

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»  
Факультет фундаментальной медицины

На правах рукописи

Плеханова Ольга Сергеевна

РОЛЬ УРОКИНАЗНОГО АКТИВАТОРА ПЛАЗМИНОГЕНА В  
РЕМОДЕЛИРОВАНИИ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ

03.01.04 – Биохимия

Диссертация  
на соискание ученой степени  
доктора медицинских наук

Научный консультант  
доктор медицинских наук,  
профессор Парфенова Елена Викторовна

Москва – 2017

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ И УРОКИНАЗНЫЙ АКТИВАТОР ПЛАЗМИНОГЕНА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	17
1.1. Механизмы ремоделирования артерий после их повреждения.....	17
1.1.1. Ремоделирование артерий, понятие и типы.....	18
1.1.2. Патогенез ремоделирования артерий .....	22
1.1.3. Ремоделирование сосудов при атеросклерозе и рестенозе....	30
1.2. Современные стратегии коррекции ремоделирования артерий после внутрисосудистого повреждения.....	39
1.3. Урокиназа как многофункциональный регулятор жизнедеятельности клеток кровеносных сосудов.....	45
1.3.1. Структура урокиназы.....	46
1.3.2. Сигнализация урокиназы.....	48
1.3.3. Протеолитический каскад, индуцируемый урокиназой.....	57
1.3.4. Урокиназа и адгезия и миграция клеток.....	59
1.3.5. Урокиназа и пролиферация и апоптоз клеток.....	63
1.3.6. Тканевой активатор плазминогена: структура и функции.....	65
1.3.7. Система активаторов плазминогена и заболевания сосудов.....	66
1.4. Заключение по обзору литературы.....	72
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	75
2.1. Экстракция, хранение и классификация аутопсийного материала.....	75
2.2. Характеристика пациентов с ишемической болезнью сердца и исследование компонентов фибринолитической системы .....	77

2.3. Экспериментальные модели.....	79
2.3.1. Рекомбинантные формы урокиназы.....	79
2.3.2. Модели ремоделирования артерий.....	80
2.3.3. Гистологические методы.....	84
2.3.4. Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией.....	88
2.3.5. Зимография.....	91
2.3.6. Метод транскрипционных матриц.....	92
2.3.7. Количественная полимеразная цепная реакция.....	94
2.4. Клеточно–биологическое исследование.....	94
2.5. Статистическая обработка.....	98
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	99
3.1. Урокиназа и заболевания сосудов у человека.....	100
3.1.1. Экспрессия компонентов системы фибринолиза в стенке аорты человека при разных типах атеросклеротического поражения.....	99
3.1.2. Частота рецидива стенокардии и рестеноза и компоненты системы фибринолиза у пациентов с ишемической болезнью сердца после коронарной ангиопластики.....	105
3.2. Роль активаторов плазминогена в регуляции ремоделирования сосудистой стенки после повреждения.....	113
3.2.1. Экспрессия урокиназы в стенке сосуда после повреждения.....	113
3.2.2. Динамика индекса пролиферации в поврежденной артерии...	117
3.2.3. Урокиназа и ранние процессы формирования неоинтимы после баллонного повреждения.....	119
3.2.4. Влияние локального введения $\alpha 2$ -антиплазмина на	

морфологию сосуда после баллонирования.....	131
3.2.5. Противоположное влияние урокиназного и тканевого активаторов плазминогена на ремоделирование сосудистой стенки.....	133
3.2.6. Урокиназа и ремоделирование адвентиции.....	136
3.2.7. Влияние урокиназы на экспрессию генов в поврежденной сосудистой стенке.....	145
3.2.8. Влияние урокиназы на протеолитический каскад при ремоделировании стенки сосуда.....	159
3.2.9. Урокиназа и воспаление в поврежденной сосудистой стенке	180
3.2.10. Новый механизм стимуляции пролиферации клеток сосудистой стенки под действием урокиназы.....	184
3.3. Обсуждение результатов.....	191
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	218
ВЫВОДЫ.....	229
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	231
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	232
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	235

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность исследования

Ремоделирование сосудов представляет собой распространенное или локальное изменение их структуры или размеров, которое позволяет им не только приспосабливаться к меняющимся условиям функционирования, но также является частью программы восстановления после повреждения и определяет прогноз многих сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе, атеросклероза, артериальной гипертензии и рестеноза [9]. Стенозирующий атеросклероз сосудов, определяющий развитие таких заболеваний, как ишемическая болезнь сердца (ИБС) и ее последствия и ишемия нижних конечностей, продолжает оставаться основной причиной смертности и инвалидизации населения в развитых странах [55,83]. В Европе и России наиболее частой причиной смерти у мужчин, не достигших 65 лет, и второй по частоте у женщин являются именно сердечно-сосудистые заболевания [83]. Приблизительно половина летальных исходов (40–60%) обусловлена стенозирующим атеросклерозом артерий. Современные подходы к лечению ишемии тканей, вызванной стенозирующим атеросклерозом, направлены на механическую реваскуляризацию с помощью хирургических или малоинвазивных эндоваскулярных методов. Эндоваскулярные методы включают в себя ангиопластику, стентирование и атероектомию и не уступают по эффективности аортокоронарному шунтированию, но при этом отличаются меньшей стоимостью и обеспечивают быструю реабилитацию. Несмотря на существенный прогресс в технике вмешательств, позволивший повысить эффективность процедур и снизить число осложнений, у части пациентов (до 11%) через несколько месяцев после эндоваскулярных процедур развивается повторный стеноз артерий или рестеноз [25, 61, 99, 121, 313, 270], а по некоторым данным частота рестенозов, например, бедренной артерии достигает 38% [196]. Существует также такое понятие, как резистентный рестеноз, возникающий у определенной категории пациентов (с сахарным диабетом, хронической почечной

недостаточностью, у пациентов с кальцинированными бляшками или расположенными в области бифуркации) с вероятностью развития рестеноза 45–55 % [314].

В основе развития рестеноза лежат два процесса – интенсивный рост неоинтимы и отрицательное (ведущее к сужению) геометрическое ремоделирование поврежденной артерии [364, 430]. Процессы ремоделирования включают в себя разрушение, перестройку и синтез новых матриксных белков, клеточные миграцию, пролиферацию и дифференцировку [230, 430]. Задачей современной медицины является разработка подходов к предотвращению неблагоприятного ремоделирования сосудов.

Важным в отношении подходов к регуляции ремоделирования артерий является выбор специфической мишени для воздействий [364]. В настоящее время проводятся разработки препаратов на основе многих биологически активных мишеней [9]. В то же время известно, что система активаторов плазминогена принимает участие во многих физиологических и патологических процессах, таких, как свертывание крови, ангио–артериогенез, ремоделирование сосудов, ранозаживление, метастазирование злокачественных опухолей [1, 8]. Система активаторов плазминогена состоит из двух физиологических активаторов: тканевого (tPA) и урокиназного типов (урокиназы, uPA), специфических рецепторов и ингибиторов активаторов плазминогена (ПАИ) [10]. Активаторы плазминогена – сериновые протеазы – превращают плазминоген в плазмин, протеазу широкой специфичности и секретируются различными клетками, включая клетки крови и сосудов и, помимо участия в фибринолизе, регулируют процессы пролиферации и миграции клеток, деградации внеклеточного матрикса, являясь неотъемлемыми участниками ремоделирования тканей, происходящего при различных физиологических и патологических процессах [11]. Как полагают исследователи, роль активаторов плазминогена различна [10]. Тканевой активатор плазминогена вовлечен в поддержание жидкого состояния циркулирующей крови и представляет собой один из двух основных факторов системы фибринолиза [7, 234]; другие функции этого фермента мало изучены. В то время, как урокиназа

является ключевым регулятором сигнальных путей, ведущих к клеточной миграции, адгезии и пролиферации [70]. Урокиназа синтезируется эндотелиальными и гладкомышечными клетками сосудов (ГМК), эпителиальными клетками, клетками моноцитарно-макрофагального ряда, фибробластами, а также клетками разных злокачественных опухолей [1, 306]. Она является мультидоменным белком, состоящим из трех доменов – С-концевого каталитического домена, N-концевого домена, подобного эпидермальному фактору роста (GFD – growth factor like domain) и крингл-домена.

Урокиназа может регулировать пролиферацию и миграцию клеток, являющихся ключевыми процессами ремоделирования тканей, как через зависимые, так и независимые от протеолиза механизмы.

Протеолитический домен урокиназы катализирует образование плазмина на поверхности клетки из неактивного плазминогена и запускает каскад протеолитических реакций в окружении клетки, приводящий к активации матриксных металлопротеаз (ММП), факторов роста, разрушению фибрина и белков внеклеточного матрикса (ВКМ), таких как коллаген, фибронектин и ламинин [11, 70]. Такой протеолитический каскад на мембране ведет к направленному движению клетки благодаря разрушению межклеточных контактов и локальному расщеплению ВКМ. Кроме того, активация и/или высвобождение латентных и связанных с матриксом факторов роста также способствует усилению хемотактического, миграционного и пролиферативного ответов клеток [10, 232].

