

Пастушкова Л. Х.¹, Каширина Д. Н.¹, Доброхотов И. В.¹, Кононихин А. С.^{1,2}, Тийс Е. С.³, Иванисенко В. А.³, Веселова О. М.⁴, Выборов О. Н.⁴, Носовский А. М.¹, Масенко В. П.⁴, Гончаров И. Н.⁵, Николаев Е. Н.⁶, Ларина И. М.¹

¹ ФГБУН «Государственный научный центр РФ – Институт медико-биологических проблем РАН», Москва

² ГБОУ ВПО «Московский физико-технический институт» (государственный университет), Долгопрудный, Московская область

³ ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

⁴ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава РФ, Москва

⁵ «Многофункциональный медицинский центр инновационных технологий им. Святослава Федорова», Москва

⁶ ФГБУН «Институт энергетических проблем химической физики им. В. Л. Тальрозе» РАН, Москва

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕОМА МОЧИ У ПАЦИЕНТОВ С ПОСТИНФАРКТНЫМ КАРДИОСКЛЕРОЗОМ И АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ ДЛЯ ОЦЕНКИ ДИСФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ

Ключевые слова: ишемическая болезнь сердца, постинфарктный кардиосклероз, дисфункция эндотелия, протеом мочи, масс-спектрометрия.

Ссылка для цитирования: Пастушкова Л. Х., Каширина Д. Н., Доброхотов И. В., Кононихин А. С., Тийс Е. С., Иванисенко В. А., Веселова О. М., Выборов О. Н., Носовский А. М., Масенко В. П., Гончаров И. Н., Николаев Е. Н., Ларина И. М. Исследование протеома мочи у пациентов с постинфарктным кардиосклерозом и артериальной гипертензией для оценки дисфункции эндотелия. Кардиология. 2017;57(11):49–58.

РЕЗЮМЕ

Протеомный профиль мочи 18 здоровых лиц сопоставлялся с данными протеома мочи 18 больных ишемической болезнью сердца (ИБС) в сочетании с гипертонической болезнью. Хромато-масс-спектрометрический анализ второй фракции утренней мочи проводили на базе нанопоточного высокоэффективного жидкостного хроматографа (Agilent 1100) и гибридного масс-спектрометра (LTQ-FT Ultra). В результате анализа выявлено 23 белка, экспрессирующихся в эндотелии, согласно информации, содержащейся в базе данных Vgее, и 49 белков, демонстрирующих прямую функциональную связь с процессами в эндотелии при реконструкции ассоциативных сетей программой ANDSystem. Сравнение протеома мочи здоровых и больных постинфарктным кардиосклерозом, даже в отношении лишь белков эндотелия, позволило выявить специфические белки для пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями (ССЗ). Так, белки витронектин, синдекан-4, гликопротеин, богатый гистидином, эндотелиальный рецептор протеина С, колониестимулирующий фактор, катепсин D и секретогранин-1 могут рассматриваться как потенциальные маркеры развития ССЗ. Дальнейшие исследования в данном направлении должны касаться клинической и экспериментальной верификации высказанных гипотез.

Pastushkova L. Kh.¹, Kashirina D. N.¹, DobrokhotoV I. V.¹, Kononikhin A. S.^{1,2}, Tiys E. S.³, Ivanisenko V. A.³, Veselova O. M.⁴, Vyborov O. N.⁴, Nosovskiy A. M.¹, Masenko V. P.⁴, Goncharov I. N.⁵, Nikolaev E. N.², Larina I. M.¹

¹ Federal State Budget Institution SSC RF – Institute for Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Moscow Region, Russia

³ Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia

⁴ National Medical Research Center of Cardiology, Moscow, Russia

⁵ Multifunctional Medical Center of innovative technologies named after Svyatoslav Fyodorov, Moscow, Russia

⁶ Institute of Energy Problems of Chemical Physics named after V. L. Tal'roze, RAS, Moscow, Russia

ANALYSIS OF URINE PROTEOME IN PATIENTS WITH POSTINFARCTION CARDIOSCLEROSIS COMBINED WITH HYPERTENSIVE DISEASE FOR ASSESSING ENDOTHELIAL DYSFUNCTION

Keywords: coronary heart disease; hypertension; myocardial fibrosis; endothelial dysfunction; urine proteome; mass-spectrometry.

For citation: Pastushkova L. Kh., Kashirina D. N., DobrokhotoV I. V., Kononikhin A. S., Tiys E. S., Ivanisenko V. A., Veselova O. M., Vyborov O. N., Nosovskiy A. M., Masenko V. P., Goncharov I. N., Nikolaev E. N., Larina I. M. Analysis of Urine Proteome in Patients With Postinfarction Cardiosclerosis Combined With Hypertensive Disease for Assessing Endothelial Dysfunction. Kardiologiia. 2017;57(11):49–58.

SUMMARY

In our study urine protein composition of 18 healthy volunteers was compared with that of 18 patients with ischemic heart disease and concomitant hypertension. Liquid chromatography-mass-spectrometry (LC-MS) analysis of the second fraction of morning urine was carried out using nano-line high performance liquid chromatograph and hybrid mass spectrometer. The analysis revealed 23 proteins expressed in the endothelium, according to the information contained in the database Bgee, and 49 proteins, with direct functional link with the processes in the endothelium in the reconstruction of associative networks using ANDSystem program. Comparison of urine proteome of healthy people and patients with postinfarction atherosclerosis revealed proteins specific for patients with cardiovascular disease. Thus, proteins vitronectin, syndecan-4, a histidine rich glycoprotein, endothelial protein C receptor, colony stimulating factor, cathepsin D and sekretogranin-1 may be considered as potential markers for cardiovascular diseases. Further research in this area should be conducted for clinical and experimental verification of these hypotheses.

Широкая распространенность, высокая частота инвалидизации и смертности трудоспособного населения от сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), в частности ишемической болезни сердца (ИБС), во всех экономически развитых странах объясняет то исключительное внимание, которое уделяется изучению ее этиологии и патогенеза [1]. В России на долю ССЗ приходится более 55% от общего числа заболеваний, ИБС занимает основное место (47%) [2].

Морфологической основой ИБС, а также мозгового инсульта является атеросклероз [3], в качестве одного из основных звеньев патогенеза которого признается дисфункция эндотелия (ДЭ) [4]. Все больше фактов говорит в пользу того, что в патогенезе атеросклероза не последнюю роль также играют реакции, которые принято относить к воспалительным. Степень выраженности ДЭ коррелирует с наличием атерогенных факторов риска, таких как артериальная гипертензия (АГ), курение, сахарный диабет, возраст, ожирение, дислипидемии различного генеза, и может служить специфическим «барометром» риска развития ССЗ [5]. ИБС также является причиной развития хронической сердечной недостаточности (СН), а после перенесенного инфаркта миокарда (ИМ) формируется постинфарктный кардиосклероз (ПИК), при котором наблюдаются клинические и электрокардиографические признаки очагового фиброза миокарда (устойчивые нарушения ритма, проводимости, наличие признаков рубцовых изменений миокарда на электрокардиограмме) [6].

