

И.А. Собенин^{1,2}, Н.С. Жуковский¹, В.П. Карагодин⁵, Л.И. Ковалев³,
В.А. Мясоедова^{2,4}, К. Банфи⁴, С.С. Шишкин³, А.Н. Орехов^{1,2}

Изменения протеомного профиля интимы и медиа аорты человека при атеросклерозе

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Российской академии медицинских наук, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

² Научно-исследовательский институт атеросклероза, 143025, Москва, Инновационный Центр Сколково, ул. Новая, 100

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук, 119071, Москва, Ленинский пр-т, 33, стр. 2

⁴ Кардиологический центр Монзино, Milan, Italy, 20138, via Parea, 4

⁵ Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский экономический университет им. Г.В. Плеханова», Москва, Россия, 117997, Стремянный пер., 36

Изучалась связь между степенью атеросклеротического поражения и протеомным профилем интимы и медиа аорты человека. Представлены результаты двумерного электрофореза ЭФ белков из интимы и медиа, позволяющие изучить протеомные профили различных видов атеросклеротических поражений (жировая инфильтрация, жировая полоса, липофиброзная бляшка, фиброзная бляшка) в сравнении с непораженными атеросклерозом участками. В результате исследования обнаружены белковые пятна, проявляющие различия при сравнении протеомных профилей, подлежащих под непораженными участками интимы и медиа и под липофиброзными бляшками. Предпринята попытка идентификации этих белков с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии.

Ключевые слова: атеросклероз, протеомика, аорта, белковый профиль

I.A. Sobenin^{1,2}, N.S. Zhukovsky¹, V.P. Karagodin⁵, L.I. Kovaljev³,
V.A. Myasoedova^{2,4}, K. Banfy⁴, S.S. Shishkin³, A.N. Orekhov^{1,2}

Protein profiles changes of human aorta intima and media in atherosclerosis process

¹ Institute for General Pathology and Pathophysiology RAMS, 8, Baltiyskaya str., Moscow, 125315, Russia

² Institute for Atherosclerosis Research, Skolkovo Innovative Centre, 100, Novaya str., Moscow, 143025, Russia

³ Bach Institute of Biochemistry RAS, 33, Leninsky prospekt, Moscow, 119071, Russia

⁴ Research Center for Cardiology, 4, via Parea, Milan, 20138, Italy

⁵ Plekhanov Russian University of Economics, 36, Stremyanny per., Moscow, 117997, Russia

The present study was undertaken in order to examine association between various stages of atherosclerotic lesion and protein maps of human aorta intima and media. The results of the two dimensional electrophoresis of intima and media demonstrate protein profiles of various stages of atherosclerotic lesion (initial stages, lipid strips, lipofibrous plaques, fibrous plaques) versus controls (unaffected aorta sites). Protein spots that have been differentially expressed were found under unaffected intima and media sites versus lipofibrous plaques. Some of these proteins were identified using matrix assisted desorption ionisation time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry.

Key words: atherosclerosis, proteomics, aorta, protein profile

Атеросклероз является одной из наиболее важных медико-социальных проблем, занимая ведущее место в структуре заболеваемости и смертности. Тщательный анализ белков из пораженной атеросклерозом ткани артерий мог бы обнаружить виды белков, которые участвуют в сосудистом ремоделировании и атерогенезе. Идентификация атеросклеротического протеома че-

ловека — фундамент для дальнейших исследований, основа для построения и проверки новых гипотез. Очевидно, что выявление функциональной связи между атеросклеротическими поражениями и протеомическим профилем интимы аорты человека имеет исключительное значение для понимания иницирующих причин возникновения атеросклероза. Уже созданы базы данных по сотням белков протеома миокарда, уровни которых изменяются при сердечно-сосудистой патологии, как острой, так и хронической [2]. Однако

до настоящего времени лишь в очень небольшом количестве работ были исследованы белки, выделенные из атеросклеротических бляшек аорты человека [4, 5, 7]. *Цель исследования* — изучение протеомных профилей интимы и меди артерий при разных стадиях атеросклеротического поражения.

Методика

Материалом для исследования служили аутопсийные образцы грудного отдела аорт мужчин и женщин в возрасте 40—65 лет, получаемые в течение 1,5—3 ч после внезапной смерти. Причиной смерти в подавляющем большинстве случаев была острая сердечно-сосудистая недостаточность. Обработку аутопсийного материала проводили в стерильных условиях. После механического удаления адвентиции аорту пересекали вдоль и промывали в холодном фосфатном буфере для удаления любых следов крови. Из лоскута аорты вырезали участки, не пораженные атеросклерозом, а также участки, соответствующие различным стадиям атеросклеротических поражений (жировая инфильтрация, жировая полоса, липофиброзная бляшка, фиброзная бляшка) в соответствии с классификацией Stary [13, 14]. Затем с помощью пинцетов интиму отделяли от меди, при этом разделение слоев происходило по внутренней пограничной эластической мембране. Выделенные образцы размером 1x1 см вновь тщательно промывали в холодном фосфатном буфере, немедленно замораживали в жидком азоте и растирали фарфоровым пестиком в фарфоровой ступке до порошкообразного состояния. После упаривания жидкого азота при комнатной температуре образцы лиофилизировали в лиофильной сушке в течение 6 ч. Хранение образцов вплоть до выделения белков проводили при -80°C в низкотемпературном морозильнике.

