

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА



На правах рукописи

Катруха Иван Алексеевич

**Характеристика компонентов тропонинового комплекса,
высвобождающихся в кровь при инфаркте миокарда**

Специальность 03.01.04 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва

2019

Работа выполнена на кафедре биохимии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Научный руководитель: **Филатов Владимир Львович**, кандидат биологических наук.

Официальные оппоненты: **Тарасова Ольга Сергеевна**, доктор биологических наук, доцент кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, **Левицкий Дмитрий Иванович**, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией структурной биохимии белка, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН.

Воротников Александр Вячеславович, кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник НИИ экспериментальной кардиологии ФГБУ НМИЦ Кардиологии Минздрава России.

Защита диссертационной работы состоится «25» ноября 2019 года в 15 часов 40 минут на заседании диссертационного совета МГУ.03.12 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: Москва, Ленинские горы д. 1, стр. 12, биологический факультет МГУ, аудитория ББА.

E-mail: dkiselevs@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА» <https://istina.msu.ru/dissertations/239481311/>

Автореферат разослан «__» _____ 2019 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат биологических наук



Киселевский Д.Б.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Тропониновый комплекс состоит из трех компонентов – тропонина И, тропонина Т и тропонина С – и участвует в регуляции сокращения сердечной и скелетной мускулатуры (1, 2). Иммунохимическое определение специфичных сердечных изоформ тропонина И (сТнИ)¹ и тропонина Т (сТнТ) в крови является общепризнанным методом диагностики патологических состояний, связанных с гибелью клеток сердечной мышцы, в том числе такого распространенного заболевания, как инфаркт миокарда (ИМ) (3). В то же время иммунохимические системы, используемые для определения концентрации тропонинов, могут быть подвержены влиянию множества факторов, которые могут оказывать негативное влияние на точность определения концентрации белков и, как следствие, на точность постановки диагноза. К таким факторам можно отнести влияние гетерофильных антител, конкуренцию с аутоантителами, посттрансляционные модификации тропонинов, а также протеолитическую деградацию сТнИ и сТнТ и диссоциацию тропонинового комплекса – процессы, которые могут происходить при гибели клеток миокарда и, затем, в крови больного (4-7).

В различных работах было показано, что сТнИ (8) и сТнТ (9, 10) подвержены протеолитической деградации, и в крови данные белки присутствуют как в виде интактных молекул, так и в виде набора протеолитических фрагментов. Считалось, что с течением времени происходит все более интенсивный протеолиз молекул белков и увеличение доли протеолитических фрагментов (10, 11). Однако, до сих пор фрагменты сТнИ и сТнТ не были детально описаны (12, 13). Также не было понятно, где – в некротическом миокарде или в крови больных – происходит протеолиз тропонинов.

Результаты исследования форм тропонинового комплекса, присутствующего в крови больных с ИМ, во многом противоречивы. Так, в ранней работе, проведенной в

¹ Список используемых сокращений в порядке появления: сТнИ – сердечная изоформа тропонина И человека; сТнТ – сердечная изоформа тропонина Т человека; ТнС – медленная скелетная/сердечная изоформа тропонина С человека; ИМ – инфаркт миокарда; ИС – комплекс сТнИ с ТнС; ИТС – тройной сТнИ-сТнТ-ТнС тропониновый комплекс; мАт – моноклональное антитело; ако – аминокислотный остаток; рекТнИ – рекомбинантная сердечная изоформа ТнИ человека; рекТнТ – рекомбинантная сердечная изоформа тропонина Т человека; ФИА – флуороиммунный анализ; ИП – иммунопреципитация; ВБ – Вестерн блоттинг; НСЧ – нормальная сыворотка крови человека; НгПЧ – нормальная гепариновая плазма крови человека; NIH U – National Institute of Health units, единицы измерения активности тромбина, предложенные Национальным институтом здоровья США; USP U – United States Pharmaceutical, фармацевтические единицы США.

нашей лаборатории, предполагалось, что сТнИ присутствует в крови больных преимущественно в виде двойного сТнИ-ТнС (ИС) комплекса (14), Giuliani *et al* также детектировали в крови больных только ИС комплекс и не обнаружил двойного сТнИ-сТнТ или тройного сТнИ-сТнТ-ТнС (ИТС) комплекса (15). Напротив, Wu *et al* показали, что тропонины присутствуют в кровотоке в виде ИТС и ИС комплексов, а также в виде свободного сТнТ. При этом в работе Wu не было показано наличие в крови свободного сТнИ (16). Согласно исследованию Bates *et al*, сТнИ представлен преимущественно в виде ИС комплекса, в то время как большинство сТнТ представлено в кровотоке в виде свободных молекул (17).

Цель исследования: охарактеризовать фрагменты сердечных изоформ тропонина И и тропонина Т, а также виды тропонинового комплекса, присутствующие в крови больных в различные периоды времени после возникновения инфаркта миокарда.

В рамках поставленной цели нами были сформулированы следующие **задачи:** 1) Разработать высокочувствительные методы для исследования сТнИ, сТнТ, а также их протеолитических фрагментов; 2) Определить границы фрагментов сТнИ и сТнТ, присутствующих в крови больных с ИМ; 3) Оценить изменение содержания полноразмерного сТнИ и сТнТ и их фрагментов в крови больных с ИМ во времени; 4) Определить, в виде каких форм (свободные белки или белки в составе комплекса) сТнТ и сТнИ находятся в кровотоке у больных с ИМ, и оценить изменение содержания этих форм во времени; 5) Определить, какие участки молекул сТнИ и сТнТ больше всего подходят в качестве мишеней при получении моноклональных антител (мАт), используемых для количественного определения тропонинов.

Научная новизна работы. Разработаны высокочувствительные методы определения сТнИ и сТнТ и их фрагментов; впервые определены примерные границы протеолитических фрагментов сТнИ и сТнТ, обнаруживаемых в крови больных с ИМ. Исследована динамика содержания различных фрагментов сТнИ и сТнТ в крови больных в первые 30 часов после начала ИМ. Показано, что деградация как сТнИ, так и сТнТ происходит преимущественно в некротическом миокарде, а не в крови больных. Охарактеризованы формы тропонинового комплекса, присутствующие в крови человека в первые 30 часов после начала ИМ, в т.ч. впервые показано наличие в крови тройного комплекса, включающего в себя фрагменты сТнИ и сТнТ

(«низкомолекулярный» ИТС). Показано, что в первые 4-10 часов после начала ИМ тропонин представлен в крови больных преимущественно в виде полноразмерного тройного ИТС комплекса и «низкомолекулярного» ИТС комплекса, а в более поздние периоды – в виде «низкомолекулярного» ИТС, двойного ИС комплекса и свободных фрагментов сТнТ.

Практическая значимость работы. В ходе исследования сТнИ, сТнТ и их фрагментов, присутствующих в крови больных с ИМ, были выявлены наиболее стабильные участки белков, было предположено, что участки, расположенные примерно между 24-40² и 130-197 аа молекулы сТнИ, а также участок, расположенный примерно между 69-158 аа молекулы сТнТ, являются наиболее перспективными мишенями при получении антител, используемых для создания диагностических систем.

Положения, выносимые на защиту.

1. Определены границы и относительное содержание фрагментов сТнИ и сТнТ, присутствующие в крови больных с ИМ. Соотношение фрагментов сТнИ в крови больных остается неизменным в первые 30 часов после начала приступа. Доля свободных фрагментов сТнТ, включающих в себя центральную и N-концевые части молекулы, в указанный период значительно возрастает. Протеолиз сТнИ и сТнТ происходит преимущественно в некротическом миокарде, но не в крови больного.
2. сТнТ подвергается протеолизу под воздействием тромбина по участку R68/69S, и данное расщепление происходит при приготовлении образца сыворотки крови больного.
3. После инфаркта тропонины присутствуют в крови в виде а) тройного комплекса, содержащего ТнС, а также полноразмерные сТнИ, сТнТ и их фрагменты различной длины, б) двойного комплекса, состоящего из сТнИ и ТнС, в) свободных фрагментов сТнТ, содержащих центральную и N-концевую части молекулы.
4. Участки сТнИ, включающие в себя аминокислотные остатки ~23-40 и 130-197, а также участок сТнТ, ограниченный остатками ~69-158, являются наиболее перспективными мишенями для получения антител при создании иммунохимических диагностических систем.

² Все номера аминокислотных остатков сТнИ и сТнТ указаны согласно последовательностям, приведенным в базе данных UniProt (P19429-1 и P45379-6 соответственно) и включающим N-концевые метионины, отщепляемые у эндогенных белков.

Методология и методы диссертационного исследования. Работа выполнена с использованием разнообразных современных методов исследования белковых молекул. Для проведения исследования использованы классические биохимические (в т.ч. разделение белков методом электрофореза и гель-фильтрации среднего давления), иммунохимические (аффинная хроматография, Вестерн блоттинг и различные типы иммунного анализа с использованием высокоспецифичных моноклональных антител) и физико-химические (масс-спектрометрия) методы.

Степень достоверности полученных результатов. Постановка цели и задач работы, подготовка обзора литературы и обсуждение основаны на анализе актуальных публикаций по теме исследования. Представленные в работе данные получены с использованием современных методов исследований. Полученные результаты воспроизводимы и статистически достоверны.

Личный вклад соискателя присутствует на всех этапах работы, включая анализ литературы по теме исследования, отработку используемых методик, получение и обработку экспериментальных данных, обсуждение результатов, составление выводов, подготовку статей и тезисов конференций.