Эндотелий представляет собой однослойный пласт плоских клеток мезенхимного происхождения, выстилающий внутреннюю поверхность кровеносных и лимфатических сосудов, полостей сердца. Регуляция эндотелием сократительной активности подлежащих гладких мышечных клеток осуществляется за счет выделения вазоактивных веществ с дилататорными (например, оксида азота – NO) и констрикторными (например, эндотелина-1) функциями [7]. В норме поддерживается баланс сосудосуживающих и сосудорасширяющих влияний. Продукция NO и эндотелина-1 зависит от стимуляции эндотелия биологически активными веществами разной природы [8]. В таких кровеносных сосудах, как перифе-

рические вены и крупные мозговые артерии, эндотелий в норме предрасположен к высвобождению сосудосуживающих веществ (супероксид анион, тромбоксан A₂) [9]. Полагают, что дисбаланс вазоконстрикторных и вазодилататорных влияний на сократительный аппарат сосудистой стенки является пусковым механизмом развития АГ [10] и СН [11]. Исследование функции эндотелия у больных ПИК позволяет выяснить степень изменения сосудов, дает возможность выделить пациентов с высоким риском прогрессирования сосудистых заболеваний, развития повторных ИМ и оценить эффективность терапии.

Непрерывно совершенствующиеся методы протеомики на основе масс-спектрометрического анализа, пополнение баз биологической информации новыми данными открывают большие возможности для выявления белков, экспрессия генов которых затрагивается в ходе развития патологического процесса. Все большее распространение приобретает протеомика мочи. Поскольку моча является фильтратом крови, а также содержит белки почечных канальцев и других клеток почек, протеомный анализ мочи используют для исследования не только болезней почек, но и системных заболеваний, что позволяет обнаруживать в ней биомаркеры различных болезней (например, остеоартрита [12], волчаночного нефрита [13]). Данные протеомики могут быть использованы в создании новых методов диагностики, поиска мишеней для лекарственной терапии или уточнять существующие представления о патогенезе патологического процесса.

Целью настоящей работы было выявление признаков ДЭ по данным протеома мочи у больных ПИК.

Материал и методы

В исследование были включены 18 больных ПИК в сочетании с гипертонической болезнью (16 мужчин и 2 женщины) в возрасте от 30 до 67 лет (средний возраст 52 года)

Группу сравнения составили 18 здоровых добровольцев мужского пола в возрасте от 20 до 59 лет (средний возраст 49 лет). Состояние здоровья этой группы лиц подтверждалось врачебной экспертной комиссией ИМБП РАН, согласно международным критериям, принятым агентствами по пилотируемым космическим полетам.

У 18 больных ПИК получена вторая фракция утренней мочи, которая в дальнейшем была подготовлена для масс-спектрометрического анализа, согласно ранее описанному протоколу [14]. В качестве сравнения были использованы результаты анализа протеома мочи группы здоровых добровольцев.

Образцы мочи 18 больных и 18 здоровых добровольцев подвергались пробоподготовке, состоящей из стандартных этапов: восстановления, алкилирования, осаждения белка и протеолиза с использованием трипсина. Полученная полипептидная смесь разделялась при помощи жидкостной хроматографии в трех повторах и затем анализировалась на масс-спектрометре.

Анализ образцов проводили на системе, состоящей из хроматографа Agilent 1100 и гибридного масс-спектрометра LTQ-FT Ultra (Thermo, Бремен, Германия) – масс-спектрометр ионного циклотронного резонанса, совмещенный с линейной квадрупольной ионной ловушкой, использующейся для накопления ионов и измерения спектров столкновительно индуцированной фрагментации ионов. Для хроматографии использовали колонку с обращенной фазой ReproSil-Pur C18 (диаметр частиц 3 мкм, диаметр пор 100 Å, Dr. Maisch GmbH, Аммербух – Энтринген, Германия), изготовленную с использованием капилляра-эмиттера. Масс-спектрометрический анализ фракций пептидов осуществлялся при помощи программы Xcalibur в 2-стадийном режиме автоматического измерения спектров. Список из точных масс пептидов и масс их фрагментов использовали для поиска и идентификации белков по базе данных IPI-human (международные индексы белков – International protein indices) version 3.65 при помощи программы Mascot version 2.0.04.

Статистический анализ был осуществлен с помощью программы Statistica 10.0. Оценка достоверности различий двух групп производилась методом группирования выборок с наименее значимой разницей (метод LSD). Основная часть информации о полученных белках была экстрагирована из баз данных UniProt (<http://www.uniprot.org>) и Vgee (<http://bgee.unil.ch>). Реконструкция ассоциативных сетей осуществлялась с помощью программы для автоматической экстракции данных ANDSystem [15]. Построенные ассоциативные сети включали все белки, обнаруженные в протеоме мочи здоровых добровольцев и пациентов с ССЗ; связь с функциональным состоянием эндотелия устанавлива-

лась через идентификатор *endothel*, которому соответствовало 190 биологических процессов, согласно генным онтологиям, указанных в базе данных GO и содержащихся в базе знаний системы ANDCell. Для поиска связей использовали также идентификаторы *vascul* и *angiogenes*.

Результаты

У здоровых добровольцев комплект белков мочи состоял из 220 протеинов, протеом больных – из 120 белков, суммарный протеом здоровых и больных включал 245 различных белков.

Из базы данных экспрессии Vgee был получен список генов, высоко экспрессируемых в эндотелиальных клетках. Всего база содержит информацию о 19294 генах, которые экспрессируются в эндотелии. Из них были отобраны гены с указанием на их высокий уровень экспрессии (expression high quality), для них были определены белки по базе данных UniProt (2659 белков). Сопоставление списка высокоэкспрессирующихся в эндотелии белков с нашими данными позволило получить список из 23 белков.

Оценка достоверности различий по распространению белков у больных и здоровых выявила статистически значимое различие ($p < 0,05$) для белков PTGDS_HUMAN и SCG1_HUMAN (табл. 1).

С помощью программы для автоматической экстракции данных ANDSystem был проведен поиск эндотелиальных белков путем установления прямых взаимосвязей между различными процессами в эндотелии и белками, обнаруженными в протеоме мочи здоровых и больных людей. Данный подход позволил выявить 13 процессов, связанных с функционированием эндотелия, которые имели прямые связи с 49 белками протеома мочи здоровых и больных людей (табл. 2).

Статистический анализ показал, что для 10 белков (UFO, ROBO4, KLK1, CD44, VTNC, SDC4, HRG, EPCR, CSF1, CATD), функционально связанных с эндотелием, выявляются статистически значимые различия между двумя группами (табл. 3).