Для выделения белков из порошкообразных образцов использовали два метода. В первом — порошок растворяли в мочевином буфере $\text{pH}=8.0$ (мочевина 8 М, тиомочевина 2 М, CHAPS 4%, дитиотреитол 1%, Трис 20 мМ) из расчета 7 мл буфера на 1 г порошка. Буфер готовили заранее, фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм и хранили до использования в аликвотах при -80°C . Непосредственно перед добавлением буфера к образцу к нему добавляли коктейль из ингибиторов протеаз (из расчета 1 мкл/мл раствора ортованадата натрия 1 М, 1 мкл/мл раствора апротинина 10 мг/мл, 2 мкл/мл раствора фенолметилсульфонилфлюорида 0,5 М, 2 мкл/мл раствора леупептина 1 мг/мл, 2 мкл/мл раствора бензамидина 100 мМ). Экстракцию белков проводили в течение 1 ч при непрерывном перемешивании на шейкере при комнатной температуре. По окончании экстракции образцы центрифугировали

при 15 000 g при комнатной температуре в течение 30 мин, отбирали супернатант и хранили при -80°C до проведения 2D электрофореза.

Во втором методе порошок растворяли в ледяном Rira-буфере $\text{pH}=8.0$ (Трис 50 мМ, натрия хлорид 150 мМ, Тритон X-100 1%, дезоксихолат натрия 1%, додецилсульфат натрия 0,1%). Непосредственно перед добавлением буфера к образцу к нему добавляли вышеописанный коктейль из ингибиторов протеаз. Гомогенизацию образцов в буфере выполняли на гомогенизаторе тканей Tissue Tearor (Biospec Products, США) при 10 000 об./мин 3 раза по 10 с с последующей мягкой сонификацией при 30% максимальной мощности 3 раза по 10 с; операции выполняли на льду. По окончании гомогенизации образцы центрифугировали при 15 000 g при комнатной температуре 4°C в течение 30 мин, отбирали супернатант и хранили при -80°C до проведения 2D электрофореза. Концентрацию белка в экстрактах определяли по Lowry.

Для проведения 2D электрофореза 250 мкг экстрагированного белка обессоливали путем фильтрации на колонках Spin-X (Costar). Далее, исследуемый образец очищали и осаждали с использованием набора 2D-Clean-up (GE Healthcare) в соответствии с инструкцией производителя. После обессоливания образцы ресуспендировали в регидратирующем буфере. Для электрофореза в первом измерении к образцам добавляли трибутилфосфин в качестве восстановителя и амфолиты (Bio-Rad), электрофорез проводили в полиакриламидных стрипах с фиксированными градиентами pH 4—7 и 3—10 (Bio-Rad). Изоэлектрофокусировку проводили в горизонтальном направлении при 20°C , как описано Lazago с соавторами [6]. Во время изоэлектрофокусировки 2 полоски фильтровальной бумаги и полиакриламидные стрипы были помещены между электродами (Electrode Wicks, Bio-Rad) для удаления солей, избытка воды и белков с изоэлектрической точкой, находящейся вне пограничных значений pH для используемых полиакриламидных стрипов.

По окончании изоэлектрофокусировки стрипы выдерживали в эквilibрирующем буфере и проводили электрофорез во втором измерении. Затем гели окрашивали серебром с использованием наборов AmphiLine PAGplate (Pharmacia Biotech, GE Healthcare) в соответствии с инструкцией производителя. Окрашенные гели сканировали на GS-800 сканере-денситометре (Bio-Rad) и анализировали с помощью программного пакета PDQUEST 8.0 (Bio-Rad).

Для идентификации белков соответствующие пятна вырезали из геля, переваривали на автомате Ettan Digester (GE Healthcare) и проводили определение методом MALDI-TOF/TOF и поиском соответст-

вий в базе данных. Вкратце, фрагменты геля восстанавливали 10 мМ дитиотреитолом (Sigma Aldrich) в 50 мМ бикарбонате аммония (Scharlau) и алкилировали 55 мМ иодоацетамидом (Sigma Aldrich) в 50 мМ бикарбонате аммония. Фрагменты геля отмывали в 50 мМ бикарбонате аммония, 50% метаноле (Scharlau) и ацетонитриле (Scharlau), и высушивали в Speedvac (Thermo Fisher). Модифицированный свиной трипсин (Promega, США) добавляли к фрагментам геля в конечной концентрации 20 нг/мкл в 20 мМ бикарбонате аммония и переваривали в течение ночи при 37°C. Наконец, добавляли 60% водный раствор ацетонитрила с 0,1% муравьиной кислотой (Sigma Aldrich) для полной экстракции пептидов.

