko A. V., Martynov A. A., Batyrov F. A.

- Organizatsiya protivotuberkuleznoy pomoshchi bol'nym VICH-infektsiy: posobie dlya vrachey. M.–Tver': Izdatel'stvo "Triada"; 2006. 119 p. Russian.
9. Prikaz Minzdrava RF ot 13.11.2013 №547 ob utverzhdenii uchetonoy formy № 263/U–TV "Karta personal'nogo ucheta na bol'nogo tuberkulezom, sochetannym s VICH-infektsiy". Russian.
10. Vasil'eva I. A., Pokrovskiy V. V., Aksenova V. A., Mar'yandyshhev A. O., Ergeshov A. E., Chernousova L. N. i dr. Federal'nye klinicheskie rekomendatsii po diagnostike i lecheniyu tuberkuleza u bol'nykh VICH-infektsiy. Tver': Izdatel'stvo "Triada"; 2014. 55 p. Russian.
11. Frolova O. P. Tuberkulez u bol'nykh VICH-infektsiy: kliniko-morfologicheskie i epidemiologicheskie aspekty. Problemy tuberkuleza. 2002; (6): 30–33. Russian.
12. Otten T. F., Vasil'ev A. V. Mikobakterioz. SPb.: Meditsinskaya pressa; 2005. 224 p. Russian.
13. Pis'mo Ministerstva zdavookhraneniya Rossiyskoy Federatsii ot 15.06.2015. № 17–06–3109. Russian.
14. Federal'nyy zakon ot 30 marta 1995 g. № 38–FZ "O preduprezhdenii rasprostraneniya v Rossiyskoy Federatsii zabolevaniya, vyzvaemogo virusom immunodefitsita cheloveka (VICH-Infektsii) (s izmeneniyami na 30 dekabrya 2015)". Available from: <http://pravo.gov.ru/proxy/ips/?docbody=&nd=102034858&intelsearch=38-%D4%C7>.
15. Frolova O. P. Profilaktika tuberkuleza u bol'nykh VICH-infektsiy: metodicheskie rekomendatsii. M.: GBOU VPO RNI MU im. N. I. Pirogova Minzdrava Rossii; 2014. 36 p. Russian.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СОВРЕМЕННОГО РОССИЙСКОГО И ЗАРУБЕЖНОГО ПОДХОДОВ К ОЦЕНКЕ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ

А. С. Анискевич¹✉, Р. А. Хальфин², Л. В. Татарина³

¹ Министерство здравоохранения Российской Федерации, Москва

² Высшая школа управления здравоохранением,
Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова, Москва

³ Российское общество врачей восстановительной медицины, медицинской реабилитации, курортологов и физиотерапевтов, Москва

В статье приведены основные методы оценки деятельности российских медицинских научных организаций. Описаны количественные и качественные показатели эффективности. Представлен мировой опыт, проведен сравнительный анализ методов оценки, используемых в России и за рубежом. Рассмотрены мировые тенденции развития подходов к изучению эффективности научных учреждений. На основании проведенного анализа продемонстрированы убедительные данные о необходимости разработки более совершенных критериев оценки деятельности научных медицинских организаций.

Ключевые слова: оценка деятельности медицинских научных организаций, результативность и востребованность научных исследований, кадровый потенциал, интеграция в мировое научное пространство, распространение научных знаний, повышение престижа науки, ресурсное обеспечение деятельности научной организации

✉ **Для корреспонденции:** Анна Сергеевна Анискевич
127994 ГСП-4, г. Москва, Рахмановский пер., д. 3; anna.aniskevich@yandex.ru

Статья поступила: 20.02.2016 **Принята к печати:** 24.02.2016

COMPARATIVE ANALYSIS OF MODERN APPROACHES TO THE PERFORMANCE ASSESSMENT OF SCIENTIFIC MEDICAL ORGANIZATIONS IN RUSSIA AND ABROAD

Aniskevich AS¹✉, Halfin RA², Tatarinova LV³

¹ Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russia

² Higher School of Healthcare Management,
The First Sechenov Moscow State Medical University, Moscow, Russia

³ Russian Society of Regenerative Medicine, Medical Rehabilitation, Physiotherapists and Balneologists, Moscow, Russia

The article reviews basic methods of performance assessment of scientific medical organizations in Russia. Qualitative and quantitative effectiveness criteria are provided. International practices are described; a comparative analysis of assessment methods used in Russia and abroad is carried out. Global trends in the development of approaches to analyzing the effectiveness of scientific organizations are reviewed. Based on our analysis, a compelling rationale for developing more up-to-date criteria for evaluating the performance of scientific medical organizations is given.