Обсуждение

В настоящее время в базе данных Vgee отсутствует информация по специфическим белкам, экспрессируемым в эндотелии человека, поэтому мы использовали

Таблица 1. Белки с высокой экспрессией в эндотелии, демонстрирующие статистически значимые различия при сравнении больных и здоровых лиц

Белок	Группа больных (n=18)		Группа здоровых (n=18)		P
	средняя	стандартное отклонение	средняя	стандартное отклонение	
PTGDS_HUMAN	0,00	0,00	0,83	0,38	0,00001
SCG1_HUMAN	0,89	0,32	0,28	0,46	0,00006

Таблица 2. Связь между процессами в эндотелии и белками протеома здоровых и больных

Процесс	Белок				
Васкулогенез	CADH1	PTPRJ	PGBM		
Ремоделирование сосудов	RNAS2	UROK	OSTP		
Регуляция ангиогенеза	OSTP				
Положительная регуляция ангиогенеза	HPT				
Негативная регуляция ангиогенеза	VTDB	TRFM	HRG**		
Марк-путь эндотелия	EPCR**				
Пролиферация эндотелиальных клеток	UROK	S10A9	S10A8	KLK3	CSPG4
	CD44*	ANGL2	EPCR**		
Морфогенез эндотелиальных клеток	COIA1				
Миграция эндотелиальных клеток	VTNC**	UROK	UFO*	TRFE	SDC4**
	RNAS2	OSTP	MMRN1	HRG**	CD44*
Дифференциация эндотелиальных клеток	CD44*				
Развитие эндотелиальных клеток	RNAS2				
Активация эндотелиальных клеток	VCAM1	UFO*	THY1	CD14	
Ангиогенез	VTNC**	UROK	TRFM	THY1	THRB
	S10A8	ROBO4*	RNAS2	RNAS1	PTPRJ
	MMRN1	KLK3	KLK1*	IBP7	HRG**
	CSPG4	CSF1**	COIA1	COFA1	CO1A1
	TETN	SULF2	SLUR1	SDC2	S10A9
	PGBM	OSTP	NGAL	NEP	MUC1
	HPT	FBLN3	ENOA	EGF	DPP4
	CD44*	CATD**	CADH1	ANGL2	AMPN
	AMPE				

* – распространенность статистически значимо выше у здоровых добровольцев; ** – распространенность статистически значимо выше у больных.

Таблица 3. Белки, функционально связанные с эндотелием, демонстрирующие статистически значимые различия при сравнении групп больных и здоровых лиц

Белок	Группа больных (n=18)		Группа здоровых (n=18)		p
	средняя	стандартное отклонение	средняя	стандартное отклонение	
VTNC_HUMAN	0,72	0,46	0,11	0,32	0,0001
SDC4_HUMAN	0,94	0,24	0,61	0,50	0,015
HRG_HUMAN	0,22	0,43	0,00	0,00	0,03
EPCR_HUMAN	0,94	0,24	0,61	0,50	0,015
CSF1_HUMAN	0,83	0,38	0,22	0,43	0,0001
CATD_HUMAN	0,50	0,51	0,11	0,32	0,01
UFO_HUMAN	0,00	0,00	1,00	0,41	0,0001
ROBO4_HUMAN	0,00	0,00	0,83	0,38	0,0001
KLK1_HUMAN	0,00	0,00	0,72	0,57	0,0001
CD44_HUMAN	0,00	0,00	0,61	0,50	0,0001

лишь данные по высокоэкспрессируемым белкам, что не всегда отражает связь данных белков со спецификой функционирования эндотелиальной ткани.

Оценка достоверности различий по распространенности белков, экспрессируемых в эндотелии, у больных и здоровых выявила статистически значимое различие для PTGDS_HUMAN и SCG1_HUMAN, причем первый белок встречался с высокой частотой у здоровых добровольцев, в то время как у больных с ПИК не выявлялся. PTGDS_HUMAN, или простагландин-H2 D-изомераза, является представителем семейства липокалинов, уча-

ствующих в метаболизме арахидоновой кислоты, и играет ключевую роль в регуляции сна, болевых ощущений, при подавлении приступов эпилепсии [16]. Липокалины вовлечены в такие функции, как ангиогенез, сокращение гладкой мускулатуры, а благодаря участию в метаболизме арахидоновой кислоты могут играть роль в развитии ревматоидного артрита [17]. Считают, что определение белка простагландин-H2 D-изомеразы может быть применено в качестве одного из диагностических критериев некоторых неврологических расстройств, дисфункции сперматогенеза и почечных заболеваний [18].

Распространенность второго белка (SCG1_HUMAN) статистически значимо выше у больных. SCG1_HUMAN, или секретогранин-1, принадлежит к семейству белков, которые взаимодействуют и совместно секретируются с различными гормонами [19]. Секретогранины широко распространены в эндокринной системе, выполняют различные функции, такие как поддержание уровня внутриклеточного кальция и регуляция клеточной сигнализации, выступая в качестве предшественников биологически активных пептидов и вызывая биогенез секреторных гранул [20].

Полагают, что на уровень секретогранина-1 в плазме не влияют снижение почечной функции или фармакологическая блокада протонного насоса [21], в отличие от секретогранина-2, который является биомаркером СН [22]. Поскольку у пожилых пациентов с СН часто наблюдается ухудшение функции почек и/или они принимают подобные лекарственные препараты, информативность секретогранина-1 как биомаркера явно превосходит таковую секретогранина-2.

До сих пор мало известно о роли секретогранина-1 в патологии сердечно-сосудистой системы. Известно, что он выступает регулятором сигнальных путей кардиомиоцитов, и таким образом участвует в развитии гипертрофии и СН [23]. Этот белок регулирует передачу сигнала в кардиомиоцитах через инозитол-1,4,5-трифосфат/кальций-зависимый путь, активность ядерного фактора NF-κB и базальную и ангиотензин-II-стимулируемую продукцию и секрецию натрийуретического пептида. Показано, что уровень секретогранина-1 повышается в желудочках сердца мышей после введения им ангиотензина II. На основании этих данных авторы работы предполагают, что секретогранин-1 играет значительную роль в гипертрофии сердца и развитии СН.

Авторы работы [24] показали, что у мышей после ИМ увеличилась экспрессия секретогранина-1 в левом желудочке, а также уровень данного белка как в кардиомиоцитах, так и в плазме крови. Отмечено, что в плазме секретогранин-1 повышен у пациентов с СН и коррелирует с тяжестью заболевания. Эти данные позволяют предположить, что секретогранин-1 является многообещающим маркером СН. Наши исследования подтверждают выводы авторов работы [24] и позволяют предложить секретогранин-1 в качестве маркера ССЗ.