Урокиназа также способна стимулировать миграцию и пролиферацию клеток независимо от своих протеолитических свойств. Так, домен, подобный фактору роста, отвечает за высокоафинное связывание урокиназы с ее специфическим рецептором (uPAR/CD87) [70]. Рецептор урокиназы заякорен на мембране через гликозилфосфатидинозитольный якорь [10], который обеспечивает высокую подвижность рецептора в плазматической мембране, а его локализация зависит от состояния и окружения клетки [70]. Поскольку рецептор урокиназы не имеет в своей структуре цитоплазматических или трансмембранных

доменов, для запуска внутриклеточной сигнализации при взаимодействии урокиназы с рецептором необходимо образование комплекса рецептора с трансмембранными белками [10, 70]. Взаимодействие урокиназы с рецептором на клетке активирует системы сигнализации, регулирующие пролиферацию и миграцию клеток [370], а также сигнальные пути регуляции реорганизации цитоскелета.

Таким образом, урокиназа вызывает особый интерес, так как представляет собой многофункциональный белок, который регулирует фибринолиз, ремоделирование внеклеточного матрикса и клеточную миграцию и пролиферацию, а также ассоциирован с патогенезом многих патологических состояний [10]. К настоящему моменту известно, что урокиназа представляет собой мультидоменный белок, превращающий плазминоген в плазмин, который помимо регуляции фибринолиза осуществляет активацию факторов роста, модуляцию цитокинов, шеддинг рецепторов, фенотипическую трансформацию клеток, экспрессию белков и активацию протеолитических каскадов. Эти механизмы обеспечивают стимуляцию под действием урокиназы ключевых механизмов таких процессов, как ремоделирования артерий, прогрессирования атеросклероза, рестеноза после процедур реваскуляризации и ангиогенеза при ишемии тканей. Многие исследования указывают на особое значение урокиназы для роста неоинтимы и рестеноза [9, 254]. Тем не менее, роль доменов урокиназы в осуществлении ее эффектов в сосудистой стенке оставалась неизвестной. Оставались неясными механизмы влияния урокиназы на процессы перестройки сосудистой стенки. Многие аспекты эффектов урокиназы на пролиферацию и миграцию клеток в стенке сосуда не были изучены. Изучение роли отдельных доменов урокиназы в различных функциях этого белка может позволить разработать лекарственные препараты, влияющие на эти процессы.

Значительная роль урокиназы в регуляции миграции и пролиферации сосудистых клеток стимулировала исследования по созданию препаратов, направленных на ее блокирование. Ведущие научные центры и фармацевтические концерны начали разрабатывать ингибиторы урокиназы [273]. Не существует,



однако, препарата, прочно вошедшего в клиническую практику, в связи с этим понимание механизмов действия урокиназы и разработка подходов к ингибированию ее эффектов остаются актуальными.

### **Цель и задачи исследования**

**Целью** настоящего исследования было изучение роли и механизмов участия урокиназного активатора плазминогена в регуляции ремоделирования кровеносных сосудов; поиск и определение новых оптимальных мишеней для предотвращения неблагоприятной структурной перестройки сосудов с целью дальнейшего использования в клинической практике.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи:**

1. Исследовать экспрессию компонентов урокиназной системы в атеросклеротических поражениях аорты человека различной степени выраженности.

2. Изучить динамику содержания урокиназного активатора плазминогена и активности его ингибитора в периферической крови больных ишемической болезнью сердца до и после баллонной ангиопластики и оценить предикторную значимость компонентов системы фибринолиза в отношении возобновления стенокардии.

3. На экспериментальной модели баллонирования сонной артерии *in vivo* изучить динамику и локализацию экспрессии урокиназы и ее рецептора в поврежденной сосудистой стенке в сопоставлении с динамикой миграции и пролиферации клеток.

4. Исследовать значение структурных доменов урокиназы в реализации ее эффектов на рост неоинтимы и неоадвентиции *in vivo* на модели экспериментального баллонирования сонной артерии с помощью рекомбинантных форм урокиназы и антител, нейтрализующих ее протеолитическую активность.

5. Сопоставить влияние рекомбинантных урокиназного и тканевого активаторов плазминогена на ремоделирование сосудистой стенки *in vivo* после баллонирования сонной артерии животных.

6. Оценить влияние активаторов плазминогена на экспрессию генов в поврежденной при экспериментальном баллонировании стенке сонной артерии животных.

7. Исследовать взаимодействие важнейших протеолитических систем (система фибринолиза/матриксные металлопротеиназы) при ремоделировании стенки сонной артерии *in vivo*.

8. Исследовать молекулярные механизмы влияния урокиназы на ключевые процессы констриктивного ремоделирования сосудистой стенки: деление гладкомышечных клеток, фенотипическую трансформацию фибробластов, развитие воспаления и образование активных форм кислорода *in vivo* и в культуре клеток.

### **Научная новизна исследования**

Показана предикторная значимость урокиназы для возобновления стенокардии у пациентов с ишемической болезнью сердца после транслюминальной баллонной ангиопластики. Получены новые данные о совместной локализации экспрессии урокиназы и ее рецептора на клетках моноцитарно-макрофагального ряда в аорте человека в зависимости от выраженности ее атеросклеротического поражения.

Установлена уникальная роль урокиназы в ремоделировании кровеносных сосудов после повреждения *in vivo*. Показано, что протеолитические свойства урокиназы играют доминирующую роль в реализации ранних процессов перестройки стенки артерии. Выявлено, что урокиназа способствует констриктивному (отрицательному) ремоделированию артерии, а тканевой активатор плазминогена – компенсаторному (положительному) ремоделированию стенки сосуда на ранних этапах после экспериментального баллонирования

общей сонной артерии. С помощью метода транскрипционных матриц было выяснено, что локально нанесенная урокиназа в отличие от тканевого активатора плазминогена стимулирует экспрессию группы про-воспалительных генов, а также группы генов, участвующих в развитии оксидативного стресса в стенке артерии после повреждения. Впервые было обнаружено, что урокиназа, но не тканевой активатор плазминогена, способна стимулировать фенотипическую трансформацию фибробластов в миофибробласты и их аккумуляцию в адвентиции поврежденной сосудистой стенки. Показано, что урокиназа в отличие от тканевого активатора плазминогена способствует привлечению и аккумуляции моноцитов/макрофагов и повышению экспрессии фактора некроза опухолей альфа и фермента, превращающего его в активную форму, в поврежденной стенке артерии *in vivo*. Установлено, что урокиназа усиливает экспрессию и активацию матриксных металлопротеиназ 2 и 9 типов в поврежденной сосудистой стенке, тогда как тканевой активатор плазминогена, напротив, способствует подавлению экспрессии матриксной металлопротеиназы 2 типа в баллонированной артерии. Выявлено, что урокиназа стимулирует экспрессию матриксной металлопротеиназы 9 типа в фибробластах, повышая образование активных форм кислорода. Обнаружен ранее неизвестный механизм стимуляции урокиназой деления гладкомышечных клеток сосуда через образование активных форм кислорода.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Полученные результаты вносят существенный вклад в расширение фундаментальных знаний о механизмах ремоделирования артерий и способствуют более глубокому пониманию молекулярных механизмов действия активаторов плазминогена в этих процессах. Использование различных экспериментальных подходов и моделей *in vivo* и *in vitro* позволило получить свидетельства того, что урокиназа является обязательным участником развития атеросклероза, рестеноза и

реакции сосуда на повреждение, а также уникальным регулятором перестройки сосудистой стенки, опосредующим констриктивное ремоделирование сосудов.

Определение уровня урокиназы крови у пациентов с ишемической болезнью сердца до проведения процедур эндоваскулярной реваскуляризации позволяет выявить пациентов с высоким риском возобновления стенокардии. На основании данных о корреляции уровня урокиназы с риском возобновления стенокардии после транслюминальной баллонной ангиопластики возможно создание диагностической системы для оценки риска возобновления стенокардии. Представленные результаты позволяют определить новые мишени для фармакологической и генно-терапевтической профилактики рестенозов, развивающихся после процедур эндоваскулярной реваскуляризации. Локальное ингибирование протеолитической активности урокиназы в сосудистой стенке является новым перспективным подходом к регуляции ремоделирования сосудов.