Апробация результатов работы. Результаты работы были доложены на заседании кафедры биохимии Биологического факультета МГУ, на 23^{-ем} Европейском конгрессе «Клиническая химия и лабораторная медицина» EuroMedLab 2019, Барселона, Испания, на 71^{-ом}, 70^{-ом} и 67^{-ом} Ежегодных конгрессах Американской ассоциации клинической химии (в 2019, 2018 и 2015 годах, соответственно), а также на 4^{-ом} совместном конгрессе Европейской федерации лабораторной медицины и Европейского союза медицинских специалистов, Варшава, Польша, 2016 год.

Структура диссертации. Диссертация построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов работы и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 194 страницах печатного текста, иллюстрирована 52 рисунками и 2 таблицами. Список цитированной литературы содержит 665 работ.

Публикации. По теме диссертации было опубликовано 11 печатных работ, включая 4 экспериментальных и 1 обзорную статью в профильных журналах.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

В обзоре приведены сведения о свойствах и функциях тропонинового комплекса сердца человека, а также об использовании сТнИ и сТнТ в качестве биомаркеров ИМ. Обсуждаются основные преимущества использования сТнИ и сТнТ для диагностики ИМ, а также основные сложности, связанные с иммунохимическим определением данных белков в образцах крови больных.

Материалы и методы

Эндогенный сТнИ, сТнТ и ИТС, рекомбинантные сердечные изоформы тропонина И (рекТнИ), тропонина Т (рекТнТ) человека (продуцент – *E. coli*) и все мАт, использованные в данной работе, были любезно предоставлены компанией NuTest. Если не отмечено особо, оставшиеся реактивы и материалы были производства компании Sigma Aldrich.

Образцы сыворотки и гепариновой плазмы получали путем сбора венозной крови в вакуумные пробирки (Greiner Bio-one), содержащие частицы оксида кремния или Li-гепарин, соответственно. В данной работе белки тропонинового комплекса исследовали в образцах крови больных, перенесших ИМ с подъемом ST сегмента, последующее проведение коронарной ангиографии и восстановление кровотока путем коронарного стентирования.

Флуороиммунный анализ сэндвич типа (ФИА) проводили, сорбируя на поверхность лунок 96-луночного полистирольного планшета (Corning Costar) мАт подложки, после чего отмывали лунки от не связавшихся мАт и блокировали места неспецифического связывания буфером, содержащим Tween 20. Затем в лунки вносили исследуемые образцы и раствор, содержащий детекторное мАт, конъюгированное со стабильным хелатом Eu^{3+} . После инкубации и отмывки в лунки вносили раствор усиления и детектировали флуоресценцию Eu^{3+} .

Исследование стабильности сТнИ и сТнТ in vitro проводили, инкубируя экстракт миокарда, образцы крови больных с ИМ или образцы, соответственно, нормальной сыворотки (НСЧ) или гепариновой плазмы (НгПЧ) с внесенным ИТС, в течение 0-48 часов при 37°C.

Аффинную очистку сТнИ или сТнТ из исследуемых образцов проводили путем иммунопреципитации (ИП) с использованием аффинных носителей на основе

сефарозы CL-4В, конъюгированной с 13 анти-ТнИ или 16 анти-сТнТ мАт, специфичными к различным эпитопам, соответственно, сТнИ или сТнТ.

Электрофоретическое разделение сТнИ, сТнТ и их фрагментов проводили в редуцирующих условиях в Трис-глициновой системе по Лэммли (18) или по методике Шаггера и фон Ягова (19), соответственно.

Вестерн блоттинг (ВБ) и детекцию иммунных комплексов методом усиленной хемилюминесценции проводили путем иммунохимического окрашивания белков, перенесенных из геля на нитроцеллюлозную мембрану. Окрашивание сТнИ проводили анти-ТнИ мАт, конъюгированными с пероксидазой хрена, окрашивание сТнТ проводили при помощи биотинилированных анти-ТнТ мАт с последующей инкубацией со стрептавидин-полипероксидазой (Pierce). Иммунные комплексы детектировали при помощи набора SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific) на приборе ChemiDoc Touch Imaging System (BioRad).

*Масс-спектрометрический анализ*³ интактных белков и их фрагментов после проведения стандартной пробоподготовки проводили в линейном режиме масс-спектрометра ultrafleXtreme MALDI-TOF/TOF (Bruker). MS/MS фрагментов ТнТ проводили в режиме позитивных ионов с рефлектроном.

Гель-фильтрационное разделение белков проводили на хроматографической системе среднего давления АКТА pure (GE Healthcare), используя колонку HiLoad Superdex 200 PG 16/60 (GE Healthcare).

Результаты и обсуждение

Оценка эффективности ИП тропонинов

Основным использованным в данной работе методом выявления сТнИ, сТнТ и их фрагментов, присутствующих в крови больных с ИМ, было иммунохимическое окрашивание белков при помощи специфичных мАт в ВБ. Однако образцы крови содержат значительное количество разнообразных белков (~70 мг/мл), в то время как концентрации тропонинов крайне низки (0,1-100 нг/мл), что затрудняет количественную оценку содержания тропонинов и их фрагментов. Поэтому перед проведением анализа мы ввели дополнительную стадию – экстракцию тропонинов методом ИП, которая позволила удалить большинство примесных белков из

³ Масс-спектрометрический анализ проводился в сотрудничестве с в.н.с. отдела химии белка НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, к.х.н. М.В. Серебряковой.

анализируемых образцов и значительно сконцентрировать тропонины. В результате стало возможным наносить на дорожки гелей $\sim 0,5-5$ нг эндогенного белка. Результаты контрольных экспериментов показали, что а) в пробах элюатов ИП содержалось $82,5\% \pm 16,3\%$ от ожидаемого количества сТнИ и $76\% \pm 10\%$ от ожидаемого количества сТнТ, б) разработанные методы ИП позволяют эффективно выделить как полноразмерные белки, так и их фрагменты, в) в процессе выделения не происходило дополнительного протеолиза исследуемых белков. Полученные данные говорят о том, что разработанные методы ИП позволяют эффективно выделить сТнИ и сТнТ и их протеолитические фрагменты из исследуемых образцов.

Оценка чувствительности детекции сТнИ и сТнТ в ВБ

Для количественной оценки сТнИ и его фрагментов в ВБ было выбрано мАт TnI560, конъюгированное с пероксидазой хрена. Для выявления сТнТ в данной работе были использованы системы, состоящие из биотинилированных мАт TnT329 или TnT7E7 и стрептавидин-полипероксидазы. Для того, чтобы быть уверенным в эффективности определения в ВБ тропонинов и их фрагментов, выделенных из образцов крови больных с ИМ, мы должны были убедиться в том, что выбранные нами мАт и метод детекции обладают достаточной чувствительностью.

Иммунохимическое окрашивание рекТнИ при помощи мАт TnI560 показало, что данное антитело способно эффективно детектировать полосы, содержащие $\sim 30-40$ пг белка (Рис. 1 А). Окрашивание рекТнТ показало, что обе используемых системы мАт-

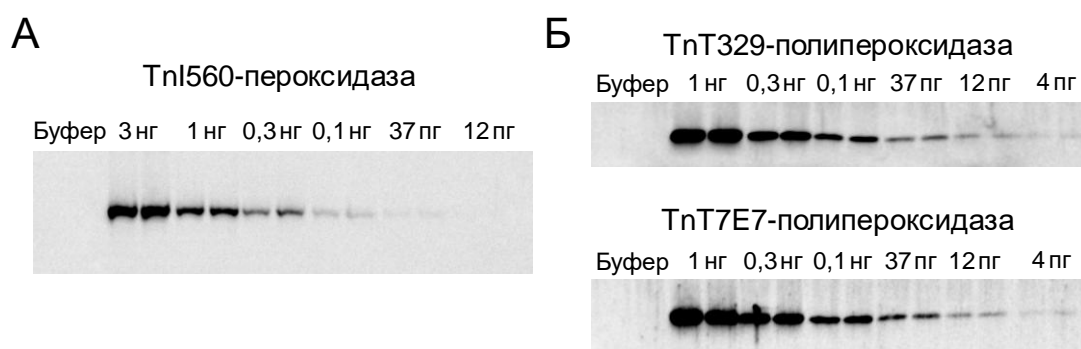


Рисунок 1. Определение чувствительности детекции тропонинов в ВБ.

А – Иммунохимическое окрашивание рекТнИ при помощи мАт TnI560, конъюгированных с пероксидазой хрена.

Б – Иммунохимическое окрашивание рекТнТ при помощи систем, состоящих из биотинилированных мАт TnT329 или TnT7E7 и стрептавидин-полипероксидазы.

Количества внесенных белков указаны над соответствующими дорожками. Каждый образец анализировали в двух повторах.

полипероксидаза способны детектировать полосы, в которых содержится ~10 пг белка (Рис. 1 Б), что примерно в 5 раз превышало чувствительность тех же МАт, напрямую конъюгированных с пероксидазой хрена (данные не приведены). Полученные данные говорят о том, что разработанные методы детекции позволяют эффективно выявлять сТНИ, сТнТ и их фрагменты, выделенные из образцов крови больных с ИМ.

