

ЖЕТИШЕВА РАДИМА АНАТОЛЬЕВНА

**ПРОТЕОМНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ
БЕЛКОВОГО СОСТАВА АОРТЫ БОЛЬНЫХ
АТЕРОСКЛЕРОЗОМ: ПОИСК И ИДЕНТИФИКАЦИЯ
БЕЛКОВЫХ АУТОАНТИГЕНОВ**

14.01.05 – Кардиология

03.01.04 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

МОСКВА

2021

Работа выполнена в отделе проблем атеросклероза НИИ клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор
доктор биологических наук

НАУМОВ Владимир Геннадьевич
КОВАЛЕВ Леонид Иванович

Официальные оппоненты:

Затейщиков Дмитрий Александрович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий первичным сосудистым отделением Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Городская клиническая больница №51 Департамента здравоохранения города Москвы»

Метельская Виктория Алексеевна – доктор биологических наук, профессор, руководитель, главный научный сотрудник отдела изучения биохимических маркеров риска хронических неинфекционных заболеваний Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальной медицинской исследовательской центр терапии и профилактической медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «__» _____ 2021 года в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.073.05 по присуждению ученой степени кандидата медицинских наук Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 121552, г. Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15А

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (121552, г.Москва, ул. 3-я Черепковская, д.15А) и на сайте <https://cardioweb.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2021 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Ускач Татьяна Марковна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Несмотря на заметные успехи в медицине за последние несколько десятилетий, сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) по-прежнему являются основной причиной заболеваемости и смертности. По данным ВОЗ, примерно одна треть всех смертей в мире связана с ишемической болезнью сердца (ИБС) [Информационный бюллетень ВОЗ, 2015]. В большинстве случаев причиной ССЗ является атеросклероз. В настоящее время атеросклероз рассматривается как мультифакторное заболевание, в основе которого лежит сочетание нарушений липидного обмена, воздействие поражающих эндотелий факторов и включение иммунологических механизмов с клеточным и гуморальным ответом [Сергиенко И.В., Аншалес А.А., Кухарчук В.В., 2018]. Однако, несмотря на многочисленные исследования, до сих пор этиология и патогенез атеросклероза не совсем ясны [Libby P., Ridker P.M., 2011]. В этой связи, особое внимание в настоящее время уделяется протеомному исследованию атеросклероза, изучению белкового состава сыворотки крови, мочи, пораженных атеросклеротических очагов *ex vivo*. Большинство таких работ выполнено на животных моделях [Fuster J.J., Castillo A.I. et al., 2012].

Поиск биомаркеров коронарного атеросклероза, ССЗ является перспективным направлением современной медицинской диагностики. В клинической практике используются различные биомаркеры, но многие из них не полностью соответствуют современным клиническим требованиям. Среди всех возможных технологий поиска новых биомаркеров заболеваний протеомные являются наиболее перспективными. Протеомика - исследование структуры и функции белков, включающая в себя быстро развивающуюся клиническую протеомику, которая направлена на идентификацию белков, участвующих в патогенезе различных заболеваний, изучение их экспрессии и состава. Известно, что геном человека содержит не менее 30000 генов, которые кодируют более миллиона белков [Venter J.C., Adams M.D., et al., 2001]. Идентификация конкретных белков может дать четкое понимание патогенеза различных

заболеваний [Wang X.L., Fu A., et al., 2008]. Особое значение приобретают протеомные технологии при изучении патогенеза атеросклероза [Говорун В.М., Арчаков А.И., 2002].

Цель исследования: определить изменения белкового состава интимы и медиального слоя аорты (грудной отдел) больных атеросклерозом, выявить и идентифицировать аутоантигены с использованием протеомных технологий.

Задачи исследования:

1. Исследовать с помощью протеомных методов белковый состав интимы и медиального слоя аутопсийных образцов грудного отдела аорты с атеросклеротическими изменениями и без.

2. Провести масс-спектрометрическую идентификацию основных белков.

3. Выявить изменения в составе белков интимы и медиального слоя грудного отдела аорты при атеросклеротическом поражении с использованием двумерного электрофореза.

4. Провести сравнительный анализ белкового состава интимы и медиального слоя грудного отдела аорты в зависимости от степени атеросклеротического поражения.

5. Выявить и идентифицировать аутоантигены среди белков интимы и медиального слоя грудного отдела аорты.

6. Определить взаимосвязь между наличием факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний, биохимическими показателями и реакцией на белки сывороток крови в группах с начальными признаками атеросклероза, распространенным атеросклерозом и условно здоровых.

Научная новизна: Впервые с использованием современных протеомных технологий, включая масс-спектрометрическую идентификацию, удалось расширить базу данных белков интимы и медиального слоя аорты в норме с 29 до 98, а при атеросклеротическом поражении выявить и идентифицировать и атипичные фракции, в частности: аполипопротеин A1 (*APOA1*), β -фибриноген (*FGB*), γ -фибриноген (*FGG*), макрофаг кэспирующий белок (*CAPG*), катепсин D (*CTSD*), легкие и тяжелые цепи ферритина (*FTH/FTL*), гаптоглобин (*HP*),

супероксиддисмутаза (*SOD3*), трансгелин (*TAGLN*). Выявлено, что накопление атипичных белков увеличивается в зоне липофиброзных бляшек. Показано, что в сыворотках крови больных с атеросклерозом при проведении двумерного иммуноблоттинга выявляются антитела к атипичным белковым фракциям. Это позволяет рассматривать их как аутоантигены. В качестве возможных аутоантигенов выявлены ламин А/С (*LMNA*), проларгин (*PRELP*), альфа-енолаза/лактадгерин (*ENO1/MFGE8*), лактадгерин (*MFGE8*), трансгелин (*TAGLN*), аполипопротеин А1 (*APOA1*), α -1 антитрипсин (*SERPINA1*), r-ras онкоген (*RRAS*), аннексин А4 (*ANXA4*).

Теоретическая и практическая значимость: Полученные данные позволили существенно дополнить компьютерную базу данных о белковом составе аорты в норме и при атеросклеротическом поражении, что может служить ориентиром для дальнейших исследований в данном направлении. Впервые выявленные в ходе исследования аутоантигены и антитела к ним у больных атеросклерозом в перспективе могут быть использованы как новые биомаркеры атеросклероза.

Положения, выносимые на защиту:

1. Исследование белкового состава интимы и медиального слоя грудного отдела аорты в норме и при патологии с использованием протеомных технологий является перспективным направлением изучения патогенеза атеросклероза. Существуют специфичные белки как для интимы, так и для медиального слоя грудного отдела аорты.