### **Методология и методы исследования**

Работа включала в себя подтверждение участия урокиназы в ремоделировании артерий у человека и состоял в оценке экспрессии компонентов системы фибринолиза в стенке артерий, пораженных атеросклерозом в сопоставлении с маркерами воспаления сосудистой стенки; определении динамики содержания урокиназы в крови пациентов с ишемической болезнью сердца после ангиопластики в сопоставлении с исходом ангиопластики и оценке прогностической значимости уровня урокиназы после коронарной ангиопластики. Исследования были проведены на срезах атеросклеротических бляшек, полученных при аутопсии, а также на пробах периферической крови пациентов с ИБС с использованием иммуноферментного анализа, иммуногистохимии, а также стандартных методов лабораторной диагностики, применяемых в клинике.

Далее было проведено изучение роли активаторов плазминогена в регуляции роста неоинтимы и ремоделирования поврежденной сосудистой стенки на моделях *in vivo*. Отработаны экспериментальные модели баллонного

повреждения сонной артерии крысы, изолированного повреждения адвентиции сонной артерии крысы, модель ремоделирования сосудов при снижении кровотока в общей сонной артерии мыши, отработан метод введения в сосудистую стенку белковых препаратов с использованием плюронического геля. Исследована экспрессия урокиназы в сосуде, изучено влияние активаторов плазминогена на структуру сосуда, состав клеток, экспрессию генов, воспалительную реакцию в поврежденной сосудистой стенке *in vivo* после экспериментального баллонирования общей сонной артерии. Исследованы эффекты активаторов плазминогена на образование активных форм кислорода в клетках сосудистой стенки и вклад их образования в развитие неблагоприятного ремоделирования стенки артерии после баллонирования и в стимуляцию пролиферации клеток. Выявлены сигнальные механизмы, опосредующие эффекты урокиназы на развитие негативного ремоделирование поврежденной артерии.

Часть исследований проводилась также в культуре гладкомышечных клеток и фибробластов. При выполнении работы использовались такие методы, как различные варианты микроскопии, морфометрии и иммуногистохимии с применением методов компьютерной обработки изображений, электрофорез и иммуноблоттинг, зимография, методы определения экспрессии генов (полимеразная цепная реакция и метод транскрипционных матриц), специальные методы регистрации образования активных форм кислорода и некоторые другие.

### **Внедрение результатов работы**

Результаты исследования внедрены в работу Медицинского научно-образовательного центра Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Министерства здравоохранения РФ,

используются в учебном процессе кафедры биохимии и молекулярной медицины факультета фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

### **Основные положения, выносимые на защиту**

**ПОЛОЖЕНИЕ 1:** Уровень урокиназы в крови пациентов с ишемической болезнью сердца обладает предикторной значимостью для возобновления стенокардии после транслюминальной баллонной ангиопластики. При развитии атеросклероза экспрессия урокиназы и ее рецептора повышена и в значительной степени солокализована с моноцитами/макрофагами.

**ПОЛОЖЕНИЕ 2:** Экспрессия урокиназы и ее рецептора в стенке артерии возрастает в ранние сроки после повреждения сосуда. Урокиназа стимулирует процессы констриктивного ремоделирования сосудов *in vivo*, причем эти эффекты обусловлены в основном ее протеолитическими свойствами. Стимуляция констриктивного ремоделирования является особым свойством урокиназы, а тканевой активатор плазминогена обладает противоположным действием.

**ПОЛОЖЕНИЕ 3:** Урокиназа способствует констриктивному ремоделированию кровеносных сосудов поскольку стимулирует фенотипическую трансформацию фибробластов в миофибробласты и рост неоадвентиции и увеличивает экспрессию матриксных металлопротеиназ. Урокиназа обладает провоспалительным действием и оказывает влияние на развитие оксидативного стресса в стенке артерии *in vivo*.

**ПОЛОЖЕНИЕ 4:** Существует механизм регуляции деления клеток под действием урокиназы, опосредованный образованием активных форм кислорода клетками сосудистой стенки.

**ПОЛОЖЕНИЕ 5:** Урокиназа является обязательным участником развития атеросклеротического поражения и ремоделирования сосудистой стенки.

**ПОЛОЖЕНИЕ 6:** Протеолитическая активность урокиназы является новой функциональной мишенью для предотвращения неблагоприятного ремоделирования сосудов.

### **Степень достоверности**

Достоверность результатов определяется применением современных методов исследования. Все научные положения и выводы основаны на статистически достоверных наблюдениях.

По теме диссертации опубликовано 57 печатных работ, в том числе 17 в российских журналах перечня ВАК Минобрнауки России, 13 статей в зарубежных журналах, тезисы 25 докладов на научно-практических конференциях и конгрессах, 1 глава в сборнике и 1 патент на изобретение. Публикации достаточно полно отражают результаты научного исследования.

Достоверность полученных результатов подтверждается публикациями в рецензируемых научных журналах, показателями их цитируемости в системах РИНЦ (445), Web of Science и Scopus (317).

### **Агробация результатов исследования**

Основные результаты работы были представлены на конференциях: 8<sup>th</sup> International Congress on Cardiovascular Pharmacotherapy in Amsterdam, Holland (1999), 71<sup>th</sup> European Atherosclerosis Society Congress in Athens, Greece (1999), 9<sup>th</sup> European Meeting on Hypertension, Milan, Italy (1999), XXI Congress of the European Society of Cardiology, Barcelona, Spain (1999), 18<sup>th</sup> Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, Chicago, USA (2000), 2nd International Congress of the Central European Vascular Forum, Rome, Italy (2000), 72<sup>th</sup> European Atherosclerosis Society Congress in Glasgow, UK (2001), 11<sup>th</sup> European Meeting on Hypertension, Milan, Italy (2001), Научный семинар University of Rochester Medical Center, Rochester, NY, USA (2003), 77th Congress of the European Atherosclerosis

Society, Greece (2008), VI Российский Симпозиум “Белки и пептиды” в Уфе (2013), Научный семинар факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва (2015), Межлабораторный научный семинар Института экспериментальной кардиологии, РКНПК Минздрава РФ, Москва (2017). Основные результаты доложены и обсуждены на научном семинаре факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва (2017).

Непосредственное участие О.С. Плехановой заключалось в планировании и организации исследований, методической разработке и постановке экспериментов, анализе результатов исследований, формулировке научных положений и выводов, написании статей. Соавторы указаны в публикациях.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 280 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, результатов исследования, обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Библиография включает 451 ссылку.



# ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ И УРОКИНАЗНЫЙ АКТИВАТОР ПЛАЗМИНОГЕНА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

## 1.1. Механизмы ремоделирования артерий после их повреждения

Сосудистые заболевания по-прежнему являются ведущей причиной заболеваемости и смертности в мире, основной причиной инфаркта миокарда и ишемии [9,83]. Природа сосудистых заболеваний сложна и до сих пор недостаточно изучена. И, хотя ремоделирование артерий можно рассматривать, как естественный механизм старения сосудов, неблагоприятное ремоделирование, суживающее просвет артерии, ассоциируется со значительными гемодинамическими изменениями, сердечно-сосудистой заболеваемостью и смертностью [9, 364]. Артериальное ремоделирование осуществляется рядом сложных патофизиологических механизмов, которые тесно взаимосвязаны и воздействуют как на клеточные, так и на неклеточные компоненты сосудистой стенки. Механизмы, участвующие в ремоделировании сосудистой стенки, включают гиперплазию интимы и меди, изменения внеклеточного коллагена и эластина, эндотелиальной функции и фиброз [305, 364]. Миграция и пролиферация сосудистых гладкомышечных клеток (ГМК) способствуют утолщению интимы и меди артерий. Дифференцировка ГМК из сократительного в секреторный фенотип приводит к повышению тонуса сосудов и способствует накоплению внеклеточного матрикса. Из-за сложности и множественности процессов, трудно обнаружить единый механизм, способствующий неблагоприятному ремоделированию сосудов [9, 232]. Изучение молекулярных и клеточных механизмов перестройки сосудистой стенки даст возможность разработки новых эффективных подходов к предотвращению неблагоприятного ремоделирования сосудов.

### 1.1.1. Ремоделирование артерий, понятие и типы

Ремоделирование артерий является перестройкой сосудистой стенки, которая отражает адаптацию сосуда к механическим и гемодинамическим стимулам [9, 230]. Артериальное ремоделирование сопровождается изменениями в структуре и функции сосудистой стенки и наблюдается при атеросклерозе, артериосклерозе, а также заживлении сосудов после повреждения. Атеросклероз характеризуется фокальным воспалительным процессом в интиме и накоплением липидов в бляшках, а артериосклероз – диффузным поражением сосудистой стенки [9, 153]. Артериосклероз связан со старением, сердечно-сосудистыми, метаболическими или воспалительными заболеваниями [227]. Макроскопически можно выделить различные типы перестройки сосудистой стенки в зависимости от типа и локализации сосуда (рисунок 1). Ремоделирование артерии может сопровождаться как расширением (положительное ремоделирование), так и сужением (отрицательное ремоделирование) просвета артерии, может быть гипертрофическим (утолщение стенки сосуда), эуτροφическим (нормальная толщина стенки) или гипотрофическим (истончение сосудистой стенки) [430].