Из 10 белков, функционально связанных с эндотелием, по результатам анализа в ANDSystem 6 белков (VTNC_HUMAN, SDC4_HUMAN, HRG_HUMAN, EPCR_HUMAN, CSF1_HUMAN, CATD_HUMAN) статистически значимо чаще встречаются в протеоме мочи больных ПИК. Ниже приведены описания этих белков, выполненные по открытым базам данных.

VTNC_HUMAN, или витронектин (ВН), представляет собой многофункциональный гликопротеин, который экспрессируется в плазме и включается в состав внеклеточного матрикса различных тканей. Гликопротеины внеклеточного матрикса участвуют в ангиогенезе и во многих физиологических и патологических процессах, в том числе ишемии, воспалении, росте опухоли и метастазировании [25, 26]. Большая часть плазменного ВН является неактивным мономером. Во внеклеточном матриксе ВН содержится в виде активной мультимерной формы, которая связывается с различными лигандами, например, интегринами [27], при взаимодействии с поверхностью клеток ВН регулирует клеточную адгезию и клеточную подвижность. Уровень ВН увеличен у пациентов с различными ССЗ, такими как ИМ и атеросклероз, а также представлен в стенках артерий и неоинтима в различных животных моделях повреждения артерий [28]. Он обнаруживается в протеоме тромбоцитов у больных с ишемическим инсультом [29], играет важную роль в регуляции патологического ангиогенеза [30]. ВН стимулирует развитие кровеносных сосудов, активируя фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) путем прямого связывания. Эти данные свидетельствуют, что ВН играет важную роль в передаче сигналов VEGF, и это позволяет предложить его как мишень для новых стратегий терапии ССЗ, связанных с развитием ишемии [31].

SDC4_HUMAN, или синдекан-4, – трансмембранный белок, гепарансульфатпротеогликан, входит в семейство синдеканов. Синдеканы опосредуют связывание клеток, передачу сигнала в клетке и организацию цитоскелета. Синдекан-4 несет гепарансульфатные цепи, которые обеспечивают связь цитоскелета с внеклеточным матриксом. Данный белок экспрессирован на эпителиальных клетках и фибробластах, способствует миграции эндотелиальных клеток в ответ на связывание лиганда путем активации белка Rac1 [32]. Может функционировать либо в качестве ко-рецепторов с другими рецепторами на клеточной поверхности, либо в качестве независимых рецепторов адгезии, которые опосредуют клеточную сигнализацию. Синдекан-4 участвует также в регуляции клеточной пролиферации и ангиогенезе [33], в воспалительных процессах и заживлении ран в качестве молекул иммунной защиты [34]. Он взаимодействует с многочисленными гепаринсвязывающими факторами роста, такими как факторы роста фибробластов, тромбоцитов и VEGF [35], способствует организации их распределения во внеклеточном пространстве.

Результаты работы Н. Wu и соавт. показали, что воспалительный ответ и окислительное повреждение значительно активированы у больных с фибрилляцией предсердий (ФП) и клапанными пороками сердца, при этом уровни синдекана-4 значительно снижены у пациентов

с ФП. Кроме того, уровень отщепленного эктодомена синдекана-4 коррелировал с уровнем окислительных и воспалительных маркеров [36].

Фиброз сердца занимает центральное место среди ССЗ. Экспрессия синдеканов повышается в ответ на провоспалительные стимулы при фиброзе. Так, у мышей, лишенных синдекана-1 и -4, выявляются снижение активности профиброзной сигнализации и повышенная частота повреждения сердца после инфаркта [37]. В то время как короткий цитоплазматический хвост синдеканов регулирует внутриклеточную сигнализацию, их внеклеточная часть связывает множество молекул внеклеточного матрикса, участвующих в фиброзе, таких как коллагены, факторы роста, цитокины и иммунные белки адгезии клеток. Полноразмерные синдеканы индуцируют профиброзную сигнализацию, увеличивая экспрессию коллагенов, факторов дифференциации миофибробластов, ферментов внеклеточного матрикса, факторов роста и иммунных молекул адгезии клеток, таким образом ускоряя заживление сердца и предотвращая разрывы. При действии провоспалительных молекул эктодомена синдекана ферментативно высвобождаются из клеток сердца, влияя на экспрессию молекул внеклеточного матрикса, способствуя его деградации и повреждению сердца после ИМ. Отмечено, что уровни в крови эктодоменов синдекана-1 и -4 связаны со смертностью и ремоделированием сердца у больных с СН. Эктодомены синдекана могут представлять собой будущее прогностическое средство для заболеваний сердца с фиброзом [37].

HRG_HUMAN, или богатый гистидином гликопротеин (HRG), представляет собой гепарансульфатсвязывающий гликопротеин [38]. HRG образует мультипротеиновые комплексы, которые регулируют свертываемость крови, клиренс иммунных комплексов, пролиферацию и адгезию клеток, ангиогенез и другие биологические процессы [39]. Инактивация гена данного белка у мышей совместима с эмбриональным развитием и рождением, но приводит к повышенному образованию тромбов [40].

Показано, что высокие уровни HRG в плазме крови связаны с клиническими проявлениями ССЗ, в том числе с признаками окклюзии кровеносных сосудов и тромбозом [41]. Первичная структура HRG содержит Zn-связывающий домен, при активации цинком увеличивается сродство HRG к антикоагулянтам гепарину и гепарансульфату [42]. Таким образом, HRG нейтрализует действие антикоагулянтов, что приводит к протромботическому эффекту [43, 44].

EPCR_HUMAN, или эндотелиальный рецептор протеина С (EPCR), экспрессируется на эндотелиальных клетках артерий, капилляров сердца, легких и кожи. Он играет важную роль в активации протеина С и обладает схожим сродством как к протеину С, так и к активи-

рованному протеину С (аРС) [45]. Кроме того, EPCR усиливает активацию протеина С под действием комплекса тромбин – тромбомодулин и участвует в передаче сигнала, опосредованного протеином С, контролируя свертывание крови и усиливая антикоагулянтный эффект активированного протеина С. Активированный протеин С через EPCR и PAR1 оказывает противовоспалительное действие на эндотелий, защищая клетки от апоптоза и стабилизируя эндотелиальный барьер [46]. Значение системы протеина С лучше всего демонстрируется протромботическими и воспалительными осложнениями, обусловленными дефицитом данного белка или нарушением его функций [47]. В отличие от мембранной формы EPCR, активирующей протеин С, растворимая форма EPCR блокирует активацию протеина С и его антикоагуляционное действие, выступая конкурентом за субстрат для рецептора EPCR, а также нейтрализует противовоспалительное действие аРС на эндотелий [48].