Keywords: performance assessment of scientific medical organizations, effectiveness and relevance of scientific research, human resources, integration into world science, dissemination of scientific knowledge, enhancing the prestige of science, resource maintenance of the scientific organization

✉ **Correspondence should be addressed:** Anna Aniskevich
Rakhmanovskii per., d. 3, Moscow, Russia, 127994, GSP-4; anna.aniskevich@yandex.ru

Received: 20.02.2016 **Accepted:** 24.02.2016

Современный подход к оценке медицинских научных учреждений в сфере здравоохранения в России является преимущественно количественным и включает большое число показателей. С одной стороны, такой комплексный анализ позволяет собирать разносторонние сведения об организациях и отдельных направлениях их деятельности, с другой — усложняет регулярный мониторинг и получение объективного результата. Использование числовых шкал предполагает расчет итогового усредненного по-

казателя, на основании которого проводят дальнейший сравнительный анализ. Объединение разнородных факторов, невозможность определения наиболее важных из них, сложность четкой интерпретации полученных значений повышают вероятность ошибок в оценке научных учреждений при применении количественного подхода. Результаты оценки могут оказаться неполными или недостаточно достоверными для решения вопроса о дальнейшей перспективе научной организации [1].

Согласно составу сведений о результатах деятельности научных организаций, выполняющих научно-исследовательские, опытно-конструкторские и технологические работы гражданского назначения, представляемых в целях мониторинга и оценки, утвержденному приказом Минобрнауки России от 05.03.2014 № 162, основными показателями эффективности являются:

- результативность и востребованность научных исследований;
- развитие кадрового потенциала;
- интеграция в мировое научное пространство, распространение научных знаний и повышение престижа науки;
- ресурсное обеспечение деятельности научной организации.

Результативность и востребованность деятельности научных организаций

В достаточной мере результативность и востребованность деятельности учреждений науки в сфере здравоохранения позволяют оценить количественные и качественные характеристики их научной активности. Для комплексной оценки данного направления также учитываются ресурсные показатели — финансирование, кадры и материально-техническое обеспечение.

Применение для анализа деятельности научных организаций преимущественно количественных методов привело к активному развитию наукометрических систем [2–4]. На сегодняшний день по числу научных публикаций Россия занимает 15–18-е место в мире. Однако по уровню цитирования опубликованных трудов она не входит в список 20 стран-лидеров [5].

Наукометрию, как достоверный инструмент оценки научных организаций и сообществ, активно используют в России и за рубежом. С 2005 г. в отечественной наукометрии применяют Российский индекс научного цитирования [2, 6]. В число основных показателей оценки результативности научных исследований входит публикационная активность ученых в российских и зарубежных научных изданиях [6–8]. Анализируется преимущественно количество публикаций, а также число цитирований работ, включенных в мировые базы данных Web of Science и Scopus и национальную информационно-аналитическую систему Российский индекс научного цитирования [9]. Количественный анализ публикационной активности — простой, но достоверный и наглядный метод определения результативности научной организации. Качественные методы оценки характеризуют достоверность, актуальность, репрезентативность и доступность [3, 4].

В большинстве экономически развитых стран, так же как и в России, используют количественные показатели оценки [10]. Например, в Великобритании для анализа применяют три основных критерия. Первый из них включает изучение новизны, значимости и степени проработки научных тематик, второй исследует масштабность результатов проведенных исследований [11], третий — конкурентоспособность научной организации [12]. В процедуре проведения экспертизы используют двойной слепой метод [13]. Результативность деятельности национальных университетов Великобритании оценивают с помощью программы Research Assessment Exercise раз в 4 года. Итоговые рейтинговые данные служат основанием для дальнейшего финансирования. Сходный анализ при подготовке экономических решений применяют и в США [14, 15].

В США основным методом оценки эффективности и безопасности созданных технологий являются систематические литературные обзоры, анализ которых проводят специально созданные для этих целей организации. Второй оценочный метод — это анализ «затраты–эффективность», в котором рассчитывают расходы на достижение дополнительного года жизни человека с поправкой на качество. На основании полученных значений принимают решение о дальнейшем финансировании. Менее широко используют метод клинико-экономического анализа [16].

В мировом научном сообществе медицинская наука является самой цитируемой. Наиболее известные наукометрические базы — Web of Science и Scopus, высоковостребованный библиотечный фонд — американская национальная медицинская библиотека The U.S. National Library of Medicine [16, 17].

В неанглоязычных научных сообществах широко применяют национальные базы данных. Например, китайская система Chinese Social Sciences Citation Index охватывает большинство изданий страны. Одновременно стараются увеличивать долю публикаций в европейских и американских изданиях. Похожие проекты реализованы на Тайване (Taiwan Humanities Citation Index) и в Японии (Citation Database for Japanese Papers) [18].

Среди наукометрических показателей в зарубежных странах применяют импакт-фактор изданий, который ежегодно высчитывают в Институте научной информации (Institute for Scientific Information, ISI) и публикуют в Journal Citation Reports. Поскольку данный критерий используют на Западе с 70-х гг. XX в., у многих европейских и американских журналов, в отличие от российских, он довольно высокий [19]. Например, импакт-фактор одного из самых престижных медицинских периодических изданий The New England Journal of Medicine на 2015 г. составляет 55,87 [20]. Европейские и американские ученые стараются публиковаться в журналах с очень высокими импакт-факторами, поскольку такая практика повышает престиж и способствует карьерному росту [16].