Типичные для артериосклероза изменения наблюдаются, в основном, при перестройке крупных центральных эластических артерий. Они характеризуются увеличением диаметра сосудов и утолщением интимы и медиа (положительное гипертрофическое ремоделирование) [9, 261]. С другой стороны, ремоделирование периферических сосудов мышечного типа чаще отрицательное эу- или гипертрофическое, что, вероятно, отражает устойчивые вазоконстрикторные влияния [247]. В случае заживления сосуда после внутрисосудистого повреждения (например, после ангиопластики, стентирования) может быть, как эу-, так и гипертрофическим, в случаях дезадаптивного ответа является отрицательным, то есть, приводит к сужению просвета артерии, как это происходит при развитии рестеноза [9].

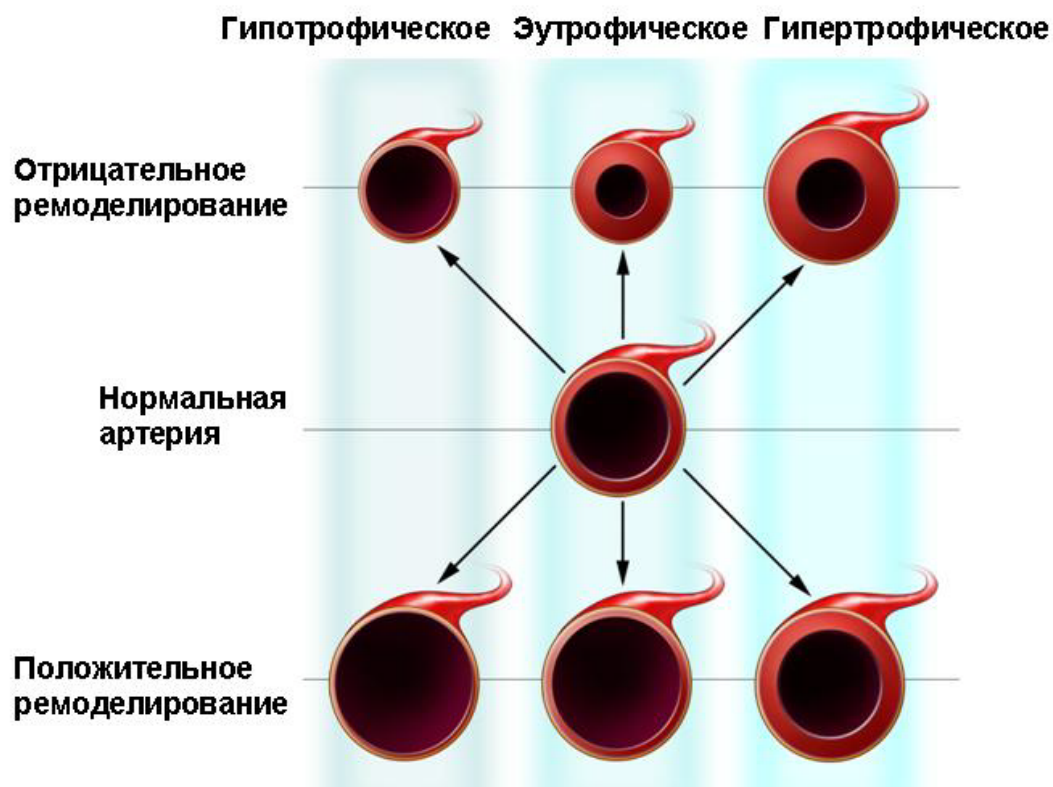


Рисунок 1 – Влияние ремоделирования на структуру и просвет артерии

(Обозначения: Сосуд в центре – неизменная нормальная артерия. Отрицательное ремоделирование сопровождается уменьшением просвета артерии, а положительное – увеличением просвета артерии; оба типа ремоделирования могут сопровождаться утолщением сосудистой стенки (гипертрофическое ремоделирование), истончением (гипотрофическое ремоделирование) или же оставаться неизменной (эуτροφическое ремоделирование) (Цит. по: Carretero, O.A., 2005. P. 589) [76]

Адаптивное ремоделирование сосудов (также известное как положительное ремоделирование или феномен Глагова) впервые было обнаружено в коронарных артериях на ранних стадиях атеросклероза, где компенсационное расширение сосудов имеет место для поддержания постоянного кровотока, несмотря на рост бляшки [9, 100]. Эта адаптация зависит от динамического взаимодействия между факторами роста, вазоактивными веществами и гемодинамическими стимулами (поток, растяжением, напряжением сдвига) и приводит, в конечном итоге, к устойчивым изменениям просвета или диаметра сосудистой стенки (положительное ремоделирование) [9, 309]. Если эта реакция выходит за рамки

возможностей адаптации, ремоделирование становится патологическим и приводит к уменьшению размеров просвета артерии (отрицательное или констриктивное ремоделирование), что вносит вклад в развитие сердечно-сосудистых патологий (атеросклероза, рестеноза и недостаточности шунтов) и, в конечном итоге, может привести к клиническим осложнениям, таким, как ишемия миокарда или нижних конечностей, или инсульт [9, 267].

За положительное ремоделирование отвечает, главным образом, активность протеаз (в основном, матриксных металлопротеиназ) в атеросклеротических бляшках, стимулированная воспалением. Этот феномен вызывает потерю коллагена и уменьшение количества ГМК [304], что приводит к истончению меди и адвентиции, тем самым позволяя внешнюю экспансию сосудистой стенки [9, 428]. Аналогичные, но более интенсивные процессы происходят при формировании аневризм сосудов [9, 304]. Стоит заметить, что матриксные металлопротеиназы также способствуют нестабильности бляшек [102]. Этот тип ремоделирования таит в себе парадоксальную опасность: хотя он задерживает сужение просвета, это может повысить риск разрыва бляшки и тромбоза с последующим острым сужением просвета или даже окклюзией артерии [9, 102].

Отрицательное ремоделирование является развивающимся во времени феноменом, в значительной степени напоминающим ранозаживление. Утолщение стенки артерии вызывают гиперплазия ГМК интимы и меди, а также гиперплазия клеток адвентиции и отложение внеклеточного матрикса в слоях сосудистой стенки [9, 105, 157]. При ремоделировании артерий меняются нормальный состав и укладка ВКМ в сосудистой стенке. В меди нормальной артериальной стенки эластические волокна расположены параллельными, концентрическими, фенестрированными слоями, чередующимися со слоями ГМК, заякоренными к эластическим волокнам гликопротеинами и интегринами [9, 141]. Эти структуры, называемые эластические мембраны, позволяют сосуду расширяться в ответ на пульсовую волну систолического артериального давления и обеспечивают пассивный упругий буфер, в то время как ГМК динамически перераспределяют напряжение растяжения волокон благодаря способности

сокращаться и расслабляться [9, 295]. При ремоделировании артерий слоистая архитектура эластических мембран теряется, и они постепенно становятся фрагментарными и фиброзными [9, 129]. С возрастом ГМК синтезируют в основном не эластин, а неэластичный коллаген, увеличивающий жесткость сосудистой стенки [9, 162]. Отложение минералов кальция дополнительно способствует жесткости и неблагоприятному ремоделированию сосудистой ткани [9, 49]. При механическом повреждении сосуда под действием различных факторов может происходить усиленный синтез коллагена клетками сосудистой стенки как ГМК, так и миофибробластами, что ведет к локальному утолщению сосудистой стенки и сужению просвета артерии, то есть, отрицательному ремоделированию в участке повреждения [9, 68].

Реорганизация сосудистой стенки при различных состояниях состоит из двух основных процессов – структурных изменений в слоях сосудистой стенки и геометрического ремоделирования сосуда. Основной показатель, важный физиологически и клинически, а именно, размер просвета артерии, зависит от суммарного соотношения этих процессов. Один из наиболее значимых показателей сосудистого ремоделирования – утолщение комплекса интима – медиа сонных артерий, регистрируемое при ультразвуковом исследовании, является фактором риска болезней сердца и сосудов [12]. Утолщение комплекса интима – медиа играет компенсаторную роль для обеспечения адекватности кровотока и коррелирует с размером просвета артерии [9, 32]. Важным является тот факт, что увеличение толщины комплекса интима – медиа общей сонной артерии до 1,2 мм сопровождается пропорциональным увеличением просвета сосуда, дальнейший рост индекса ( $> 1,3$  мм) ведет к обратному процессу – концентрическому сужению просвета артерии. Ультразвуковые признаки утолщения стенки артерий вошли в Европейские рекомендации по профилактике, диагностике и лечению артериальной гипертензии как одна из характеристик поражения органов-мишеней [9, 359]. Тесная взаимосвязь утолщения стенки сонной артерии и риска развития кардиальных и цереброваскулярных осложнений ассоциируется с высокой частотой встречаемости повышенных

значений толщины интимы-медии у бессимптомных пациентов с высоким риском сердечно-сосудистых осложнений [9, 53]. Высокая прогностическая значимость утолщения интимы-медии определяет важную роль сосудистого ремоделирования в развитии и прогрессировании сердечно-сосудистых заболеваний [9].