2. Предполагается важнейшая роль изменений ряда белков интимы и медиального слоя грудного отдела аорты и кодирующих их генов (аполипопротеин А1, β -фибриноген, γ -фибриноген, катепсин D, комплекс легких и тяжелых цепей ферритина, гаптоглобин, трансгелин) в дебюте и прогрессировании атеросклероза.

3. Существует корреляция между определенными факторами сердечно-сосудистого риска (курение, дислипидемия, наличие острых сосудистых событий в анамнезе, сахарный диабет) и измененными белками или белковыми фракциями

интимы и медиального слоя грудного отдела аорты при атеросклерозе. Степень этой корреляции возрастает при прогрессировании атеросклероза.

4. Наличие атеросклеротических изменений грудного отдела аорты в зависимости от степени их выраженности сопряжено с появлением аутоантигенов, верификация которых может использоваться при определении иммунного статуса и стратификации риска атеросклероза у пациентов.

5. Возможно установление выраженности атеросклеротического процесса у больных, определяя иммунный ответ сывороток крови при иммуноблоттинге, что может быть в будущем перспективно при подборе терапии.

Внедрение в практику: Результаты исследования внедрены в научную и практическую работу отдела проблем атеросклероза НИИ клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Степень достоверности и апробация работы. Достоверность результатов диссертации основана на использовании современных клинических, лабораторных и инструментальных методов, применении стандартных статистических тестов. Материалы диссертации были доложены на межотделенческой конференции по апробации кандидатских диссертаций НИИ клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России 2 июля 2019 года, протокол № 62.

Публикации. По теме опубликовано 27 печатных работ, из них 8 - статьи в журналах, входящих в перечень Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования и науки Российской Федерации, 19 тезисов как в отечественных (7), так и в зарубежных (12) сборниках трудов научных конференций.

В 2015 году материалы по научной теме были представлены на Международном образовательном форуме «Российские дни сердца» (Москва, 2015 г.); на 17-м Международном симпозиуме по атеросклерозу в Амстердаме (Нидерланды, 2015 г.); на 84-м конгрессе Европейского общества атеросклероза в

Инсбруке (Австрия, 2016 г.); на 85-м конгрессе Европейского общества атеросклероза в Праге (Чехия, 2017 г.); на 86-м конгрессе Европейского общества атеросклероза в Лиссабоне (Португалия, 2018 г.); на 87-м конгрессе Европейского общества атеросклероза в Маастрихте (Нидерланды, 2019 г.).

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 142 страницах машинописного текста, состоит из введения, четырех глав, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 162 публикации отечественных и зарубежных авторов. Текст диссертации иллюстрирован 25 таблицами и 37 рисунками.

Личный вклад автора: Автором проведен отбор больных согласно критериям включения и исключения, создана база данных, выполнена статистическая обработка материала, анализ и научная интерпретация полученных данных. Автор непосредственно участвовала в комплексном лабораторно-инструментальном обследовании больных, выполняла подбор и коррекцию терапии. Отбирала и подготавливала аутопсийные образцы грудного отдела аорты, проводила двумерный электрофорез и масс-спектрометрическую идентификацию белков вместе с сотрудниками лаборатории. Подготовила устные и стендовые доклады на различные отечественные и зарубежные конференции. Написала и опубликовала печатные работы в журналах, рекомендованных перечнем Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования и науки Российской Федерации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В научно-исследовательской работе проанализировано более 100 аутопсийных образцов грудного отдела аорты, полученные в течение суток после смерти от 24 умерших. Из них 17 мужчин и 7 женщин; 18 летальных случаев вследствие ССЗ, 6 – по другим причинам. Средний возраст составил $64,3 \pm 9,5$ лет; у мужчин – $63,8 \pm 10,2$, у женщин – $65,6 \pm 8,3$. От каждого умершего были взяты по

3-4 разных участка аорты (грудной отдел) с учетом атеросклеротического поражения.

Сыворотки крови были взяты у 69 мужчин, проходивших лечение и обследование в отделе проблем атеросклероза ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России.

Всем включенным в исследование проводилось обследование, включающее сбор жалоб, анамнеза заболевания, анамнеза жизни, физикальный осмотра, пальпацию, перкуссию, аускультацию, измерение артериального давления (АД), лабораторные и инструментальные методы обследования. В стационаре проводились электрокардиограмма (ЭКГ) в 12 стандартных отведениях, суточное мониторирование ЭКГ, эхокардиография (ЭХО-КГ), нагрузочный тредмил-тест, УЗДС артерий, коронарография (КАГ).