По окончании переваривания аликвоты образцов смешивали с аликвотами матрикса α -циано-4-гидроксикоричной кислоты (Sigma Aldrich) в 50% ацетонитриле с 0,1% трифторуксусной кислотой. Смесь помещали тонким слоем на 123·81 мм Opti-TOF 384 Well MALDI plate (Applied Biosystems) и высушивали при комнатной температуре. Данные MALDI-MS/MS получали автоматически при масс-спектрометрии на анализаторе 4800 Plus MALDI/TOF/TOF Analyzer (Applied Biosystems).

Спектры поглощения захватывали в режиме положительно заряженных ионов, используя 355-нм Nd:YAG лазер с частотой 200 Гц, и получали от 100 до 2000 индивидуальных спектров. Для анализа фрагментов ионов в тандеме TOF/TOF, ионы-предшественники ускорялись до 8 кВ и отбирались в порту входа ионов. Фрагменты, возникающие в результате столкновения между предшественниками и воздухом в коллизионной камере, были ускорены до 15 кВ в источнике 2, и их массы были проанализированы после прохождения отражателя ионов. Данные о массах были проанализированы автоматически с помощью программного пакета 4000 Series Explorer версии 3.5.3 (Applied Biosystems). Внутренняя калибровка MALDI-TOF проводилась с использованием 2 ионов автолиза трипсина ($m/z=842,510$ и $m/z=2211,105$ соответственно). Калибровка MALDI-MS/MS проводилась с использованием ионных спектров фрагментов Glu1-фибринопептида В (4800 MALDI/TOF-TOF, Applied Biosystems). Данные MALDI-MS и MS/MS были объединены с помощью программы GPS Explorer версии 3.6, которая позволяет проводить нерезервирующий поиск в базе данных белков NCBIнг белка (версия 20080225) с использованием программы Mascot версии 2.1 (Matrix science), при допуске ошибки определения массовой доли до 50 ppm и одного пропуска расщепления.

Результаты и обсуждение

В результате исследования обнаружены белковые пятна, проявляющие различия при сравнении протеомных профилей, подлежащих под непораженными участками интимы и меди и под липофизрозными бляшками.

На рис. 1 представлены 2D-электрофореграммы экстрактов белка из образцов ткани непораженной интимы аорты человека и липофизрозной бляшки, полученных из одного аутопсийного материала. Очевидно, что полученные протеомные профили имеют существенные качественные и количественные различия. В частности, в липофизрозной бляшке (наиболее активной и угрожающей жизни форме атеросклеротического поражения) по сравнению с нормой отмечается преобладание белков с массой 75—90 кДа и изоэлектрической точкой в интервале рН от 5 до 7; белков с массой около 65 кДа и изоэлектрической точкой в интервале рН от 4,5 до 5,5. При этом в липофизрозной бляшке уменьшено содержание белков с массой около 70 кДа и около 40 кДа и изоэлектрической точкой в интервале рН от 4,5 до 5,0. Также существуют многочисленные менее выраженные различия.

На рис. 2 представлены электрофореграммы экстрактов белка из образцов ткани интимы, полученной из аутопсийного материала, в котором присутствовали, наряду с непораженными участками, все изучаемые виды атеросклеротических поражений (начальные поражения, жировая полоса, липофизрозная бляшка, фиброзная бляшка). Очевидно, что существенные изменения в протеомном профиле происходят уже на самых ранних стадиях формирования атеросклеротического поражения, т.е. при жировой инфильтрации. Макроскопически начальные поражения представляют собой участки с гладкой желтоватой поверхностью, иногда с мелкими желтыми точками; микроскопические изменения при этом минимальны: наблюдаются небольшие накопления внеклеточных липидных капель в соединительно-тканном матриксе. Считают, что в участках начальных поражений, по-

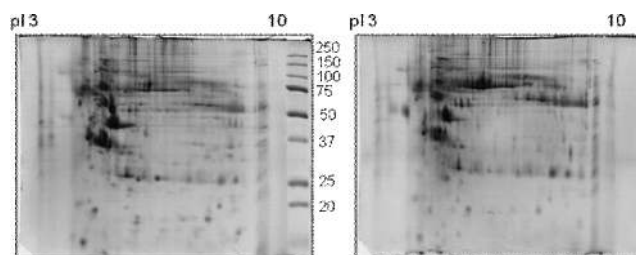


Рис. 1. 2D электрофорез экстрактов белков из интимы аорты человека. Слева — непораженная интима аорты, справа — липофизрозная бляшка. Окраска серебром.