Ресурсная оценка результативности и востребованности научных исследований является важной, но на сегодняшний день уязвимой сферой для многих российских медицинских научных учреждений. Зачастую в научных организациях недостаточно работает система оценки перспективности патентов и управления правами на результаты интеллектуального труда [21, 22]. Только в последние годы были предприняты эффективные меры по созданию малых инновационных предприятий, способных продуктивно использовать запатентованные инновационные продукты и услуги. Для модернизации данного направления создан механизм государственных гарантий закупок инновационных продуктов и формирования центров трансфера технологий [5].

В большинстве экономически развитых стран мира коммерциализируют интеллектуальную собственность [23]. Для США характерна передача прав собственности на интеллектуальные продукты или услуги, созданные за счет государственной поддержки, частному сектору в связи с тем, что государство по закону не может быть их правообладателем. В Евросоюзе, Великобритании и Японии государство обладает некоторыми правами на результаты интеллектуальной деятельности и принимает активное участие в коммерциализации научной продукции [24].

Оценку финансовой результативности научных исследований в России проводят по двум показателям: источникам дохода организации и видам выполняемых работ.

Со стороны государства финансовое обеспечение предусмотрено за счет средств федерального бюджета в рамках государственных программ Российской Федерации «Развитие здравоохранения» на 2013–2020 гг. и «Развитие науки и технологий» на 2013–2020 гг., а также в соответствии с государственными заданиями и грантовой поддержкой [16]. При этом по мере продвижения к конечному результату происходит уменьшение государственной материальной поддержки учреждений науки и увеличение доли частного капитала. По уровню финансирования научных исследований в мировом рейтинге Россия занимает 9-е место [5, 25]. Совершенствование механизмов государственного финансирования с повышением расходов на медицинскую науку необходимо, но его недостаточно для модернизации данного направления.

Большинство зарубежных стран осуществляет активный поиск наиболее эффективных механизмов финансирования медицинских научных учреждений. К самым распространенным относятся грантовая и государственная поддержка, а также спонсирование от научных фондов, советов и бизнес-структур [26]. Возрастает значимость инноваций для государственного сектора экономики. Для США характерно финансирование как фундаментальных, так и прикладных исследований. В большинстве стран Евросоюза эффективную ресурсную поддержку оказывает государство, помощь частного сектора слабая и нерегулярная [27]. При этом проводят совместную оценку эффективности деятельности как научных организаций, так и ведомств, ответственных за развитие и финансирование научных исследований [28]. Количественные методы анализа обязательно дополняют качественными, особенно критериями эффективности и безопасности инновационных медицинских технологий [16].

Развитие кадрового потенциала

Из всех критериев результативности учреждений оценке развития кадрового потенциала в российских медицинских научных организациях уделено наименьшее число показателей (всего четыре). Полученных в итоге данных недостаточно для системного анализа. Однако именно от кадрового потенциала организации зависит большинство показателей результативности любого научного учреждения и его конкурентоспособности.

По количеству ученых Россия занимает 4-е место, уступая Китаю, США и Японии [5]. В последние годы на смену подходу, относящему сотрудников к издержкам, приходит новая теория, рассматривающая персонал как важнейший ресурс эффективности деятельности организации.

Качественные и количественные показатели оценки кадрового потенциала отражают степень реализации научных программ, эффективность работы структуры учреждения и использования человеческих ресурсов, рост производительности и качества научной продукции. Использование для анализа не связанных между собой критериев при их разной значимости затрудняет объективную конечную оценку деятельности всей организации [29]. Отсутствие строго формализованных оценок кадрового потенциала организаций научно-медицинской сферы и баз данных, а также влияющие на результат деятельности качественные факторы создают проблемы для объективной оценки направления [30]. Оценка кадрового потенциала в зарубежных странах зависит преимущественно от статуса и качества научно-исследовательской деятельности ученого и научного учреждения в мировом сообществе [31].

Для модернизации кадрового сектора Национальный научный фонд США (The National Science Foundation) применяет научное управление (scientific management). Используют систему постоянного обучения, мотивации повышения квалификации, проявления лидерских качеств и творческого потенциала у сотрудников [5, 32].

Повышение престижа российской науки

Оценка показателей интеграции в мировое научное пространство, распространения научных знаний и повышения престижа науки для России чрезвычайно актуальна в связи с явной необходимостью модернизации данной сферы. В последнее время в сознании россиян сформировалось представление о непрестижности научной работы и статуса ученого [33]. Нестабильность социально-экономического развития привела к резкому снижению репутации представителей науки. Вследствие низкой заработной платы только около 9 % россиян назвали престижной профессию ученого [5]. Происходящая в силу экономических причин потеря кадрового состава многих научных организаций снижает эффективность научных исследований и общий уровень учреждений, что, безусловно, отражается в оценке данного направления. Трансляционные барьеры [34], непривлекательность инвестирования в медицинскую науку, неконкурентоспособность интеллектуальной продукции по сравнению с экономически развитыми странами — только небольшой список проблем, требующих решения.

