



Научная статья

## ВЫЯВЛЕНИЕ ОМИК-МАРКЕРОВ ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РИСКА РАЗВИТИЯ НЕГАТИВНЫХ ЭФФЕКТОВ У ДЕТЕЙ С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ МЕДИ И НИКЕЛЯ В КРОВИ

Н.В. Зайцева<sup>1</sup>, М.А. Землянова<sup>1,2</sup>, Ю.В. Кольдибекова<sup>1</sup>, Н.И. Булатова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения, Россия, 6140045, г. Пермь, ул. Монастырская, 82

<sup>2</sup>Пермский государственный национальный исследовательский университет, Россия, 614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15

*Технология протеомного профилирования является перспективным направлением для исследования и обоснования молекулярных механизмов возникновения и развития ответных реакций организма на негативные воздействия на самых ранних стадиях их формирования, до возникновения симптомов клеточного и органного поражения. Особую актуальность приобретают исследования, направленные на повышение эффективности прогнозирования развития негативных эффектов для задач раннего выявления и профилактики последствий, ассоциированных с воздействием химических факторов среды обитания, в первую очередь с атмосферным воздухом.*

*Выявлены омик-маркеры для прогнозирования риска развития негативных эффектов у детей с повышенным содержанием меди и никеля в крови.*

*Выполнено протеомное исследование плазмы крови у детей, моделирование причинно-следственных связей. У детей с повышенным (до 3,5 раза) содержанием в крови меди и никеля выявлено порядка двадцати белковых пятен, достоверно отличающихся от соответствующих данных детей группы контроля. Установлены зависимости увеличения относительного объема трех белковых пятен, включающих аполипопротеин А-I, якорный белок А-киназы 9, витронектин, и уменьшения относительного объема одного белкового пятна, включающего транстиретин, от повышенного содержания в крови меди и никеля ( $R^2 = 0,30-0,44$ ;  $p = 0,0001-0,008$ ). Перечисленные белки являются прогностически значимыми для развития негативных эффектов, связанных с нарушением нейрорегуляции и эндотелиальной дисфункции. Доказана реализация риска развития прогнозируемых негативных эффектов в виде повышенной частоты развития заболеваний нервной и сердечно-сосудистой системы при повышенной концентрации в крови меди и никеля ( $R^2 = 0,35-0,96$ ;  $p = 0,0001-0,013$ ). Установленный перечень потенциальных молекул-мишеней (аполипопротеин А-I, витронектин, якорный белок А-киназы 9, транстиретин) и генов, кодирующих их экспрессию (APOA1, VTN, AKAP9, TTR), обоснован в качестве омик-маркеров развития негативных эффектов со стороны сердечно-сосудистой и нервной систем.*

**Ключевые слова:** медь и никель в крови, риск здоровью, протеомный профиль плазмы крови, нервная система, сердечно-сосудистая система, аполипопротеин А-I, якорный белок А-киназы 9, витронектин, транстиретин.

В связи с приоритетными национальными и международными направлениями стратегического развития научных исследований в области фундаментальной медицины до 2025 г.<sup>1</sup> особую значимость приобретают исследования специфических изменений регуляторных

механизмов гомеостаза организма на молекулярном уровне для эффективного прогнозирования и оценки потенциальных негативных эффектов на самой ранней стадии их формирования, проводимые на научной платформе «Профилактическая среда».

© Зайцева Н.В., Землянова М.А., Кольдибекова Ю.В., Булатова Н.И., 2021

**Зайцева Нина Владимировна** – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, научный руководитель (e-mail: znv@fcrisk.ru; тел.: 8 (342) 237-25-34; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2356-1145>).

**Землянова Марина Александровна** – доктор медицинских наук, заведующий отделом биохимических и цитогенетических методов диагностики (e-mail: zem@fcrisk.ru; тел.: 8 (342) 236-39-30; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8013-9613>).

**Кольдибекова Юлия Вячеславовна** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник с выполнением обязанностей заведующего лабораторией метаболизма и фармакокинетики отдела биохимических и цитогенетических методов диагностики (e-mail: koldibekova@fcrisk.ru; тел.: 8 (342) 237-18-15; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3924-4526>).

**Булатова Наталья Ивановна** – научный сотрудник лаборатории биохимической и наносенсорной диагностики (e-mail: 1179815@mail.ru; тел.: 8 (3422) 36-80-18; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3392-9097>).

<sup>1</sup> Об утверждении Стратегии развития медицинской науки в Российской Федерации на период до 2025 года: Распоряжение Правительства Российской Федерации от 28 декабря 2012 года № 2580-р [Электронный ресурс] // Гарант.Ру. Информационно-правовой портал. – URL: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/70192396/> (дата обращения: 20.09.2019).

В условиях особого высокого уровня загрязнения атмосферного воздуха химическими веществами, к числу которых относятся высокотоксичные соединения никеля и меди, существует риск развития негативных эффектов со стороны органов дыхания, системы крови, иммунной и нервной систем<sup>2</sup>.

В связи с этим особую значимость приобретает идентификация изменений гомеостаза на молекулярном уровне. Этим требованиям в полной мере соответствуют исследования пептидных пулов, играющих исключительную роль в биорегуляции в живых организмах. Эффективным инструментом, позволяющим выполнить анализ самих пептидов, их конечных и промежуточных метаболитов в клетке, является технология протеомного профилирования [1–4]. Данный метод позволяет исследовать и обосновывать молекулярные этиопатогенетические механизмы возникновения и развития ответных реакций организма на негативные воздействия на самых ранних стадиях их формирования, еще до возникновения симптомов клеточного и органного поражения, то есть на уровне трансформированного протеомного профиля плазмы крови. Для прогнозирования экспрессии данных пептидов важным является определение генов, их кодирующих, что возможно с помощью существующих баз данных (например Swiss Prot). Обозначенная проблема обуславливает актуальность исследований, направленных на идентификацию молекулярных омик-маркеров с целью раннего выявления и профилактики последствий, ассоциированных с аэрогенным воздействием металлов [5, 6].