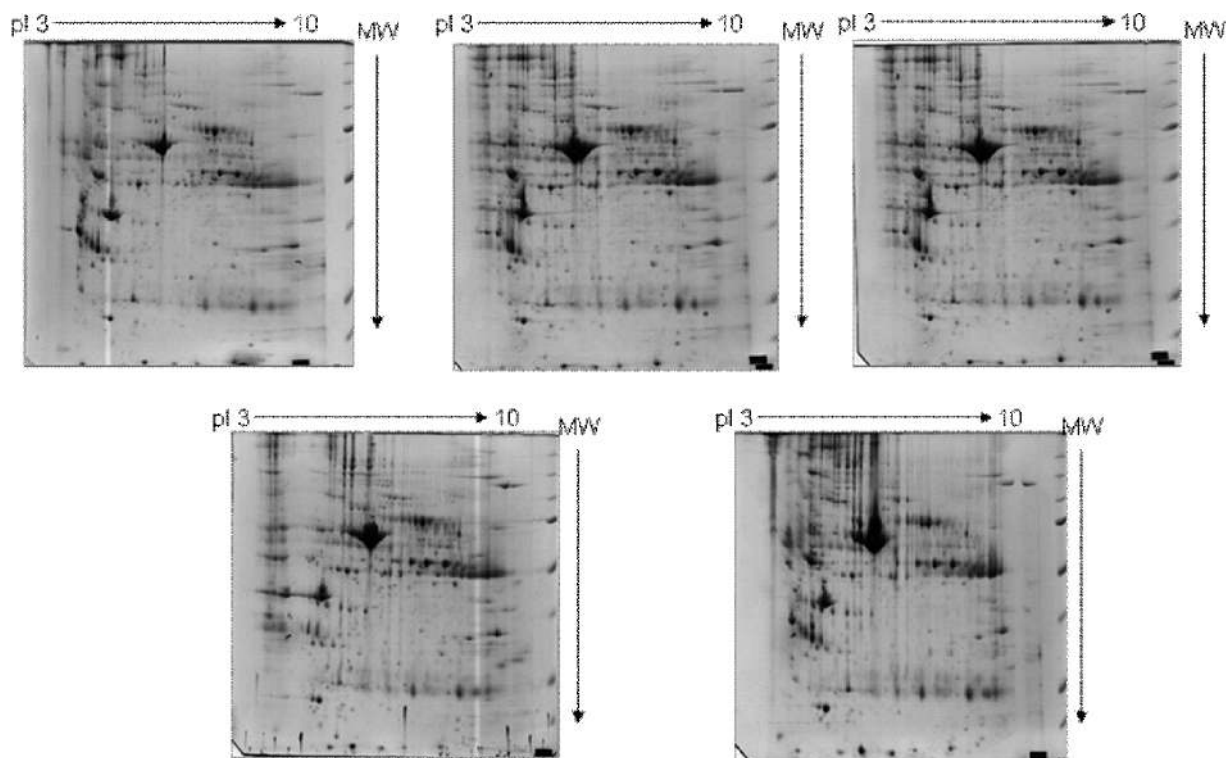


Рис. 2. 2D электрофорез экстрактов белков из интимы аорты человека. Вверху слева — непораженная интима аорты, вверху посередине — жировая инфильтрация (начальные поражения), вверху справа — жировая полоса, внизу слева — липофиброзная бляшка, внизу справа — фиброзная бляшка. Окраска серебром.

мимо оседлых клеток, отмечается несколько увеличенное по сравнению с непораженной интимой количество мононуклеарных клеток; при этом отсутствуют явные нарушения в структуре ткани. В этот момент, как показано нами, протеомный профиль ткани уже существенно изменен. Несмотря на существенные морфологические изменения, происходящие при прогрессировании атеросклероза (формирование жировых полос, липофиброзных и фиброзных бляшек — накопление внутриклеточных и внеклеточных липидов, разрастание соединительнотканного матрикса, изменение клеточного состава ткани, формирование возвышающихся поражений), принципиальных изменений протеомного профиля по сравнению с начальными поражениями уже не происходит.

Считается, что при атеросклерозе основные патологические изменения происходят в интима артерий как морфологическом субстрате для формирования атеросклеротических поражений, а в медиальном слое наблюдаются вторичные изменения. Для оценки таких изменений было проведено изучение протеомного профиля участков меди, подлежащих под неизменной интимой и под липофиброзной бляшкой (рис. 3). Очевидно, что в меди также происходят существенные изменения протеомного профиля, ассоциированные с наличием атеросклеротического поражения. Ключевые различия бел-

ковых пятен, выявленные на данных электрофореграммах, приведены на рис. 4 (фрагменты фото). На рис. 5 представлено фото электрофореграммы экстракта белков из меди, подлежащей под непораженным участком интимы аорты человека. Стрелками указаны белковые пятна в области белков массой менее 33 кДа, для которых наблюдаются наиболее выраженные количественные изменения при анализе участков меди, подлежащих под атеросклеротическими поражениями (липофиброзными и фиброзными бляшками).

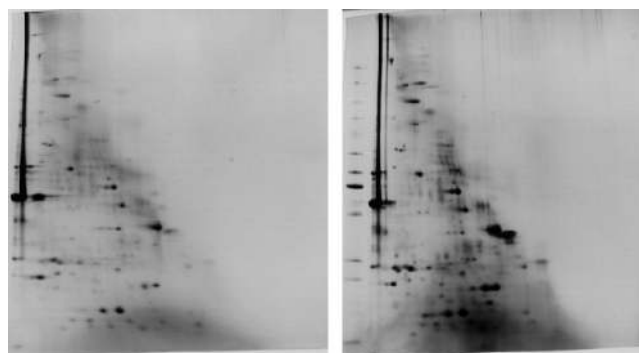


Рис. 3. 2D электрофорез экстрактов белков из участка меди аорты человека, подлежащего под непораженным участком интимы (слева) и под липофиброзной бляшкой (справа). Окраска серебром.