В большинстве экономически развитых стран мира социологические опросы убедительно демонстрирует противоположные результаты. По статистике, около 51 % опрошенных в США считают карьеру ученого в высшей степени престижной, 25 % признали ее весьма престижной и 20 % — престижной [5]. Опыт зарубежных стран показывает, что высокий социальный статус научной элиты отражает социально-экономический уровень страны и проводимую информационную политику [33].

В странах Евросоюза для медицинской научной общности традиционно важны вопросы защиты прав не только лиц, задействованных в клинических исследованиях, но и животных, принимавших участие в экспериментах, а также проблемы изменения законодательства. Часть европейского и американского научных сообществ выступает за открытый доступ к полной информации о больных, участвовавших в клинических исследованиях, с целью дальнейшего анализа и получения достоверных дополнительных данных для диагностики и лечения широкого спектра заболеваний, в первую очередь онкологических. Европейская научная элита при поддержке одной из крупнейших организаций Германии — Общества научных исследований имени Макса Планка — выступает за открытый доступ к научным публикациям для любого человека в соответствии с Берлинской декларацией и парадигмой Open Access. Для привлечения внимания к данным проблемам создаются научные общества и организации, широко представленные в Интернете и получающие достаточный отклик со стороны небезразличного населения [35–37].

Ресурсное обеспечение деятельности научной организации

Для проведения эффективного мониторинга российских научных медицинских учреждений одними из самых

важных становятся показатели, отвечающие за ресурсное обеспечение деятельности научной организации [33]. За последние годы в России предпринят ряд мер по модернизации научных учреждений, что привело, в отличие от западных стран, к сокращению числа занятых в научном секторе [38].

Для анализа направления применяют преимущественно количественные показатели, которые, по-видимому, носят формальный характер. Одним из стабильно низких во многих научных организациях показателей является число молодых ученых в возрасте до 39 лет. Результаты социологических исследований демонстрируют слабую заинтересованность молодых людей в научной карьере из-за низких оплат труда и престижа деятельности, недостаточного финансирования перспективных исследований, плохих социальных условий и возрастающей бюрократизацией [39]. Среднее количество молодых ученых не превышает 25 % всех научных сотрудников [5].

Нематериальные активы в современном российском научном учреждении становятся важным критерием результативности деятельности организации. Они учитываются на балансе в составе внеоборотных активов. Исключительные права на результаты интеллектуальной деятельности способны монополизированию организацией права на их использование, в том числе на получение доходов от передачи в промышленный сектор. Наличие инновационных нематериальных активов позволяет выплачивать авторское вознаграждение, включая затраты в себестоимость [40]. Однако на практике использование данных активов мало по сравнению с другими секторами российской науки. Запатентованные технологии зачастую не находят применения в производстве.

Оплата труда научных кадров также является важным фактором, влияющим на результативность деятельности научной организации и ее итоговую оценку [41]. В большинстве экономически развитых стран мира отмечено по-

вышение затрат на научные исследования, что приводит к увеличению числа привлекаемых научных сотрудников [33].

По данным Национального научного фонда США, 60–65 % средств расходуется на оплату труда научных сотрудников, аспирантов, студентов, 12 % идет на закупку нового оборудования, 11 % составляют расходы на образование, около 6 % — на трансфер технологий и только 1–3 % — на административный аппарат [16, 42].

ВЫВОДЫ

В целях эффективной реализации Стратегии развития медицинской науки в Российской Федерации на период до 2025 г., утвержденной распоряжением Правительства РФ от 28.12.2012 № 2580-р [5], необходима разработка более совершенных критериев оценки деятельности научных медицинских учреждений.

По мнению ряда исследователей [43], для оценки результативности научной организации следует использовать преимущественно качественные показатели, полученные в результате экспертизы. Однако большинство специалистов рекомендует построение модели, учитывающей постоянный мониторинг, алгоритмы оценки, создание и поддержание персонализированной базы данных регистра сотрудников [20]. Подобная аналитическая модель сформирует итоговую оценку научного учреждения и будет способствовать принятию решения о его перспективе, поэтому должна включать системный подход и обладать функциями накопления, обработки и хранения данных [44]. Исходя из вышеизложенного, на данном этапе развития методов оценки научных организаций задача разработки объективного подхода для получения итоговых показателей результативности для российских учреждений науки в сфере здравоохранения является чрезвычайно актуальной.