### **1.1.2. Патогенез ремоделирования артерий**

Ремоделирование артерий обусловлено множеством взаимосвязанных и сложно регулируемых процессов. Процессы, которые имеют особое значение, поскольку они являются ключевыми, включают: пролиферацию и дифференцировку клеток, деградацию волокон эластина и отложение ВКМ, нарушение функции эндотелия, важность которой трудно переоценить (рисунок 2) [9].

Адвентиция артерии считалась поддерживающей тканью по сравнению с интимой и медией, однако, экспериментальные данные последних лет показали, что повреждение адвентиции индуцирует патологические изменения в интимае и медии, подобные тем, которые вызывает повреждение эндотелия, кроме того, было показано, что изменения в адвентиции участвуют в ремоделировании интимы и медии [9, 274]. Фибробласты имеют решающее значение для заживления и развития фиброза сосудистой стенки и играют важную роль в ремоделировании адвентиции [9, 97]. Для реализации пролиферативного ответа фибробластов необходима их активация и дифференцировка в миофибробласты [97].

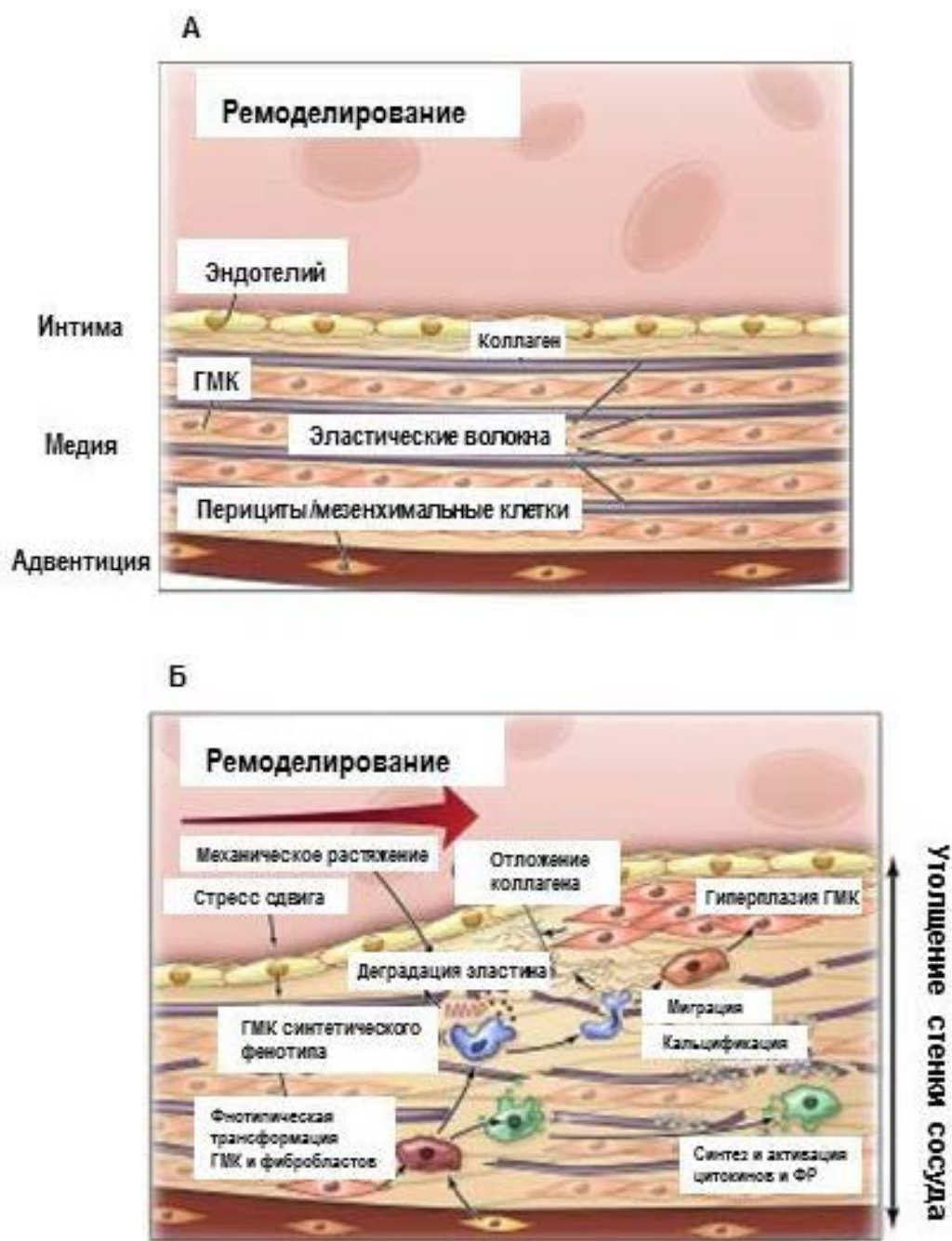


Рисунок 2 – Патологические механизмы сосудистого ремоделирования  
 (Обозначения: (А) Нормальный сосуд; (Б) Ремоделирование. Артериальное ремоделирование характеризуется утолщением стенки за счет миграции и пролиферации клеток сосудистой стенки и отложения внеклеточного матрикса (ГМК – гладкомышечные клетки; ФР – факторы роста) (Цит. по: van Varik, B.J., 2012. P. 291) [230])

Множество патологических состояний, например, артериальная гипертензия [430], а также различные виды повреждений сосудов, либо внутрисосудистых, например, формирование атеросклеротических бляшек [100] или перерастяжение сосуда при баллонной дилатации [163], либо периваскулярных (например, периваскулярное сдавление) [128], могут нарушать структуру и функцию сосудистой стенки. В ответ на эти стимулы включаются относительно стандартные механизмы адаптации и заживления, ведущие к ремоделированию адвентиции (рисунок 3) [9].

В поврежденных баллонным катетером коронарных артериях было показано, что отрицательное ремоделирование, в том числе, опосредовано усиленным делением фибробластов адвентиции и трансформацией фибробластов в миофибробласты, что приводит к образованию утолщенной адвентиции богатой миофибробластами и коллагеновыми волокнами [9]. В конце концов, адвентициальные миофибробласты подвергаются быстрому апоптозу, образуя рубцовоподобную ткань, сдавливающую сосуд [9, 97]. Помимо сдавления, реорганизация коллагеновых волокон, межмолекулярные сшивки, а также непрерывный синтез и отложение эластина, играют роль в ремоделировании слоев сосудистой стенки и ведут к уменьшению просвета сосуда [9, 274]. Негативное (констриктивное) ремоделирование в связи с модификацией адвентиции является одним из основных факторов, определяющих развитие рестеноза после баллонной ангиопластики, помимо раннего эластического спазма и роста неоинтимы [9, 448].

Функция ГМК имеет первостепенное значение для понимания причин ремоделирования артерий. В нормальных артериях ГМК медики регулируют диаметр и тонус сосудов для поддержания гемодинамического равновесия [9, 39]. Для выполнения этой регуляторной функции ГМК должны иметь сократительной фенотип.



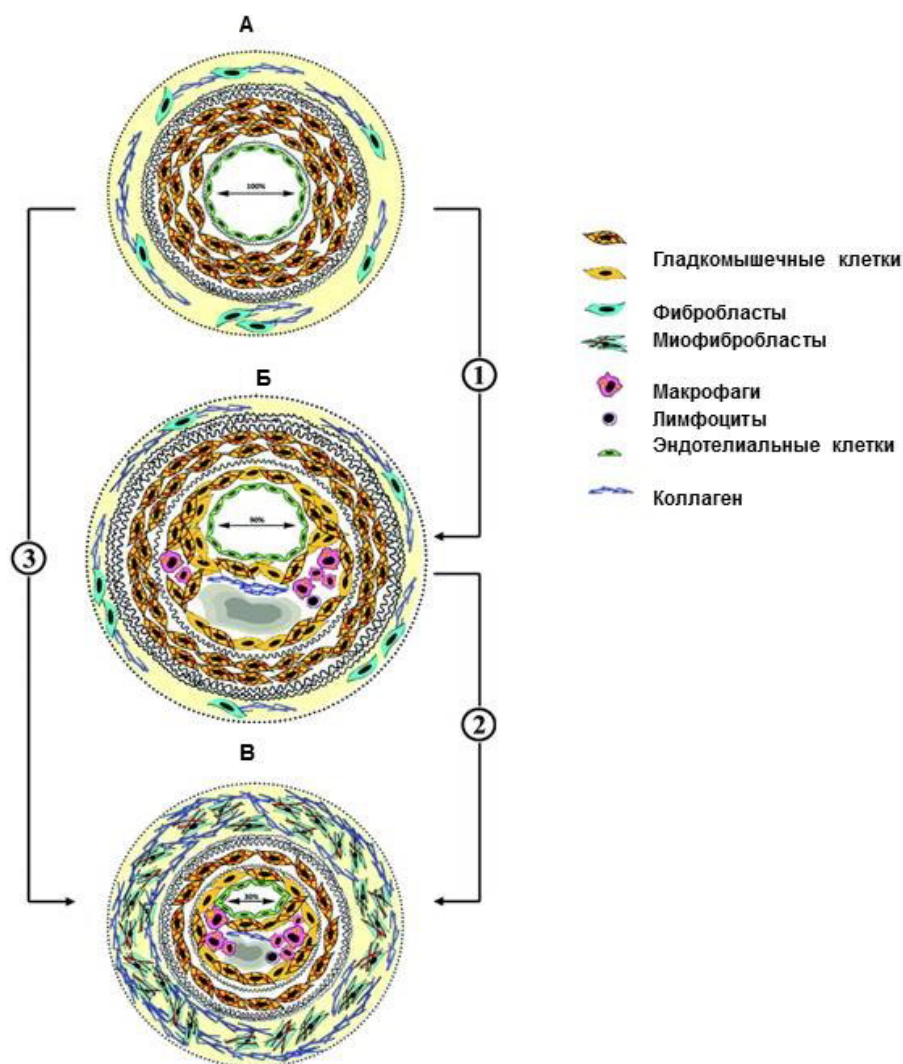


Рисунок 3 – Роль адвентиции в ремоделировании артерий

(Обозначения: (А) Адвентиция нормальной артерии, содержит отдельные фибробласты, окруженные рыхлой соединительной тканью. (Б) Адаптивное (положительные) ремоделирование происходит на ранних стадиях атеросклероза для поддержания постоянного потока, несмотря на рост бляшки (1). Оно заключается во внешней экспансии сосудистой стенки, которой способствуют потеря коллагена и утоньшение меди и адвентиции. (В) Констриктивное (отрицательное) ремоделирование приводит к уменьшению просвета сосуда, которое опосредовано ускоренной пролиферацией адвентициальных фибробластов, трансдифференцированных в миофибробласты, что ведет к образованию утолщенной и жесткой адвентиции, богатой коллагеновыми волокнами. Этот тип ремоделирования может развиваться как после положительного ремоделирования (2), так и сразу в результате ответа нормальной артерии на различные негативные воздействия (3) (Цит. по: Coen M., Gabbiani G., Vochaton-Piallat M.L., 2011. P. 2393) [97]

ГМК сократительного фенотипа характеризуются рядом специфических маркерных белков, таких как гладкомышечный 22-альфа, альфа-актин гладких мышц и смузелин [432]. Определенное количество ГМК меди обладает способностью дифференцироваться в клетки синтетического фенотипа, которые могут затем делиться и мигрировать или секретировать ВКМ [9, 39]. Фенотипическая гибкость ГМК необходима для адаптации сосудистой ткани к различным условиям. Стрессовые сигналы переключают экспрессию генов, модулирующих фенотип ГМК для адаптации. Этот процесс дифференцировки называется фенотипическим переключением и считается важным механизмом ремоделирования артерий [39, 432]. Фенотипическое переключение происходит в ответ на повреждение сосудов или иной стресс и характеризуется снижением экспрессии генов специфических для сократительного фенотипа ГМК [9, 39].

ГМК синтетического фенотипа продуцируют протеазы, расщепляющие эластин (в том числе, активаторы плазминогена, матриксные металлопротеиназы (ММП)). Эластичные волокна состоят из полимеров тропоэластина сшитых с микрофибриллами, богатыми фибриллинном. В сосудистой стенке эластин, в основном, синтезируется внутриутробно и в период новорожденности секреторными ГМК. При старении происходит разрушение эластичных волокон, ведущее к ремоделированию и жесткости сосудов [9, 227]. Было высказано предположение, что деградация эластина является преимущественно результатом усталости вследствие циклического растяжения эластических волокон с каждым ударом сердца [9, 152]. В поддержку этой гипотезы было показано, что структурные изменения эластина пропорционально связаны с общим количеством сердечных циклов [60]. Синтез коллагена ГМК и миофибробластами обеспечивает стабильность атеросклеротических бляшек. Напротив, если значительная часть ГМК имеет синтетический фенотип и секретировать протеолитические ферменты, деградация фиброзной покрышки может способствовать разрыву бляшки [102]. Таким образом, стабильность атеросклеротической бляшки во многом зависит от экспрессии протеолитических ферментов [9, 304].

Протеазы облегчают клеточную миграцию, отделяя клетки от базальной мембраны и ВКМ. Гиперэкспрессия ММП совпадает с миграцией ГМК [431]. Было показано, что ингибирование активности ММП подавляет миграцию сосудистых ГМК [9, 237]. Промиграционные стимулы воздействуют на цитоскелет ГМК. Ламеллоподии вытягиваются из лидирующего края клетки за счет полимеризации актина, что позволяет ей перемещаться через ВКМ по направлению к хемотактическому стимулу [9, 431]. Миграция способствует перемещению ГМК из меди в интиму и приводит к сужению просвета артерии. Особую роль в регуляции миграции клеток сосудистой стенки играет активатор плазминогена урокиназного типа (урокиназа) [9, 11, 153].

Функция эндотелия играет важнейшую роль в ремоделировании артерий. Функция эндотелия меняется с возрастом, а эндотелиальная дисфункция сопровождает многие сердечно-сосудистые заболевания. Поток крови и напряжение сдвига оказывают влияние на синтез эндотелиальными клетками оксида азота (NO), который в свою очередь регулирует сокращение и расслабление ГМК. В ответ на патологические воздействия, такие как изменения напряжения сдвига, воспаление или внутрисосудистое повреждение, эндотелиальные клетки экспрессируют цитокины и факторы роста, которые влияют на гомеостаз сосудистой стенки [9, 339]. Цитокины и факторы роста, в свою очередь, регулируют пролиферацию, миграцию и трансдифференцировку ГМК и фибробластов, а также синтез ВКМ этими клетками [9, 230, 246]. Отложение белков ВКМ, таких как фибронектин и фибриноген, способствует пролиферации, выживанию клеток и ремоделированию сосудистой стенки.

Длительное наблюдение пациентов после ангиопластики и атерэктомии с внутрисосудистой ультразвуковой оценкой состояния сосудов показало, что негативное ремоделирование происходит преимущественно в период от 1 до 6 месяцев после процедуры, отличающие его от раннего эластического спазма [52]. Стенты предотвращают сужение диаметра артерии, но вместе с тем приводят к чрезмерному росту интимы [269]. Эндотелиальная дисфункция в расширенных

сегментах артерий может быть связана с инактивацией оксида азота и развитием оксидативного стресса после внутрисосудистого повреждения [263].

При колебаниях артериального давления ремоделирование артерий на первых этапах является компенсаторным и служит для снижения напряжения в стенке артерии, однако, на более поздних стадиях компенсаторные механизмы становятся патологическими и инициируют патофизиологические отклонения. Так, фрагментация эластической мембраны, гиперплазия и гипертрофия ГМК, потеря сократительной способности ГМК, отложение коллагена и кальцификация ведут к жесткости артерий [49]. Многие исследования показали, что жесткость артерий независимо связана с сердечно-сосудистым риском и смертностью, а также является независимым предиктором поражения органов-мишеней: сердца, почек и мозга [9, 50, 51]. Жесткость артерий отражает степень ремоделирования крупных артерий и используется в качестве параметра для стратификации сердечно-сосудистого риска наряду с традиционными факторами риска [50].

В нормальных условиях ламинарный поток крови и циклические изменения напряжения сдвига поддерживают адекватные функции эндотелия, такие, как NO-опосредованную регуляцию сосудистого тонуса, отсутствие тромбоза и воспаления, поддержание нормального метаболизма ВКМ и регуляцию проницаемости сосудов [161]. При ремоделировании турбулентный кровоток и локальные изменения напряжения сдвига вызывают дисфункцию эндотелия, которая характеризуется нарушением синтеза NO и активацией провоспалительных и проатерогенных факторов, усилением окислительного стресса, а также вазоконстрикцией [9, 161, 230]. Жесткость артерий и эндотелиальная дисфункция не только стимулируют развитие атеросклеротических бляшек, но и способствуют дальнейшей реконструкции меди сосуды. Наконец, патологические гемодинамические изменения, связанные с повышенной жесткостью артерий, приводят к повреждению органов-мишеней, таких, как почки, мозг и сердце [9, 50, 51].

Сосудистые клетки могут чувствовать изменения механических сил и преобразовывать механический сигнал в биологический ответ – феномен

механотрансдукции, механизмы которого до конца не ясны. Были предложено несколько механизмов, обеспечивающих трансформацию механических стимулов, это стретч-активируемые ионные каналы, интегрины, цитоскелет, рецепторы тирозиновых киназ, а также внутриклеточная сигнализация, запускаемая активными формами кислорода (АФК) [9, 233, 337]. Исследования показали, что изменения напряжения сдвига или растяжения вызывают выраженное увеличение уровня АФК, которые могут способствовать спазму сосудов при артериальной гипертензии [233] или стимулировать ремоделирование сосудов, атеросклероз или ангиогенез через опосредованную АФК активацию транскрипции факторов роста, белков внеклеточного матрикса, матриксных металлопротеиназ или биоактивных пептидов [9, 167, 228]. Таким образом, стретч-индуцированная регуляция образования АФК и синергичные эффекты механических и химических раздражителей на образование АФК в патологических и физиологических условиях представляют собой важный молекулярный механизм регуляции ремоделирования артерий.

АФК служат вторичными посредниками, которые стимулируют деление клеток, реконструкцию цитоскелета и экспрессию генов во многих системах [324]. В эндотелиальных клетках АФК являются важными вторичными посредниками в регуляции роста клеток, миграции, пролиферации и выживания [9, 299]. При нарушениях напряжения сдвига происходит усиление АФК-зависимой сигнализации за счет подавления антиоксидантных генов и гиперэкспрессии секретируемых факторов, таких, как морфогенетический белок кости-4 [202, 299]. Изменения кровотока приводят к устойчивой гиперпродукции АФК, индукции оксидативного стресса и активации в эндотелиальных клетках MAP-киназ и NF- $\kappa$ B, что способствует эндотелиальной дисфункции и воспалению [210]. Окислительный стресс также связан с образованием окисленных липопротеидов низкой плотности, которые могут стимулировать активацию многих про-воспалительных сигнальных путей и усиливать атерогенез [9, 293].

Таким образом, нормальные адаптивные ответы эндотелия на нарушения кровотока, опосредующие сосудистый гомеостаз, могут стать неадекватными в

условиях, когда нарушения напряжения сдвига становятся хроническими, а также в присутствии других повреждающих факторов [9, 89].

Воспаление играет важную роль в ремоделировании сосудов, особенно при наличии атеросклеротического поражения. Клетки воспалительного типа привлекаются в участок повреждения и экспрессируют активные вещества, способствующие миграции и пролиферации клеток сосудистой стенки. Привлечение моноцитов / макрофагов молекулами клеточной адгезии, такими как молекула межклеточной адгезии 1 и молекула клеточной адгезии сосудов 1, чувствительно к изменениям напряжения сдвига [9, 172], что отчасти объясняет накопление макрофагов и Т-клеток выше пораженных атеросклерозом участков [9, 118] и в сосудах, в которых преобладает позитивное ремоделирование [309]. Гиперлипидемия также увеличивает инфильтрацию воспалительными клетками атеросклеротических бляшек и способствует экспрессии этими клетками матриксных металлопротеиназ. Большая часть экспрессии ММП в бляшках обеспечивается макрофагами/пенистыми клетками, и может быть уменьшена за счет снижения уровня липидов или подавления окисления липидов [9, 215]. С повышенной локальной активностью матриксных металлопротеиназ связывают положительное ремоделирование и истончение меди, наблюдаемые при атеросклерозе [9, 304, 428]. При повреждении бляшки, например, после ангиопластики или разрыве бляшки, образование фиброзного рубца может привести к негативному ремоделированию и сужению просвета артерии [9, 97].

### **1.1.3. Ремоделирование сосудов при атеросклерозе и рестенозе**

Атеросклеротическое поражение сосудов проявляется увеличением толщины интимы-меди (ТИМ) [9, 32]. При развитии атеросклероза сначала возникает утолщение интимы, при этом, связь между структурными изменениями сосудистой стенки и факторами риска развития атеросклероза считается доказанной. Так, например, существует прямая корреляция между ТИМ и уровнем холестерина липопротеидов низкой плотности [58]. Кроме того, установлена корреляция между ТИМ и патологическими изменениями

метаболизма кальция, фосфора, а также возрастом пациентов [221]. Атеросклеротические бляшки, суживающие просвет сосудов, вызывают нарушение кровоснабжения тканей и органов и, таким образом, нарушение их функционирования, при этом, наиболее существенным показателем является степень стенозирования сосуда. Кровоток в крупных артериях не меняется пока уменьшение диаметра не превысит 50%. Существенное снижение кровотока отмечается развитии критического стеноза – сужении просвета более 70%. В этом случае способность к возрастанию кровотока при нагрузке существенно снижается, и у таких пациентов часто развиваются ишемические осложнения [9, 363]. В 1964 г. С.Т. Dotter и М.Р. Judkins [120] предложили принципиально новое решение оперативного лечения стенозирующих осложнений при атеросклерозе [9]. Они выполнили механическое внутрисосудистое расширение бедренной артерии при помощи коаксиального катетера. В дальнейшем G. Porstmann [288] провел ряд экспериментов с использованием латексного баллона и внутрисосудистого катетера [9]. В 1977 г. в Цюрихе А.Р. Gruentzig [163] выполнил первое вмешательство по этой методике, применив внутрисосудистую баллонную ангиопластику в клинике [9].

Проведение транслюминальной баллонной коронарной ангиопластики (ТБКА) действительно уменьшало стеноз коронарных артерий, а также устраняло объективные и субъективные проявления ишемической болезни сердца [9]. Положительный эффект ТБКА исследователи вначале объясняли увеличением просвета сосуда за счет раздавливания и фрагментации атеросклеротической бляшки [120]. При дальнейших наблюдениях было установлено, что раздувание баллона сопровождается фокальным разрушением бляшки и ее компрессией с распределением компонентов бляшки по стенке сосуда. Вокруг атеромы возникали надрывы интимы и меди, которые проявлялись при коронароангиографии более или менее выраженной диссекцией тканей. Закрытие дефекта тканей коронарной артерии новым эндотелием с восстановлением целостности стенки артерии происходило через несколько недель после вмешательства [9, 393]. После успешного проведения ТБКА появилось

значительное количество пациентов, от которых поступали жалобы на возобновление стенокардии спустя 4–6 месяцев. Было обнаружено, что чрезмерная репарация сосудистой стенки приводит к рестенозу – повторному сужению сосуда [9, 65]. Повторное сужение артерии – патология, которая возникает после вмешательства и до сих пор считается ведущей проблемой эндоваскулярной хирургии. Рестеноз в участке проведенной ангиопластики характеризуется существенным ростом неоинтимы и гемодинамически значимым сужением просвета артерии. Диагностируют рестеноз ангиографически, при этом рестенозом считается сужение просвета артерии более чем на 50%, которое определяется при повторной ангиографии после успешно проведенной ТБКА через 3–6 месяцев [65]. В среднем частота рестенозов после ТБКА составляла по разным данным от 10 до 40 % [9, 367]. Рестеноз после ТБКА, являющейся одной из основных техник реваскуляризации, является результатом сложного процесса заживления сосудистой стенки после повреждения, также включающего каскад клеточных и молекулярных событий и высвобождение множества вазоактивных, тромбогенных и митогенных факторов [9, 317]. Сразу после ангиопластики в 30 % случаев происходит острый спазм эластических компонентов сосудистой стенки, который приводит к раннему сужению просвета артерии [45]. Тогда как рестеноз, определяемый при повторном ангиографическом исследовании как сужение диаметра артерии более 50 %, является причиной позднего сужения просвета в течение 6–9 месяцев и происходит за счет интенсивного пролиферативного и миграционного ответов сосудистой стенки на локальное повреждение, а также сдавление сосуда за счет ремоделирования [317]. В настоящее время, несмотря на большой прогресс в технике эндоваскулярных вмешательств частота рестенозов при наличии факторов риска, почечной недостаточности, в случае протяженных стенозов более 10 см сохраняется на уровне 9–11%, что является проблемой для данных категорий пациентов [61, 270, 312]. У некоторых пациентов (с сахарным диабетом, хронической почечной недостаточностью, у пациентов с кальцинированными бляшками или расположенными в области бифуркации)



наблюдают высокий риск развития рестеноза (45–55 %), так называемый, резистентный рестеноз [314].

В соответствии с существующими представлениями, рестеноз является недостаточно адаптированным ответом артерии на травму, вызванную ангиопластикой, которая запускает серию процессов, таких, как тромбоз, воспаление, миграция и пролиферация клеток и избыточная продукция внеклеточного матрикса (рисунок 4) [9], что вместе приводит к сужению просвета артерии после процедуры [317]. Сужение просвета можно разделить на 3 стадии: раннее сужение, вызванное ответом эластических компонентов стенки артерии (elastic recoil), позднее сужение вследствие негативного ремоделирования и поздняя гиперплазия неоинтимы [297]. Помимо этого, на участке дилатации возможно тромбообразование [312].