CSF1_HUMAN, или колониестимулирующий фактор (CSF1), играет существенную роль в регуляции выживания, дифференцировки, пролиферации и миграции предшественников гемопоэтических клеток, особенно мононуклеарных фагоцитов, таких как моноциты и макрофаги [49]. CSF1 участвует в регуляции пролиферации и дифференцировки остеокластов, регуляции резорбции кости; он необходим для нормального развития костей. Колониестимулирующий фактор стимулирует высвобождение провоспалительных хемокинов и играет важную роль в процессах врожденного иммунитета и в системных поражениях, связанных с провоспалительными реакциями, таких как артриты, ожирение и атеросклероз [50]. CSF1 играет важную роль в патогенезе атеросклероза. Доказательством этого служат данные о том, что под влиянием окисленных липидов эндотелий начинает выделять CSF1 [51]. У мышей, «нокаутированных» по гену, кодирующему CSF1, практически не удается вызвать атеросклероз [52]. Однако роль CSF1 в развитии атеросклероза не до конца изучена, в частности, неясно, каким образом CSF1 участвует в формировании начального повреждения эндотелия. Существует гипотеза, что поскольку CSF1 регулирует дифференциацию, пролиферацию и миграцию моноцитов, то уменьшение его концентрации тормозит эти процессы и, таким образом, моноциты не попадают в сосудистую стенку [53].

Известно, что экспрессия CSF1 на эндотелиоцитах резко возрастает под воздействием окисленных липопротеинов низкой плотности и провоспалительных молекул (например, под воздействием бактериальных липополисахаридов). CSF1 в большом количестве продуцируется атеросклеротически измененным эндотелием человека, и в очень малом – интактным [54]. Y. Iso

и соавт. подтвердили связь гена макрофагального колониестимулирующего фактора с атерогенезом, показав, что экспрессия гена ассоциирована с процессом превращения макрофагов в пенные клетки в медиальном слое сосудов. Поскольку дефицит CSF1 значительно снижает вероятность развития атеросклероза, изучается возможность создания препаратов, блокирующих его выработку, которые могли бы использоваться для лечения атеросклероза [55]. В другой работе показано, что CSF1 стимулирует рост опухоли за счет увеличения числа эндотелиальных клеток-предшественников и активации ангиогенеза, эти эффекты в значительной степени основаны на способности CSF1 индуцировать VEGF в скелетных мышцах [56].

CATD_HUMAN, или катепсин D (CATD) – это кислая аспаргатовая протеаза, многофункциональный белок, работающий внутри и вне клетки. В лизосомах CATD играет важную роль в расщеплении белков в кислой среде, а также в образовании биологически активных белков, регулирующих рост клеток и тканевой гомеостаз. После того как произошла транслокация в цитозоль, CATD становится протеолитически неактивным, но дает ранний апоптотический сигнал, что влечет за собой активацию каспазы-3 [57] и белков семейства Bcl-2, участников апоптоза [58]. Кроме того, показано, что транслокация катепсина D в цитозоль культуры клеток HUVEC (эндотелиальные клетки пупочной вены человека), возникающая при повышении проницаемости лизосомальной мембраны, вносит вклад в дисфункцию митохондрий, которая в итоге приводит к апоптозу [59].

Вне клетки CATD становится протеолитически активным только в кислой среде, генерируемой при патологических процессах [60]. Протеолитически неактивный CATD способен связываться с ингибитором специфического класса протеаз и таким образом увеличивать активность протеаз [61], которые контролируют ангиогенез с помощью высвобождаемых из матрикса ангиогенных факторов. Протеолитически неактивные формы CATD, по-видимому, обладают свойствами факторов роста, скорее всего, взаимодействуя с неустановленным пока поверхностным рецептором эндотелиальных клеток [62].

Катепсин D участвует в модификации липопротеинов, в том числе липопротеинов низкой плотности; это означает, что катепсин D может быть вовлечен в процессы атеросклероза [63].

Все 6 описанных белков тем или иным путем вносят вклад в развитие ССЗ. Одни белки – HRG_HUMAN, EPCR_HUMAN дают протромботический эффект, другие – VTNC_HUMAN, CSF1_HUMAN, CATD_HUMAN, а также EPCR_HUMAN участвуют в развитии атеросклероза и других сосудистых осложнений. То, что эти белки выявляются в моче больных ПИК досто-

верно чаще, чем у здоровых, позволяет предположить, что они являются потенциальными биомаркерами ССЗ.

В то же время показано, что 4 белка – UFO_HUMAN, ROBO4_HUMAN, KLK1_HUMAN, CD44_HUMAN – статистически значимо чаще встречаются в протеоме мочи здоровых лиц. Ниже представлено описание данных белков.

UFO_HUMAN, или тирозинкиназный рецептор (UFO), экспрессируется во многих тканях организма человека, и вместе с Tug-3 и Mer составляет семейство TAM тирозинкиназных рецепторов. UFO преобразовывает сигналы от внеклеточного матрикса в цитоплазму путем связывания фактора роста Gas6, таким образом, регулируя многие физиологические процессы, в том числе выживаемость, пролиферацию, миграцию и дифференцировку клеток. Кроме того, данный рецептор принимает участие в регуляции ангиогенеза [64]. Показано, что сигнализация Gas6/UFO играет важную роль в выживании эндотелиальных клеток при ацидозе [65].

KLK1_HUMAN, или калликреин-1 (KLK1), является участником ключевой протеолитической системы, включающей калликреины, кининогены, рецепторы кининов, кининазы, регулируя широкий спектр физиологических функций организма [66]. Калликреин-1 синтезируется во многих органах, включая почки и артерии, где при его участии образуются вазодилататоры брадикинин и каллидин. Экспериментальные и клинические исследования показали обратную корреляцию между содержанием в моче KLK1 и параметрами артериального давления. В улучшении функций сердца, почек и нервной системы, как полагают, главным «игроком» калликреин-кининовой системы, который участвует в этих эффектах, является именно KLK1 [67]. Существует взаимное влияние между активацией системы комплемента и кининовым каскадом, что ведет к образованию продуктов активации, которые влияют на функции эндотелия сосудов [68].

CD44_HUMAN – это антигенный рецептор гиалуроновой кислоты (CD44). Известно, что CD44 участвует в межклеточных взаимодействиях, а также во взаимодействиях клеток с межклеточным матриксом [69]. Белок отвечает за пролиферацию и дифференциацию эндотелиальных клеток [70], обладает высоким сродством к лигандам, таким как остеопонтин, и коллагенам различного типа.

ROBO4_HUMAN, или белок ROBO4, член семейства белков Robo, класса высококонсервативных трансмембранных белков, вносящих вклад в развитие нервной системы; они играют решающую роль в формировании синапсов, подавляя миграцию нейронов [71]. ROBO4 преимущественно экспрессируется в локусах неоангиогенеза [72]. Растворимый рецептор ROBO4 ингибирует ангиогенез и миграцию эндотелиальных клеток.