Литература

1. Проничкин С. В., Тихонов И. П. Разработка системы критериев и методических подходов к экспертной оценке эффективности деятельности научных организаций. Нац. интересы: приоритеты и безопасность. 2013; 37: 13–8.
2. Бобков А. В., Каталажная И. Н., Павлов И. В. Мониторинг научной деятельности научно-образовательной системы. Совр. пробл. науки и обр. 2009; 6 (1): 49–50.
3. Вялков А. И., Глухова Е. А., Мартынич С. А. Модель мониторинга формирования инновационных компетенций кадрового состава научной медицинской организации, ориентированного на создание критически важных технологий. Соц. аспекты здоровья насел. 2015; 42 (2): 17.
4. Вялков А. И., Мартынич С. А., Полесский В. А. Методологические основы стандартизации оценочной деятельности медицинской научной организации. Здравоохран. РФ. 2010; 6: 3–7.
5. Распоряжение Правительства РФ от 28.12.2012 № 2580-р «Об утверждении Стратегии развития медицинской науки в Российской Федерации на период до 2025 года» [Интернет]. [Дата обращения 14.01.2016]. Доступно по: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_140249/.
6. Шарабчиев Ю. Т. Продуктивность ученых: инструменты оценки. Наука и инновации. 2013; 1 (119): 4–8.
7. Вялков А. И., Кучеренко В. З., Мартынич С. А., Глухова Е. А. Методологические основы управления качеством деятельности медицинской научной организации в конкурентной среде. Пробл. упр. здравоохран. 2010; 4: 14–9.
8. Кучеренко В. З., Мартынич С. А., Башкина Е. М. Цитирование в науке и роль электронных ресурсов и оценочных инструментов. Пробл. упр. здравоохран. 2009; 46 (3): 14–21.
9. Быков В. Л. Библиометрия вчера, сегодня и завтра: количественные показатели и научная этика. Морфология. 2013; 144 (4): 7–13.
10. Mushlin AI, Ghomrawi HM. Comparative effectiveness research: a cornerstone of healthcare reform? Trans Am Clin Climatol Assoc. 2010; 121: 141–54; discussion 154–5.
11. VanLare JM, Conway PH, Sox HC. Five next steps for a new national program for comparative-effectiveness research. N Engl J Med. 2010 Mar 18; 362 (11): 970–3.
12. Platt R, Wilson M, Chan KA, Benner JS, Marchibroda J, McClellan M. The new Sentinel Network — improving the evidence of medical-product safety. N Engl J Med. 2009 Aug 13; 361 (7): 645–7.
13. Higher Education Funding Council for England [Internet]. 2014 Research Excellence Framework [updated 2014 Dec 18]. Assessment criteria and level definitions [updated 2014 Dec 12; cited 2016 Jan 15]. Available from: <http://www.ref.ac.uk/panels/assessmentcriteriaandleveldefinitions/>.
14. Ларичев О. И. Вербальный анализ решений. Петровский А. Б., редактор. М.: Наука, 2006. Раздел 9.5.2 Организационные критерии.
15. Smyth RL. A risk adapted approach to the governance of clinical trials. BMJ. 2011 Oct 25; 343: d6756.
16. Перхов В. И., Стебунова Р. В., Янкевич Д. С., Юркин Ю. Ю. Анализ зарубежного опыта финансирования и организации научных исследований в области здравоохранения. Менеджер здравоохран. 2013; 7: 49–56.
17. Califf RM. The patient-centered outcomes research network: a national infrastructure for comparative effectiveness research. N