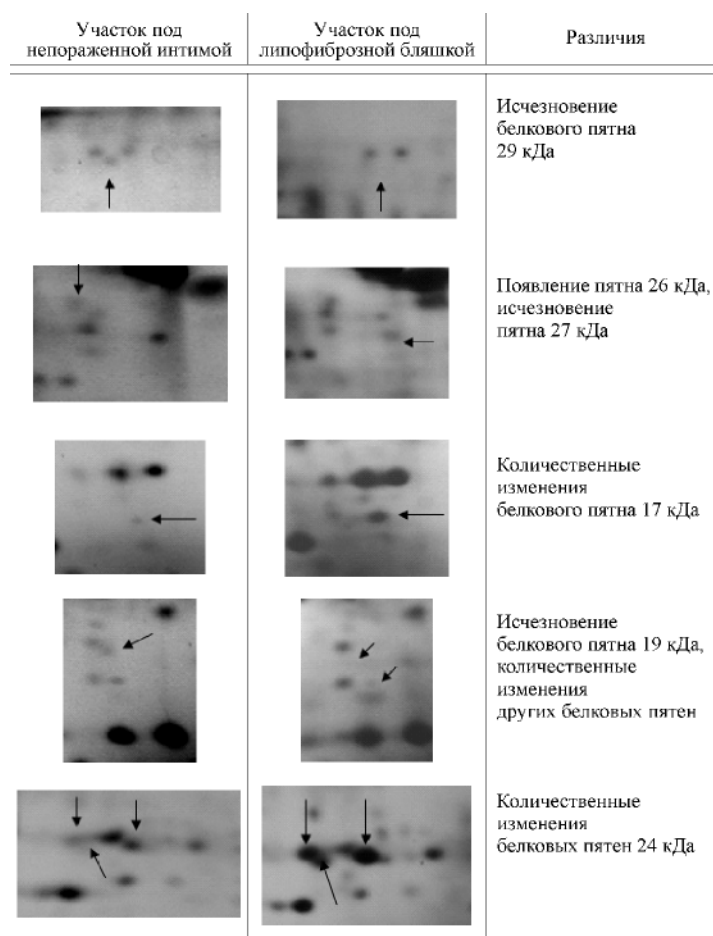


Рис. 4. Фрагменты двумерных электрофореграмм белков меди аорты человека

Была предпринята попытка идентификации данных белков с использованием технологии MALDI-TOF масс-спектрометрии. Результаты анализа представлены в таблице. Эти низкомолекулярные белки оказались фрагментами изоформы 1 аннексина-2, α -В-кристаллина, γ -гас онкогена, белка теплового шока β -1, бетаглобина, трансгелина и его изоформ, а также пероксиредоксина-1. Следует отметить, что данный анализ носил весьма ограниченный характер. Из-за сложности процедуры идентификации на данном этапе исследования не были включены белки с молекулярной массой более 40 кДа, хотя из результатов 2D электрофореза, представленных на рис. 1—3, очевидно, что в этом диапазоне молекулярных масс при развитии атеросклеротических поражений также происходят существенные изменения протеомного профиля как в интимальном, так и медиальном слое аорты.

Исследование протеома элементов сердечно-сосудистой системы, атеросклеротические изменения в которой затрагивают многие ее компоненты, включая гладкомышечные и эндотелиальные клетки, привлека-

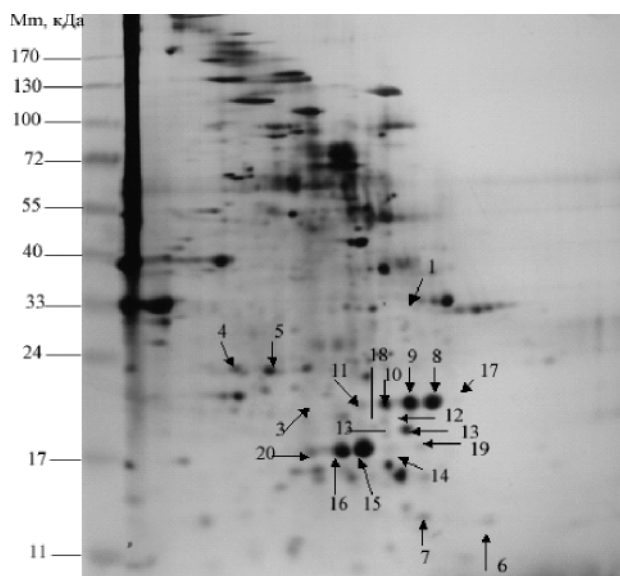


Рис. 5. 2D электрофорез экстракта белков из участка меди аорты человека, подлежащего под неповрежденным участком интимы. Стрелками указаны пятна, идентифицированные с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии. Окраска серебром.