Исследование фрагментации сТНИ и изменение содержания фрагментов белка в крови больных с ИМ во времени

Для определения границ фрагментов сТНИ проводили иммунохимическое окрашивание белков, выделенных из образцов сыворотки крови больных с ИМ, при

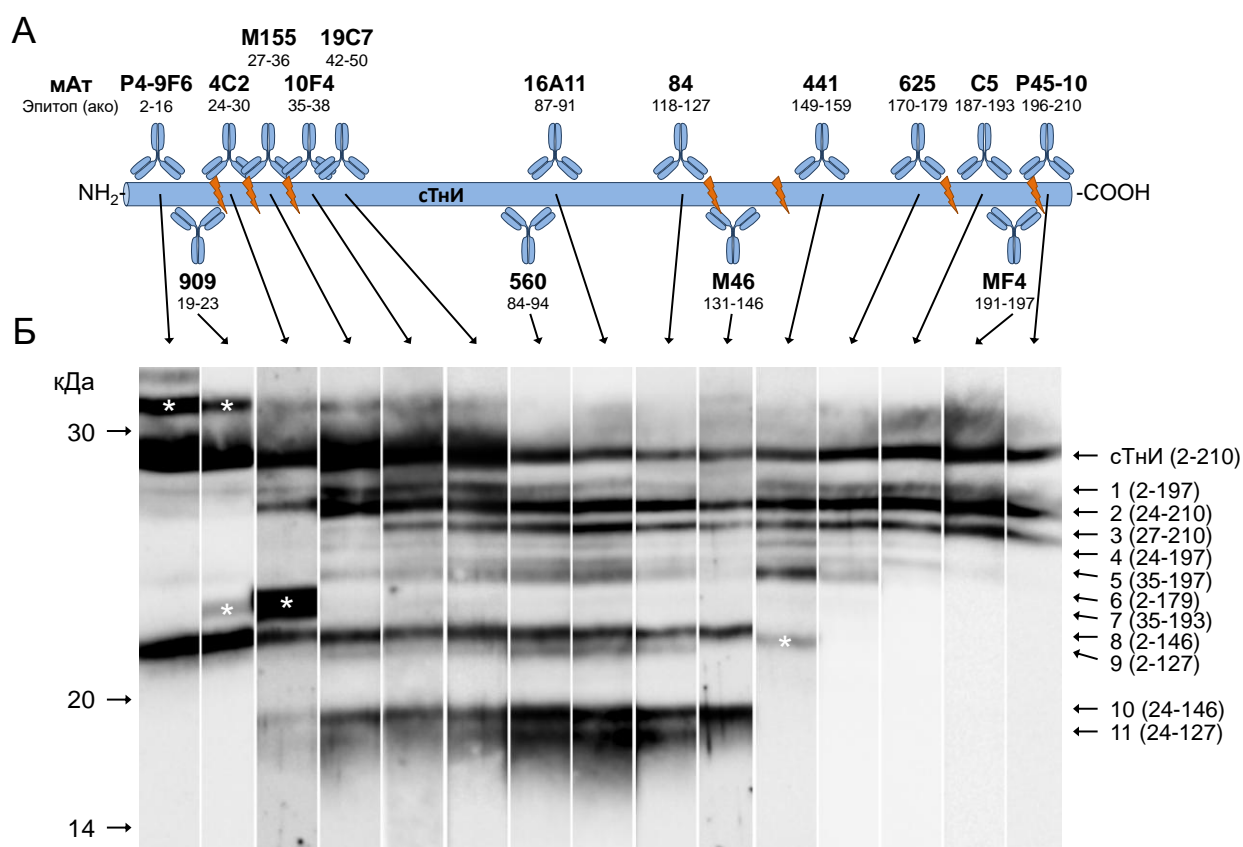


Рисунок 2. Определение границ фрагментов сТНИ, присутствующих в крови больного с ИМ.

А – схема расположения эпитопов МАт, использованных для определения границ фрагментов сТНИ. Эпитопы МАт (ако сТНИ) отмечены под названиями антител. Стрелки указывают на полосы нитроцеллюлозной мембраны, окрашенные соответствующими антителами.

Б – сТНИ и его фрагменты, аффинно выделенные из образца сыворотки больного с ИМ и окрашенные МАт, специфичными к различным эпитопам сТНИ. Примерные границы каждого фрагмента сТНИ отмечены в скобках справа от рисунка. Белыми звездочками отмечены полосы, окрашенные неспецифически.

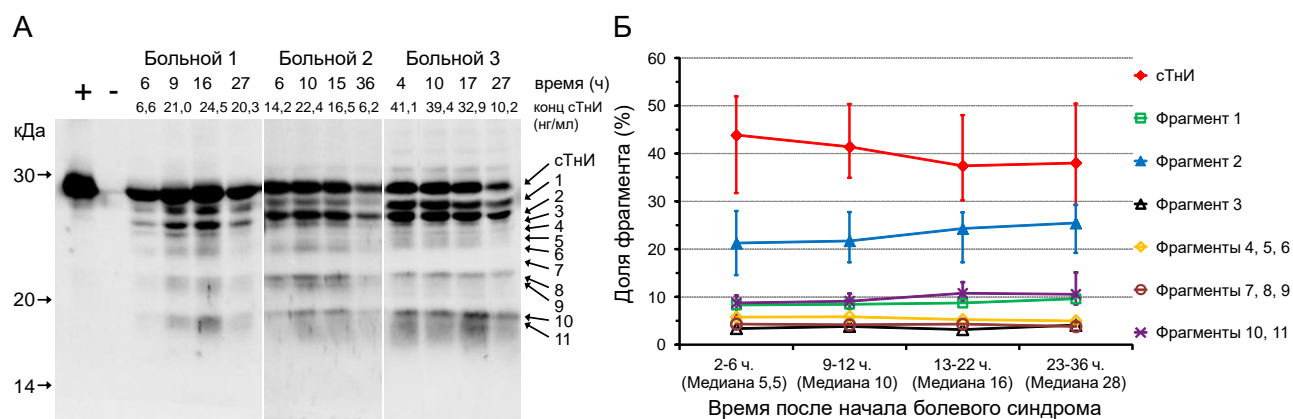


Рисунок 3. Изменение содержания сТнИ и его фрагментов в крови больных с ИМ во времени.

А – репрезентативный ВБ, демонстрирующий изменение содержания сТнИ и его фрагментов в серийных образцах сыворотки трех больных с ИМ. Иммунохимическое окрашивание мАт ТnI560 (специфичны к центральной части молекулы сТнИ и способны окрашивать все детектируемые фрагменты белка). Время, прошедшее от начала приступа до сбора образца, и концентрация сТнИ в исходном образце указаны над соответствующими дорожками.

Б – медианные значения доли различных фрагментов сТнИ в серийных образцах 20 больных с ИМ. Интерквартильные разбросы (25^{ая} и 75^{ая} перцентили) приведены для трех наиболее интенсивных полос (полноразмерной молекулы, фрагментов 2 и 11).

Таблица 1. Фрагменты сТнИ, узнаваемые моноклональными антителами с разной эпитопной специфичностью.

Данные получены при окрашивании в ВБ при помощи мАт ТnI560 сТнИ, выделенного из серийных образцов 20 больных с ИМ. Доля сТнИ (полноразмерный белок и его фрагменты), с которой взаимодействуют различные мАт, выражена в % (средние±стандартное отклонение).

мАт	Эпитоп (ако)	Фрагменты, содержание эпитоп	Доля сТнИ (%), окрашиваемого мАт ТnI560			
			6 часов	10 часов	16 часов	28 часов
P4-9F6	2-16	сТнИ, 1, 6, 8, 9	56,9±12,1	55,6±9,8	52,8±10,0	51,9±12,3
909	19-23	сТнИ, 1, 6, 8, 9	56,9±12,1	55,6±9,8	52,8±10,0	51,9±12,3
4C2	24-30	сТнИ, 1, 2, 4, 6, 8-11	93,5±2,3	93,3±2,3	93,4±2,6	93,2±3,1
M155	27-36	сТнИ, 1-4, 6, 8-11	95,0±2,2	95,1±1,9	95,3±1,5	95,5±1,5
10F4, 19C7, 560, 16A11, 84	35-127	Все детектируемые фрагменты	100	100	100	100
M46	131-146	сТнИ, 1-10	95,3±2,7	95,1±1,8	94,2±2,4	94,0±2,7
441	149-159	сТнИ, 1-7	85,1±7,4	84,9±4,8	83,4±5,6	83,3±7,1
625	170-179	сТнИ, 1-7	85,1±7,4	84,9±4,8	83,4±5,6	83,3±7,1
C5	187-193	сТнИ, 1-5, 7	82,0±7,8	81,7±5,8	80,1±6,2	80,3±7,3
MF4	191-197	сТнИ, 1-5	82,8±7,8	82,7±5,4	81,2±5,9	81,2±7,3
P45-10	196-210	сТнИ, 2, 3, 5	70,4±8,5	70,2±6,7	69,2±6,4	69,1±7,6

помощи 15 мАт, специфичных к различным эпитопам молекулы белка. Результаты данного исследования показали, что в крови сТнИ представлен в виде полноразмерной молекулы и 11 фрагментов (Рис. 2). В N-концевой части молекулы было идентифицировано три основных участка протеолиза: первый находился между эпитопами мАт TnI909 (19-23 ако) и TnI4C2 (24-30 ако) (Рис. 2, фрагменты 2, 4, 10, 11), второй – между эпитопами мАт TnI4C2 и TnI M155 (27-36 ако) (фрагмент 3), и третий – между эпитопами мАт TnIM155 и TnI10F4 (35-38 ако) (фрагменты 5 и 7). На С-конце молекулы было идентифицировано как минимум четыре участка протеолиза. мАт TnIM46 (эпитоп 131-146 ако) оказалось первым антителом с С-конца, способным окрасить все видимые фрагменты сТнИ. Таким образом, можно заключить, что наиболее стабильный участок сТнИ ограничен примерно остатками 35-146.