**Цель исследования** – выявление омик-маркеров для прогнозирования риска развития негативных эффектов у детей с повышенным содержанием меди и никеля в крови.

**Материалы и методы.** Объектом исследования являлись образцы плазмы крови 20 детей в возрасте 4–6 лет, имеющих повышенное содержание меди и никеля в крови (группа наблюдения), и 10 детей этого же возраста с содержанием в крови изучаемых химических веществ, соответствующих минимальным или референтным значениям (группа контроля).

Настоящие исследования выполнены с соблюдением этических требований Хельсинкской декларации (ред. 2013 г.) и одобрены этическим комитетом ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» Роспотребнадзора. Сравнимые группы сопоставимы по гендерному признаку, возрастному критерию и не имеют различий по социально-экономическим факторам риска здоро-

вью. Законные представители детей добровольно подписали информированное согласие на участие и публикацию данных несовершеннолетних, участвующих в обследовании.

Химико-аналитическое исследование крови на содержание никеля и меди осуществляли в соответствии с действующими в Российской Федерации методическими указаниями МУК 4.1.3230-14 «Измерение массовых концентраций химических элементов в биосредах (кровь, моча) методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой»<sup>3</sup>. Использовано аналитическое оборудование: масс-спектрометр с индуктивно связанной аргонной плазмой Agilent 7500cx (США).

Исследование протеомного профиля плазмы крови детей группы наблюдения и контроля выполнено по технологии двухмерного электрофореза в полиакриламидном геле в соответствии с методиками, рекомендованными для используемого оборудования [7–9]. Полученные электрофореграммы плазмы крови визуализировали методом окраски серебром и документировали с помощью системы для геле-документирования (BioRad, США). Анализ полученных протеомных карт проводили с помощью программного комплекса PDQuest (Bio-Rad, США). В полученной протеинограмме выделяли значимые белковые пятна по их интенсивности и проводили последующий анализ методом жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрическим анализом (на хроматографе UltiMate 3000 (Германия) и тандемном масс-спектрометре ABSciex 4000 QTRAP с источником ионизации Nanospray 3 (Канада)). Данные тандемных экспериментов обрабатывались программой ProteinPilot, версия 4.5 (AB SCIEX), с идентификацией по базе данных UniProt\_sprot\_fasta (от 24.11.2017), с выборкой по таксону Homo Sapiens. Основная часть информации о полученных белках экстрагирована из баз данных UniProt. Установление гена, которому соответствует идентифицированный белок, выполнено с помощью базы данных HGNC database of human gene name.

Характеристики выборок представляли в виде среднего значения (*M*) и ошибки репрезентативности (*m*). Статистическую значимость различий переменных между группами наблюдения и сравнения определяли по критерию Манна – Уитни. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью пакета программ Statistica 10.

Для сопоставительного анализа прогнозируемых негативных эффектов в исследуемой выборке (возраст 4–6 лет) использовали оценку заболеваемости детей в возрасте 10–12 лет (по МКБ-10) по данным углубленных исследований.

<sup>2</sup> Р 2.1.10.1920–04. Оценка риска для здоровья населения при воздействии химических веществ, загрязняющих окружающую среду: Руководство. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004 – 143 с.

<sup>3</sup> МУК 4.1.3230-14. Измерение массовых концентраций химических элементов в биосредах (кровь, моча) методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой [Электронный ресурс] / утв. Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А.Ю. Поповой 19 декабря 2014 г. // КОДЕКС: электронный фонд правовой и нормативно-технической документации. – URL: <http://docs.cntd.ru/document/495856222> (дата обращения: 22.09.2019).

Маркерные белковые пятна обосновывали на основании полученных достоверных причинно-следственных связей, описываемых многофакторными моделями зависимости «статистически значимое пятно – концентрация никеля и меди в крови» с помощью линейной регрессии. Достоверность и адекватность полученных моделей оценивали на основе дисперсионного анализа с использованием  $F$ -критерия Фишера, коэффициента детерминации ( $R^2$ ),  $t$ -критерия Стьюдента при статистической значимости  $p \leq 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** Анализ результатов химико-аналитических исследований крови на содержание никеля и меди позволил установить, что у детей в группе наблюдения выявлен повышенный в 1,2 раза уровень меди ( $1,04 \pm 0,09$  мг/дм<sup>3</sup>) по сравнению с его концентрацией ( $0,87 \pm 0,09$  мг/дм<sup>3</sup>) в группе контроля ( $p = 0,011$ ), а также увеличение содержания никеля в крови ( $0,007 \pm 0,002$  мг/дм<sup>3</sup>) до 3,5 раза относительно значения показателя ( $0,002 \pm 0,0001$  мг/дм<sup>3</sup>) в контрольной группе ( $p = 0,001$ ). Доля проб с содержанием меди и никеля в крови выше референтных значений<sup>4</sup> ( $R/L_{\text{меди}} = 0,09$  мг/дм<sup>3</sup>,

$R/L_{\text{никеля}} = 0,001$  мг/дм<sup>3</sup>) составила от 77,0 до 82,0 % от общего числа обследованных детей, в то время как в группе контроля от 10,0 до 20,0 % проб.

В результате проведения двумерного электрофореза получены протеомные карты плазмы крови детей исследуемых выборок, в которых денситометрически определены относительные объемы белковых пятен (рис. 1).

Сравнительный анализ результатов денситометрического измерения протеомных карт плазмы крови обследуемых детей позволил выявить наличие достоверных различий относительного объема порядка 20 белковых пятен у детей группы наблюдения относительно соответствующих данных группы контроля (табл. 1).