Результаты идентификации пятен белков из 2D электрофореграмм белков меди аорты человека

№	Белок	Номер в NCBI protein	Вероятностный коэффициент достоверности / количество выявленных масс пептидов	% перекрытия	Mw/pI эксп.	Mw/pI теор.
1	Аннексин-2, изоформа 1 (фрагмент)	50845388	74/11	35	35,0/7,25	40,4/8,53
2	Альфа-В-кристаллин	4503057	62/5	23	19,5/7,30	20,1/6,76
3	г-гас онкоген	5454028	117/8	45	22,5/6,50	23,5/6,44
4	Белок теплового шока бета-1	4504517	97/10	52	23,0/5,60	22,8/5,98
5	Белок теплового шока бета-1	4504517	97/10	25	23,0/5,80	22,8/5,98
6	Цепь А гемоглобина	61679690	68/8	64	15,5/8,30	15,1/8,72
7	Бета глобин	71727231	117/7	60	16,0/7,80	16,0/7,86
8	Трансгелин	48255905	89/10	50		22,6/8,87
9	Трансгелин	48255905	206/22	83		22,6/8,87
10	Трансгелин	48255905	145/10	53		22,6/8,87
11	Смесь трансгелина и пероксиредоксина-1	48255905, 55959887	122/10, 53/5	52, 27		22,6/8,87
12	Трансгелин	48255905	147/12	47		22,6/8,87
13	Трансгелин	48255905	106/8	37		22,6/8,87
14	Трансгелин	48255905	142/10	45		22,6/8,87
15	Трансгелин	48255905	172/21	73		22,6/8,87
16	Трансгелин	48255905	143/17	64		22,6/8,87
17	Трансгелин, изоформа CRA_c	119587704	55/6	33		23,7/8,54
18	Альфа-В-кристаллин	4503057	62/5	26		20,1/6,76
19	Трансгелин вариант	62897565	67/6	23		20,9/8,69
20	Трансгелин вариант	62897565	54/5	28		20,9/8,69

Примечание. Приведены результаты компьютерного поиска по базам данных о секвенированных последовательностях (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) — процент совпадения выявленных масс триптических пептидов с аминокислотной последовательностью соответствующего белка.

ет внимание ряда ученых. Представляется, что выявление модифицируемых патологией белков может дать ключ как к пониманию механизмов атеросклероза, так и к его лечению. В данный момент таких экспериментов, характеризующихся как «функциональная протеомика», выполнено явно недостаточно. Тем не менее, соответствующее поведение белков, включая изменение их количества, изучалось при кардиомиопатиях человека и животных и в ряде других случаев. Согласно предварительным данным, наиболее обещающими маркерами для кардиопротеомики могут быть тропонины, изоформы α -1-фибриногена, изоформы аполипопротеина А-1, С-реактивный белок и др. [5].

Главное препятствие для анализа протеома сосудов при атерогенезе — гетерогенность клеточного состава атеросклеротических бляшек [11]. Другой методической проблемой является выбор адекватного контроля, с учетом локализации образца в сосудистой стенке и отсутствия протеолитических изменений до начала анализа. С учетом воспалительной природы атеросклероза, следует принимать во внимание также взаимодействие между инфильтрованными Т-лимфоцитами и макрофагами, образованными из моноцитов. Макрофаги довольно много-

численны и могут маскировать белки, происходящие из компонентов нормальной стенки сосудов.

Несмотря на эти ограничения, первые попытки анализа атеросклеротического поражения с помощью 2-DE были предприняты почти 20 лет назад. Так, Stastny и Fosslie [15] сравнивали белковый состав липофиброзной бляшки с составом нормальной интимы и обнаружили, что белки плазменного происхождения (альбумин, фибриноген, иммуноглобулин G, α -1 анти-трипсин, трансферрин, гаптоглобин, apo A-I, and apo A-II) аккумулируются в пораженных сосудах. Аналогично, Song et al. [12] обнаружили, что белки из плазмы становятся более многочисленными в интима артерий при старении одновременно с утолщением интимы. Установлено, что остеоонектин усиленно экспрессируется клетками, присутствующими в стенке сосуда при прогрессировании атеросклероза, а именно при кальцификации атеросклеротической бляшки [3].

В более поздних работах с помощью лазерной денситометрии было подтверждено значительное увеличение отношения альбумин/актин в жировых слоях по сравнению с нормой [16]. При сравнении атеросклеротических бляшек коронарных артерий с нор-

мальными коронарными артериями было продемонстрировано увеличение экспрессии ферритина (белка, участвующего в клеточном накоплении железа) в коронарных артериях индивидов с заболеваниями коронарных артерий [18]. В гомогенатах атеросклеротических бляшек человека обнаружено 2-кратное увеличение легкоцепочечного ферритина по сравнению с контролем. Предполагается участие этого белка в образовании активных форм кислорода, вызывающих окисление липидов в стенке коронарных артерий.