Заключение

Сравнение протеома мочи здоровых и больных постинфарктным кардиосклерозом позволяет выявить специфические белки для пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Белки витронектин, синдекан-4, гликопротеин, богатый гистицином, эндотелиальный рецептор протеина С, колониестимулирующий фактор, катепсин D и секретогранин-1 могут рассматриваться как потенциальные маркеры развития сердечно-сосудистых заболеваний. Дальнейшие исследования в данном направлении должны касаться клинической и экспериментальной верификации высказанных гипотез. В целом использование в кли-

нической практике у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями протеомного метода исследования мочи позволяет расширить представления о развитии патологического процесса, что может послужить основой разработки индивидуальных схем лечения пациентов данной категории.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 15-04-02463 А. Исследование белков и пептидов с использованием масс-спектрометрии высокого разрешения выполнено в рамках гранта РНФ 14-24-00114 П.

Сведения об авторах:

ФГБУН «Государственный научный центр РФ – Институт медико-биологических проблем РАН», Москва

Лаборатория протеомики

Пастушкова Л. Х. – д.биол.н., вед.н.с. лаборатории.

Каширина Д. Н. – и.о.н.с. лаборатории.

Доброхотов И. В. – к.биол.н., н.с. лаборатории.

Носовский А. М. – д.биол.н., вед.н.с. лаборатории.

Ларина И. М. – д.м.н., проф., руков. лаборатории.

ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики» СО РАН, Новосибирск

Тийс Е. С. – мл.н.с. лаборатории компьютерной протеомики,

Иванисенко В. А. – зав. лаборатории компьютерной протеомики.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава РФ, Москва

Веселова О. М. – к.биол.н., ст. н.с., и.о.зав. лаборатории метаболизма сердца.

Выборов О. Н. – к.м.н., н.с. отдела легочной гипертензии и заболеваний сердца.

Масенко В. П. – д.м.н., проф., руков. отдела нейрогуморальных и иммунологических исследований.

«Многофункциональный медицинский центр инновационных технологий им. Святослава Федорова», Москва

Гончаров И. Н. – терапевт.

ФГБУН «Институт энергетических проблем химической физики им. В. А. Тальрозе» РАН, Москва

Николаев Е. Н. – д.физ.-мат. н., проф., зав. лаборатории ионной и молекулярной физики.

Кононихин А. С. – к.физ.-мат. н., вед.н.с. лаборатории протеомики ФНБНУ Государственный научный центр РФ «Институт медико-биологических проблем» РАН, Москва; вед.н.с. лаборатории ионной и молекулярной физики ГБАОУ ВПО «Московский физико-технический институт» (государственный университет), Долгопрудный, Московская область.

E-mail: daryakudryavtseva@mail.ru

Information about the author:

Federal State Budget Institution SSC RF – Institute for Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Daria N. Kashirina – research fellow.

E-mail: daryakudryavtseva@mail.ru

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. WHO Newsletter. January 2015;317. Russian (Информационный бюллетень ВОЗ, январь 2015;317).
2. Oganov R. G. Achievements and failures in prevention of cardiovascular diseases. Cardiovascular therapy and prevention 2014;1:4–7. Russian (Оганов Р. Г. Достижения и неудачи в профилактике сердечно-сосудистых заболеваний. Кардиоваскулярная терапия и профилактика 2014;1:4–7).
3. Severgina L. O. Morphogenesis of unstable atherosclerotic plaque and its role in development of acute coronary syndrome. Archives of Pathology 2005;67 (3):51–54. Russian (Севергина Л. О. Морфогенез нестабильной атеросклеротической бляшки и ее роль в развитии острого коронарного синдрома. Архив патологии 2005;67 (3):51–54).
4. Davignon J., Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. Circulation 2004;109:27–32.