- C Med J. 2014 May–Jun; 75 (3): 204–10.
18. Lee D, Kim S, Cha SH. Evaluating the effectiveness of research centers and institutes in universities: Disciplines and life cycle stages. *KEDI J Educ Policy*. 2014; 11 (1): 119.
 19. Ranking of Research Institutions SIR World Report 2010 Health Sciences [Internet]. *SCImago Journal & Country Rank*. [cited 2016 Jan 15]. Available from: <http://www.scimagojr.com>.
 20. Selby JV, Lipstein SH. PCORI at 3 years — progress, lessons, and plans. *N Engl J Med*. 2014 Feb 13; 370 (7): 592–5.
 21. Кучеренко В. З., Мартынич С. А., Осокина О. В. Информационные средства контроллинга производственно-хозяйственной деятельности медицинской организации. Методическое пособие. Екатеринбург: УГМА, 2008.
 22. Мартынич С. А., Осокин П. С., Осокина О. В. Организационная основа мониторинга производственно-хозяйственной деятельности медицинской организации. В: Полесский В. А., редактор. Мониторирование состояния здоровья, качества и образа жизни населения России. Влияние поведенческих факторов риска на здоровье населения: Тезисы Всероссийской научно-практической конференции; 2011 июнь 06 — 2011 июль 06; Москва, Россия. М., 2011. с. 233–5.
 23. Zerhouni EA, Alving B. Clinical and translational science awards: a framework for a national research agenda. *Transl Res*. 2006 Jul; 148 (1): 4–5.
 24. Academy of Medical Sciences [Internet]. A new pathway for the regulation and governance of health research, 2011. [cited 2016 Jan 13]. Available from: <http://www.acmedsci.ac.uk/policy/policy-projects/>.
 25. Мартынич С. А. Планирование государственного (муниципального задания) в здравоохранении. *Здравоохранение*. 2012; 4: 18–23.
 26. Sully BG, Julious SA, Nicholl J. A reinvestigation of recruitment to randomised, controlled, multicenter trials: a review of trials funded by two UK funding agencies. *Trials*. 2013 Jun 9; 14: 166.
 27. Arnold E, Brown N, Eriksson A, Jansson T, Muscio A, Nählinder J, et al. The Role of Industrial Research Institutes in the National Innovation System. Stockholm: VINNOVA; 2007.
 28. Warlow C. A new NHS research strategy. *Lancet*. 2006 Jan 7; 367 (9504): 12–3.
 29. Чернова А. А., Куршакова Н. Б. Подходы к оценке результативности системы менеджмента качества в научно-исследовательских организациях. *Инноваци. эконом. и о-во*. 2015; 3 (9): 90–5.
 30. Мартынич С. А., Глухова Е. А., Галустова Л. П. Требования к построению системы для оценки результативности и потенциала научной деятельности на уровне организации. *Соц. аспекты здоровья насел*. 2013; 32 (4): 10.
 31. Sveiby K-E. What is Knowledge Management? [Internet]. 1996 Mar [updated 2001 Apr; cited 2016 Jan 15]. Available from: <http://www.sveiby.com/articles/KnowledgeManagement.html>.
 32. Kahn C, McGourty S. Performance Management at R&D Organizations. Practices and Metrics from Case Examples. Bedford, MA: The MITRE Corporation; 2009.
 33. Фадеева И. М., Осипова О. Ю., Фадеева Е. С. Компетенции молодых ученых для научно-исследовательской деятельности и академической карьеры. *Интеграция обр*. 2012; 1: 7–13.
 34. Ипатова О. М., Медведева Н. В., Арчаков А. И., Григорьев А. И. Трансляционная медицина — путь от фундаментальной биомедицинской науки в здравоохранение. *Вестн. РАМН*. 2012; 6: 57–65.
 35. Anderson ML, Califf RM, Sugarman J; participants in the NIH Health Care Systems Research Collaboratory Cluster Randomized Trial Workshop. Ethical and regulatory issues of pragmatic cluster randomized trials in contemporary health systems. *Clin Trials*. 2015 Jun; 12 (3): 276–86. doi: 10.1177/1740774515571140.
 36. Frewer LJ, Coles D, van der Lans IA, Schroeder D, Champion K, Apperley JF. Impact of the European clinical trials directive on prospective academic clinical trials associated with BMT. *Bone Marrow Transplant*. 2011 Mar; 46 (3): 443–7.
 37. Neaton JD, Babiker A, Bohnhorst M, Darbyshire J, Denning E, Frishman A, et al. Regulatory impediments jeopardizing the conduct of clinical trials in Europe funded by the National Institutes of Health. *Clin Trials*. 2010 Dec; 7 (6): 705–18.
 38. Гохберг Л. М., Заиченко С. А., Китова Г. А., Кузнецова Т. Е. Научная политика: глобальный контекст и российская практика. М.: НИУ ВШЭ; 2011.
 39. Фадеева И. М., Шаманаев П. А., Соколова М. Ю. Управление кадровым потенциалом исследовательского университета на основе информационных систем. *Университетское управление: практика и анализ*. 2011; 6: 23–31.
 40. Зубова Л. Г., Андреева О. Н., Антропова О. А. К вопросу о результативности деятельности государственных научных организаций (по оценкам социологического мониторинга 2005–2011 гг.). *Инновации*. 2012; 12 (170): 51–60.
 41. Стародубов В. И., Куракова Н. Г., Цветкова Л. А., Маркусова В. А. О новых критериях оценки российской академической и вузовской медицинской науки. *Мед. обр. и проф. развитие*. 2011; 1: 16.
 42. Altbach PG, Reisberg L, Yudkevich M, Androushchak G, Pacheco IF, editors. *Paying the Professoriate: A Global Comparison of Compensation and Contracts*. New York: Routledge, 2012.
 43. Бондаренко Т. В. «Работа над ошибками», или как разработать эффективную систему KPI. *Менеджмент сегодня*. 2010; 4: 236–41.
 44. Мартынич С. А., Глухова Е. А., Галустова Л. П. Требования к построению системы для оценки результативности и потенциала научной деятельности на уровне организации. *Соц. аспекты здоровья насел*. 2013; 32 (4): 10.