В нестабильных бляшках (последние стадии развития) обнаружены также изоформы $\alpha 1$ -антитрипсина [7] и набора из 27 белков, участвующих в биологических процессах (миграции гладкомышечных клеток, активации металлопротеиназ матрикса, регуляции провоспалительных цитокинов).

В отличие от выяснения роли отдельных белков в развитии атеросклероза, протеомика позволяет оценить микроокружение бляшки в целом. Так, обнаружено снижение уровня белка теплового шока (hsp27) в супернатанте культуры пораженных атеросклерозом клеток, а также hsp27, hsp20, супероксиддисмутаза 3 в стабильных бляшках по сравнению с нестабильными [9].

Наконец, следует указать на работу, в которой изучались белки из иммуногистохимически классифицированных стабильных и нестабильных бляшек сонных артерий [8]. Авторы обнаружили, что около 70% идентифицированных белков происходят из плазмы, что свидетельствует о нарушении барьерных функций эндотелия независимо от типа бляшки. В нестабильных бляшках, по сравнению со стабильными, снижалось содержание супероксиддисмутаза 3 (СОД 3) и глутатион s-трансферазы (ГСТ), белков теплового шока 20 и 27, аннексина А10, а возрастало содержание легкого ферритина, СОД2 и фрагмента D фибриногена. Как известно, все эти белки так или иначе вовлечены в окислительные или воспалительные процессы, а также образование бляшек.

Альтернативный подход к исследованию протеома бляшки применил Dugan et al. [4]. В этих опытах образцы из сонных артерий культивировали в безбелковой среде и анализировали супернатант с помощью 2-DE. Установлено, что белки, высвобождаемые из бляшек, вовлечены в обратный транспорт холестерина (аполипопротеин В-100, аполипопротеин А-1), апоптоз (лектин, растворимый b-галактозидазой), деградацию белков (гидролаза 23) и антиокислительное действие (супероксиддисмутаза, пероксиредоксин 2). С повышением сложности поражения возрастало и количество белков. Однако неясно, выделяются ли эти белки из бляшек активно или пассивная диффузия в среду клеточной культуры происходит легче из бляшек, чем из нормальных артерий. Белок теплового шока 27, секретируемый из бляшки в культуральную сре-

ду, рассматривается как потенциальный маркер атеросклероза, поскольку его содержание снижается как по сравнению с контролем *in vitro*, так и в плазме крови *in vivo*. Другим маркером в работах этой же группы исследователей признается катепсин D.

Принципиально новую методику по исследованию протеомного профиля бляшки предложила группа, руководимая Han [1], разработавшая так называемую процедуру прямой тканевой протеомики (ДТР), позволяющую идентифицировать белки в минимальных количествах ткани сосуда. С этой целью белки экстрагируются из фиксированных формальдегидом и погруженных в парафин образцов ткани, что обеспечивает их более эффективное разделение. Полученный профиль бляшки из коронарной артерии включал в себя 806 белков, ряд из которых и ранее связывали с развитием атеросклероза.

Однако наряду с ними были обнаружены выполняющие регуляторные функции PEDF (pigment-epithelium derived factor), периостин, MFG-E8 (milk fat globule-EGF-factor 8) и аннексин I, а также некоторые факторы роста и цитокины. Авторы полагают, что ими в основном идентифицированы белки внеклеточного матрикса, вовлеченные в развитие атеросклероза и способные мигрировать из меди и интими.

Как и в нашей работе, внимание исследователей привлекают гладкомышечные клетки (ГМК) сосудов, чья пролиферация и миграция важны для развития патологии. Дифференциальная протеомика выявила важную роль шаперонов, а также белков цитоскелета (виментина и актина) в формировании бляшки, продолжается изучение влияния на ГМК окисленных ЛПНП, окислительного стресса, механического гемодинамического напряжения [10]. В частности, в последнем случае обнаружено изменение уровней гелсолина, белка теплового шока hsp27 и CapZ. Здесь уместно отметить, что другие авторы обнаружили увеличение экспрессии hsp60 и hsp70 при атеросклеротическом поражении [17].

С учетом представленных здесь результатов исследований, сходных с выполненными нами, следует указать, как минимум, на подтверждение роли в формировании атеросклеротической бляшки таких низкомолекулярных белков, как аннексины и белки теплового шока. Тем не менее, совершенно ясно, что для уточнения роли белков в атерогенезе с помощью протеомики необходимы дальнейшие исследования на вырезаемых лазером микроучастках сосудов, а также оценка посттрансляционных модификаций белков, в частности, окислительного характера, что может быть полезным как для обнаружения новых маркеров патологии, так и для целей терапии.

Данная работа была выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации.