5. Heitzer T., Vita J.A., Keaney J.F. Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk. *Circulation* 2002;106:640–642. DOI:10.1161/01.CIR.0000028581.07992.56.
6. Baker B.J., Franciosa J.A. Effect of the left ventricle on the right ventricle. *Cardiovasc Clin* 1987;17 (2):145–155.
7. Gladwin M.T., Schechter A.N. Nitrite Versus S-Nitroso-Hemoglobin. *Circulation Research* 2004;94:851–855. DOI: 10.1161/01.RES.0000126697.64381.3.
8. Petrishev N.N., Vlasov T.D. Physiology and Pathophysiology of the endothelium/Endothelial dysfunction. Reasons, mechanisms. Pharmacological correction. St. Petersburg: St. Petersburg State Medical University 2003:4–38. Russian (Петрищев Н.Н., Власов Т.Д. Физиология и патофизиология эндотелия/Дисфункция эндотелия. Причины, механизмы. Фармакологическая коррекция. Ст-Петербург: СПбГМУ 2003:4–38).
9. Gamboa A., Abraham R., Diedrich A. et al. Role of Adenosine and Nitric Oxide on the Mechanisms of Action of Dipyridamole. *Stroke* 2005;36:2170–2175. DOI: 10.1161/01.STR.0000179044.37760.9d.
10. Zoghi M., Nalbantgil I. Hypertension and endothelial dysfunction. *Anadolu Kardiyol Derg* 2002;2 (2):142–147.
11. Haider D.G., Bucek R.A., Giurgea A.G. et al. PGE1 analog alprostadil induces VEGF and eNOS expression in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289 (5):H2066–2072. DOI:10.1152/ajpheart.00147.2005.
12. Hsueh M.F., Önerfjord P., Kraus V.B. Biomarkers and proteomic analysis of osteoarthritis. *Matrix Biol* 2014;39:56–66. DOI:10.1016/j.matbio.2014.08.012.
13. Brúgós B., Zeher M. Biomarkers in lupus nephritis. *Orv Hetil* 2010;151 (29):1171–1176. DOI:10.1556/OH.2010.28928.
14. Valeeva O.A., Pastushkova L.H., Paharukova N.A. et al. Variability of healthy human urine proteome in 105-day isolation experiment. *Human Physiology* 2011;37 (3):98–102. Russian (Валеева О.А., Пастушкова Л.Х., Пахарукова Н.А. и др. Вариабельность протеома мочи здорового человека в эксперименте с 105-суточной изоляцией в гермообъекте. Физиология человека 2011;37 (3):98–102).
15. Ivanisenko V.A., Saik O.V., Ivanisenko N.V. et al. ANDSystem: an Associative Network Discovery System for automated literature mining in the field of biology. *BMC Systems Biology* 2015;9 (2):S2. DOI:10.1186/1752-0509-9-S2-S2.
16. Kaushik M.K., Aritake K., Kamauchi S. et al. Prostaglandin D (2) is crucial for seizure suppression and postictal sleep. *Exp Neurol* 2014;253:82–90. DOI:10.1016/j.expneurol.2013.12.002. Epub 2013 Dec 10.
17. Singh S., Vennila J.J., Snijesh V.P. et al. Implying Analytic Measures for Unravelling Rheumatoid Arthritis Significant Proteins Through Drug-Target Interaction. *Interdiscip Sci* 2016;8 (2):122–31. DOI: 10.1007/s12539-015-0108-9.
18. Zhou Y., Sha W.N., Li Y. et al. Structure-function analysis of human l-prostaglandin D synthase bound With fatty acid molecules. *FASEB J* 2010;24:4668–4677. DOI:10.1096/fj.10-164863.
19. Laslop A., Mahata S.K. Neuropeptides and chromogranins: session overview. *Ann N Y Acad Sci* 2002;971:294–299.
20. Winkler H., Fischer-Colbrie R. The chromogranins A and B: the first 25 years and future perspectives. *Neuroscience* 1992;49:497–528.
21. Stridsberg M., Eriksson B., Fellstrom B. et al. Measurements of chromogranin B can serve as a complement to chromogranin A. *Regul Pept* 2007;139:80–83. DOI:10.1016/j.regpep.2006.10.008.
22. Goetze J.P., Alehagen U., Flyvbjerg A., Rehfeld J.F. Chromogranin A as a biomarker in cardiovascular disease. *Biomark Med* 2014;8 (1):133–140. DOI:10.2217/bmm.13.102. Review.
23. Heidrich F.M., Zhang K., Estrada M. et al. Chromogranin B regulates calcium signaling, nuclear factor kappaB activity, and brain natriuretic peptide production in cardiomyocytes. *Circ Res* 2008;102:1230–1238. DOI:10.1161/CIRCRESAHA.107.166033.
24. Røsjø H., Husberg C., Dahl M.B. et al. Chromogranin B in heart failure: a putative cardiac biomarker expressed in the failing myocardium. *Circ Heart Fail* 2010;3:503–511. DOI:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.109.867747.
25. DeClerck Y. A., Mercurio A.M., Stack M.S. et al. Proteases, extracellular matrix, and cancer: a workshop of the path B study section. *Am J Pathol* 2004;164:1131–1139. DOI:10.1016/S0002-9440 (10) 63200-2.
26. Davis G.E., Senger D.R. Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circ Res* 2005;97:1093–1107. DOI:10.1161/01.RES.0000191547.64391.e3.
27. Silva R., D'Amico G., Hodiola-Dilke K.M., Reynolds L.E. Integrins: the keys to unlocking angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:1703–1713. DOI:10.1161/ATVBAHA.108.172015.
28. Ekmekçi O.B., Ekmekçi H. Vitronectin in atherosclerotic disease. *Clin Chim Acta* 2006;368:77–83.
29. Cevik O., Baykal A.T., Sener A. Platelets Proteomic Profiles of Acute Ischemic Stroke Patients. *PLoS One* 2016;11 (6):e0158287. DOI:10.1371/journal.pone.0158287.
30. Li R., Ren M., Chen N. et al. Vitronectin increases vascular permeability by promoting VE-cadherin internalization at cell junctions. *PLoS One* 2012;7 (5):e37195. DOI:10.1371/journal.pone.0037195.
31. Li R., Luo M., Ren M. et al. Vitronectin regulation of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis. *J Vasc Res* 2014;51 (2):110–117. DOI:10.1159/000360085.
32. Tkachenko E., Elfenbein A., Tirziu D., Simons M. Syndecan-4 clustering induces cell migration in a PDZ-dependent manner. *Circ Res* 2006;98 (11):1398–1404. DOI:10.1161/01.RES.0000225283.71490.5a.
33. Cheng B., Montmasson M., Terradot L., Rousselle P. Syndecans as Cell Surface Receptors in Cancer Biology. A Focus on their Interaction with PDZ Domain Proteins. *Front Pharmacol* 2016;7:10. DOI:10.3389/fphar.2016.00010.
34. Morgan M.R., Hamidi H., Bass M.D. et al. Syndecan-4 phosphorylation is a control point for integrin recycling. *Dev Cell* 2013;24 (5):472–485. DOI:10.1016/j.devcel.2013.01.027.
35. Tkachenko E., Rhodes J.M., Simons M. Syndecans: new kids on the signaling block. *Circ Res* 2005;96 (5):488–500. DOI:10.1161/01.RES.0000159708.71142.e8.
36. Wu H., Zhou Q., Xie J. et al. Syndecan-4 shedding is involved in the oxidative stress and inflammatory responses in left atrial tissue with valvular atrial fibrillation. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8 (6):6387–6396.
37. Lunde I.G., Herum K.M., Carlson C.C., Christensen G. Syndecans in heart fibrosis. *Cell Tissue Res* 2016;365 (3):539–552. DOI:10.1007/s00441-016-2454-2.
38. Lee C., Bongcam-Rudloff E., Söllner C. et al. Structure and function of type 3 cystatins; fetuins, kininogen and histidine-rich glycoprotein. *Frontiers in Bioscience* 2009;14:2911–2922.
39. Jones A.L., Hulett M.D., Parish C.R. Histidine-rich glycoprotein: a novel adaptor protein in plasma that modulates the immune, vascular and coagulation systems. *Immunol Cell Biol* 2005;83:106–118. DOI:10.1111/j.1440-1711.2005.01320.x.
40. Tsuchida-Straeten N., Ensslen S., Schafer C. et al. Enhanced blood coagulation and fibrinolysis in mice lacking histidine-rich glycoprotein (HRG). *J Thromb Haemost* 2005;3:865–872. DOI:10.1111/j.1538-7836.2005.01238.x.
41. Kuhlmann C., Scharrer I., Koch F., Hattenbach L.O. Recurrent retinal vein occlusion in a patient with increased plasma levels of histidine-rich glycoprotein. *Am J Ophthalmol* 2003;135:232–234.
42. Borza D.B., Morgan W.T. Histidine-proline-rich glycoprotein as a plasma pH sensor. Modulation of its interaction with glycosaminoglycans by pH and metals. *J Biol Chem* 1998;273:5493–5499.
43. Mori S., Shinohata R., Renbutsu M. et al. Histidine-rich glycoprotein plus zinc reverses growth inhibition of vascular smooth muscle cells by heparin. *Cell Tissue Res* 2003;312:353–359. DOI:10.1007/s00441-003-0737-x.
44. Jones A.L., Hulett M.D., Parish C.R. Histidine-rich glycoprotein binds to cell-surface heparan sulfate via its N-terminal domain