References

1. Pronichkin SV, Tikhonov IP. Razrabotka sistemy kriteriev i metodicheskikh podkhodov k ekspertnoy otsenke effektivnosti deyatel'nosti nauchnykh organizatsii. *Natsional'nye interesy: priority i bezopasnost'*. 2013; 37: 13–8. Russian.
2. Bobkov AV, Katalazhnova IN, Pavlov IV. Monitoring nauchnoi deyatel'nosti nauchno-obrazovatel'noi sistemy. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2009; 6 (1): 49–50. Russian.
3. Vyalkov AI, Glukhova EA, Martynchik SA. Model' monitoring formirovaniya innovatsionnykh kompetentsii kadrovogo sostava nauchnoi meditsinskoj organizatsii, orientirovannogo na sozdanie kriticheski vazhnykh tekhnologii. *Sotsial'nye aspekty zdorov'ya naseleniya*. 2015; 42 (2): 17. Russian.
4. Vyalkov AI, Martynchik SA, Poleskii VA. Metodologicheskie osnovy standartizatsii otsenочноi deyatel'nosti meditsinskoj nauchnoi organizatsii. *Zdravookhranenie Rossijskoj Federatsii*. 2010; 6: 3–7. Russian.
5. Rasporyazhenie Pravitel'stva RF ot 28.12.2012 N 2580-r "Ob utverzhdenii Strategii razvitiya meditsinskoj nauki v Rossijskoj Federatsii na period do 2025 goda" [Internet]. [cited 2016 Jan 14]. Available from: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_140249/. Russian.
6. Sharabchiev YuT. Produktivnost' uchenykh: instrumenty otsenki. *Nauka i innovatsii*. 2013; 1 (119): 4–8. Russian.
7. Vyalkov AI, Kucherenko VZ, Martynchik SA, Glukhova EA. Metodologicheskie osnovy upravleniya kachestvom deyatel'nosti meditsinskoj nauchnoi organizatsii v konkurentnoi srede. *Problemy upravleniya zdavookhraneniem*. 2010; 4: 14–9. Russian.
8. Kucherenko VZ, Martynchik SA, Bashkina EM. Tsitirovanie v nauke i rol' elektronnykh resursov i otsenочноykh instrumentov. *Problemy upravleniya zdavookhraneniem*. 2009; 46 (3): 14–21. Russian.
9. Bykov VL. Bibliometriya vchera, segodnya i zavtra: kolichestvennye pokazateli i nauchnaya etika. *Morfologiya*. 2013; 144 (4): 7–13. Russian.
10. Mushlin AI, Ghomrawi HM. Comparative effectiveness research: a cornerstone of healthcare reform? *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2010; 121: 141–54; discussion 154–5.
11. VanLare JM, Conway PH, Sox HC. Five next steps for a new national program for comparative-effectiveness research. *N Engl J*