Для того, чтобы оценить изменение содержания фрагментов сТнИ в разные периоды времени после начала ИМ, мы провели иммунохимическое окрашивание сТнИ, выделенного из серийных образцов крови 20 больных, при помощи мАт TnI560. Данное антитело специфично к центральному участку сТнИ (ако 84-94) и способно взаимодействовать со всеми обнаруженными фрагментами белка. Проведенный анализ показал, что в первые 30 часов после ИМ соотношение фрагментов сТнИ оставалось практически неизменным (Рис. 3), хотя общее их содержание в крови больного существенно менялось. Полоса, соответствующая полноразмерному сТнИ, составила ~40% от всего окрашенного сТнИ. Также было показано, что мАт, эпитопы которых расположены между остатками 24 и 197 сТнИ, взаимодействуют более чем 80% от всего обнаруженного белка (Таблица 1). Таким образом, можно заключить, что большая часть сТнИ, попадающего в кровь больных в первые 30 часов после ИМ, подвергается только ограниченному протеолизу аминокислотных остатков, расположенных на N- и С-концах молекул белка.

Исследование стабильности сТнИ in vitro

Для того, чтобы определить где – в некротическом миокарде, или в крови больных – происходит протеолиз сТнИ, мы провели *in vitro* инкубацию экстракта миокарда (модель протеолиза сТнИ в некротическом миокарде) и сывороток 11 больных с ИМ (модель протеолиза сТнИ в крови больного) в течение 48 часов при 37°C.

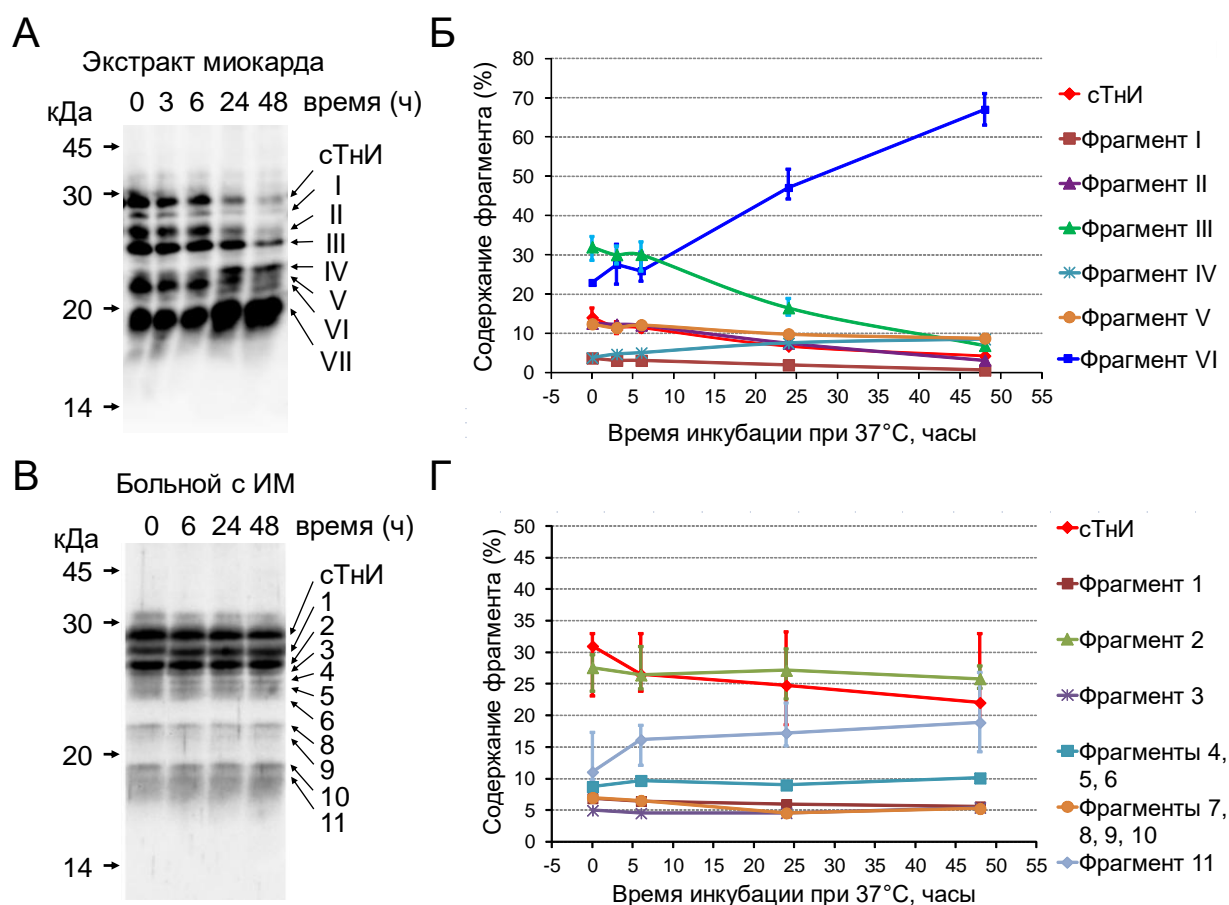


Рисунок 4. Исследование протеолитической деградации сТнИ в экстракте миокарда и в образцах сыворотки больных с ИМ *in vitro*.

А – ВБ сТнИ и его фрагментов, выделенных из проб экстракта миокарда после инкубации в течение 0-48 часов при 37°C. Окрашивание мАт TnI560.

Б – Относительное содержание сТнИ и его фрагментов после инкубации экстракта миокарда в течение 0-48 часов при 37°C. Медианные значения для 4 измерений. Разбросы обозначают 25⁻¹⁰ и 75⁻¹⁰ перцентили для трех наиболее представленных полос (целый белок и фрагменты III и VII).

В – Репрезентативный ВБ сТнИ и его фрагментов, выделенных из проб сыворотки больного, после инкубации в 0-48 часов при 37°C. Окрашивание мАт TnI560.

Г – Изменение соотношения сТнИ и его фрагментов после инкубации сывороток больных 0-48 часов при 37°C. Медианные значения для 11 образцов сывороток больных с ИМ. Разбросы обозначают 25⁻¹⁰ и 75⁻¹⁰ перцентили для трех наиболее представленных полос (целый белок, фрагменты 2 и 11).

В пробах, полученных после инкубации экстракта миокарда, наблюдалось значительное падение содержания полноразмерного сТнИ, а также его 28-25-кДа фрагментов, в то время как содержание низкомолекулярных фрагментов значительно выросло (Рис. 4 А и Б). В противоположность этому, инкубация образцов сывороток больных не привела значительному протеолизу содержащегося в них сТнИ (Рис. 4 В и Г), что позволяет предположить, что протеолиз сТнИ происходит преимущественно в некротическом миокарде, а не в крови больных.

Протеолиз сТнТ под воздействием тромбина

Сравнение сТнТ, выделенного из образцов сыворотки и гепариновой плазмы, которые были собраны у больных единовременно, показало, что в сыворотке сТнТ был представлен преимущественно в виде фрагмента с кажущейся молекулярной массой 29-кДа, в то время как в плазме значительная часть сТнТ была представлена в виде полноразмерного белка (Рис. 5 дорожки 4 и 5). Проведенные исследования позволяют утверждать, что образование 29-кДа фрагмента в сыворотке крови происходит под действием тромбина – сериновой протеазы, активируемой в процессе свертывания крови (Рис. 5, дорожки 6-12). Масс-спектрометрический анализ полученного фрагмента показал, что сайт протеолиза тромбина находится между аминокислотными остатками R68/69S (данные не приведены). Поскольку мы показали, что при приготовлении образца сыворотки сТнТ подвергается протеолизу под воздействием тромбина, для дальнейших исследований сТнТ мы использовали образцы гепариновой плазмы, в которых тромбин не активен.

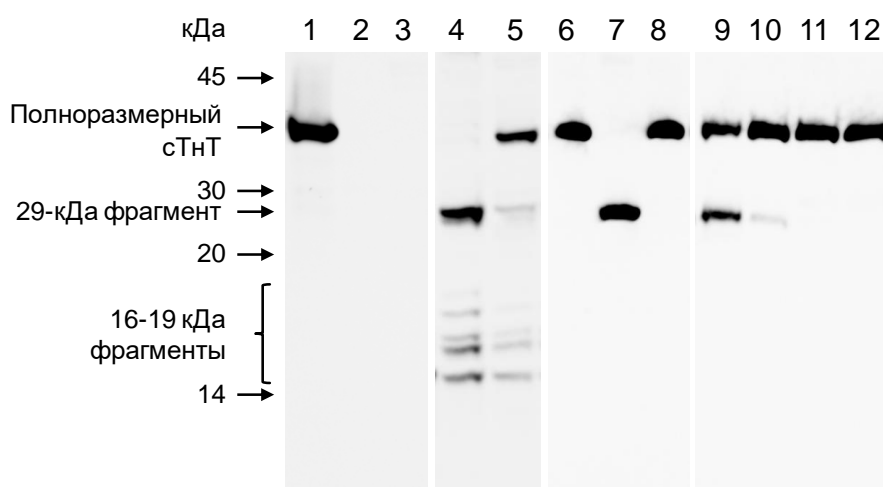


Рисунок 5. Протеолиз сТнТ под воздействием тромбина.