Список литературы

1. **Bagnato C., Thumar J., Mayya V.** et al. Proteomic analysis of human coronary atherosclerotic plaque: a feasibility study of direct tissue proteomics by liquid-chromatography and tandem mass spectrometry // *Mol. Cell. Proteomics*. — 2007. — Vol. 6, тф26. — P. 1088—1102.
2. **Berhane B.T., Zong C., Liem D.A.** et al. Cardiovascular-related proteins identified in human plasma by the HUPO plasma proteome project pilot phase // *Proteomics*. — 2005. — Vol. 5. — P. 3520—3530.
3. **Donners M.M., Verluyten M.J., Bouwman F.G.** et al. Proteomic analysis of differential protein expression in human atherosclerotic plaque progression // *J. Pathol.* — 2005. — Vol. 206, №2. — P. 39—45.
4. **Duran M.C., Mas S., Martin-Ventura J.L.** et al. Proteomic analysis of human vessels: application to atherosclerotic plaques // *Proteomics*. — 2003. — Vol. 3, №6. — P. 973—978.
5. **Fach M.E., Garulacan L.A., Gao J.** et al. In vitro biomarker discovery for atherosclerosis by proteomics // *Mol. Cell. Proteomics*. — 2004. — Vol. 3. — P. 1200—1210.
6. **Lazaro A., Gallego-Delgado J., Osende J.I.** et al. Expresion diferencial de proteomas en el corazon de ratas espontaneamente hipertensas con hipertrofia cardiaca // *Clin. Invest. Arterioscl.* — 2005. — Vol. 17. — P. 1—9.
7. **Lepedda A.J., Cigliano A., Cherchi G.M.** et al. A proteomic approach to differentiate histologically classified stable and unstable plaques from human carotid arteries // *Atherosclerosis*. — 2009. — Vol. 203, №1. — P. 112—118.
8. **Lutgens E., van Suylen R.J., Faber B.C.** et al. Atherosclerotic plaque rupture: local or systemic process? // *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.* — 2003. — Vol. 23, №212. — P. 2123—2130.
9. **Martin-Ventura J.L., Duran M.C., Blanco-Colio L.M.** et al. Identification by a differential proteomic approach of heat shock protein 27 as a potential marker of atherosclerosis // *Circulation*. — 2004. — Vol. 110, Jte 15. — P. 2216—2219.
10. **McGregor E., Kempster L., Wait R.** et al. F-actin capping (CapZ) and other contractile saphenous vein smooth muscle proteins are altered by hemodynamic stress: a proteomic approach // *Mol. Cell. Proteomics* — 2004. — Vol. 3, Jfe2. — P. 115—124.
11. **Rezaee F., Casetta B., Levels J.H.** et al. Proteomic analysis of high-density lipoprotein // *Proteomics* — 2006. — Vol. 6, Jfe 2. — P. 721—730.
12. **Song J., Stastny J., Fosslien E., Robertson A.L. Jr.** Plasma-derived proteins in the aging arterial intima and intimal thickening // *Exp. Mol. Pathol.* — 1985. — Vol. 43. — P. 297—304.
13. **Stary H.C.** Natural History and Histological Classification of Atherosclerotic Lesions: An Update // *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.* — 2000. — Vol. 20, №5. — P. 1177—1178.
14. **Stary H.C., Chandler A.B., Glagov S.** et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association // *Circulation*. — 1994. — Vol. 89. — P. 2462—2478.
15. **Stastny J.J., Fosslien E.** Quantitative alteration of some aortic intima proteins in fatty streaks and fibro-fatty lesions // *Exp. Mol. Pathol.* — 1992. — Vol. 57, №3. — P. 205—214.
16. **Sung H.J., Ryang Y.S., Jang S.W.** et al. Proteomic analysis of differential protein expression in atherosclerosis // *Biomarkers*. — 2006. — Vol. 11, №3. — P. 279—290.
17. **Vivanco F., Darde V.M., De la Cuesta F., Bardeiras M.G.** Proteomic Biomarkers of Atherosclerosis // *Cardiovascular Proteomics. Curr. Proteom.* — 2006. — Vol. 3. — P. 147—170.
18. **You S.A., Archacki S.R., Angheloiu G.** et al. Proteomic approach to coronary atherosclerosis shows ferritin light chain as a significant marker: evidence consistent with iron hypothesis in atherosclerosis // *Physiol. Genomics*. — 2003. — Vol. 13, №1. — P. 25—30.

Поступила 27.04.12

Сведения об авторах:

Карагодин Василий Петрович, канд. биол. наук, старш. науч. сотр. ФГБОУ ВПО РЭУ им. Г.В. Плеханова
 Жуковский Николай Сергеевич, аспирант ФГБУ «НИИОПП» РАМН
 Ковалев Леонид Иванович, д-р мед. наук, вед. научн. сотр. ФГБУН ИНБИ РАН
 Мясоедова Вероника Александровна, канд. мед. наук, старш. науч. сотр. НИИ атеросклероза
 Банфи Кристина, д-р наук, зав. лаб., Кардиологический центр им. Монзини
 Шишкин Сергей Сергеевич, д-р биол. наук, проф. зав. лаб. ФГБУН ИНБИ РАН
 Орехов Александр Николаевич, д-р биол. наук, проф. зав. лаб. клеточных механизмов атерогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН