



УДК 616.153.96:616.132.2-004.6]-071
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-121-129>

Изучение ассоциаций белков в крови с наличием нестабильных атеросклеротических бляшек в коронарных артериях методом количественной протеомики

Стахнёва Е.М.¹, Каштанова Е.В.¹, Полонская Я.В.¹, Стрюкова Е.В.¹, Шрамко В.С.¹,
Садовский Е.В.¹, Кургузов А.В.², Мурашов И.С.², Чернявский А.М.², Рагино Ю.И.¹

¹ Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал Федерального исследовательского центра «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН)
630089, г. Новосибирск, ул. Б. Богаткова, 175/1

² Национальный медицинский исследовательский центр (НМИЦ) им. акад. Е.Н. Мешалкина
Россия, 630055, г. Новосибирск, ул. Речкуновская, 15

РЕЗЮМЕ

Цель. Изучение ассоциаций белков крови с наличием нестабильных атеросклеротических бляшек в артериях у пациентов с коронарным атеросклерозом с использованием количественного протеомного анализа.

Материалы и методы. В исследование участвовали пациенты с ишемической болезнью сердца и коронарным атеросклерозом ($n = 40$), средний возраст пациентов 58 ± 7 лет. Материал исследования – сыворотка крови. Концентрации белков в образцах сыворотки определяли с помощью набора PeptiQuant Plus Proteomics Kit (Cambridge Isotope Laboratories, США). Идентификацию белковых фракций осуществляли методом мониторинга множественных реакций на масс-спектрометре Q-TRAP 6500, комбинированном с жидкостным хроматографом.

Результаты. Масс-спектрометрическая идентификация выявила в образцах сыворотки крови у пациентов с нестабильными атеросклеротическими бляшками повышенную концентрацию белков: фибриноген, фибулин-1 и фактор комплемента Н. При одновременном сниженном уровне белков: витронектин, α -2-антиплазмин, кофактор гепарина 2, коагуляционный фактор XII, плазминоген и протромбин, белки комплемента (C1, C3, C7, C9) и фактор комплемента В. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Выявлено, что нестабильность атеросклеротических бляшек ассоциирована с концентрацией фибулина-1 ($\text{Exp}(B) = 1,008$; $p = 0,05$), плазминогена ($\text{Exp}(B) = 0,995$; $p = 0,027$) и коагуляционного фактора X ($\text{Exp}(B) = 0,973$; $p = 0,037$).

Заключение. Повышенная концентрация фибулина-1 в крови может рассматриваться как потенциальный биомаркер нестабильности атеросклеротических бляшек при коронарном атеросклерозе. Возможность использования исследованных белков как биомаркеров нестабильности атеросклеротических бляшек при коронарном атеросклерозе требует дальнейших исследований их потенциальной роли в развитии данного заболевания.

Ключевые слова: протеомный анализ, масс-спектрометрия, коронарный атеросклероз

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках бюджетной темы по Государственному заданию № 122031700094-5 и в рамках гранта РНФ №. 21-15-00022.

Соответствие принципам этики. Все участники подписали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено этическим комитетом НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН (протокол № 7 от 26.09.2017).

Для цитирования: Стахнёва Е.М., Каштанова Е.В., Полонская Я.В., Стрюкова Е.В., Шрамко В.С., Садовский Е.В., Кургузов А.В., Мурашов И.С., Чернявский А.М., Рагино Ю.И. Изучение ассоциаций белков в крови с наличием нестабильных атеросклеротических бляшек в коронарных артериях методом количественной протеомики. *Бюллетень сибирской медицины*. 2022;21(4):121–129. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-121-129>.

Study of associations of blood proteins with development of unstable atherosclerotic plaques in coronary arteries by quantitative proteomics

Stakhneva E.M.¹, Kashtanova E.V.¹, Polonskaya Ya.V.¹, Striukova E.V.¹, Shramko V.S.¹, Sadovski E.V.¹, Kurguzov A.V.², Murashov I.S.², Chernyavskii A.M.², Ragino Yu.I.¹

¹ Research Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences
175/1, B. Bogatkova Str., Novosibirsk, 630089, Russian Federation

² Meshalkin National Medical Research Center
15, Rechkunovskaya Str., Novosibirsk, 630055, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. To study the associations of blood proteins with the presence of unstable atherosclerotic plaques in the arteries in patients with coronary artery disease using the quantitative proteomic analysis.

Materials and methods. The study included patients with coronary artery disease ($n = 40$); the average age of patients was 58 ± 7 years. Material for the study was blood serum. Protein concentrations in serum samples were determined using the PeptiQuant Plus Proteomics Kit (Cambridge Isotope Laboratories, USA). Protein fractions were identified using the liquid chromatograph and tandem mass spectrometer Q-TRAP 6500.

Results. Mass spectrometry revealed an increased concentration of proteins, such as fibrinogen, fibulin-1, and complement factor H, in the serum samples of patients with unstable atherosclerotic plaques. It took place with a simultaneous decrease in the levels of α 2-antiplasmin, heparin cofactor II, coagulation factor XII, plasminogen, prothrombin, vitronectin, complement proteins (C1, C3, C7, C9), and complement factor B. The differences were considered significant at $p < 0.05$. It was revealed that the presence of unstable atherosclerotic plaques was associated with the level of fibulin-1 ($\text{Exp(B)} = 1.008$; $p = 0.05$), plasminogen ($\text{Exp(B)} = 0.995$; $p = 0.027$), and coagulation factor X ($\text{Exp(B)} = 0.973$; $p = 0.037$).

Conclusion. An increased concentration of fibulin-1 can be considered as a potential biomarker of unstable atherosclerotic plaque development in coronary artery disease. The possibility of using the studied proteins as biomarkers of unstable atherosclerotic plaques requires further studies on their potential role in the development of this disease.

Keywords: proteomic analysis, mass spectrometry, coronary artery disease

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious or potential conflict of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The study was carried out within the budgetary topic of the state assignment No.122031700094-5 and within the grant of the Russian Science Foundation No. 21-15-00022.

Conformity with the principles of ethics. All patients signed an informed consent to participate in the study. The study was approved by the Ethics Committee at the Research Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of the Institute of Cytology and Genetics (Protocol No. 7 of 26.09.2017).

For citation: Stakhneva E.M., Kashtanova E.V., Polonskaya Ya.V., Striukova E.V., Shramko V.S., Sadovski E.V., Kurguzov A.V., Murashov I.S., Chernyavskii A.M., Ragino Yu.I. Study of associations of blood proteins with development of unstable atherosclerotic plaques in coronary arteries by quantitative proteomics. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2022;21(4):121–129. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-4-121-129>.

ВВЕДЕНИЕ

Исследования в области этиологии и патогенеза коронарного атеросклероза, которые определяют осложнения коронарного атеросклероза, в настоящее время актуальны из-за высокой распространенности и смертности от этого заболевания. Атеросклероз, основа сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), включает в себя ряд патологических процессов: эндотелиальную дисфункцию, обширное отложение липидов в интимае, обострение врожденных и адаптивных иммунных реакций, пролиферацию гладкомышечных клеток и ремоделирования внеклеточного матрикса, в итоге приводящих к образованию атеросклеротической бляшки (АБ).

Дестабилизация АБ усугубляет патологический атеросклеротический процесс, приводя к развитию осложнений ССЗ. Состав бляшки и наличие внутреннего кровоизлияния в атеросклеротической бляшке являются независимым фактором риска развития инсульта и ишемической болезни сердца (ИБС) [1]. Генетически обусловленное ингибирование α -, β - и γ -цепей фибриногена, фактора II и фактора XI связано со снижением риска венозной тромбоэмболии ($p < 0,001$), а ингибирование β - и γ -фибриногена – со снижением риска инсульта в крупных артериях ($p = 0,001$) [2]. Различные биомеханические и гемодинамические факторы способствуют дестабилизации АБ. Неповрежденный эндотелий сосудов обладает тромборезистентностью, а поврежденный эндотелий формирует мощную прокоагулянтную активность. Гемостаз осуществляется клетками крови и плазменной ферментной системой, представленной тесно взаимодействующими белковыми компонентами. Чтобы изучить участие различных белков в патогенезе коронарного атеросклероза, необходимо исследовать специфический вклад белков с про- или антикоагуляционной активностью в развитие нестабильности атеросклеротических поражений в коронарных артериях.

Накопление знаний о патогенезе коронарного атеросклероза и его осложнений вместе с развитием современных методов исследования вносит вклад в поиск белков – потенциальных прогностических и диагностических биомаркеров ССЗ. Количественный протеомный анализ, используемый для идентификации и количественного определения биологических молекул на основе масс-спектрометрии с тандемными химическими метками, является полезным методом в точном количественном одновременном определении белков в различных биологических образцах. Несмотря на то, что количество изучаемых белков-кандидатов постоянно растет, не всегда до

конца ясна их роль в патогенезе коронарного атеросклероза. Понимание изменений белковой составляющей крови при атеросклерозе поможет выявить новые биомаркеры для лучшего понимания условий развития осложнений данного заболевания.

Цель данного исследования – изучение ассоциаций некоторых белков крови с наличием нестабильных АБ в артериях у мужчин с коронарным атеросклерозом с помощью количественного протеомного анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены пациенты с ИБС и коронарным атеросклерозом, поступившие на операцию коронарного шунтирования, которым в ходе операции по интраоперационным показаниям была проведена эндартерэктомия из коронарных артерий. Критерии исключения: инфаркт миокарда менее 6 мес, острые хронические инфекционно-воспалительные заболевания или их обострение, почечная недостаточность, активные заболевания печени, рак, гиперпаратиреоз. Протокол исследования был одобрен этическим комитетом НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН. Все участники подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Материал исследования – образцы сыворотки крови. У всех пациентов кровь забирали из локтевой вены утром натощак. Для количественного протеомного анализа были отобраны образцы сыворотки крови 40 мужчин, которые были поделены на две группы по 20 пациентов в каждой. Первую группу составили пациенты (средний возраст 58 ± 4 лет), у которых, по данным гистологического анализа, были только стабильные АБ. Вторую группу составили пациенты (средний возраст 57 ± 10 лет), у которых, по данным гистологического анализа, в образцах крови были только нестабильные АБ. Определение концентрации белков в образцах сыворотки крови проводили с помощью набора PeptiQuant Plus Proteomics Kit (Cambridge Isotope Laboratories, США) по методике производителя с некоторыми модификациями.

Для проведения трипсинолиза в растворе к 10 мкл образца сыворотки крови добавляли 20 мкл раствора, содержащего 9 М мочевины, 20 мМ дитиотреитола, 300 мМ Трис-НСl (рН 8,0). В отдельную пробирку вносили 10 мкл раствора бычьего сывороточного альбумина (БСА), используемого в дальнейшем в качестве раствора матрицы для точек калибровки. Образцы инкубировали 30 мин при 37 °С. Во все пробирки вносили по 20 мкл раствора 100 мМ йодацетамиды. Инкубировали 30 мин в темноте при комнатной температуре. Добавляли 272 мкл 100 мМ Трис-НСl

(рН 8,0) и 35 мкл раствора трипсина. Инкубировали 18 ч при 37 °С. Протеолиз останавливали внесением 343 мкл 2%-й муравьиной кислоты.

Смесь легких (немеченых) пептидов разводили в 60 мкл раствора 30%-го ацетонитрила, 0,1%-й муравьиной кислоты. Готовили серию разведений для калибровки по схеме. Смесь пептидов, меченых тяжелыми стабильными изотопами, разводили в 450 мкл 30%-го ацетонитрила, 0,1%-й муравьиной кислоты и использовали в качестве внутреннего стандарта.

В пробирки вносили по 40 мкл образцов сыворотки после трипсинолиза и по 40 мкл раствора БСА после трипсинолиза. Во все пробирки вносили по 10 мкл раствора меченых пептидов. В пробирки с БСА добавляли по 10 мкл соответствующего разведения стандартов для калибровочной кривой. В пробирки с образцами сыворотки вносили по 10 мкл раствора 30%-го ацетонитрила, 0,1%-й муравьиной кислоты. Во все пробирки добавляли по 540 мкл 0,1%-й муравьиной кислоты.

Очистку образцов проводили на картриджах для твердофазной экстракции Oasis HLB (Waters, США), 10 мг. Картриджи активировали 600 мкл метанола и уравнивали 600 мкл 0,1%-й муравьиной кислоты. Вносили по 510 мкл образца, промывали 600 мкл воды 3 раза. Пептиды элюировали 300 мкл раствора 50%-го ацетонитрила, 0,1%-й муравьиной кислоты. Полученные образцы замораживали при –80 °С и высушивали с помощью лиофильной сушки FreeZone 2.5 (Labconco, США). Сухие осадки разводили в 34 мкл 0,1%-й муравьиной кислоты и использовали для анализа.

Детекцию пептидов осуществляли методом мониторинга множественных реакций (MRM – Multiple Reaction Monitoring) на масс-спектрометре Q-TRAP 6500 (AB Sciex, США), комбинированном с жидкостным хроматографом Infinity 1290 (Agilent, США). Хроматографическое разделение проводили на колонке Titan C18, 1,9 мкм (Supelco, США) в несколько этапов. Скорость потока – 0,4 мл/мин, температура разделения – 45 °С.

Детектировали положительно заряженные ионы, полученные с помощью ионизации электроспреем в источнике Turbo Spray IonDrive. Построение калибровочных кривых и определение концентрации белков осуществляли в программе MultiQuant 3.0.2 (AB Sciex, США) по площади пиков MRM-переходов, специфичных для каждого исследованного пептида.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы SPSS 20.0 для Windows. Статистический анализ включал тест на нормальность распределения признаков Колмогорова – Смирнова, сравнительный анализ по Манну – Уитни. Возраст пациентов приведен в виде средних

значений и стандартного квадратичного отклонения переменных ($M \pm \sigma$). Результаты в таблице приведены в виде медианы, интерквартильного размаха $Me [Q_{25}; Q_{75}]$. С целью поиска ассоциаций был проведен многофакторный логистический регрессионный анализ. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Протеомное профилирование образцов сыворотки крови проводили с помощью набора PeptiQuant Plus Proteomics Kit. Всего было идентифицировано 125 белков. Идентификацию белков осуществляли методом мониторинга множественных реакций на тройном квадруполь-времяпролетном масс-спектрометре сверхвысокого разрешения с ионизацией электроспреем, комбинированном с высокоэффективным жидкостным хроматографом.

Анализ дифференциальной экспрессии белка был проведен по двум техническим повторам каждого образца. В результате сравнительного анализа были выделены белки, концентрация которых статистически значимо различалась в исследуемых группах ($p < 0,05$).

Один из основных белков свертывающей системы крови, фибриноген, значительно отличался в исследуемых группах. В группе пациентов с нестабильными бляшками концентрация каждой из двух изоформ фибриногена (chain α и chain γ) была в 1,8 и 2,5 раза выше (таблица). При этом уровень связанного с фибриногеном и участвующего в образовании сгустка фибулина был также выше в группе пациентов с нестабильными бляшками. Кроме того, многофакторный логистический анализ показал, что нестабильность атеросклеротических бляшек ассоциирована с концентрацией фибулина-1 ($\text{Exp}(B) = 1,008$; 95%-й доверительный интервал (ДИ) 1,000–1,015; $p = 0,05$).

В нашем исследовании уровень главного компонента фибринолитической системы плазминогена был выше в группе пациентов со стабильными бляшками ($p < 0,05$). Также многофакторный логистический анализ показал, что нестабильность атеросклеротических бляшек отрицательно ассоциирована с концентрацией плазминогена ($\text{Exp}(B) = 0,995$; 95%-й ДИ 0,990–0,999; $p = 0,027$), кофактором гепарина 2 ($\text{Exp}(B) = 0,999$; 95%-й ДИ 0,998–1,000; $p = 0,010$) и коагуляционным фактором X ($\text{Exp}(B) = 0,973$; 95%-й ДИ 0,949–0,998; $p = 0,037$). Фибринолитическая активность крови зависит также от ингибиторов фибринолиза. Концентрация ингибитора активатора плазминогена-1 (PAI-1) на 13% была выше в группе пациентов со стабильными бляшками, но уровня статистической значимости не достигала ($p = 0,102$).

Таблица

Количественная масс-спектрометрическая идентификация белков в крови, Me [Q_{25} ; Q_{75}]			
Название белка	Концентрация белка, fmol/ μ l		<i>p</i>
	Группа 1	Группа 2	
Фибриноген, chain α	143,5 [139,4;147,7]	254,4 [243,6;284,9]	0,006
Фибриноген, chain γ	45,9 [40,9;52,1]	120,9 [45,4;165,8]	0,005
Фибулин-1	663,9 [576,1;748,6]	735,2 [600,4;796,0]	0,038
Фибронектин	429,6 [234,0;522,5]	256,2 [197,9;402,3]	0,161
Тромбоспондин-1	75,0 [63,0;95,2]	75,1 [53,8;89,8]	0,419
Витронектин	2839,5 [2166,2;3362,2]	2151,0 [1654,0;2878,0]	0,005
α -2-антиплазмин	522,2 [427,2;649,4]	472,2 [323,4;599,2]	0,034
α -2-макроглобулин	4885,0 [4342,5;5345,5]	4714,5 [3324,5;5868,2]	0,376
Антитромбин III	3880,0 [2460,75;4845,75]	3272,5 [3017,5;4291,0]	0,844
Кофактор гепарина 2	4274,5 [4057,7;4577,5]	3803,0 [3055,0;4233,0]	0,0001
Коагуляционный фактор IX	87,8 [67,7;107,9]	74,1 [48,2;124,0]	0,166
Коагуляционный фактор X	136,0 [107,5;142,4]	105,3 [92,3;123,3]	0,065
Коагуляционный фактор XII	419,4 [294,9;525,0]	291,1 [265,8;380,6]	0,0001
Кининоген-1	178,3 [162,5;205,7]	175,5 [154,9;192,1]	0,346
Компонент комплемента C1q, subunit B	67,1 [53,3;95,9]	68,5 [57,2;80,2]	0,538
Компонент комплемента C1q, subunit C	106,2 [93,8;143,3]	112,1 [92,4;146,5]	0,939
Компонент комплемента C1r	251,2 [169,7;273,6]	194,0 [164,2;242,5]	0,106
Компонент комплемента C1s	47,4 [42,8;54,0]	43,8 [34,0;74,8]	0,729
Компонент комплемента C3	586,8 [469,1;717,1]	471,8 [408,7;572,0]	0,008
Компонент комплемента C7	75,9 [56,4;82,0]	60,4 [54,2;74,9]	0,006
Компонент комплемента C9	191,3 [113,9;212,5]	137,7 [75,4;185,5]	0,026
Фактор комплемента В	4985,0 [3585,0;6251,2]	3980,5 [3698,0;4358,7]	0,017
Фактор комплемента Н	526,4 [463,3;587,8]	581,4 [531,9;626,6]	0,018
Ингибитор протеазы плазмы C1	2037,0 [1565,0;2294,0]	1651,5 [1092,0;2234,7]	0,041
Ингибитор сериновой протеазы плазмы	51,4 [48,2;62,1]	49,4 [46,5;74,6]	0,769
Ингибитор активатора плазминогена-1	27,6 [21,1;36,4]	24,1 [19,2;32,1]	0,102
Плазминоген	933,1 [833,2;1050,5]	803,5 [695,6;879,2]	0,001
Протромбин	902,2 [711,1;1044,2]	788,4 [718,7;821,1]	0,047

Кроме того, у пациентов со стабильными бляшками концентрация белков, первичных антикоагулянтов (α -2-антиплазмин, α -2-макроглобулин, кофактор гепарина 2), была значительно выше (см. таблицу). При этом содержание в крови антикоагулянта антитромбина III было выше у пациентов с нестабильными бляшками. Антитромбин III является универсальным ингибитором тромбина и почти всех факторов свертывания, что подтверждается нашим исследованием, уровень коагуляционных факторов IX, X и XII ниже у пациентов группы 2.

При этом уровень коагуляционного фактора XII в группе пациентов со стабильными бляшками был достоверно выше. Высокоактивированный фактор XII в комплексе с кининогеном обуславливает внутреннюю активацию фибринолиза. В нашем исследовании уровень кининогена был выше в группе пациентов со стабильными бляшками, но уровня статистической значимости не достигал.

Существует взаимосвязь между механизмами образования тромбов и иммунной активацией. В

нашем исследовании значимой разницы между субкомпонентами C1 (C1q; C1r; C1s) в исследуемых группах не обнаружено (см. таблицу). Но суммарно содержание компонента комплемента C1 было выше в группе пациентов со стабильными АБ, чем с нестабильными АБ, и составила 471,37 fmol/ μ l против 446,48 fmol/ μ l ($p < 0,0001$). Содержание компонентов комплемента C3, C7, C9 и фактора комплемента В было выше в группе пациентов со стабильными АБ ($p < 0,05$). А уровень фактора комплемента Н, принимающего участие в инактивации C3b, был выше на 10% в группе пациентов с нестабильными АБ (см. таблицу).

Фибронектин, тромбоспондин и витронектин также участвуют в каскаде коагуляции, способствуя адгезии тромбоцитов. В нашем исследовании значимой разницы в содержании фибронектина и тромбоспондина между исследуемыми группами не обнаружено. А концентрация витронектина была значительно выше у пациентов со стабильными бляшками ($p = 0,005$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Процесс атеросклероза неразрывно связан с воспалением и эндотелиальной дисфункцией сосудов. Неповрежденный эндотелий сосудов обладает тромборезистентностью, а поврежденный эндотелий — значительными прокоагулянтными свойствами.

В нашем исследовании уровень фибриногена и связанного с ним фибулина-1 значительно отличался в исследуемых группах. Концентрация каждой из двух изоформ фибриногена (chain α и chain γ) и фибулина-1 была выше в группе пациентов с нестабильными бляшками. Многофакторный логистический анализ показал, что нестабильность АБ ассоциирована с концентрацией фибулина-1. Ранее нами было установлено, что максимальное количество фибриногена было в ткани стабильных фиброзных АБ, а в нестабильных АБ уровень белка был значительно ниже [3]. Таким образом, мы предполагаем, что высокая концентрация фибриногена и фибулина-1 может быть перспективными биомаркерами нестабильности АБ в крови пациентов с коронарным атеросклерозом.

Белки фибронектин, тромбоспондин и витронектин участвуют в каскаде коагуляции. Показано, что активация тромбоцитов приводит к локальному высвобождению фибриногена, фибронектина, vWF, тромбоспондина, витронектина и факторов свертывания, способствуя адгезии тромбоцитов и усилению коагуляции [4]. В нашем исследовании значимой разницы в содержании фибронектина и тромбоспондина между исследуемыми группами не обнаружено.

Витронектин является основным гликопротеином клеточной адгезии, содержащимся в плазме и внеклеточном матриксе. Повышенная экспрессия витронектина может способствовать развитию хронических сосудистых заболеваний, таких как атеросклероз, играя важную роль в гомеостазе сосудов и патологическом ремоделировании сосудов. Ингибитор активатора плазминогена (РАИ-1) стимулировал экспрессию витронектина путем связывания белка-1, ассоциированного с рецептором липопротеинов низкой плотности. Концентрация витронектина в плазме крови была значительно снижена у мышей с дефицитом РАИ-1 по сравнению с контролем [5]. Витронектин, связываясь с РАИ-1, принимает участие в активации фибринолиза. При атеросклерозе сонных артерий показано, что уровень РАИ-1 в плазме крови был снижен в группе пациентов по сравнению с контролем. При этом уровень РАИ-1 положительно коррелировал с уровнем витронектина в группе пациентов с атеросклерозом, возможно, из-за повышения фибринолитической активности и прогресси-

рования заболевания за счет усиления сосудистого ремоделирования [6]. Уровень витронектина в крови у пациентов с ИБС значительно выше, чем в контрольной группе. Предположительно, витронектин является маркером ИБС [7]. В нашем исследовании концентрация витронектина в крови была значительно выше у пациентов со стабильными бляшками.

Ранее в проспективном когортном исследовании было установлено, что высокие уровни факторов IX и XI и α -2-антиплазмина были связаны с повышенным риском ИБС и не зависели от других факторов коронарного риска [8]. Показаны корреляционные связи между уровнем фактора XII в крови и наличием уязвимых атеросклеротических бляшек в коронарных артериях [9].

В нашем исследовании у пациентов со стабильными бляшками концентрации белков α -2-антиплазмина, α -2-макроглобулина, кофактора гепарина 2, коагуляционного фактора XII были значительно выше, чем во второй группе. Антитромбин III (АТ-III) является универсальным ингибитором тромбина и почти всех факторов свертывания, но в нашем исследовании концентрация в крови АТ-III была выше у пациентов с нестабильными бляшками, хотя уровня статистической значимости не достигнуто.

Уровень коагуляционных факторов IX, X и XII был ниже у пациентов 2-й группы. При этом логистический регрессионный анализ показал, что нестабильность АБ имеет отрицательную связь с концентрацией коагуляционного фактора X, кофактора гепарина 2 и плазминогена.

Ранее было показано, что уровень АТ-III был снижен в подгруппе высокого риска острого коронарного синдрома (ОКС) по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). Модель логистической регрессии продемонстрировала, что АТ-III был защитным фактором ($OR = 0,958$; $p = 0,012$) для ОКС. Уровень АТ-III продемонстрировал прогностические значения у пациентов с ОКС и был связан с тяжестью стеноза коронарной артерии [10]. В то же время сниженный уровень АТ-III не является независимым фактором риска развития инфаркта миокарда [11].

Высокоактивированный фактор XII в комплексе с кининогеном обуславливает внутреннюю активацию фибринолиза. Кининоген является предшественником брадикинина и каллидина, белков, вызывающих вазодилатацию и сокращение гладких мышц. Кроме того, что кинины известны своей способностью к индукции оксида азота и простаглицлина, которые опосредуют кардиопротекцию, брадикинин способствует воспалению, фиброплазии и фиброзу после инфаркта миокарда у крыс [12]. Таким образом, кининоген играет роль в воспалении, контроле

артериального давления, коагуляции и возникновении болевых ощущений. При дефиците кининогена происходит снижение уровня брадикинина, не влияющее на функцию левого желудочка, но влияющее на риск развития ишемической болезни сердца [13]. В нашем исследовании уровень кининогена не различался в исследуемых группах пациентов. Но обнаружен высокий уровень плазминогена и ингибитора фибринолиза PAI-1 в группе пациентов со стабильными бляшками.

Существует взаимосвязь между иммунной активацией, воспалением и механизмами образования тромбов. Система комплемента – не только элемент врожденного иммунного ответа, но и ключевой медиатор воспалительного процесса [14]. Белки системы комплемента неоднократно ассоциировались с ремоделированием сосудов и атеросклерозом [15, 16].

Накапливающиеся данные исследований указывают на то, что аномалия компонентов комплемента и возникающая чрезмерная активация комплемента связаны с атерогенезом. Обнаружение отложений C3b/iC3b и MAC в атеросклеротических артериях указывает на повышенную активацию комплемента [17]. Система комплемента может модулировать активацию тромбоцитов и последующее образование тромбов. Сообщалось, что несколько компонентов системы комплемента, включая C3 и мембраноатакующий комплекс, связаны с тромбоцитами и становятся функционально действующими при активации тромбоцитов [18].

Система комплемента может быть активирована одним из трех путей: классическим, альтернативным и лектиновым. Все три сходятся на уровне C3 с образованием конвертаз C5, что в конечном итоге приводит к полимеризации C9 и сборке комплексов мембранной атаки. Классический путь активируется распознаванием антител C1q или апоптотических клеток, связанных с антигенами или микробными поверхностями. Воздействие C1q на его мишень приводит к активации сериновых протеаз C1r и C1s, за которыми следует C1s-опосредованное расщепление C4 на анафилатоксин C4a и опсонин C4b [14, 18]. Тромбоциты могут также высвобождать C1q при активации, тем самым активируя другие тромбоциты [19]. Существует несколько точек взаимодействия в каскаде комплемента и системе свертывания крови (например, фактор XIIa, который может активировать C1q и, следовательно, классический путь комплемента [20]).

В нашем исследовании значимой разницы между субкомпонентами C1 (C1q; C1r; C1s) в исследуемых группах не обнаружено. Но суммарно содержание компонента комплемента C1 было выше в группе пациентов со стабильными АБ, а содержание компо-

нентов комплемента C3, C7, C9 и фактора комплемента В было выше в группе пациентов со стабильными АБ ($p < 0,05$). Уровень фактора комплемента Н, служащего кофактором для инактивации C3b, был выше в группе пациентов с нестабильными АБ (см. таблицу).

Ранее проведенные исследования методом иммуно-ферментного анализа показали высокий уровень C5b-9 в утолщении интимы и фиброзных бляшках по сравнению с нормальной тканью. При этом уровень C5b-9 в утолщениях интимы были выше, чем в фиброзных бляшках. Это позволило авторам предположить, что активация комплемента происходит непосредственно в стенке артерии и является активной частью атерогенеза [16].

Воспаление и активация системы комплемента C5b-9 predisполагают к разрыву аневризмы внутричерепной артерии [21]. В эксперименте на животных показано, что фактор комплемента C5a и его рецептор C5aR экспрессируются в уязвимых атеросклеротических бляшках. Значительное увеличение C5aR в бляшке было обнаружено у мышей, получавших C5a, при этом местное лечение C5a привело к поразительному увеличению количества разрушений бляшки с сопутствующим кровотечением. Кроме того, гладкомышечные клетки и эндотелиальные клетки после обработки C5a *in vitro* показали заметное увеличение апоптоза, что может способствовать нестабильности поражения *in vivo* [22]. Также было обнаружено, что мембраноатакующий комплекс может играть решающую роль в образовании бляшек и разрыве аневризм [23]. В нашем исследовании мы не получили повышения концентрации компонентов комплемента C7 и C9, участвующих в образовании мембраноатакующего комплекса, в крови пациентов с нестабильными бляшками. По-видимому, данный процесс носит исключительно локальный характер в ткани атеросклеротической бляшки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Возможность использования исследованных белков как биомаркеров нестабильности АБ при коронарном атеросклерозе требует дальнейших исследований их потенциальной роли в развитии данного заболевания. Результаты этого исследования, полученные с помощью современного метода количественной протеомики, выявили в образцах сыворотки крови у пациентов с нестабильными АБ повышенные концентрации белков: фактора комплемента Н, фибриногена и фибулина-1. При одновременном сниженном уровне белков, участвующих в каскаде коагуляции, процессе фибринолиза, и белков, связанных с ними функционально (α -2-антиплазмин,

α -2-макроглобулин, кофактор гепарина 2, коагуляционный фактор XII, протромбин, плазминоген, PAI-1, витронектин), в группе пациентов с нестабильными АБ идентифицированы сниженные концентрации белков комплемента (C1, C3, C7, C9) и фактора комплемента В, ассоциированные с процессами коагуляции и фибринолиза.

Наши данные показали, что при угнетении коагуляционного и фибринолитических процессов в крови пациентов с нестабильными АБ значительно повышена концентрация белков фибулина-1 и фибриногена. Это подтвердил многофакторный логистический регрессионный анализ, показавший связь нестабильности с концентрацией фибулина-1 ($\text{Exp}(B) = 1,008$; $p = 0,05$).

Таким образом, возможно, что повышенная концентрация фибулина-1 в крови может рассматриваться как перспективный потенциальный биомаркер нестабильности АБ при коронарном атеросклерозе.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Bos D., Arshi B., van den Bouwhuijsen Q.J.A., Ikram M.K., Selwaness M., Vernooij M.W. et al. Atherosclerotic carotid plaque composition and Incident stroke and coronary events. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2021;77(11):1426–1435. DOI: 10.1016/j.jacc.2021.01.038
2. Yuan S., Burgess S., Laffan M., Mason A.M., Dichgans M., Gill D. et al. Genetically proxied Inhibition of Coagulation Factors and Risk of Cardiovascular Disease: A Mendelian Randomization Study. *J. Am. Heart Assoc.* 2021;10(8):e019644. DOI: 10.1161/JAHA.120.019644.
3. Stakhneva E.M., Meshcheryakova I.A., Demidov E.A., Starostin K.V., Sadovski E.V., Peltek S.E. et al. A Proteomic Study of Atherosclerotic Plaques in Men with Coronary Atherosclerosis. *Diagnostics.* 2019;9(4):E177. DOI: 10.3390/diagnostics9040177.
4. Badimon L., Vilahur G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J. Intern. Med.* 2014;276(6):618–632. DOI: 10.1111/joim.12296.
5. Luo M., Ji Y., Luo Y., Li R., Fay W.P., Wu J. Plasminogen activator inhibitor-1 regulates the vascular expression of vitronectin. *J. Thromb. Haemost.* 2017;15(12):2451–2460. DOI: 10.1111/jth.13869.
6. Ekmekçi H., Güngör Öztürk Z., Ekmekçi O.B., İşler Bütün I., Beşirli K., Gode S. et al. Significance of vitronectin and PAI-1 activity levels in carotid artery disease: comparison of symptomatic and asymptomatic patients. *Minerva Med.* 2013;104(2):215–223.
7. Ekmekci H., Sonmez H., Ekmekci O.B., Ozturk Z., Domanic N., Kokoglu E. Plasma vitronectin levels in patients with coronary atherosclerosis are increased and correlate with extent of disease. *J. Thromb. Thrombolysis.* 2002;14(3):221–225. DOI: 10.1023/a:1025000810466.
8. Yamagishi K., Aleksic N., Hannan P.J., Folsom A.R.; ARIC Study Investigators. Coagulation factors II, V, IX, X, XI, and XII, plasminogen, and alpha-2 antiplasmin and risk of coronary heart disease. *J. Atheroscler. Thromb.* 2010;17(4):402–409. DOI: 10.5551/jat.3673.
9. Ragino Y.I., Striukova E.V., Murashov I.S., Polonskaya Y.V., Volkov A.M., Kurguzov A.V. et al. Association of some hemostasis and endothelial dysfunction factors with probability of presence of vulnerable atherosclerotic plaques in patients with coronary atherosclerosis. *BMC Res. Notes.* 2019;12(1):336. DOI: 10.1186/s13104-019-4360-7.
10. Lu J., Niu D., Zheng D., Zhang Q., Li W. Predictive value of combining the level of lipoprotein-associated phospholipase A2 and antithrombin III for acute coronary syndrome risk. *Biomed. Rep.* 2018;9(6):517–522. DOI: 10.3892/br.2018.1162.
11. Elmissbah T.E., Iderous M.E., Al-Qahtani F.M., Elaskary A., Dahlawi H. Assessment of antithrombin III and protein C in Saudi myocardial infarction patients. *Clin. Lab.* 2021;67(10). DOI: 10.7754/Clin.Lab.2021.201206.
12. Sridharan V., Tripathi P., Sharma S.K., Moros E.G., Corry P.M., Lieblong B.J. et al. Cardiac inflammation after local irradiation is influenced by the kallikrein-kinin system. *Cancer Res.* 2012;72(19):4984–4992. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1831
13. Koch M., Bonaventura K., Spillmann F., Dendorfer A., Schultheiss H.P., Tschöpe C. Attenuation of left ventricular dysfunction by an ACE inhibitor after myocardial infarction in a kininogen-deficient rat model. *Biol. Chem.* 2008;389(6):719–723. DOI: 10.1515/BC.2008.083.
14. Lubbers R., van Essen M.F., van Kooten C., Trouw L.A. Production of complement components by cells of the immune system. *Clin. Exp. Immunol.* 2017;188(2):183–194. DOI: 10.1111/cei.12952.
15. Martin-Ventura J.L., Martinez-Lopez D., Roldan-Montero R., Gomez-Guerrero C., Blanco-Colio L.M. Role of complement system in pathological remodeling of the vascular wall. *Mol. Immunol.* 2019;114:207–215. DOI: 10.1016/j.molimm.2019.06.016.
16. Vlaicu S.I., Tatmir A., Rus V., Mekala A.P., Mircea P.A., Niculescu F. et al. The role of complement activation in atherogenesis: the first 40 years. *Immunol. Res.* 2016;64(1):1–13. DOI: 10.1007/s12026-015-8669-6.
17. Ge X., Xu C., Liu Y., Zhu K., Zeng H., Su J. et al. Complement activation in the arteries of patients with severe atherosclerosis. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2018;11(1):1–9.
18. Rawish E., Sauter M., Sauter R., Nording H., Langer H.F. Complement, inflammation and thrombosis. *Br. J. Pharmacol.* 2021;178(14):2892–2904. DOI: 10.1111/bph.15476.
19. Speth C., Rambach G., Würzner R., Lass-Flörl C., Kozarcanin H., Hamad O.A. et al. Complement and platelets: Mutual interference in the immune network. *Mol. Immunol.* 2015;67(1):108–118. DOI: 10.1016/j.molimm.2015.03.244.
20. Amara U., Rittirsch D., Flierl M., Bruckner U., Klos A., Gebhard F. et al. Interaction between the coagulation and complement system. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2008;632:71–79. DOI: 10.1007/978-0-387-78952-1_6.
21. Tulamo R., Frösen J., Paetau A., Seitsonen S., Hernesniemi J., Niemelä M. et al. Lack of complement inhibitors in the outer intracranial artery aneurysm wall associates with complement terminal pathway activation. *Am. J. Pathol.* 2010;177(6):3224–

3232. DOI: 10.2353/ajpath.2010.091172.
22. Wezel A., de Vries M.R., Lagraauw H.M., Foks A.C., Kuiper J., Quax P.H. et al. Complement factor C5a induces atherosclerotic plaque disruptions. *J. Cell Mol. Med.* 2014;18(10):2020–2030. DOI: 10.1111/jcmm.12357.
23. Wu G., Hu W., Shahsafaei A., Song W., Dobarro M., Sukhova G.K. et al. Complement regulator CD59 protects against atherosclerosis by restricting the formation of complement membrane attack complex. *Circ. Res.* 2009;104(4):550558. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.191361.

Вклад авторов

Стахнёва Е.М. – разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных. Каштанова Е.В. – проверка критически важного интеллектуального содержания. Полонская Я.В., Стрюкова Е.В., Шрамко В.С., Садовский Е.В., Кургузов А.В., Мурашов И.С. – анализ и интерпретация данных. Чернявский А.М., Рагино Ю.И. – окончательное утверждение для публикации рукописи.

Информация об авторах

Стахнёва Екатерина Михайловна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний, НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск, stahneva@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0003-0484-6540>.

Каштанова Елена Владимировна – д-р биол. наук, вед. науч. сотрудник, зав. лабораторией клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний, НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск, elekstanova@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0003-2268-4186>

Полонская Яна Владимировна – д-р биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний, НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск, yana-polonskaya@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-3538-0280>;

Стрюкова Елена Владимировна – канд. мед. наук, науч. сотрудник, лаборатория клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний, НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск, strukova.j@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0001-5316-4664>

Шрамко Виктория Сергеевна – канд. мед. наук, науч. сотрудник, лаборатория клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний, НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск, nosova@211.ru, <http://orcid.org/0000-0002-0436-2549>

Садовский Евгений Викторович – мл. науч. сотрудник, лаборатория клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний, НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск, stinger000@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0001-7350-534X>

Кургузов Алексей Витальевич – врач-кардиолог, кардиохирургическое отделение аорты и коронарных артерий, НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина, г. Новосибирск, <http://orcid.org/0000-0003-1345-2199> aleksey_kurguzov@mail.ru

Мурашов Иван Сергеевич – канд. мед. наук, науч. сотрудник, лаборатория патоморфологии, НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина, г. Новосибирск, ivmurashov@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0002-3712-1258>

Чернявский Александр Михайлович – д-р мед. наук, профессор, директор НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина, г. Новосибирск, amchern@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0001-9818-8678>

Рагино Юлия Игоревна – д-р мед. наук, профессор, чл.-корр. РАН, руководитель НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск, ragino@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-4936-8362>

(✉) Стахнёва Екатерина Михайловна, stahneva@yandex.ru

Поступила в редакцию 06.05.2022;
одобрена после рецензирования 27.06.2022;
принята к публикации 08.09.2022