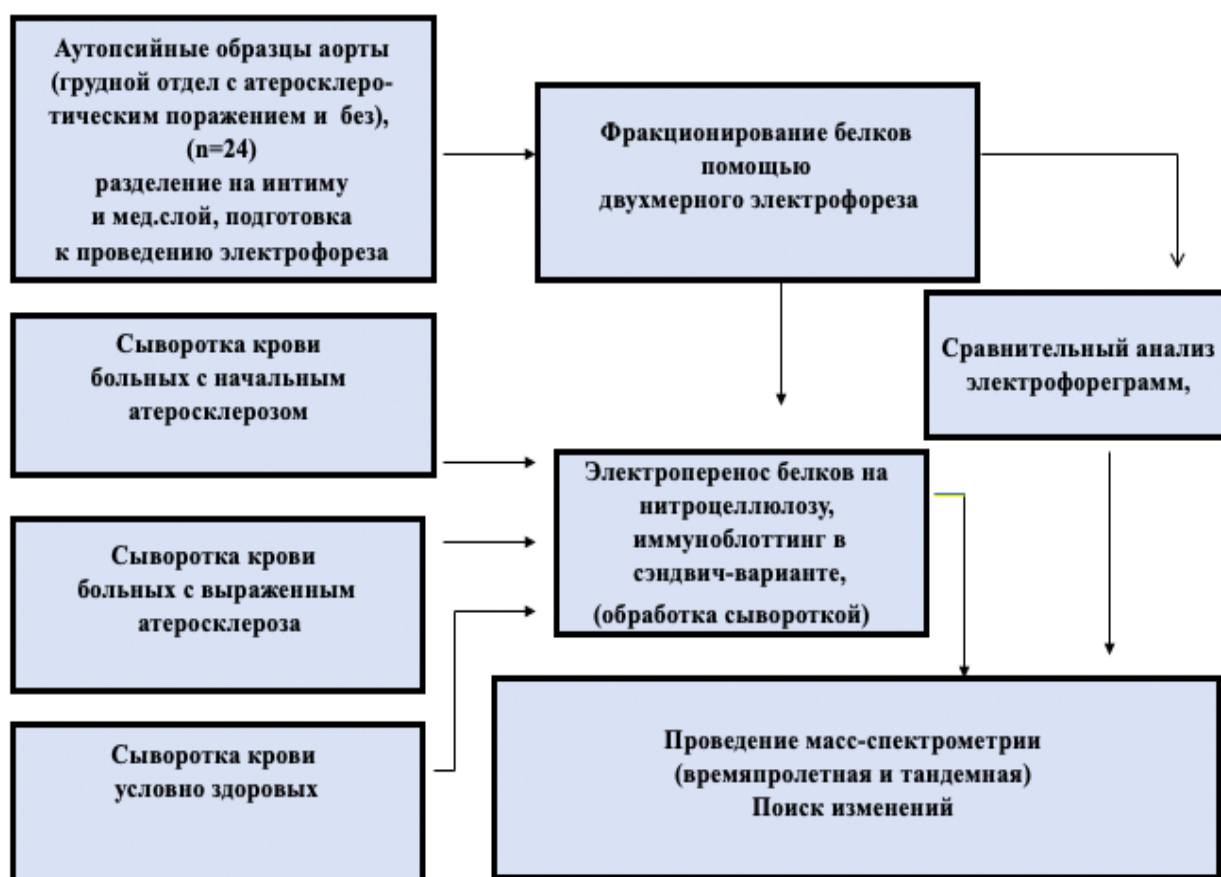


Рисунок 1- Дизайн исследования

Критериями исключения из исследования:

- отказ больного от участия в исследовании;
- наличие острых инфекционно-воспалительных заболеваний (в том числе и аутоиммунных);
- заболевания, требующие постоянного приема нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВС), глюкокортикостероидов;
- перенесенные операции аортокоронарного шунтирования (АКШ), каротидной эндартерэктомии, эндоваскулярные вмешательства любой локализации;
- перенесенные в течение последних трех месяцев инфаркт миокарда (ИМ), или острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК);
- симптоматические артериальные гипертонии (АГ);
- кардиальный синдром Х;
- хроническая почечная недостаточность и хроническая печеночная недостаточность.

Все пациенты были разделены на три группы: 1-я группа, включавшая 17 пациентов (средний возраст $54,9 \pm 13,6$ года), с начальным атеросклерозом, в том числе и коронарных артерий (критериями включения по данным УЗДС и КАГ были: неровности контуров и стенозы не более 30%); 2-я группа 37 пациентов (средний возраст $58,7 \pm 7,7$ лет) с распространенным атеросклерозом (критериями включения были стенозы 60% и более по данным УЗДС и КАГ); и 3-я группа, условно здоровые, в составе 15 человек (средний возраст $27,7 \pm 1,7$ лет) без проявлений атеросклероза. Клиническая характеристика пациентов представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Клиническая характеристика пациентов

Показатель	Группа 1 n=17	Группа 2 n=37	Группа 3 n=15
Возраст	54,9±13,6	58,7±7,7	27,7±1,7*
ИМТ (кг/м ²)	29,5±2,8	28,6±4,1	23,7±1,2
Анамнез (%)	41,2	37,8	20
Курение (%)	58,8	72,9	40
Наличие АГ (%)	88,2	94,6	0
ИМ (%)	0	43,2*	0
ОНМК (%)	0	5,4	0
НРС (%)	41,2	37,8	0
СД (%)	29,4	24,3	0

* - различия между группами достоверны ($p < 0,05$). Сравнение количественных признаков с использованием *t*-критерия Стьюдента. Примечание: ИМТ - индекс массы тела, АГ - артериальная гипертензия, ИМ - инфаркт миокарда, ОНМК - острое нарушение мозгового кровообращения, НРС - нарушение ритма сердца, СД - сахарный диабет

Протеомные исследования проводились на базе Института биохимии имени А. Н. Баха, Федерального исследовательского центра биотехнологии РАН. Проводили экстракцию белков из тканей, последующее фракционирование белков двумерным электрофорезом (2ДЭ) в полиакриламидном геле (ПААГ) по О'Фарреллу и окрашивание белковых фракций кумасси голубым R-250 (СВВ R-250) и азотнокислым серебром. Затем проводили масс-спектрометрическую идентификацию с использованием времяпролетной и тандемной масс-спектрометрии. Для выявления аутоантител к белкам аорты в крови больных использовали «сэндвич» - модификацию иммуноблоттинга. С этой целью белки ткани аорты фракционировали двумерным электрофорезом и переносили с гелей электроблоттингом на нитроцеллюлозные фильтры, которые обрабатывали препаратами сывороток крови (в качестве «первых антител») больных в

разведении 1:30, а затем - пероксидазным конъюгатом кроличьих антител («вторые антитела») против суммарных иммуноглобулинов человека. Для регистрации результатов фильтры инкубировали в 5 мМ растворе 4-хлор-1-нафтола, 6% этанола и 0,25% перекиси водорода. Белковые фракции, прореагировавшие как аутоантигены, вырезали из окрашенной двумерной электрофореграммы, использованной для электропереноса, и проводили масс-спектрометрическую идентификацию. Идентификацию белков проводили с помощью программы Mascot, опция Peptide Fingerprint («MatrixScience», США), с точностью определения массы MH^+ равной 0.01% (допуская возможность модификации цистеинов акриламидом и окисления метионинов), и по базам данных Национального центра биотехнологической информации США (NCBI).

Статистические методы исследования. Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием пакетов программ: Statistica 6.1; BIOSTAT, MS Office Excel 2003 [Microsoft]. Сравнение количественных признаков в двух независимых группах проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Результаты с уровнем значимости менее 0,05 рассматривали как статистически значимые. При попарном сравнении уровней в группах больных и контроле для расчета чувствительности, специфичности и относительного риска (OR) использовали таблицу сопряженности 2x2 с поправкой Йейтса на непрерывность [www.biometrika.tomsk]

Описательная статистика при нормальном распределении признака (в соответствии с результатами теста Колмогорова-Смирнова) была представлена в виде среднего значения и стандартного отклонения ($M \pm SD$). Описательная статистика качественных признаков была представлена также в виде абсолютных и относительных частот (процентов). Для сравнения двух независимых групп по одному признаку применялись U-критерий Уитни-Манна, критерий Хи-квадрат Пирсона, точный критерий Фишера (в случаях малых выборок). Сравнение трех независимых групп по одному признаку проводилось методом однофакторного дисперсионного анализа вариаций по Краскелу-Уоллису. Статистически значимыми различия считались при $p < 0,05$. Для выявления взаимосвязи двух

признаков применялся непараметрический корреляционный анализ по Спирмену и Кендаллу. Для исключения искажающих переменных проводился расчет частной корреляции.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Атеросклероз является одной из наиболее важных медико-социальных проблем, которая занимает ведущее место в структуре заболеваемости и смертности [Сергиенко И.В., Аншалес А.А., Кухарчук В.В., 2018]. Наблюдается значительный интерес к протеомике со стороны биомедицины как для раннего обнаружения и мониторинга болезней, так и для разработки более эффективных методов лечения на основе лучшего понимания патогенеза. Тщательный анализ белков в норме, а также из пораженной атеросклерозом ткани артерий мог бы обнаружить виды белков, которые участвуют в сосудистом ремоделировании и атерогенезе.

Протеомное исследование специфичности белкового состава интимы и медиального слоя грудного отдела аорты

Первым этапом было проведено послойное исследование интимы и медиального слоя грудного отдела аорты в норме (без поражения атеросклерозом), что позволило выявить и идентифицировать 98 постоянно встречающихся белковых фракций, тогда как ранее было выявлено лишь 29 белковых фракций. Полные результаты идентификации размещены в модуле «Белки медиального слоя аорты» базы данных «Протеомика мышечных органов» в интернете по адресу www.mp.inbi.ras.ru.

Сравнительный анализ белкового состава исследованных тканей показал, что можно выделить три группы: специфичные для интимы; специфичные для медиального слоя; общие для обеих структур. Для интимы оказались наиболее специфичными такие белковые фракции как, β -фибриноген (*FGB*), γ -фибриноген (*FGG*), ламин А/С (*LMNA*), проларгин (*PRELP*) и т.д. Для медиального слоя: кальпонин 1 (*CNN1*), трансгелины (*TAGLN*), протеин S100-A11 (*S100A11*) и

другие. Общие для обеих структур – аполипопротеин А1 (*APOA1*), глицеральальдегид-3-фосфат дегидрогеназа (*GAPDH*), виментин (*VIM*).

Полученные в нашей работы данные позволили выявить группы белков с множественными электрофоретическими изоформами и приступить к исследованию изменений белкового состава в ткани аорты, связанных с процессом атерогенеза.

Анализ выявленных белковых фракций в зависимости от стадии атеросклероза

Проведенный нами анализ выявления белковых фракций в зависимости от стадии атеросклеротического поражения показал, что белковые фракции аполипопротеина А1 (*APOA1*), фибриногена (*FGB*), фибриногена (*FGG*), макрофаг кэспирующего белка (*CAPG*), катепсина D (*CTSD*), легких и тяжелых цепей ферретина (*FTH/FLT*), гаптоглобина (*HP*), супероксиддисмутазы (*SOD3*), трансгелина (*TAGLN*) склонны к накоплению в тканях аорты грудного отдела пропорционально степени поражения атеросклерозом. Отмечается варьирование уровня белковых фракции от отсутствия и/или следового количества в норме до выраженного накопления при стадии липофиброзной бляшки (рисунок 2-4). Учитывая это, можно предположить, что они могут являться аутоантигенами.



Рисунок 2 – Выявление белковых фракций в нормальной ткани (аутопсийный материал, n = 24). Примечание: аполипопротеин А 1 (*APOA1*), фибриноген β

(FGB), фибриноген γ (FGG), макрофаг-кэппирующий белок (CAPG), катепсин D (CTSD), ферритин (FTH/FTL), гаптоглобин (HP), супероксиддисмутаза (SOD3), трансгелин (TAGLN)

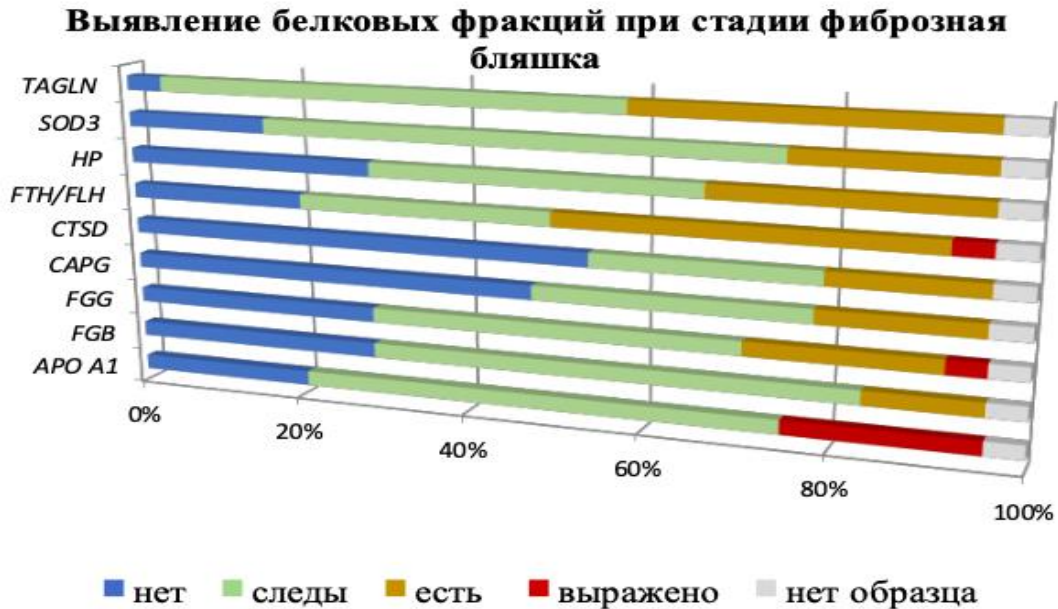


Рисунок 3 – Выявление белковых фракций в области бляшки (аутопсийный материал, $n = 24$). *Примечание: аполипротеин A 1 (APOA1), фибриноген β (FGB), фибриноген γ (FGG), макрофаг-кэппирующий белок (CAPG), катепсин D (CTSD), ферритин (FTH/FTL), гаптоглобин (HP), супероксиддисмутаза (SOD3), трансгелин (TAGLN)*

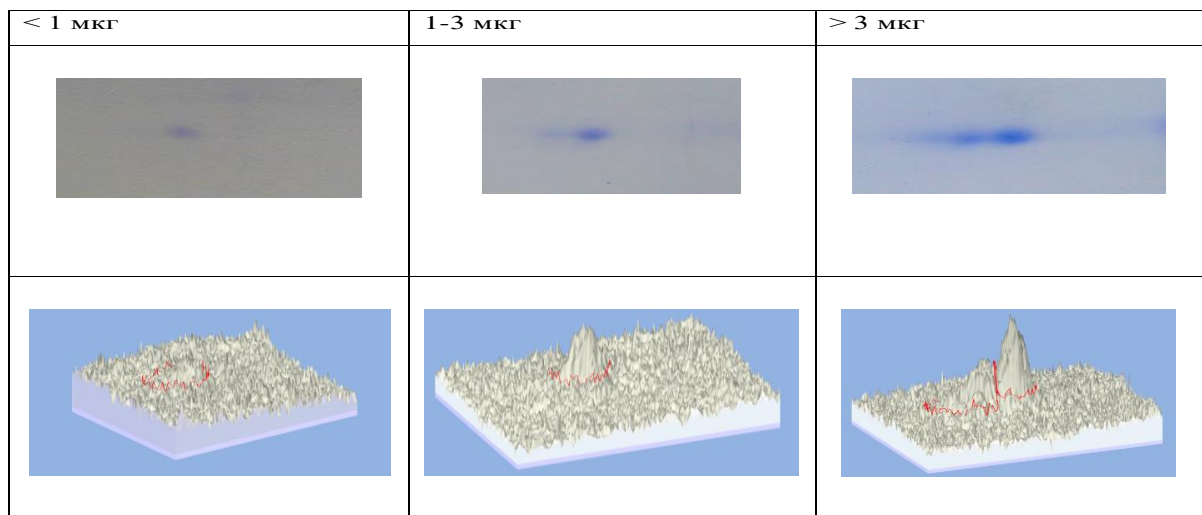


Рисунок 4 – Фрагменты двумерных электрофореграмм зоны аполипротеина A1. *Примечание: норма, окрашивание кумасси голубым R-250, иллюстрирующие различные уровни его накопления. Внизу – трехмерные модели количественного содержания по результатам компьютерной денситометрии*

Протеомное выявление аутоантигенов при атеросклерозе

При проведении иммуноблоттинга с сыворотками крови пациентов, включенных в исследование, положительную реакцию дали белки, представленные на рисунке 5. В группе 1 (n=17) с начальными проявлениями атеросклеротического процесса в 3-х сыворотках крови выявлен иммунный ответ на ламин A/C (LMNA), проларгин (PRELP), альфа-енолаза/лактадгерин (ENO1/MFGE8), лактадгерин (MFGE8), что соответствует 17,6%.

В группе 2 (n=37) с выраженным атеросклерозом иммунный ответ получен на трансгелин (TAGLN) в 12 случаях (32,4%), в 4 случаях на лактадгерин (MFGE8) и аполипопротеин A1 (APOA1), что соответствует (10,8%). По два иммунных ответа получили ламин A/C (LMNA); проларгин (PRELP); альфа-енолаза/лактадгерин (ENO1/MFGE8); α -1 антитрипсин (SERPINA1); r-ras онкоген (RRAS); аннексин A4 (ANXA4), что соответствует 5,4%. В группе 3 с условно здоровыми (без признаков атеросклероза) иммунных реакций ни на одну из представленных белковых фракций не наблюдалось.

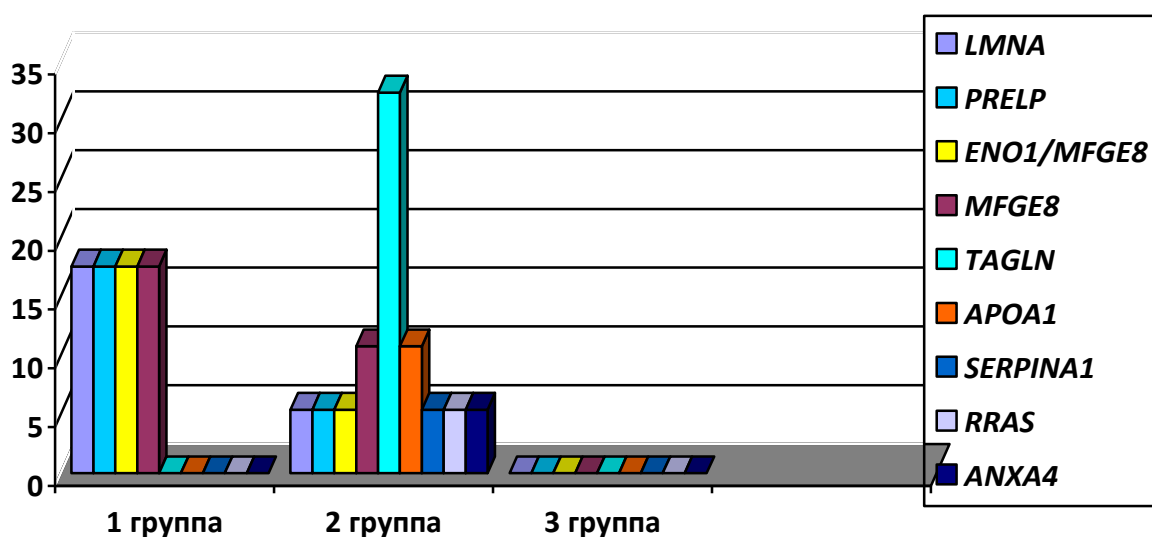


Рисунок 5 – Процентное соотношение показателей (реакции сывороток на белки) в основных и контрольной группах. *Примечание: описательная статистика представлена в виде абсолютных и относительных частот (процентов). Ламин A/C (LMNA); проларгин (PRELP); альфа-енолаза/лактадгерин (ENO1/MFGE8); лактадгерин (MFGE8); трансгелин (TAGLN); аполипопротеин A1 (APOA1); α -1 антитрипсин (SERPINA1); r-ras онкоген (RRAS); аннексин A4 (ANXA4)*

При выявлении взаимосвязи между факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний, биохимическими показателями и реакцией на белки в группе с начальными признаками атеросклероза, получены следующие данные: отрицательная умеренная корреляция между такими белками, как лактадгерин (*MFGE8*), ламин A/C (*LMNA*), проларгин (*PRELP*), сочетанием альфа-енолазы 1 и лактадгерина (*ENO 1/MFGE8*) и курением, ИМ в анамнезе, но статистически незначимая. Слабая отрицательная корреляция с наличием СД в анамнезе с теми же белками. Также отсутствовала корреляционная связь между ОНМК в анамнезе и приемом статинов. Выявлена слабая корреляция между реакцией на белки и уровнем холестерина, умеренная корреляция с уровнем ЛПНП и умеренная отрицательная корреляция с уровнем триглицеридов в крови, но статистически не достоверная. Отсутствовала корреляционная связь с уровнем СРБ и ЛПВП.

Во 2-ой группе с распространенным атеросклерозом была выявлена достоверная умеренная корреляция между трансгелином (*TAGLN*) и курением $r=0,46$ ($p<0,05$), умеренная, статистически значимая корреляция с лактадгерином (*MFGE8*) $r=0,38$ ($p<0,05$), а также слабая, достоверная корреляция с *r-gas* онкогеном (*RRAS*) $r=0,27$ ($p<0,05$) и ИМ в анамнезе. Кроме того, выявлена достоверная, высокая корреляция между лактадгерином (*MFGE8*) и ОНМК в анамнезе $r=0,71$ ($p<0,05$). Данные представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Выявленные корреляции между реакцией на белки и факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний в группе с распространенным атеросклерозом

Белки	Курение	ИМ в анамнезе	ОНМК в анамнезе	СД
Лактадгерин (<i>MFGES</i>)	r=0,2	r=0,38*	r=0,71*	r=-0,18
Ламин А/С (<i>LMNA</i>)	r=0,14	r=0,26	r=1,0	r=-0,12
Проларгин (<i>PRELP</i>)	r=0,14	r=0,26	r=1,0	r=-0,12
Альфа-енолаза/ лактадгерин (<i>ENO 1/MFGES</i>)	r= 0,14	r=0,26	r=1,0	r=-0,12
Трансгелин (<i>TAGLN</i>)	r=0,46*	r=-0,2	r=-0,15	r=-0,16
Онкоген (<i>RRAS</i>)	r=0,14	r=0,27*	r=-0,05	r=-0,12
Аполипопротеин А1 (<i>APOA1</i>)	r=0,2	r=0,04	r=-0,07	r=0,19
Альфа-антитрипсин 1 (<i>SERPINA1</i>)	r=0,14	r=-0,19	r=-0,05	r=-0,12
Аннексин А4 (<i>ANX A4</i>)	r=0,14	r=-0,19	r=-0,05	r=-0,12

* - корреляционные связи достоверны ($p < 0,05$). Для выявления взаимосвязи двух признаков применялся непараметрический корреляционный анализ по Спирману

В таблице 3 представлены корреляционные связи между реакцией на белки и биохимическими показателями, из них статистически значимыми были корреляции между уровнем моно-СРБ и реакцией на трансгелин (*TAGLN*) $r=0,49$ ($p < 0,01$), а также отрицательная достоверная корреляция между уровнем ЛПВП и реакцией на трансгелин (*TAGLN*) $r = - 0,42$ ($p < 0,05$)

Таблица 3 – Выявленные корреляции между реакцией на белки и биохимическими показателями в группе 2

Белки	СРБ	МОНО-СРБ	IL-6	ХС	ЛПВП	ЛПНП
Лактадгерин (MFGES)	r=0,32	r=-0,02	r=0,27	r=0,1	r=0,13	r=0,13
Ламин А/С (LMNA)	r=0,26	r=-0,14	r=0,31	r=-0,14	r=0,26	r=-0,07
Проларгин (PRELP)	r=0,26	r=-0,14	r=0,31	r=-0,14	r=0,26	r=-0,07
альфа-енолаза/ лактадгерин (ENO 1/ MFGES)	r=0,25	r=-0,14	r=0,31	r=-0,14	r=0,26	r=-0,07
Трансгелин (TAGLN)	r=0,15	r=0,49**	r=0,31	r=0,03	r=-0,42*	r=0,13
Онкоген (RRAS)	r=-0,41	r=-0,22	r=0,31	r=-0,25	r=0,11	r=-0,22
Аполипопротеин А1 (APOA1)	r=0,08	r=0,08	r=-0,13	r=0,5	r=-0,1	-
Альфа-антитрипсин 1 (SERPINA1)	r=0,03	r=0,15	r=0,21	r=-0,03	r=0,03	r=0,07
Аннексин А4 (ANXA4)	r=-0,18	r=0,14	r=-0,23	r=-0,18	r=-0,11	r=-0,14

* - корреляционные связи достоверны ($p < 0,05$); ** - корреляционные связи достоверны ($p < 0,01$) Для выявления взаимосвязи двух признаков применялся непараметрический корреляционный анализ по Спирману

В группе 3, где молодые, условно здоровые, реакций сывороток крови на белки не отмечалось.

ВЫВОДЫ

1. С помощью протеомных методов исследования аутопсийных образцов аорты (грудной отдел) без атеросклеротического поражения идентифицированы специфичные белки отдельно для интимы и медиального слоя, что позволило расширить базу идентифицированных белков «Протеомика мышечных органов» с 29 до 98.

2. С помощью протеомных технологий, масс-спектрометрической идентификации выделены 3 группы белков: специфичные для интимы (шесть белков); специфичные для медиального слоя (21 белок) и общие для обеих структур (68 белков).

3. В зоне атеросклеротического поражения аорты (грудной отдел) в интимае и медиальном слое при проведении масс-спектрометрической идентификации наиболее часто выявлены изменения 9 генов, формирующий следующий ряд по количеству: *APOA1*, *FGB*, *FGG*, *CAPG*, *CTSD*, *FTH/FTL*, *HP*, *SOD3*, *TAGLN* в различных сочетаниях. По результатам масс-спектрометрической идентификации они оказались аполипопротеином А1, β -фибриногеном, γ -фибриногеном, макрофаг-кэспирующим белком, катепсином D, комплексом легких и тяжелых цепей ферритина, гаптоглобином, экстраклеточной супероксиддисмутазой и трансгелином.

4. Анализ выявления белковых фракций в зависимости от стадии атеросклеротического поражения показал, что белковые фракции аполипопротеина А1 (*APO A1*), фибриногена (*FGB*), фибриногена (*FGG*), макрофаг-кэспирующего белка (*CAPG*), катепсина D (*CTSD*), легких и тяжелых цепей ферритина (*FTH/FLT*), гаптоглобина (*HP*), супероксиддисмутазы (*SOD3*), трансгелина (*TAGLN*) склонны к накоплению в тканях аорты грудного отдела пропорционально степени поражения атеросклерозом. Отмечается варьирование уровня белковых фракции от отсутствия и/или следового количества в норме до выраженного накопления при стадии липофиброзной бляшки.

5. По результатам двумерного иммуноблоттига в ткани аорты выявлены аутоантигены ламин А/С (*LMNA*), проларгин (*PRELP*), альфа-енолаза/лактадгерин

(*ENO1/MFGE8*), лактадгерин (*MFGE8*), трансгелин (*TAGLN*), аполипопротеин А1(*APOA1*), α -1 антитрипсин (*SERPINA1*), *r-ras* онкоген (*RRAS*), аннексин А4 (*ANX A4*). Ламин А/С (*LMNA*), проларгин (*PRELP*), лактадгерин (*MFGE8*) и трансгелин (*TAGLN*) могут рассматриваться как перспективные маркеры иммунного статуса для включения в систему стратификации при оценке степени атеросклероза.

6. При проведении иммуноблоттинга в сыворотках крови больных с выраженным, распространенным атеросклерозом магистральных артерий, в том числе и коронарных артерий выявлены антитела наиболее высокие к трансгелину (*TAGLN*), лактадгерину (*MFGE8*) и аполипопротеину А1 (*APOA1*), в то время как в группе здоровых исследуемых без проявлений атеросклероза иммунных реакций ни на одну из представленных белковых фракций не было. Выявлена достоверная корреляция между вышеперечисленными белками и уровнем ЛПВП, моно-СРБ, а также сердечно-сосудистыми факторами риска (курение, инсульт или инфаркт в анамнезе).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Полученные в настоящей работе данные могут быть использованы для разработки новых методов диагностики и оценки предрасположенности к атеросклерозу, а также для «персонализации» подходов к профилактике и лечению атеросклеротических заболеваний.

2. Верификация выявленных в настоящем исследовании аутоантигенов (ламин А/С (*LMNA*), проларгин (*PRELP*), лактадгерин (*MFGE8*) и трансгелин (*TAGLN*)) может использоваться для оценки иммунного статуса и стратификации риска атеросклероза у различных групп пациентов.

3. Проведенное впервые в Российской Федерации исследование с комплексным использованием протеомных технологий позволило существенно расширить базу данных белков интимы и медиального слоя не только в норме, но и при атеросклеротическом поражении, что позволяет детальнее изучить патогенез атеросклероза и является предпосылкой для дальнейших исследований в этом направлении.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Карпов А.А., Рвачева А.В., Шогенова М.Х., **Жетишева Р.А.**, Масенко В.П., Наумов В.Г. Современные представления об иммуно-воспалительных механизмах атеросклероза. Атеросклероз и дислипидемии, 2014, №1, стр. 25-30.
2. **Жетишева Р.А.**, Ковалева М.А., Галахов И.Е., Каменихина И.А., Новикова Л.А., Шогенова М.Х., Карпов А.М., Ковалев Л.И., Наумов В.Г. Исследование изменений белкового состава интимы и медиального слоя грудного отдела аорты больных ИБС при атеросклеротическом поражении протеомными технологиями. Кардиологический вестник, 2015, №2, стр. 44-50.
3. Шогенова М.Х., **Жетишева Р.А.**, Карпов А.М., Доценко Ю.В., Масенко В.П., Наумов В.Г. Роль окисленных липопротеинов низкой плотности и антител к ним в иммунно-воспалительном процессе при атеросклерозе. Атеросклероз и дислипидемии, 2015, №2, стр. 17-21.
4. Шогенова М.Х., **Жетишева Р.А.**, Карпов А.М., Масенко В.П., Наумов В.Г. Окисленные липопротеиды низкой плотности и антитела к ним у больных с коронарным атеросклерозом и здоровых лиц. Атеросклероз и дислипидемии, 2015, №3, стр. 56-60.
5. Карпов А.А., Рвачева А.В., Шогенова М.Х., **Жетишева Р.А.**, Масенко В.П., Наумов В.Г. Роль дендритных клеток в патогенезе атеросклероза. Доктор.ру, 2015, №9, стр. 4-8.
6. **Жетишева Р.А.**, Ковалева М.А., Новикова Л. А., Шогенова М. Х., Карпов А. М., Ковалев Л. И., Наумов В. Г. Изучение белкового состава слоев грудного отдела аорты при атеросклеротических изменениях протеомными технологиями. Материалы III Международного образовательного форума «Российские дни сердца». Москва, 15 - 17 апреля 2015 Российский кардиологический журнал, 2015; 4(120), приложение 1, стр. 39.
7. **Жетишева Р. А.**, Ковалева М.А., Новикова Л. А., Шогенова М. Х., Карпов А. М., Ковалев Л. И., Наумов В. Г. Выявление и идентификация аутоантигенов среди белков интимы и медиального слоя грудного отдела аорты. Материалы III Международного образовательного форума «Российские дни сердца». Москва, 15 - 17 апреля 2015 Российский кардиологический журнал, 2015; 4(120), приложение 1, стр. 40.
8. Шогенова М. Х., **Жетишева Р.А.**, Карпов А. М., Масенко В. П., Наумов В. Г. Уровни окисленных липопротеинов низкой плотности, показатели липидного профиля и маркеры воспаления у больных с коронарным атеросклерозом и здоровых лиц. Материалы III Международного образовательного форума «Российские дни сердца». Москва, 15 - 17 апреля 2015 Российский кардиологический журнал, 2015; 4(120), приложение 1, стр. 111.

9. Шогенова М. Х., **Жетишева Р.А.**, Карпов А. М., Масенко В. П., Наумов В. Г. Связь уровня аутоантител к окисленным липопротеинам низкой плотности с тяжестью коронарного атеросклероза. Материалы III Международного образовательного форума «Российские дни сердца». Москва, 15 - 17 апреля 2015 Российский кардиологический журнал, 2015; 4(120), приложение 1, стр. 111.

10. **Zhetisheva R.A.**, Kovaleva M.A., Kamenihina I.A., Shogenova M.H., Kovalev L.I., Naumov V.G. New data on the intima and media protein composition of the thoracic aorta atherosclerotic lesions using proteomic technologies. 17th International symposium on atherosclerosis Amsterdam, May 23-26 2015, Poster № 829.

11. **Zhetisheva R.A.**, Kovaleva M.A., Novikova L.A., Shogenova M.H., Karpov A.M., Kovalev L.I., Naumov V.G. Intimal and medial layer's autoantigens of the thoracic aorta in atherosclerotic lesions. 17th International symposium on atherosclerosis Amsterdam, May 23-26 2015, Poster № 831.

12. Карпов А. М., Рвачева А. В., Шогенова М. Х., **Жетишева Р.А.**, Масенко В. П., Наумов В. Г. Связь дендритных клеток, хемокина CCL17 и Т-клеточного рецептора CCR4 с тяжестью коронарного атеросклероза. Материалы III Международного образовательного форума «Российские дни сердца». Москва, 15 - 17 апреля 2015 Российский кардиологический журнал, 2015; 4(120), приложение 1, стр. 48.

13. Shogenova M.H., **Zhetisheva R.A.**, Karpov A.M., Masenko V.P., Naumov V.G. Oxidized low density lipoproteins in patients with coronary atherosclerosis and healthy volunteers. 17th International symposium on atherosclerosis Amsterdam, May 23-26 2015, Poster № 830.

14. Shogenova M.H., **Zhetisheva R.A.**, Karpov A.M., Masenko V.P., Naumov V.G. Autoantibodies against oxidized low-density lipoproteins: relationship with the severity of coronary atherosclerosis. 17th International symposium on atherosclerosis Amsterdam, May 23-26 2015, Poster № 828.

15. Шогенова М.Х., **Жетишева Р.А.**, Кабардиева М.Р., Карпов А.М., Ефремов Е.Е., Масенко В.П., Наумов В.Г. Диагностическое значение определения модифицированных иммуноглобулинов G у больных с коронарным атеросклерозом. Доктор.Ру. 2016. № 11 (128). С. 23-27.

16. Karpov A.M., Rvacheva A. V. , Shogenova M.H., **Zhetisheva R.A.**, Masenko V.P., Naumov V.G. The role of myeloid dendritic cells, chemokine CCL17 and T-cell receptor CCR4 in atherogenesis. The 84th Congress of the European Atherosclerosis Society, Innsbruck, Austria, 29 May - 1 June, 2016. Abstract EAS16-0801 Atherosclerosis 252 (2016), e171.

17. Shogenova M.H., **Zhetisheva R.A.**, Karpov A.M., Masenko V.P., Naumov V.G. The role of oxidized low-density lipoproteins and autoantibodies to them in atherogenesis in patients with coronary atherosclerosis. The 84th Congress of the European

Atherosclerosis Society, Innsbruck, Austria, 29 May - 1 June, 2016. Abstract EAS16-0782 Atherosclerosis 252 (2016), e171-172.

18. **Zhetisheva R.A.**, Kovaleva M.A., Novikova L.A., Shogenova M.H., Karpov A.M., Kovalev L.I., Naumov V.G. The protein composition of intima and media thoracic aorta layers in atherosclerosis with autoantigens detection and identification using proteomic technologies. The 84th Congress of the European Atherosclerosis Society, Innsbruck, Austria, 29 May - 1 June, 2016. Abstract EAS16-0795 Atherosclerosis 252 (2016) e228-229.

19. Л.И. Ковалев, **Р.А. Жетишева**, М.А. Ковалева, А.В. Иванов, В.Г. Наумов. Протеомное исследование белкового состава внутреннего и среднего слоев аорты у больных атеросклерозом. Материалы V съезда физиологов СНГ. V съезда биохимиков России. Сочи-Дагомыс, 4-8 октября 2016г. Спецвыпуск том 1 (2016). Стр. 128.

20. **R.A. Zhetisheva**, M.A. Kovaleva, I.A. Kamenihina, T.Y. Isaykina, M.H. Shogenova, A.M. Karpov, L.I. Kovalev, I.E. Galakhov, V.G. Naumov. Transgelin of medial layer of the thoracic aorta and its modifications as a possible autoantigen in the atherosclerotic process. The 85th Congress of the European Atherosclerosis Society Prague, Czech republic 2017, SAG074, Atherosclerosis 263 (2017) e58.

21. Karpov A., Rvacheva A., Shogenova M., **Merova R.**, Naumov V., Masenko V. Association between blood levels of CCR4 expressing T-HELPER CELLS, chemokine CCL17 and severity of coronary atherosclerosis. The 85th Congress of the European Atherosclerosis Society Prague, Czech republic 2017, PO019, Atherosclerosis 263 (2017), e116.

22. Shogenova M.H., **Zhetisheva R.A.**, Karpov A.M., Efremov E.E., Masenko V.P., Naumov V.G. Diagnostic value of modified immunoglobulin G determination in patients with coronary atherosclerosis. The 85th Congress of the European Atherosclerosis Society Prague, Czech republic 2017, PO014, Atherosclerosis 263 (2017), e115.

23. **Жетишева Р.А.**, Ковалева М.А., Каменихина И.А., Шогенова М.Х., Карпов А.М., Галахов И.Е., Ковалев Л.И., Наумов В.Г. Протеомное исследование гладкомышечного трансгелина в патогенезе атеросклероза как возможный маркер атеросклеротического процесса. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. Приложение Том 4/2017.

24. **R.A. Zhetisheva**, M.A. Kovaleva, I.A. Kamenihina, T.Y. Isaykina, M.H. Shogenova, A.M. Karpov, L.I. Kovalev, V.G. Naumov. Transgelin as a promising marker for the study of immune status in atherosclerosis. The 86th Congress of the European Atherosclerosis Society, Lisbon, 2018. Atherosclerosis. 275 (2018), e109-110.

25. **R.A. Zhetisheva**, M.A. Kovaleva, I.A. Kamenihina, T.Y. Isaykina, A.M. Karpov, L.I. Kovalev, V.G. Naumov. Comparative characteristics of the proteome of thoracic aorta intima and media in normal and atherosclerotic lesions. The 87th Congress of the European

Atherosclerosis Society Maastricht, Netherlands, May 26-29, 2019, EAS19-0537. Atherosclerosis 287 (2019), e270.

26. **Жетишева Р.А.**, Ковалева М.А., Каменихина И.А., Шогенова М.Х., Ковалев Л.И., Наумов В.Г. Гладкомышечный трансгелин и его роль в атеросклеротическом процессе. «Атеросклероз и дислипидемии» 2019, №4 (37), 18-26.

27. **Жетишева Р.А.**, Ковалева М.А., Каменихина И.А., Ковалев Л.И., Наумов В.Г. Поиск белковых биомаркеров при атеросклерозе с помощью протеомных технологий как перспективное направление науки. «Атеросклероз и дислипидемии» 2020. № 2 (39). С. 12-19.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

2ДЭ - двумерный электрофорез

АГ - артериальная гипертония

АД – артериальное давление

АКШ - аортокоронарное шунтирование

АСБ - атеросклеротическая бляшка

ВОЗ - Всемирная организация здравоохранения

ИБС - ишемическая болезнь сердца

ИМ - инфаркт миокарда

ИМТ - индекс массы тела

КАГ - коронароангиография

ЛОНП - липопротеиды очень низкой плотности

ЛПВП - липопротеиды высокой плотности

ЛПНП - липопротеиды низкой плотности

НПВС - нестероидные противовоспалительные средства

НРС - нарушение ритма сердца

ОНМК - острое нарушение мозгового кровообращения

ПААГ - полиакриламидный гель

СД - сахарный диабет

СРБ - С-реактивный белок

ССЗ - сердечно-сосудистые заболевания

ССС - сердечно-сосудистая система

ТГ - триглицериды

УЗДС – ультразвуковое дуплексное сканирование

ХС - общий холестерин

ХСН - хроническая сердечная недостаточность

ЭКГ - электрокардиограмма

ЭХО-КГ – эхокардиография