У детей группы наблюдения установлено увеличение в 8,0–12,2 раза объема белковых пятен № 12 и № 18, а также уменьшение в 5,4 раза объема пятна № 19 относительно аналогичных пятен у детей в группе контроля ( $p = 0,0001$ ). Выделенные белки и гены, кодирующие их экспрессию, представлены в табл. 2.

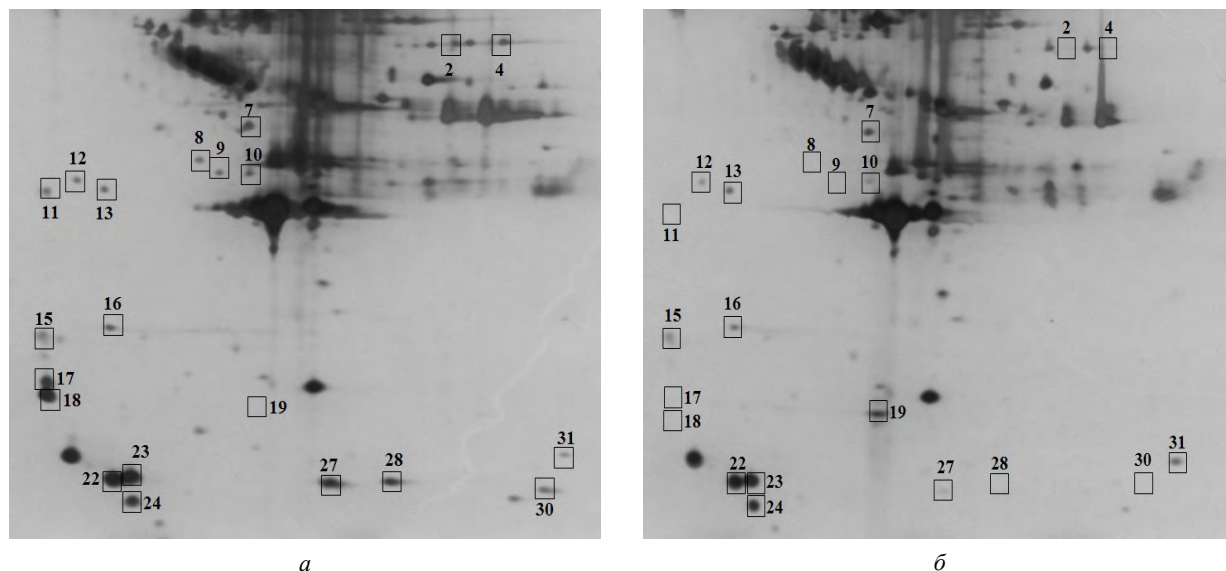


Рис. 1. Фрагмент 2D-геля плазмы крови детей с указанием номера белковых пятен:  
а – индивид группы наблюдения; б – индивид группы контроля

Т а б л и ц а 1

Спектр пептидов и белков, выделенных в протеомном профиле плазмы крови детей с повышенным содержанием меди и никеля в крови

Номер пятна	Спектр пептида	Вероятность идентификации пептида, %	Наименование белка
№ 2	RVDGSVDFYRDWATYK	1,0	Фиколин-2
	VDLVDFEDNYQFAK	56,6	
№ 4	VDGSVDFYR	88,0	Фиколин-2
	VDLVDFEDNYQFAK	99,0	
	VNVDEVGGEALGR	99,0	Бета-субъединица гемоглобина
№ 8	INGKPLPGATPAK	40,6	tPHK селеноцистеин 1-ассоциированный белок 1

<sup>4</sup> Тиц Н.У. Клиническое руководство по лабораторным тестам. – М.: ЮНИМЕД-пресс, 2003. – 570 с.

Номер пятна	Спектр пептида	Вероятность идентификации пептида, %	Наименование белка
№ 9	GLCVATPVQLR	99,0	Дополнение C4-B
	GSFEFPGDVSK	64,9	
	LGQYASPTAKRCCQDGVTR	1,0	
	QRIEALSLMHPSISFSLR	59,0	Белок репарации несоответствия ДНК Mlh3
	DSEATR	1,0	
	FYGFR	1,0	
№ 10	GVGKVPR	34,1	P2Y-пуриноцептор 12
	NIVQNV	26,1	Сидерофлексин-3
№ 11	VSFLSALEEYTK	99,0	Аполипопротеин А-I
	QGLLPVLESFK	33,6	
	VKDLATVYVDVLK	3,8	
	VDLEIQGDVTLSSYVQIR	32,2	Галектин-4
№ 12	DYVSQFEGSALGK	99,0	Аполипопротеин А-I
	QGLLPVLESFK	59,9	
	LLKILLEVVK	52,3	Якорный белок А-киназы 9
№ 13	CYTAVVPLVYGGETK	99,0	J-цепь иммуноглобулина
	FVYHLSLCK	99,0	
	AVHVKAQEDER	1,0	
	NHLLFWGVLAFIK	1,0	
	RPSTPR	73,2	
	EKQFLNAESAYMDPMK	0,2	Белковый фагот
	DRGGRDYPPLR	1,0	
	DSTSTAPDSQR	0,1	
	LEPLGPGSSGRPGK	1,0	
	VLRDGGCSLPIPNITK	0,2	
№ 15	HRAAEAAINILK	72,9	Интерферон-индуцируемый активатор двухцепочечной РНК-зависимой протеинкиназы А
	GLEEELQFSLGSK	99,0	Дополнение C4-B
	DVPRGQVVK	1,0	
	HQDFNSAVQLVENFCR	99,0	Протромбин
	LAVTTTHGLPCLAWASAK	18,3	
№ 16	GLEEELQFSLGSK	99,0	Дополнение C4-B
	MPYSVGFR	23,6	Анкирин-1
	CYGMTDDKVDK	1,0	
№ 17	SIAQYWLGCAPAGHLR	77,2	Витронектин
№ 18	SIAQYWLGCAPAGHLR	95,9	Витронектин
№ 19	GSPAINVAVHVFR	99,0	Транстиретин
	TSESGELHGLTTEEFVEGIYK	99,0	
	ALGISPFHEHAEVFTANDSGPR	94,7	
	AADDTWEPFASCK	99,0	
№ 22	DALSSVQESQVAQQR	99,0	Аполипопротеин C-III
	GWVTDGFSSLK	99,0	
	DLTEAVPR	94,1	Миотубулярин
	RDGPGLER	42,7	НАД-зависимый протеин-деацетилаза сиртуин-1
	LKSGSGPVR	32,4	Нуклеоплазмин-3
№ 23	SIAQYWLGCAPAGHLR	99,0	Витронектин
	DALSSVQESQVAQQR	3,9	Аполипопротеин C-III
	GWVTDGFSSLK	42,2	
№ 24	ESLSSYWESAK	99,0	Аполипопротеин C-II
№ 27	FFGHGAEDSLADQAANEWGR	96,5	Сывороточный амилоидный белок А-1
	FFGHGAEDSLAPQAANEWGR	1,0	
	RGPGGAWAAEVISNAR	93,0	Сывороточный амилоидный белок А-2
№ 28	SFFSFLGEAFDGR	99,0	Альбумин
	LVAASQAALGLK	79,1	
	APLAKYIGENQDSISSK	1,0	
	YIGENQDSISSKLLK	1,0	
	VFDEFKPLVEEPQNLIK	99,0	
№ 30	SAVTALWGK	99,0	Бета-субъединица гемоглобина
	VNVDEVGGEALGR	99,0	
	VLGAFSDDLHLNLK	55,6	
№ 31	LLVVPWTQR	99,0	Субъединица гемоглобина гамма-2

Таблица 2

Белки и кодирующие их гены, имеющие связь с повышенным содержанием меди и никеля в крови

Номер белкового пятна	Направление изменения объема белкового пятна	Наименование белка	Относительный объем белкового пятна ( $M \pm m$ ), int*		Ген, кодирующий белок	Код гена, коди- рующего белок, в базе данных Swiss Prot
			группа наблюдения ( $n = 20$ )	группа контроля ( $n = 10$ )		
12	увеличение	Аполипопротеин А-I	$2099 \pm 135^{**}$	$171 \pm 46$	APOA1	P02647
		Якорный белок А-киназы 9			AKAP9	Q99996
18	увеличение	Витронектин	$2731 \pm 337^{**}$	$340 \pm 101$	VTN	P04004
19	уменьшение	Транстиретин	$498 \pm 143^{**}$	$2687 \pm 746$	TTR	P02766

Примечание:

int\* – интенсивность белкового пятна;

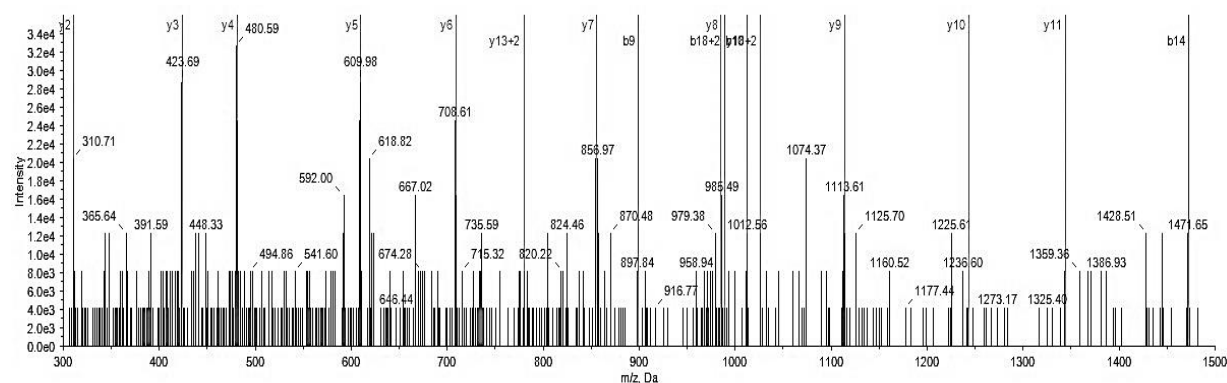
\*\* – достоверность различий средних значений,  $p \leq 0,05$ .

Рис. 2. Спектр пептида TSESGELHGLTTEEFVEGIYK (Транстиретин) (база данных SwissProt) плазмы крови ребенка в пятне № 19

Пример спектра одного из пептидов, имеющего связь с повышенным содержанием одновременно меди и никеля в крови, представлен на рис. 2.

При построении многофакторных моделей установлены прямые причинно-следственные связи между повышенным содержанием в крови меди, никеля и увеличением относительного объема белкового пятна № 12, включающего последовательность белка аполипопротеина А-I и якорного белка А-киназы 9 ( $R^2 = 0,30$ ;  $b_0 = -656,8$ ;  $b_1 = 1801,1$ ;  $b_2 = 63518,1$ ;  $p = 0,008$ ) и белкового пятна № 18 (витронектин) ( $R^2 = 0,44$ ;  $b_0 = -1372,0$ ;  $b_1 = 2743,3$ ;  $b_2 = 112937,0$ ;  $p = 0,0001$ ). Выявлена также обратная зависимость уменьшения относительного объема белкового пятна № 19, включающего транстиретин, от повышенного содержания меди и никеля в крови ( $R^2 = 0,35$ ;  $b_0 = 4870,1$ ;  $b_1 = -3266,9$ ;  $b_2 = -79946,5$ ;  $p = 0,003$ ).

Анализ биологической функции идентифицированных белков плазмы крови по данным отечественной и зарубежной научной литературы позволяет прогнозировать развитие ряда негативных эффектов со стороны сердечно-сосудистой и нервной систем. Так, установленные белки аполипопротеин А-I и витронектин характеризуют преимущественно дисфункцию эндотелия, что в дальнейшем может способствовать развитию артериальной гипертонии и

кардиомиопатии [10]. Аполипопротеин А-I – липопротеин высокой плотности, обеспечивает освобождение клеток от избытка холестерина, тем самым предотвращает образование атеросклеротических бляшек и способствует повышению эластичности эндотелия сосудов [11–13]. Витронектин – это клеточно-адгезивный гликопротеин, продуцируемый и секретируемый клетками печени, который в патологических условиях ассоциируется с клеточными поверхностями, например, с активированными тромбоцитами и с внеклеточными матрицами различных тканей (фибрин) [14]. В результате происходит усиление адгезии тромбоцитов и их местной агрегации, что подтверждается данными экспериментальных исследований [15, 16]. При увеличении относительного объема белкового пятна, содержащего аполипопротеин А-I и витронектин, в условиях повышенной концентрации в крови меди и никеля, можно прогнозировать повреждение эндотелиальных клеток кровеносных сосудов активными формами кислорода, запуск провоспалительной реакции и освобождение цитокинов из тканей сердца, через транскрипционные факторы NF- $\kappa$ B (ядерный фактор «каппа-би») и AP-1 (белок-активатор 1), что представлено в ряде зарубежных и отечественных научных работ [17, 18].

Якорный белок А-киназы 9 характеризует изменения в нейрорегуляции, поскольку ряд изоформ данного белка способен связываться с рецептором N-метил-D-аспартата в нервно-мышечном соединении и синапсах нейронов, что предполагает изменение в организации постсинаптической специализации [19]. По данным экспериментальных исследований избыточная экспрессия установленного белка может приводить к увеличению длины митохондрий и мембранного потенциала, что снижает чувствительность нейронов к постоянному напряжению в передаче сигналов [19, 20]. В свою очередь известно, что танситретин – белок, играющий важную роль в развитии нервной системы, нейрональном росте и синаптогенезе, регуляции цитоархитектоники, обеспечивающих когнитивные функции центральной нервной системы (память, эмоциональное состояние, психическое здоровье) [21, 22]. Данное предположение подтверждают результаты зарубежных экспериментальных исследований [21, 23]. Следствием изменения экспрессии танситретина являются возможные когнитивные нарушения и поведенческие отклонения [23].

По результатам сопоставительного анализа установленных изменений протеомного профиля плазмы крови детей в возрасте 4–6 лет и негативных эффектов, фактически реализованных, у детей в возрасте 10–12 лет выявлена достоверно повышенная в 2,2–3,0 раза частота встречаемости заболеваний по классу болезней сердечно-сосудистой (кардиомиопатии: I42) и нервной систем (функциональные расстройства центральной и вегетативной нервной систем: G90.9, G90.8) относительно соответствующих показателей в группе контроля ( $p = 0,001–0,032$ ). При этом у детей старшей возрастной категории установлены достоверные зависимости повышения частоты встречаемости заболеваний нервной системы в виде функциональных расстройств и кардиомиопатий от повышенного содержания в крови меди и никеля ( $R^2 = 0,35–0,96$ ;  $-1,94 \leq b_0 \leq -7,22$ ;  $1,76 \leq b_1 \leq 128,64$ ;  $p = 0,0001–0,013$ ).

Таким образом, обоснованные омик-маркеры (аполипопротеин А-I, витронектин, якорный белок А-киназы 9, танситретин) и гены, кодирующие их экспрессию (APOA1, VTN, AKAP9, TTR), могут быть использованы для повышения эффективности

прогнозирования развития негативных эффектов, связанных с нарушением нейрорегуляции и эндотелиальной дисфункции с целью раннего выявления и профилактики негативных последствий со стороны здоровья у детей в условиях высокой аэрогенной нагрузки меди и никеля.

#### Выводы:

1. У детей с повышенным до 3,5 раза содержанием в крови меди и никеля выявлено порядка двадцати белковых пятен, достоверно отличающихся от таковых у детей группы контроля.

2. Установлены зависимости увеличения относительного объема трех белковых пятен, включающих аполипопротеин А-I, якорный белок А-киназы 9, витронектин, и уменьшения относительного объема одного белкового пятна, включающего танситретин, от повышенного содержания в крови меди и никеля ( $R^2 = 0,30–0,44$ ;  $p = 0,0001–0,008$ ).

3. Изменения относительного объема белковых пятен, включающих аполипопротеин А-I, якорный белок А-киназы 9, витронектин и танситретин, являются прогностически значимыми для развития негативных эффектов, связанных с нарушением нейрорегуляции и эндотелиальной дисфункции.

4. Доказана реализация прогнозируемых негативных эффектов в виде повышения частоты развития заболеваний нервной и сердечно-сосудистой системы при повышенной концентрации в крови меди и никеля ( $R^2 = 0,35–0,96$ ;  $p = 0,0001–0,013$ ).

5. Для прогнозирования вероятности развития негативных эффектов со стороны сердечно-сосудистой и нервной систем до формирования тканевых и органных поражений обоснован перечень омик-маркеров в виде белков (аполипопротеин А-I, витронектин, якорный белок А-киназы 9, танситретин) и генов, кодирующих их экспрессию (APOA1, VTN, AKAP9, TTR), позволяющий идентифицировать трансформированный протеомный профиль, ассоциированный с аэрогенным воздействием никеля и меди.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

#### Список литературы

1. Barbarini N., Magni P. Accurate peak list extraction from proteomic mass spectra for identification and profiling studies // BMC. Bioinformatics. – 2010. – Vol. 11, № 518. – P. 1–14. DOI: 10.1186/1471-2105-11-518
2. Шендеров Б.А. «Омик» – технологии и их значение в современной профилактической и восстановительной медицине // Вестник восстановительной медицины. – 2012. – № 3. – С. 70–78.
3. Протеомные методы разделения и анализа белков / Т.А. Полунина, Ю.С. Варшавская, Г.В. Григорьева, Я.М. Краснов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2014. – № 3. – С. 107–114.
4. Ahn S.-M., Simpson R.J. Body fluid proteomics: Prospects for biomarker discovery // Proteomics Clin. Appl. – 2007. – Vol. 1, № 9. – P. 1004–1015. DOI: 10.1002/prca.200700217

5. The proteome of a healthy human during physical activity under extreme conditions (Reviews) / I.M. Larina, V.A. Ivanis-enko, E.N. Nikolaev, A.I. Grigorev // *Acta Naturae*. – 2014. – Vol. 6, № 3 (22). – P. 66–75.
6. How many human proteoforms are there? / R. Aebersold, J. Agar, I. Amster, M.S. Baker, C.R. Bertozzi, E.S. Boja, C.E. Costello, B.F. Cravatt [et al.] // *Nature chemical biology*. – 2018. – Vol. 14, № 3. – P. 206–214. DOI: 10.1038/nchembio.2576
7. PROTEAN i12 IEF System. Instruction Manual. – Hercules: Bio-Rad Laboratories, Inc, 2011. – P. 60.
8. PROTEAN II xi 2D cell. Instruction Manual. – Hercules: Bio-Rad Laboratories, Inc, 2011. – P. 52.
9. ReadyPrep 2-D starter Kit. Instruction manual. – Hercules: Bio-Rad Laboratories, Inc, 2011. – P. 28.
10. Chemical constituents of ambient particulate air pollution and biomarkers of inflammation, coagulation and homocysteine in healthy adults: a prospective panel study / S. Wu, F. Deng, H. Wei, J. Huang, H. Wang, M. Shima, X. Wang, Y. Qin [et al.] // *Part. Fibre Toxicol.* – 2012. – Vol. 9, № 49. – P. 1–13. DOI: 10.1186/1743-8977-9-49
11. Исследование влияния рекомбинантного аполипопротеина А-I на работу сердечной мышцы в эксперименте / Р.А. Князев, Н.В. Трифонова, А.В. Рябченко, М.В. Котова, А.Р. Колпаков, Л.М. Поляков // *Патология кровообращения и кардиохирургия*. – 2018. – Т. 22, № 4. – С. 88–94.
12. Maranhão R.C., Freitas F.R. HDL Metabolism and Atheroprotection: Predictive Value of Lipid Transfers // *Advances in Clinical Chemistry*. – 2014. – № 65. – P. 1–41. DOI: 10.1016/B978-0-12-800141-7.00001-2
13. Клиническое значение аполипопротеинов А и В / Г.А. Чумакова, О.В. Гриценко, Н.Г. Веселовская, Е.В. Вахромеева, А.А. Козаренко // *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. – 2011. – Т. 10, № 6. – С. 105–111.
14. Vitronectin improves cell survival after radiation injury in human umbilical vein endothelial cells / H. Masaharu, Y. Takeshi, N. Katsuko, S.-N. Ai, F. Tomoko, M. Yuichi, G. Takaya, T. Katsushi // *FEBS Open Bio*. – 2012. – № 2. – P. 334–338. DOI: 10.1016/j.fob.2012.10.002
15. Ruggeri Z.M., Jackson S.P. Platelet Thrombus Formation in Flowing Blood // *Platelet biology*. – 2013. – № 2. – P. 399–423. DOI: 10.1016/B978-0-12-387837-3.00020-1
16. Plasminogen activator inhibitor-1 and its cofactor vitronectin stabilize arterial thrombi after vascular injury in mice / S. Konstantinides, K. Schafer, T. Thinner, D.J. Loskutoff // *Circulation*. – 2001. – № 103. – P. 576–583. DOI: 10.1161/01.cir.103.4.576
17. Fine particulate matter components and emergency department visits for cardiovascular and respiratory diseases in the St. Louis, Missouri-Illinois, Metropolitan Area / S.E. Sarnat, A. Winkler, J.J. Schauer, J.R. Turner, J.A. Sarnat // *Environ. Health Perspect.* – 2015. – Vol. 123, № 123. – P. 437–444. DOI: 10.1289/ehp.1307776
18. Колпакова А.Ф., Шарипов Р.Н., Колпаков Ф.А. Загрязнения воздуха взвешенными частицами как фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний // *Гигиена и санитария*. – 2017. – Т. 96, № 2. – С. 133–137.
19. Liu Yu., Merrill R.A., Strack S. A-Kinase Anchoring Protein 1: Emerging Roles in Regulating Mitochondrial Form and Function in Health and Disease (Review) // *Cells*. – 2020. – Vol. 9, № 298. – P. 2–12. DOI: 10.3390/cells9020298
20. AKAP1 Protects from Cerebral Ischemic Stroke by Inhibiting Drp1-Dependent Mitochondrial Fission / K.H. Flippo, A. Gnanasekaran, G.A. Perkins, A. Ajmal, R.A. Merrill, A.S. Dickey, S.S. Taylor, G.S. McKnight [et al.] // *J. Neurosci.* – 2018. – Vol. 38, № 38. – P. 8233–8242. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0649-18.2018
21. Thyroid hormone signaling and adult neurogenesis in mammals / S. Remaud, J.-D. Gothié, G. Morvan-Dubois, B.A. Demeneix // *Front. Endocrinol.* – 2014. – Vol. 5, № 62. – P. 1–7. DOI: 10.3389/fendo.2014.00062
22. Возможная роль транстиретина в биологическом механизме пептидной нейропротекции / Т.В. Вьюнова, Е.В. Медведева, Л.А. Андреева, Л.В. Дергунова, С.А. Лимборская, Н.Ф. Мясоєдов // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. – 2016. – Т. 34, № 3. – С. 104–109.
23. Brouillette J., Quirion R. Transthyretin: a key gene involved in the maintenance of memory capacities during aging // *Neurobiol. Aging*. – 2008. – Vol. 29, № 11. – P. 1721–1732. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.007

*Выявление омик-маркеров для прогнозирования риска развития негативных эффектов у детей с повышенным содержанием меди и никеля в крови / Н.В. Зайцева, М.А. Землянова, Ю.В. Кольдибекова, Н.И. Булатова // Анализ риска здоровью. – 2021. – № 1. – С. 48–56. DOI: 10.21668/health.risk/2021.1.05*

UDC 612.12: 616.092

DOI: 10.21668/health.risk/2021.1.05.eng

Read  
online

Research article

## OMIC MARKERS IDENTIFICATION FOR PREDICTING RISKS OF NEGATIVE EFFECTS IN CHILDREN WITH ELEVATED COPPER AND NICKEL CONTENTS IN BLOOD

**N.V. Zaitseva<sup>1</sup>, M.A. Zemlyanova<sup>1,2</sup>, Yu.V. Koldibekova<sup>1</sup>, N.I. Bulatova<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, 82 Monastyrskaya Str., Perm, 614045, Russian Federation<sup>2</sup>Perm State University, 15 Bukireva Str., Perm, 614990, Russian Federation

*Proteomic profiling is a promising procedure for examining and substantiating molecular mechanisms of body reactions occurrence and development as a response to adverse impacts; it allows detecting and examining these reactions at early stages in their development prior to cellular damage and damage to organs. Studies aimed at increasing efficiency of adverse effects prediction are especially vital for solving tasks related to early detection and prevention of consequences associated with exposure to chemical environmental factors, first of all, ambient air.*

*Our research goal was to identify omic-markers for predicting risks of negative effects in children with elevated copper and nickel contents in blood.*

*We performed proteomic blood plasma examination in children and modeled cause-and-effect relations. Children with copper and nickel contents in their blood being 3.5 times higher than physiological standard had approximately 20 protein stains that were authentically different from those detected in children from the reference group. We detected correlations between an increase in relative volume of three protein stains including apolipoprotein A-I, anchor protein of A-kinase 9, vitronectin, and a decrease in relative volume of one protein strain including transthyretin and elevated copper and nickel contents in blood ( $R^2 = 0.30-0.44$ ;  $p = 0.0001-0.008$ ). All the above-mentioned proteins have predictive significance when it comes down to negative effects related to neuroregulation disorders and endothelial dysfunction. It was proven that there was a risk of predicted negative effects such as greater frequency of nervous and cardiovascular system diseases in case copper and nickel contents in blood were elevated ( $R^2 = 0.35-0.96$ ;  $p = 0.0001-0.013$ ). The established list of potential target molecules (apolipoprotein A-I, vitronectin, anchor protein of A-kinase 9, and transthyretin) and genes that coded their expression (APOA1, VTN, AKAP9, TTR) was substantiated as omic-markers indicating a possibility that negative effects might occur in the cardiovascular and nervous system.*

**Key words:** copper and nickel in blood, health risk, proteomic profile of blood plasma, nervous system, cardiovascular system, apolipoprotein A-I, anchor protein of A-kinase 9, vitronectin, transthyretin.

### References

1. Barbarini N., Magni P. Accurate peak list extraction from proteomic mass spectra for identification and profiling studies. *BMC. Bioinformatics*, 2010, vol. 11, no. 518, pp. 1–14. DOI: 10.1186/1471-2105-11-518
2. Shenderov B.A. «Oмик»-tekhnologii i ikh znachenie v sovremennoi profilakticheskoi i vosstanovitel'noi meditsine [«Omic»-technologies and their significance for contemporary preventive and recovery medicine]. *Vestnik vosstanovitel'noi meditsiny*, 2012, no. 3, pp. 70–78 (in Russian).
3. Polunina T.A., Varshavskaya Yu.S., Grigor'eva G.V., Krasnov Ya.M. Proteomic methods of protein separation and analysis. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*, 2014, no. 3, pp. 107–114 (in Russian).

© Zaitseva N.V., Zemlyanova M.A., Koldibekova Yu.V., Bulatova N.I., 2021

**Nina V. Zaitseva** – Academician of the Russian Academy of Sciences, Doctor of Medical Sciences, Professor, Scientific Director (e-mail: znv@fcrisk.ru; tel.: +7 (342) 237-25-34; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2356-1145>).**Marina A. Zemlyanova** – Doctor of Medical Sciences, Chief Researcher acting as the Head of the Department for Biochemical and Cytogenetic Diagnostic Techniques (e-mail: zem@fcrisk.ru; tel.: +7 (342) 236-39-30; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8013-9613>).**Yuliya V. Koldibekova** – Candidate of Biological Sciences, Senior researcher acting as the Head of the Laboratory for Metabolism and Pharmacokinetics at the Department for Biochemical and Cytogenetic Diagnostic Techniques (e-mail: koldibekova@fcrisk.ru; tel.: +7 (342) 237-18-15; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3924-4526>).**Natal'ya I. Bulatova** – Researcher at the Laboratory for Biochemical and Nanosensory Diagnostics, Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies (e-mail: 1179815@mail.ru; tel.: +7 (3422) 36-80-18; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3392-9097>).