- following Zn²⁺ chelation. *J Biol Chem* 2004;279:30114–30122. DOI:10.1074/jbc.M401996200.
45. Stearns-Kurosawa D.J., Kurosawa S., Mollica J.S. et al. The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:10212–10216.
 46. Jackson C.J., Xue M. Activated protein C. An anticoagulant that does more than stop clots. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:2692–2697. DOI:10.1016/j.biocel.2007.12.013.
 47. Hizroeva D. H., Mikhailidi I. A., Stuleva N. S. Significance of determination of protein C in obstetric practice. *Obstetrics and gynecology. Practical Medicine* 2014;07 (13). Russian (Хизроева Д. Х., Михайлиди И. А., Стулева Н. С. Значение определения протеина С в акушерской практике. *Акушерство и гинекология. Практическая медицина* 2014;07 (13)).
 48. Shishkin A. N., Lyndina M. L. Endothelial dysfunction, metabolic syndrome and microalbuminuria. *Nephrology* 2009;13 (3):24–32. Russian (Шишкин А. Н., Лындина М. Л. Эндотелиальная дисфункция, метаболический синдром и микроальбуминурия. *Нефрология* 2009;13 (3):24–32).
 49. Nozadze D. N., Rvacheva A. V., Kaznacheeva E. I., Sergienko I. V. Monocytes in the development and destabilization of the atherosclerotic plaque. *Atherosclerosis and dyslipidemia* 2012;3:25–36. Russian (Нозадзе Д. Н., Рвачева А. В., Казначеева Е. И., Сергиенко И. В. Моноциты в развитии и дестабилизации атеросклеротической бляшки. *Атеросклероз и дислипидемия* 2012;3:25–36).
 50. Chitu V., Stanley E. R. Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation. *Curr Opin Immunol* 2006;18:39–48. DOI:10.1016/j.coi.2005.11.006.
 51. Rosenfeld M. E., Yla-Herttuala S., Lipton B. A. et al. Macrophage colony-stimulating factor mRNA and protein in atherosclerotic lesions of rabbits and humans. *Am J Pathol* 1992;140:291–300.
 52. Rajavashisth T. B., Qiao J. H., Tripathi S. et al. Heterozygous osteopetrotic (op) mutation reduces atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 1998;101:2702–2710. DOI:10.1172/JCI119891.
 53. Bober L. A., Grace M. J., Pugliese-Sivo C. et al. The effects of colony stimulating factors on human monocyte cell function. *Int J Immunopharmacol* 1995;17:385–392.
 54. Clinton S. K., Underwood R., Hayes L. et al. Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis. *Am J Pathol* 1992;140:301–316.
 55. Iso Y., Suzuki H., Sato T. et al. Contribution of monocyte chemoattractant protein-1 and c-fms/macrophage colony-stimulating factor receptor to coronary artery disease: analysis of human coronary atherectomy specimens. *J Cardiol* 2003;42 (1):29–36.
 56. Okazaki T., Ebihara S., Takahashi H. et al. Macrophage colony-stimulating factor induces vascular endothelial growth factor production in skeletal muscle and promotes tumor angiogenesis. *J Immunol* 2005;174 (12):7531–7538.
 57. Johansson A. C., Steen H., Ollinger K., Roberg K. Cathepsin D mediates cytochrome c release and caspase activation in human fibroblast apoptosis induced by staurosporine. *Cell Death Differ* 2003;10:1253–1259. DOI:10.1038/sj.cdd.4401290.
 58. Guicciardi M. E., Leist M., Gores G. J. Lysosomes in cell death. *Oncogene* 2004;23 (16):2881–2890. DOI:10.1038/sj.onc.1207512.
 59. Chang Y., Li Y., Ye N. et al. Atorvastatin inhibits the apoptosis of human umbilical vein endothelial cells induced by angiotensin II via the lysosomal-mitochondrial axis. *Apoptosis* 2016;21 (9):977–996. DOI:10.1007/s10495-016-1271-0.
 60. Briozzo P., Morisset M., Capony F. et al. In vitro degradation of extracellular matrix with Mr 52,000 cathepsin D secreted by breast cancer cells. *Cancer Res* 1988;48:3688–3692.
 61. Laurent-Matha V., Maruani-Herrmann S., Prebois C. et al. Catalytically inactive human cathepsin D triggers fibroblast invasive growth. *J Cell Biol* 2005;168:489–499. DOI:10.1083/jcb.200403078.
 62. Berchem G., Glondu M., Gleizes M. et al. Cathepsin-D affects multiple tumor progression steps in vivo: proliferation, angiogenesis and apoptosis. *Oncogene* 2002;21 (38):5951–5955. DOI:10.1038/sj.onc.1205745.
 63. Hakala J. K., Oksjoki R., Laine P. et al. Lysosomal enzymes are released from cultured human macrophages, hydrolyze LDL in vitro, and are present extracellularly in human atherosclerotic lesions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2003;23 (8):1430–1436. DOI:10.1161/01.ATV.0000077207.49221.06.
 64. Gustafsson A., Martuszewska D., Johansson M. et al. Differential expression of Axl and Gas6 in renal cell carcinoma reflecting tumor advancement and survival. *Clin Cancer Res* 2009;15:4742–4749. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-08-2514.
 65. D'Arcangelo D., Gaetano C., Capogrossi M. C. Acidification prevents endothelial cell apoptosis by Axl activation. *Circ Res* 2002;91 (7):e4–12.
 66. Chen Z. B., Huang D. Q., Niu F. N. et al. Human urinary kallidinogenase suppresses cerebral inflammation in experimental stroke and downregulates nuclear factor-kappaB. *J Cereb Blood Flow Metab* 2010;30 (7):1356–1365. DOI:10.1038/jcbfm.2010.19.
 67. Yu H., Song Q., Freedman B. I. et al. Association of the tissue kallikrein gene promoter with ESRD and hypertension. *Kidney Int* 2002;61 (3):1030–1039. DOI:10.1046/j.1523-1755.2002.00198.x.
 68. Rojkaer R., Schmaier A. H. Activation of the plasma kallikrein/kinin system on endothelial cells. *Proc Assoc Am Physicians* 1999;111 (3):220–227.
 69. Dougherty G. J., Landorp P. M., Cooper D. L., Humphries R. K. Molecular cloning of CD44R1 and CD44R2, two novel isoforms of the human CD44 lymphocyte «homing» receptor expressed by hemopoietic cells. *J Exp Med* 1991;174 (1):1–5.
 70. Bajorath J. Molecular organization, structural features, and ligand binding characteristics of CD44, a highly variable cell surface glycoprotein with multiple functions. *Proteins* 2000;39 (2):103–111.
 71. Rajagopalan S., Nicolas E., Vivanco V. et al. Crossing the midline: Roles and regulation of Robo receptors. *Neuron* 2000;28:767–777.
 72. Huminięcki L., Gorn M., Suchting S. et al. Magic roundabout is a new member of the roundabout receptor family that is endothelial specific and expressed at sites of active angiogenesis. *Genomics* 2002;79 (4):547–552. DOI:10.1006/geno.2002.6745.

Поступила 15.12.16 (Received 15.12.16)