- Med. 2010 Mar 18; 362 (11): 970–3.
12. Platt R, Wilson M, Chan KA, Benner JS, Marchibroda J, McClellan M. The new Sentinel Network — improving the evidence of medical-product safety. *N Engl J Med.* 2009 Aug 13; 361 (7): 645–7.
 13. Higher Education Funding Council for England [Internet]. 2014 Research Excellence Framework [updated 2014 Dec 18]. Assessment criteria and level definitions [updated 2014 Dec 12; cited 2016 Jan 15]. Available from: <http://www.ref.ac.uk/panels/asessmentcriteriaandleveldefinitions/>.
 14. Larichev OI. Verbal'nyj analiz reshenii. Petrovskii AB, editor. Moscow: Nauka, 2006. Chapter 9.5.2. Organizacionnye kriterii. Russian.
 15. Smyth RL. A risk adapted approach to the governance of clinical trials. *BMJ.* 2011 Oct 25; 343: d6756.
 16. Perkhov VI, Stebunova RV, Yankevich DS, Yurkin YuYu. Analiz zarubezhnogo opyta finansirovaniya i organizatsii nauchnykh issledovaniy v oblasti zdravookhraneniya. Menedzher zdravookhraneniya. 2013; 7: 49–56. Russian.
 17. Califf RM. The patient-centered outcomes research network: a national infrastructure for comparative effectiveness research. *N C Med J.* 2014 May–Jun; 75 (3): 204–10.
 18. Lee D, Kim S, Cha SH. Evaluating the effectiveness of research centers and institutes in universities: Disciplines and life cycle stages. *KEDI J Educ Policy.* 2014; 11 (1): 119.
 19. Ranking of Research Institutions SIR World Report 2010 Health Sciences [Internet]. SCImago Journal & Country Rank. [cited 2016 Jan 15]. Available from: <http://www.scimagojr.com>.
 20. Selby JV, Lipstein SH. PCORI at 3 years — progress, lessons, and plans. *N Engl J Med.* 2014 Feb 13; 370 (7): 592–5.
 21. Kucherenko VZ, Martynchik SA, Osokina OV. Informatsionnye sredstva kontrollinga proizvodstvenno-khozyaystvennoi deyatel'nosti meditsinskoj organizatsii. Metodicheskoe posobie. Ekaterinburg: UGMA, 2008. Russian.
 22. Martynchik SA, Osokin RS, Osokina OV. Organizatsionnaya osnova monitoringa proizvodstvenno-khozyaystvennoi deyatel'nosti meditsinskoj organizatsii. In: Poleskii VA, editor. Monitorirovanie sostoyaniya zdorov'ya, kachestva i obraza zhizni naseleniya Rossii. Vliyaniye povedencheskikh faktorov riska na zdorov'e naseleniya: Proceedings of the Vserossiyskaya nauchno-prakticheskaya konferentsiya; 2011 Jun 06 — 2011 Jul 06; Moscow, Russia. Moscow; 2011. p 233–5. Russian.
 23. Zerhouni EA, Alving B. Clinical and translational science awards: a framework for a national research agenda. *Transl Res.* 2006 Jul; 148 (1): 4–5.
 24. Academy of Medical Sciences [Internet]. A new pathway for the regulation and governance of health research, 2011. [cited 2016 Jan 13]. Available from: <http://www.acmedsci.ac.uk/policy/policy-projects/>.
 25. Martynchik SA. Planirovanie gosudarstvennogo (municipal'nogo zadaniya) v zdravookhraneni. *Zdravookhranenie.* 2012; 4: 18–23. Russian.
 26. Sully BG, Julious SA, Nicholl J. A reinvestigation of recruitment to randomised, controlled, multicenter trials: a review of trials funded by two UK funding agencies. *Trials.* 2013 Jun 9; 14: 166.
 27. Arnold E, Brown N, Eriksson A, Jansson T, Muscio A, Nählinder J, et al. The Role of Industrial Research Institutes in the National Innovation System. Stockholm: VINNOVA; 2007.
 28. Warlow C. A new NHS research strategy. *Lancet.* 2006 Jan 7; 367 (9504): 12–3.
 29. Chernova AA, Kurshakova NB. Podkhody k otsenke rezul'tativnosti sistemy menedzhmenta kachestva v nauchno-issledovatel'skikh organizatsiyakh. *Innovatsionnaya ekonomika i obshchestvo.* 2015; 3 (9): 90–5. Russian.
 30. Martynchik SA, Glukhova EA, Galustova LR. Trebovaniya k postroeniyu sistemy dlya otsenki rezul'tativnosti i potentsiala nauchnoi deyatel'nosti na urovne organizatsii. *Sotsial'nye aspekty zdorov'ya naseleniya.* 2013; 32 (4): 10. Russian.
 31. Sveiby K-E. What is Knowledge Management? [Internet]. 1996 Mar [updated 2001 Apr; cited 2016 Jan 15]. Available from: <http://www.sveiby.com/articles/KnowledgeManagement.html>.
 32. Kahn C, McGourty S. Performance Management at R&D Organizations. Practices and Metrics from Case Examples. Bedford, MA: The MITRE Corporation; 2009.
 33. Fadeeva IM, Osipova OYu, Fadeeva ES. Kompetentsii molodykh uchenykh dlya nauchno-issledovatel'skoi deyatel'nosti i akademicheskoi kar'ery. *Integratsiya obrazovaniya.* 2012; 1: 7–13. Russian.
 34. Ipatova OM, Medvedeva NV, Archakov AI, Grigor'ev AI. Translyatsionnaya meditsina — put' ot fundamental'noi biomeditsinskoj nauki v zdravookhraneni. *Vestnik Rossiyskoj akademii meditsinskikh nauk.* 2012; 6: 57–65. Russian.
 35. Anderson ML, Califf RM, Sugarman J; participants in the NIH Health Care Systems Research Collaboratory Cluster Randomized Trial Workshop. Ethical and regulatory issues of pragmatic cluster randomized trials in contemporary health systems. *Clin Trials.* 2015 Jun; 12 (3): 276–86. doi: 10.1177/1740774515571140.
 36. Frewer LJ, Coles D, van der Lans IA, Schroeder D, Champion K, Apperley JF. Impact of the European clinical trials directive on prospective academic clinical trials associated with BMT. *Bone Marrow Transplant.* 2011 Mar; 46 (3): 443–7.
 37. Neaton JD, Babiker A, Bohnhorst M, Darbyshire J, Denning E, Frishman A, et al. Regulatory impediments jeopardizing the conduct of clinical trials in Europe funded by the National Institutes of Health. *Clin Trials.* 2010 Dec; 7 (6): 705–18.
 38. Gokhberg LM, Zaichenko SA, Kitova GA, Kuznetsova TE. Nauchnaya politika: global'nyi kontekst i rossiyskaya praktika. M.: NIU VShE; 2011. Russian.
 39. Fadeeva IM, Shamanaev PA, Sokolova MYu. Upravlenie kadrovym potentsialom issledovatel'skogo universiteta na osnove informatsionnykh sistem. *Universitetskoe upravlenie: praktika i analiz.* 2011; 6: 23–31. Russian.
 40. Zubova LG, Andreeva ON, Antropova OA. K voprosu o rezul'tativnosti deyatel'nosti gosudarstvennykh nauchnykh organizatsii (po otsenkam sotsiologicheskogo monitoringa 2005–2011 gg.). *Innovatsii.* 2012; 12 (170): 51–60. Russian.
 41. Starodubov VI, Kurakova NG, Tsvetkova LA, Markusova VA. O novykh kriteriyakh otsenki rossiyskoj akademicheskoi i vuzovskoi meditsinskoj nauki. *Meditsinskoe obrazovanie i professional'noe razvitiye.* 2011; 1: 16. Russian.
 42. Altbach PG, Reisberg L, Yudkevich M, Androushchak G, Pacheco IF, editors. Paying the Professoriate: A Global Comparison of Compensation and Contracts. New York: Routledge, 2012.
 43. Bondarenko TV. «Rabota nad oshibkami», ili kak razrabotat' effektivnyuyu sistemu KPI. *Menedzhment segodnja.* 2010; 4: 236–41. Russian.
 44. Martynchik SA, Glukhova EA, Galustova LR. Trebovaniya k postroeniyu sistemy dlya otsenki rezul'tativnosti i potentsiala nauchnoi deyatel'nosti na urovne organizatsii. *Sotsial'nye aspekty zdorov'ya naseleniya.* 2013; 32 (4): 10. Russian.