4. Ahn S.-M., Simpson R.J. Body fluid proteomics: Prospects for biomarker discovery. *Proteomics Clin. Appl.*, 2007, vol. 1, no. 9, pp. 1004–1015. DOI: 10.1002/prca.200700217
5. Larina I.M., Ivanisenko V.A., Nikolaev E.N., Grigorev A.I. The proteome of a healthy human during physical activity under extreme conditions (Reviews). *Acta Naturae*, 2014, vol. 6, no. 3 (22), pp. 66–75.
6. Aebersold R., Agar J., Amster I., Baker M.S., Bertozzi C.R., Boja E.S., C.E. Costello, B.F. Cravatt [et al.]. How many human proteoforms are there? *Nature chemical biology*, 2018, vol. 14, no. 3, pp. 206–214. DOI: 10.1038/nchembio.2576
7. PROTEAN i12 IEF System. Instruction Manual. Hercules, Bio-Rad Laboratories, Inc Publ., 2011, 60 p.
8. PROTEAN II xi 2D cell. Instruction Manual. Hercules, Bio-Rad Laboratories, Inc Publ., 2011, 52 p.
9. ReadyPrep 2-D starter Kit. Instruction manual. Hercules, Bio-Rad Laboratories, Inc Publ., 2011, 28 p.
10. Wu S., Deng F., Wei H., Huang J., Wang H., Shima M., Wang X., Qin Y. [et al.]. Chemical constituents of ambient particulate air pollution and biomarkers of inflammation, coagulation and homocysteine in healthy adults: a prospective panel study. *Part. Fibre. Toxicol.*, 2012, vol. 9, no. 49, pp. 1–13. DOI: 10.1186/1743-8977-9-49
11. Knyazev R.A., Trifonova N.V., Ryabchenko A.V., Kotova M.V., Kolpakov A.R., Polyakov L.M. Impact of recombinant apolipoprotein A-I on myocardial function in experiment. *Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokirurgiya*, 2018, vol. 22, no. 4, pp. 88–94 (in Russian).
12. Maranhão R.C., Freitas F.R. HDL Metabolism and Atheroprotection: Predictive Value of Lipid Transfers. *Advances in Clinical Chemistry*, 2014, no. 65, pp. 1–41. DOI: 10.1016/B978-0-12-800141-7.00001-2
13. Chumakova G.A., Gritsenko O.V., Veselovskaya N.G., Vakhromeeva E.V., Kozarenko A.A. Clinical role of apolipoproteins A and B. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika*, 2011, vol. 10, no. 6, pp. 105–111 (in Russian).
14. Masaharu H., Takeshi Y., Katsuko N., Ai S.-N., Tomoko F., Yuichi M., Takaya G., Katsushi T. Vitronectin improves cell survival after radiation injury in human umbilical vein endothelial cells. *FEBS Open Bio*, 2012, no. 2, pp. 334–338. DOI: 10.1016/j.fob.2012.10.002
15. Ruggeri Z.M., Jackson S.P. Platelet Thrombus Formation in Flowing Blood. *Platelet biology*, 2013, no. 2, pp. 399–423. DOI: 10.1016/B978-0-12-387837-3.00020-1
16. Konstantinides S., Schafer K., Thinnies T., Loskutoff D.J. Plasminogen activator inhibitor-1 and its cofactor vitronectin stabilize arterial thrombi after vascular injury in mice. *Circulation*, 2001, no. 103, pp. 576–583. DOI: 10.1161/01.cir.103.4.576
17. Sarnat S.E., Winquist A., Schauer J.J., Turner J.R., Sarnat J.A. Fine particulate matter components and emergency department visits for cardiovascular and respiratory diseases in the St. Louis, Missouri-Illinois, Metropolitan Area. *Environ. Health Perspect.*, 2015, vol. 5, no. 123, pp. 437–444. DOI: 10.1289/ehp.1307776
18. Kolpakova A.F., Sharipov R.N., Kolpakov F.A. Air pollution by particulate matter as the risk factor for the cardiovascular diseases. *Gigiena i sanitariya*, 2017, vol. 96, no. 2, pp. 133–137 (in Russian).
19. Liu Yu., Merrill R.A., Strack S. A-Kinase Anchoring Protein 1: Emerging Roles in Regulating Mitochondrial Form and Function in Health and Disease (Review). *Cells*, 2020, vol. 9, no. 298, pp. 2–12. DOI: 10.3390/cells9020298
20. Flippo K.H., Gnanasekaran A., Perkins G.A., Ajmal A., Merrill R.A., Dickey A.S., Taylor S.S., McKnight G.S. [et al.]. AKAP1 Protects from Cerebral Ischemic Stroke by Inhibiting Drp1-Dependent Mitochondrial Fission. *J. Neurosci.*, 2018, vol. 19, no. 38, pp. 8233–8242. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0649-18.2018
21. Remaud S., Gothié J.-D., Morvan-Dubois G., Demeneix B.A. Thyroid hormone signaling and adult neurogenesis in mammals. *Front. Endocrinol.*, 2014, vol. 5, no. 62, pp. 1–7. DOI: 10.3389/fendo.2014.00062
22. V'yunova T.V., Medvedeva E.V., Andreeva L.A., Dergunova L.V., Limborskaya S.A., Myasoedov N.F. A possible role of transthyretin in the biological mechanism of regulatory peptide neuroprotection. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*, 2016, vol. 34, no. 3, pp. 104–109 (in Russian).
23. Brouillette J., Quirion R. Transthyretin: a key gene involved in the maintenance of memory capacities during aging. *Neurobiol. Aging.*, 2008, vol. 29, no. 11, pp. 1721–1732. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.007

Zaitseva N.V., Zemlyanova M.A., Koldibekova Yu.V., Bulatova N.I. Omic markers identification for predicting risks of negative effects in children with elevated copper and nickel contents in blood. *Health Risk Analysis*, 2021, no. 1, pp. 48–56. DOI: 10.21668/health.risk/2021.1.05.eng

Получена: 12.01.2021

Принята: 15.03.2021

Опубликована: 30.03.2021