- 1 – Стандарт рекТнТ,
 - 2 – Белки, выделенные из НСЧ («-» контроль),
 - 3 – Белки, выделенные из НГПЧ («-» контроль),
 - 4 – сТнТ, выделенный из сыворотки репрезентативного больного с ИМ,
 - 5 – сТнТ, выделенный из гепариновой плазмы репрезентативного больного с ИМ,
 - 6 – рекТнТ в буфере,
 - 7 – рекТнТ в буфере + 3 NIH U/мл тромбина,
 - 8 – рекТнТ в буфере + 3 NIH U/мл тромбина, прединкубированным с гирудином,
 - 9 – рекТнТ в NHS,
 - 10 – рекТнТ в НСЧ, прединкубированной с гепарином (300 USP U/мл),
 - 11 – рекТнТ в НСЧ, прединкубированной с гирудином (10 IU/ мл),
 - 12 – рек ТнТ в НГПЧ.
- Окрашивание в ВБ при помощи мАт ТнТ313 (специфично к ако 119-138 молекулы сТнТ).

Исследование фрагментации сТнТ и изменение содержания фрагментов в крови больных с ИМ во времени

Для определения границ фрагментов сТнТ, присутствующих в крови больных после ИМ, мы провели иммунохимическое окрашивание белков, выделенных из образцов гепариновой плазмы больных, при помощи 15 мАт, специфичных к различным эпитопам молекулы сТнТ. Используя данный подход мы идентифицировали 23 фрагмента сТнТ с кажущейся молекулярной массой 8-37 кДа (Рис. 6). Судя по количеству и интенсивности детектированных фрагментов, наиболее активный протеолиз сТнТ происходит в районе эпитопа мАт ТнТ7G7 – наиболее вероятно, между остатками 68 и 69 (участок протеолиза сТнТ под воздействием

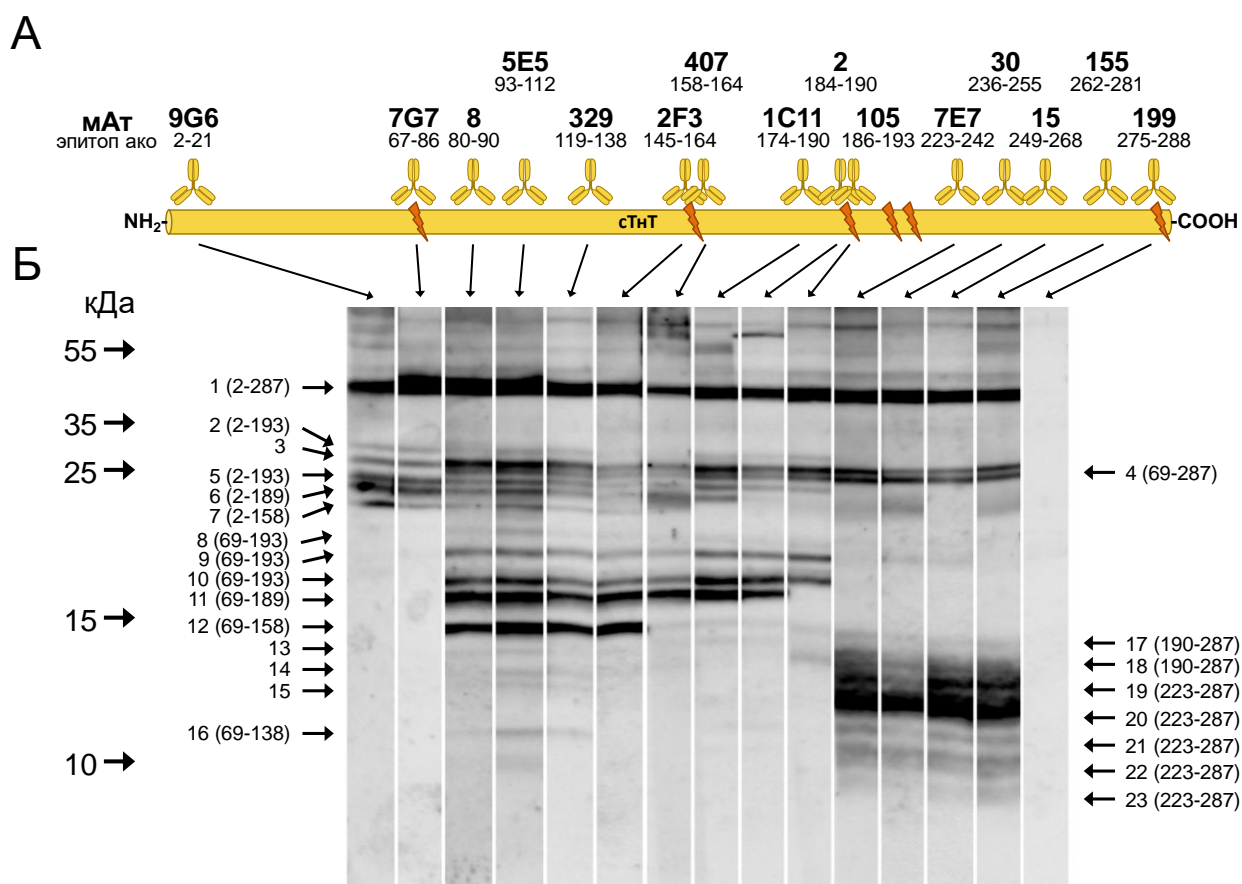


Рисунок 6. Определение границ фрагментов сТнТ, присутствующих в крови больного с ИМ.

А – схема расположения эпитопов мАт, использованных для определения границ фрагментов сТнТ. Эпитопы мАт (ако сТнТ) отмечены под названиями антител. Стрелками указаны полосы нитроцеллюлозной мембраны, окрашенные соответствующими антителами. **Б** – сТнТ и его фрагменты, аффинно выделенные из образца гепариновой плазмы больного с ИМ и окрашенные мАт, специфичными к различным эпитопам сТнТ. Примерные границы фрагментов обозначены в скобках слева и справа от дорожек. Границы фрагментов 3, 13, 14 и 15 определены не были.

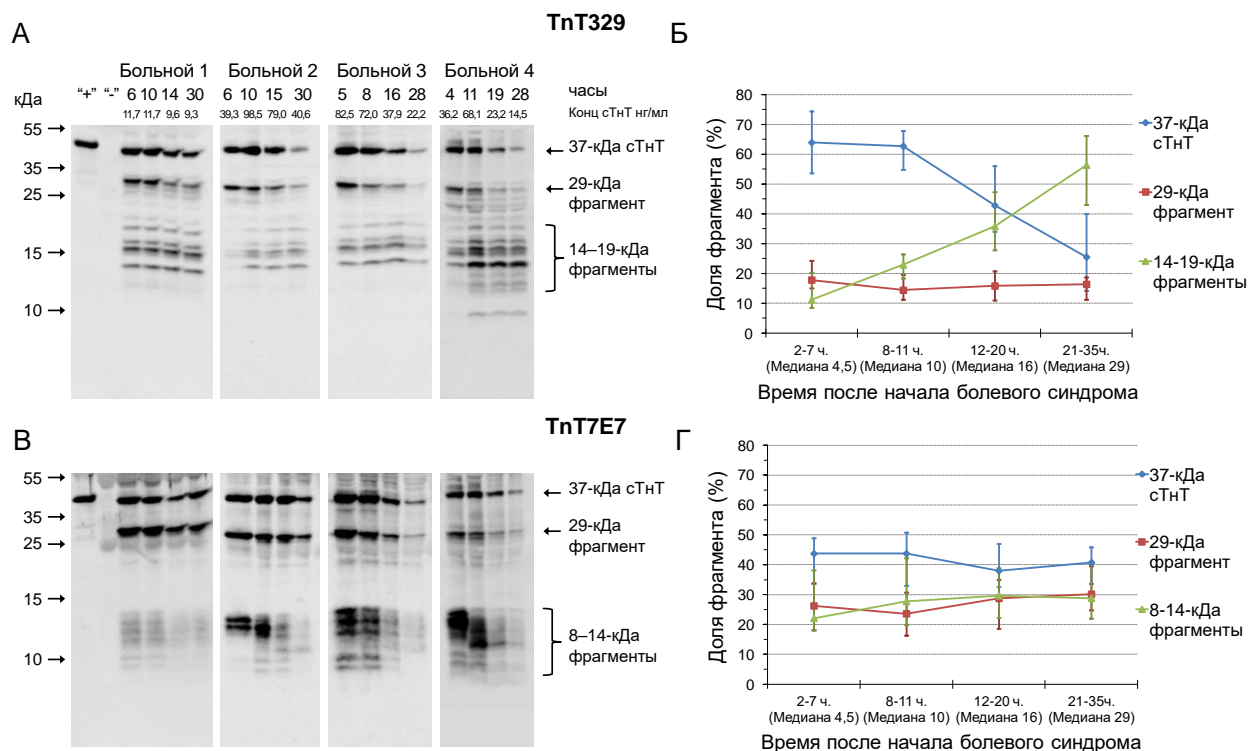


Рисунок 7. Изменение содержания фрагментов сТнТ в образцах гепариновой плазмы больных с ИМ во времени.

А и В – репрезентативный ВБ, демонстрирующий содержание фрагментов сТнТ, выделенных из серийных образцов четырех больных с ИМ. Время, прошедшее от начала болевого синдрома до сбора образца, и концентрация сТнТ в исходных образцах указана над дорожками. Иммунохимическое окрашивание мАт TnT329 (**А**) и TnT7E7 (**В**).

Б и Г – медианные значения доли различных фрагментов сТнТ, выделенных из серийных образцов 23 больных с ИМ при окрашивании мАт TnT329 (**Б**) и TnT7E7 (**Г**).

кальпаина (20, 21) и тромбина), а также между эпитопами мАт TnT2 и TnT7E7 – в нескольких местах примерно между остатками 190 и 223. В центральной части молекулы мы предполагаем наличие двух дополнительных участков протеолиза – около остатка 138 (фрагмент 16, примерно ако 69-138) и около остатка 158 (фрагменты 7 и 12, примерно ако 2-158 и 69-158, соответственно). Интенсивность полос, соответствующих фрагментам 13, 14 и 15 была слишком низка для того, чтобы определить их границы, но данные фрагменты окрашивались мАт TnT8, TnT5E5 и TnT329, что говорит о том, что это фрагменты центральной части сТнТ.

Для исследования изменения содержания различных фрагментов сТнТ в крови больных во времени мы провели окрашивание сТнТ, выделенного из серийных образцов гепариновой плазмы 23 больных с ИМ, при помощи двух мАт: TnT329

(специфично к центральной части молекулы сТнТ, эпитоп 119-138 ака) и ТнТ7Е7 (специфично к С-концевому участку молекулы, эпитоп 223-242 ака). Выявление сТнТ при помощи мАт ТнТ329 показало, что в течение первых 30 часов после начала ИМ доля 37-кДа сТнТ уменьшается более чем на половину (с ~65% до ~25%), в то время как доля центральных фрагментов (фрагменты 9-16) увеличивается с ~10% до ~55% (Рис. 7 А, Б). Доля 29-кДа фрагмента при этом осталась практически неизменной.

В противоположность результатам, полученным при окрашивании мАт ТнТ329, при выявлении сТнТ с использованием мАт ТнТ7Е7 мы не наблюдали существенных изменений в содержании ни высокомолекулярных, ни низкомолекулярных фрагментов сТнТ во времени (Рис. 7 В и Г). Значительное увеличение доли центральных фрагментов, наблюдаемое при окрашивании сТнТ мАт ТнТ329, может быть объяснено протеолизом сТнТ между остатками 68/69 и остатками 190-220 и последующим относительно быстрым вымыванием в кровь коротких свободных центральных фрагментов в то время, как С-концевая часть сТнТ остается в клетках в составе тройного комплекса.

Исследование стабильности сТнТ in vitro

Для того чтобы выяснить, подвергается ли сТнТ протеолизу под действием протеаз крови, мы инкубировали образцы гепариновой плазмы больных с ИМ, содержащие эндогенный сТнТ, или сТнТ (в форме тройного ИТС комплекса), внесенный в нормальную гепариновую плазму, в течение 0-48 часов при 37°C. В данном случае не приводятся данные по протеолизу сТнТ, полученные при инкубации экстракта сердечной мышцы, так как предварительный эксперимент показал, что сТнТ подвергается практически полной деградации с образованием фрагментов с молекулярной массой 8-28 кДа еще в процессе приготовления экстракта. Анализ сТнТ, выделенного из полученных проб, показал, что при инкубации *in vitro* в течение 48 часов не происходит существенной деградации сТнТ (Рис. 8 А). Единственный участок, по которому происходил протеолиз белка в процессе инкубации плазмы крови больных, был обнаружен при окрашивании сТнТ антителами ТнТ199, специфичными к С-концевой части молекулы (остатки 275-288, Рис. 8 Б). Масс-спектрометрический анализ продуктов протеолиза сТнТ, инкубированного в НгПЧ, показал, что в процессе инкубации происходит отщепление

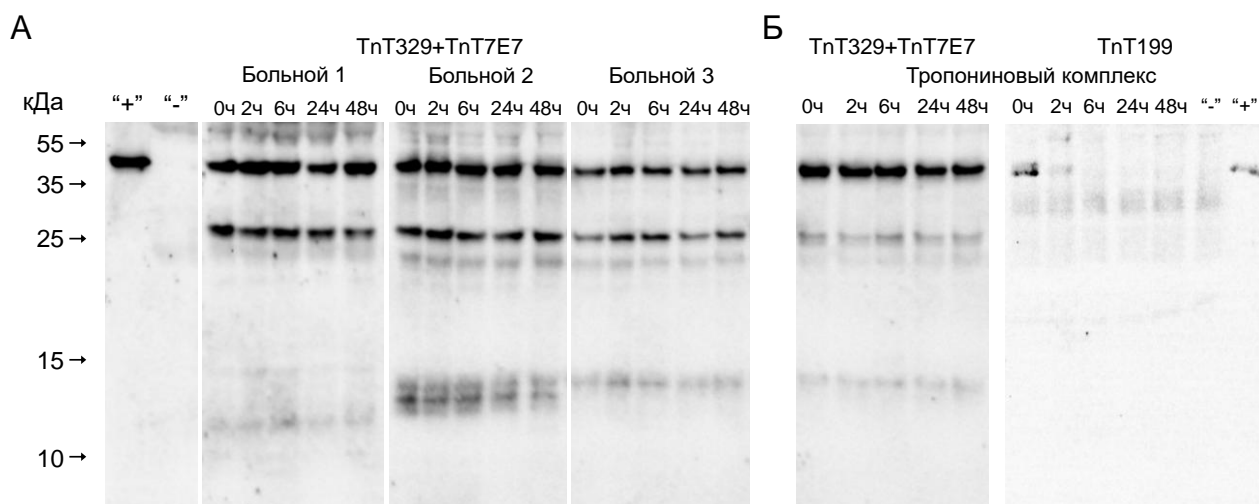


Рисунок 8. Дегградация сТнТ *in vitro*.

А – сТнТ, выделенный из образцов гепариновой плазмы трех репрезентативных больных, после инкубации 0-48 ч при 37°C.

Больной 1 – исходный образец – 5 часов, с(сТнТ)= 8,7 нг/мл; больной 2 – 3,5 часов, 23,7 нг/мл, больной 3 – 5 часов, 10,3 нг/мл. Иммунохимическое окрашивание смесью мАТ ТnT329 и ТnT7E7.

Б – сТнТ, выделенный из проб инкубации ИТС в нормальной гепариновой плазме. Иммунохимическое окрашивание смесью мАТ ТnT329 и ТnT7E7 или мАТ ТnT199.

только одного С-концевого остатка лизина. Полученные данные позволяют предположить, что, как и в случае с сТнИ, основной протеолиз сТнТ происходит в некротическом миокарде, а не в крови больных с ИМ.

Формы тропонинового комплекса, присутствующие в крови больных с ИМ

Исследование форм тропонинового комплекса, присутствующих в крови больных с ИМ, проводили, разделяя белки плазмы крови методом гель-фильтрации с последующим измерением иммунохимической активности во фракциях методом сэндвич ФИА. Данный подход позволяет разделить различные формы белковых комплексов, не нарушая их целостности. ФИА анализ фракций, полученных после разделения белков гепариновой плазмы больных с ИМ, в паре ТCom8-ТnT7E7 (мАТ подложки специфично к ИС и ИТС комплексам, детекторное мАТ специфично к С-концевой части сТнТ) и в паре ТnI84-ТnI560 (взаимодействует со свободным сТнИ и сТнИ в составе ИС комплекса, но не взаимодействует с ИТС) показал наличие трех пиков иммунохимической активности (Рис. 9 А). ФИА анализ белков, содержащихся во фракциях гель-фильтрации, и последующий анализ методом ВБ белков, выделенных из фракций, соответствующих пикам иммунохимической активности различных форм тропонинового комплекса, показали, что пик 1 соответствует ИТС

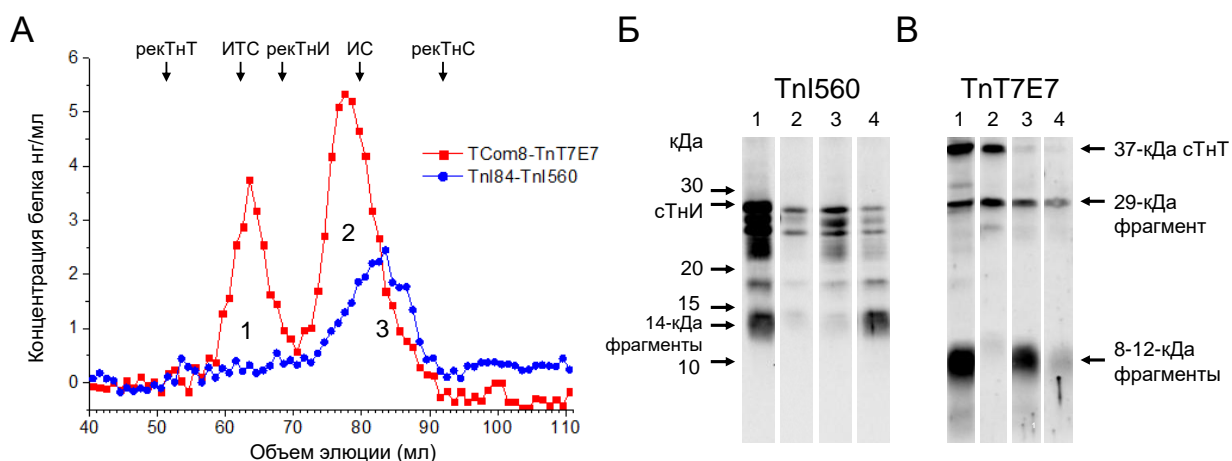


Рисунок 9. Формы тропонинового комплекса в крови больного с ИМ.

А – Профиль гель-фильтрации репрезентативного образца гепариновой плазмы больного с ИМ (9,5 ч после начала ИМ). ИТС во фракциях детектирован методом ФИА с использованием пары Tcom8-TnT7E7 (красный), ИС – с использованием пары TnI84-TnI560 (синий). Стрелками указаны объемы элюции белков-стандартов.

Б и В – Иммунохимическое окрашивание сТнИ и сТнТ, содержащихся в пиках гель-фильтрации образца гепариновой плазмы больного с ИМ. Окрашивание сТнИ при помощи мАт TnI560 (**Б**) и сТнТ при помощи мАт TnT7E7 (**В**).

- 1 – Белки, выделенные из исходной плазмы больного с ИМ,
- 2 – Белки, выделенные из фракций, соответствующих пику 1 (полноразмерный ИТС),
- 3 – Белки, выделенные из фракций, соответствующих пику 2 (НМ-ИТС),
- 4 – Белки, выделенные из фракций, соответствующих пику 3 (ИС).

комплексу, в состав которого входят преимущественно полноразмерные или слабо протеолизированные сТнИ и сТнТ, пик 2 – ИТС комплексу, в котором присутствуют фрагментированные сТнИ и сТнТ («низкомолекулярный» ИТС), пик 3 – ИС комплексу, в состав которого входили преимущественно фрагменты сТнИ с кажущейся молекулярной массой около 14 кДа. (Рис. 9 Б). Анализ профиля гель-фильтрации, проведенной после аффинного удаления из образца больного с ИМ сТнИ и связанных с ним белков (ИС и ИТС комплексов) показал наличие значительного количества свободных фрагментов сТнТ с кажущимися молекулярными массами 25-27 кДа (фрагменты ~2-189/223 ака) и 14-19 кДа (фрагменты ~69-158 и ~69-189/223 ака). В противоположность результатам, полученным другими группами (16, 17), нам не удалось обнаружить существенного количества свободного сТнИ или свободного полноразмерного сТнТ в образцах больных с ИМ.

Исследование образцов, собранных в различное время после начала ИМ, показало, что в первые часы после инфаркта тропонин представлен в крови преимущественно в виде ИТС и «низкомолекулярного» ИТС, в то время как на более

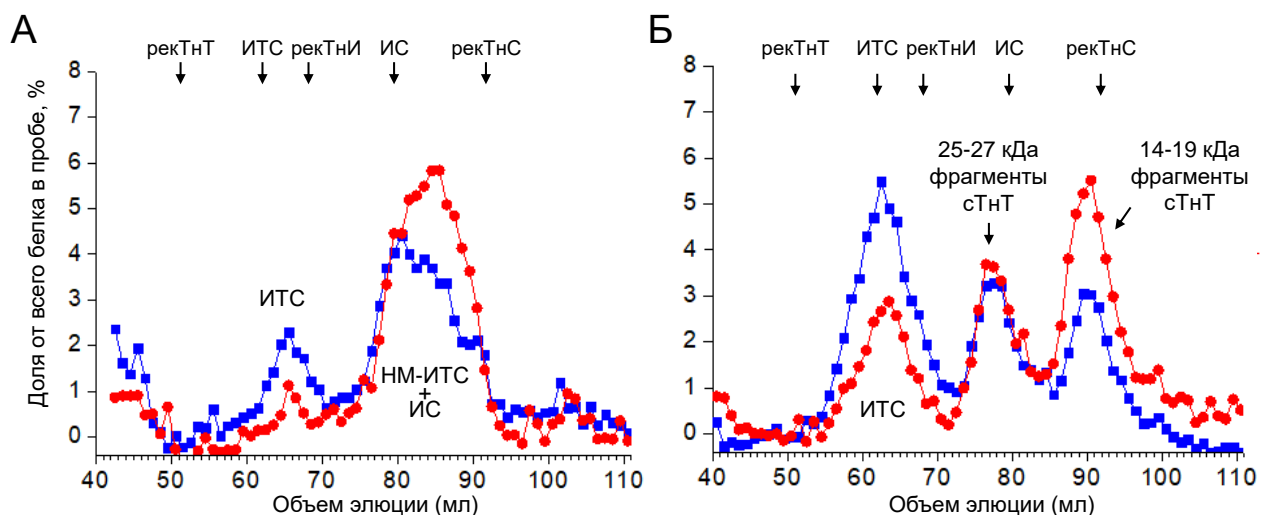


Рисунок 10. Изменение содержания форм тропонинового комплекса и свободных фрагментов сТнТ в крови больных с ИМ во времени.

Содержание белков во фракциях после проведения гель-фильтраций. Средние значения для 6 образцов гепариновой плазмы больных с ИМ, собранных через 3-10 часов после начала ИМ (синий) и 4 образцов, собранных через 13-30 часов после начала ИМ (красный).

А – сэндвич-ФИА фракций в паре TnI19C7-TnI560, специфичной к центральной части сТнИ.

Б – сэндвич-ФИА фракций в паре TnT329-TnT406, специфичной к центральной части сТнТ.

поздних сроках (~30 часов после начала ИМ) – преимущественно в виде «низкомолекулярного» ИТС, двойного ИС комплекса и свободных фрагментов сТнТ (Рис. 10).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ранее считалось, что для наиболее достоверного определения концентрации сТнИ в крови больных с ИМ следует использовать мАт, специфичные к центральной части молекулы белка. В данной работе мы показываем, что в крови больных с ИМ сТнИ присутствует в виде ИС или ИТС комплексов. Это означает, что, в крови больных участки ТнИ, ограниченные остатками ~40-80 и ~95-130, оказываются экранированы от взаимодействия с антителами диагностических систем другими компонентами тропонинового комплекса (преимущественно ТнС). В то же время, известно, что центральная часть сТнИ, находящегося в составе ИТС комплекса, в наибольшей степени подвержена влиянию аутоантител, которые присутствуют в крови некоторых больных и препятствуют взаимодействию белка с антителами диагностических систем (5-7). Одновременно с этим мы обнаружили, что более 80% сТнИ представлена в крови больных в виде полноразмерной молекулы и фрагментов, содержащих последовательность ~24-197 аа, и данное соотношение практически не

изменяется в первые 30 часов после начала ИМ. Таким образом, из результатов нашей работы можно заключить, что мАТ, специфичные к участкам сТнИ, ограниченными остатками 24-40 и 130-197, в наименьшей степени подвержены влиянию факторов, препятствующих их взаимодействию с белком (экранированию другими компонентами тропонинового комплекса, влиянию аутоантитела, протеолизу), и использование таких антител в иммунохимических диагностических системах позволит детектировать наибольшее возможное количество сТнИ в образцах крови больных.

Исследуя содержание фрагментов сТнТ в крови больных с ИМ, мы обнаружили, что наибольшей стабильностью обладают участки белка, ограниченные примерно акто 69-158 и 223-287. Однако в данном исследовании нами также было показано, что С-

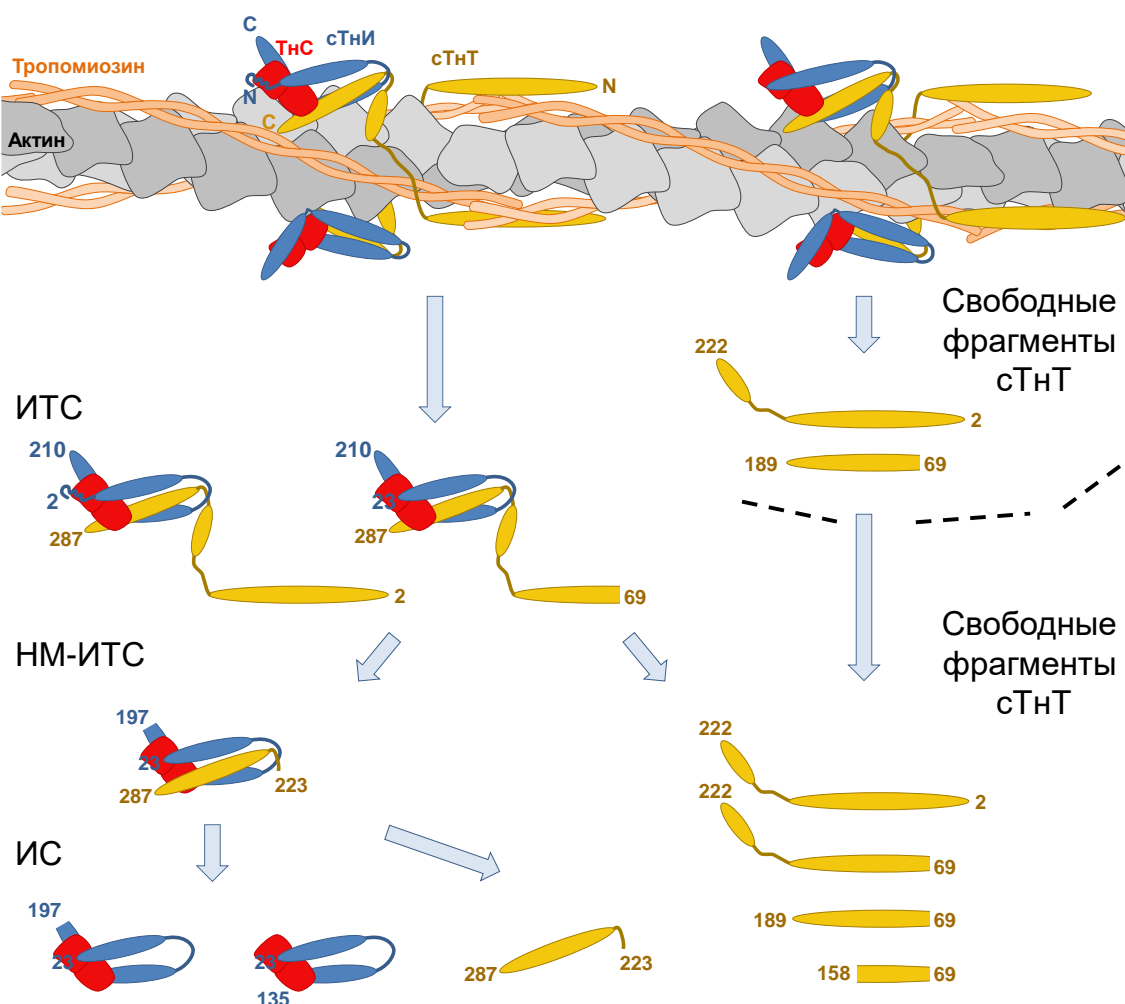


Рисунок 11. Возможная схема изменения состава форм тропонина, присутствующих в крови больных с ИМ, во времени.

сТнИ обозначен синим, сТнТ – желтым, с/мТнС – красным. Цифрами обозначены примерные границы образованных фрагментов белков.

концевой фрагмент сТнТ (ако 223-287) преимущественно входит в состав тройного комплекса, два других компонента которого – сТнИ и ТнС препятствуют взаимодействию большинства мАт, специфичных к данному участку, с белком. Помимо этого, С-концевой участок сТнТ, находящегося в составе ИТС, подвержен воздействию аутоантител, негативно влияющих на узнавание антигена антителами, специфичными к этому фрагменту (5). Таким образом, данные наших исследований позволяют предположить, что наиболее перспективным является использование в диагностических системах мАт, специфичных к участку сТнТ, ограниченному остатками 69-158.

ВЫВОДЫ

1. сТнИ представлен в крови больных с ИМ в виде полноразмерного белка и 11 протеолитических фрагментов. Соотношение фрагментов сТнИ в крови остается практически неизменным в первые 30 часов после ИМ.
2. сТнТ представлен в крови больных в виде фрагмента с кажущейся молекулярной массой 37 кДа (остатки 2-287), а также ~22 фрагментов с кажущимися молекулярными массами 8-29 кДа. Доля С-концевых фрагментов (остатки ~190/220-287) сТнТ остается практически неизменной в первые 30 часов после ИМ, в то время как содержание в крови свободных центральных фрагментов сТнТ (остатки ~69-158 и ~69-189/223) за это время значительно возрастает.
3. сТнТ подвергается протеолизу по участку R68/69S под действием тромбина.
4. Полученные данные свидетельствуют о том, что протеолиз сТнИ и сТнТ происходит преимущественно в некротическом миокарде, но не в крови больного.
5. В первые часы после ИМ тропонины представлены в крови преимущественно в виде полноразмерного тройного комплекса и «низкомолекулярного» ИТС. Через 13-30 часов после начала ИМ тропонины присутствуют в крови преимущественно в виде НМ-ИТС, двойного ИС комплекса и свободных (не связанных с другими компонентами тропонина) центральных и N-концевых фрагментов молекулы сТнТ.
6. Участки, включающие в себя остатки ~23-40 и 130-197 сТнИ, а также участок, ограниченный остатками ~69-158 сТнТ, являются наиболее перспективными мишенями для получения антител при создании иммунохимических диагностических систем.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах Scopus, WoS, RSCI:

1. Vylegzhanina A. V., Kogan A. E., Katrukha I. A., Koshkina E. V., Bereznikova A. V., Filatov V. L., Bloshchitsyna M. N., Bogomolova A. P., Katrukha A. G. Full-Size and Partially Truncated Cardiac Troponin Complexes in the Blood of Patients with Acute Myocardial Infarction // Clin Chem. – 2019. – Т. 65, № 7. – С. 882-892. **Impact Factor Scopus (IF) – 8,6**
2. Katrukha I. A., Kogan A. E., Vylegzhanina A. V., Kharitonov A. V., Tamm N. N., Filatov V. L., Bereznikova A. V., Koshkina E. V., Katrukha A. G. Full-Size Cardiac Troponin I and Its Proteolytic Fragments in Blood of Patients with Acute Myocardial Infarction: Antibody Selection for Assay Development // Clin Chem. – 2018. – Т. 64, № 7. – С. 1104-1112. **IF – 8,6**
3. Katrukha I. A., Kogan A. E., Vylegzhanina A. V., Serebryakova M. V., Koshkina E. V., Bereznikova A. V., Katrukha A. G. Thrombin-Mediated Degradation of Human Cardiac Troponin T // Clin Chem. – 2017. – Т. 63, № 6. – С. 1094-1100. **IF – 8,6**
4. Katrukha I. A., Kogan A. E., Vylegzhanina A. V., Koshkina E. V., Bereznikova A. V., Katrukha A. G. Thrombin activation via serum preparation is not the root cause for cardiac troponin T degradation. In Reply // Clin Chem. – 2017. – Т. 63, № 11. – С. 1769-1770. **IF – 8,6**
5. Катруха И. А. Тропониновый комплекс сердца человека. Структура и функции // Успехи Биологической химии (М.). – 2013. – Т. 53, – С. 149-194. **IF – 1,35**

Тезисы докладов и материалы конференций:

1. Katrukha I. A., Vylegzhanina A. V., Kogan A. E., Mukharyamova K. S., Bereznikova A. V., Bogomolova A. P., Koshkina E. V., Katrukha A. G. Full-size human cardiac troponin T and its fragments in the plasma of patients with acute myocardial infarction. 71st AACC Annual Scientific Meeting Abstracts, 2019, S10.
2. Vylegzhanina A. V., Kogan A. E., Katrukha I. A., A. Bereznikova A. V., Koshkina E. V., Bogomolova A. P., Katrukha A. G. Cardiac troponins in the blood of patients with acute myocardial infarction: in what forms do they exist? Clinica Abstracts / Clinica Chimica Acta 493 (2019) S170–S198.
3. Katrukha I. A., Vylegzhanina A. V., Kogan A. E., Kharitonov A. V., Tamm N. N., Filatov V. L., Bereznikova A. V., Koshkina E. V., Katrukha A. G. Human cardiac TnI

degradation and antibody selection for the assay development. 70th AACC Annual Scientific Meeting Abstracts, 2018, S31.

4. Katrukha I. A., Vylegzhanina A. V., Kogan A. E., Bereznikova A. V., Koshkina E. V., Mizov A. Y., Moiseev V. S., Katrukha A. G. Fragmentation of human cardiac troponin I from serum samples of AMI patients. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, (2016) 54, 10, eA289.

5. Vylegzhanina A. V., Katrukha I. A., Kogan A. E., Bereznikova A. V., Koshkina E. V., Katrukha A. G. Human cardiac Troponin T is cleaved by thrombin in serum samples. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, (2016) 54, 10, eA283.

6. Kogan A. E., Katrukha I. A., Vylegzhanina A. V., Bereznikova A. V., Katrukha A. G. *In vitro* Studies of Human Cardiac Troponin I Degradation. *Clinical chemistry*, 61, 10, Supplement, 2015, S127.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. I. A. Katrukha, *Biochemistry (Mosc)* **78**, 1447 (Dec, 2013).
2. I. Ohtsuki, *Adv Exp Med Biol* **592**, 21 (2007).
3. K. Thygesen *et al.*, *Circulation* **138**, e618 (Nov 13, 2018).
4. A. Katrukha, A. Bereznikova, V. Filatov, T. Esakova, *Clin Chem Lab Med* **37**, 1091 (Nov-Dec, 1999).
5. A. V. Vylegzhanina *et al.*, *Clin Chem* **63**, 343 (Jan, 2017).
6. S. Eriksson, M. Junikka, K. Pettersson, *Clin Biochem* **37**, 472 (Jun, 2004).
7. T. Savukoski *et al.*, *Clin Chem* **59**, 512 (Mar, 2013).
8. N. A. Morjana, *Biotechnol Appl Biochem* **28 (Pt 2)**, 105 (Oct, 1998).
9. E. C. Michielsen, J. H. Diris, V. W. Kleijnen, W. K. Wodzig, M. P. Van Dieijen-Visser, *Clin Biochem* **40**, 851 (Aug, 2007).
10. E. P. Cardinaels *et al.*, *Clin Chem* **59**, 1083 (Jul, 2013).
11. A. G. Katrukha *et al.*, *Clin Chem* **44**, 2433 (Dec, 1998).
12. A. S. Streng *et al.*, *Clin Chem* **63**, 563 (Feb, 2017).
13. A. S. Streng *et al.*, *Journal of proteomics* **136**, 123 (Mar 16, 2016).
14. A. G. Katrukha *et al.*, *Clin Chem* **43**, 1379 (Aug, 1997).
15. I. Giuliani *et al.*, *Clin Chem* **45**, 213 (Feb, 1999).
16. A. H. Wu *et al.*, *Clin Chem* **44**, 1198 (Jun, 1998).
17. K. J. Bates *et al.*, *Clin Chem* **56**, 952 (Jun, 2010).
18. U. K. Laemmli, *Nature* **227**, 680 (Aug 15, 1970).
19. H. Schagger, G. von Jagow, *Anal Biochem* **166**, 368 (Nov 1, 1987).
20. F. Di Lisa *et al.*, *Biochem J* **308 (Pt 1)**, 57 (May 15, 1995).
21. L. Ke *et al.*, *J Mol Cell Cardiol* **45**, 685 (Nov, 2008).