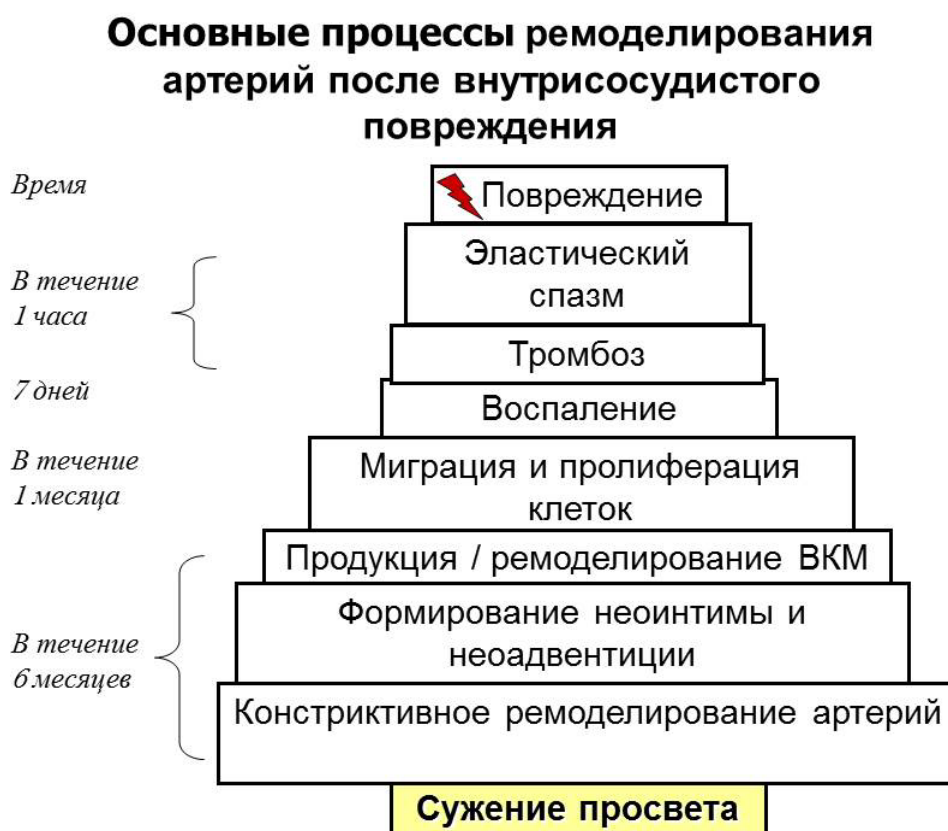


Рисунок 4 – Схема основных процессов ремоделирования артерий после повреждения сосуда (Обозначения: ВКМ – внеклеточный матрикс) (Цит. по: Ткачук, В.А. и др., 2013. С. 34) [11]

При баллонной ангиопластике происходит повреждение эндотелия, слои ГМК могут разрываться в радиальном направлении, а эластические мембраны в продольном направлении; наиболее вероятны разрывы в зоне атеросклеротических бляшек [244]. Повреждение сосудистой стенки повышает проницаемость сосудов и запускает каскад свёртывающей системы [7], а также адгезию тромбоцитов и тромбообразование, которое может длиться в течение 2 суток [103]. Пристеночное тромбообразование на поврежденном участке сразу после вмешательства может способствовать рестенозированию и в более позднем периоде. Из тромбоцитов высвобождается множество активных молекул, обладающих прокоагулянтными, вазоконстрикторными и митогенными свойствами, в том числе тромбоцитарный фактор роста (PDGF), тромбоксан A<sub>2</sub>, серотонин, фактор фон Виллебранда, аденозиндифосфат, фибронектин, фактор V. Так, тромбоцитарный фактор роста активно стимулирует миграцию и пролиферацию гладкомышечных клеток [29]. Кроме того, тромбин, как и некоторые другие компоненты свертывающей системы, является митогеном и хемоаттрактантом для гладкомышечных и моноцитарных клеток [199, 384], а ингибирование тромбина предотвращает рост неоинтимы после экспериментального баллонирования [438].

Обнаружение признаков тромбоза при ангиографии после ангиопластики коррелирует с риском рестеноза [197], в связи с этим для снижения риска применяют антикоагулянты и антиагреганты [320]. Сгусток, состоящий из фибрина и тромбоцитов, усиливает адгезию и миграцию лейкоцитов крови в зоне повреждения артерии. Привлечению лейкоцитов способствует P-селектин, экспонируемый на поверхности активированных тромбоцитов [9, 436]. Моноциты и гранулоциты прикрепляются к фибрину и гликопротеинам тромбоцитов с помощью лейкоцитарных  $\beta$ 2-интегринов [285], а адгезия моноцитов к фибронектину обеспечивается  $\beta$ 1-интегринами [245]. На экспериментальных моделях рестеноза во всех слоях сосудистой стенки были обнаружены воспалительные инфильтраты [211, 252]. Неспецифический воспалительный ответ на повреждение сосудистой стенки в самые ранние сроки обеспечивают

нейтрофилы, а привлеченные моноциты трансформируются в макрофаги и остаются в сосудистой стенке до нескольких недель [252].

В участке повреждения артерии из активированных тромбоцитов, лейкоцитов и гладкомышечных клеток происходит мощный выброс митогенов и белков, способствующих миграции и пролиферации клеток [305]. В обеспечении первой волны пролиферации ГМК меди принимает участие основной фактор роста фибробластов (bFGF) [191, 334].

Гиперплазия неоинтимы является в значительной степени результатом миграции активированных ГМК меди к участку повреждения и синтеза этими клетками внеклеточного матрикса [9, 443]. Тромбоциты и моноциты продуцируют PDGF, трансформирующий фактор роста- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), bFGF и ангиотензин 2, которые принимают участие в регуляции этих процессов [232]. Гиперплазия интимы как правило ассоциирована с трансформацией активно делящихся ГМК из сократительного в синтетический фенотип [9, 344]. Эта фенотипическая трансформация ассоциируется с повышенной продукцией компонентов ВКМ таких, как протеогликаны и коллаген, которые обладают способностью регулировать пролиферацию и дифференцировку клеток [9, 57]. В некоторых исследованиях получены данные об участии стволовых клеток костного мозга в развитии неоинтимы после повреждения [9, 385]. Полагают, что индукция пролиферации клеток неоинтимы происходит с участием PDGF [9, 101], TGF- $\beta$  [343, 375], рецептора AT1 ангиотензина 2 [433]. Тем не менее, к настоящему моменту в клинической практике не была доказана возможность блокады пролиферации с помощью подавления вышеуказанных факторов.

В процессе регенерации эндотелиального слоя деление клеток неоинтимы становится менее активным, а быстрая реэндотелизация ограничивает развитие неоинтимы [9, 394]. Нередко артерии со значительной неоинтимой отличаются неполной реэндотелизацией [62]. Ускорение реэндотелизации на животных моделях с целью ограничения роста неоинтимы с использованием трансфицированного фактора роста гепатоцитов, который стимулирует рост эндотелия, но не гладкомышечных клеток; локального введения эндотелиальных

клеток или введения предшественников эндотелиальных клеток оказалось достаточно успешным [313, 362, 394]. Оксид азота NO, который синтезируется клетками эндотелия, рассматривали, как важный фактор, подавляющий пролиферацию ГМК [189].

Отрицательное ремоделирование артерии является одним из основных механизмов позднего сужения просвета артерии после ангиопластики без стентирования [10, 231]. С использованием экспериментального баллонирования артерий было обнаружено, что компенсаторное расширение сосуда является важной детерминантой размеров просвета после баллонирования [9, 28]. Результаты некоторых исследований указывают на то, что вазоконстрикция также может быть одним из механизмов, приводящих к рестенозированию [10, 45, 73, 114]. M.J. Post et al. [289], используя 3 различные животные модели (нормальных кроликов, нормальных свиней и кроликов с атеросклерозом) и 2 разных типа повреждения (стандартную баллонную и термическую ангиопластику), обнаружили, что ремоделирование в большей степени, чем гиперплазия неоинтимы, определяет развитие рестеноза [9]. A. Lafont et al. [316] оценили вклад разных слоев сосудистой стенки в развитие рестеноза после баллонирования бедренной артерии кролика [10]. Они обнаружили значимую взаимосвязь между ответом адвентиции и хронической констрикцией артерии. Ответ на вызванное растяжением повреждение адвентиции приводит к фиброзу адвентиции [10, 274, 448] и сдавлению сосуда вокруг зоны повреждения [38, 274, 448]. Y. Shi et al. [38] показали, что глубокое повреждение сосуда с разрывами адвентиции приводит к утолщению адвентиции, трансформации фибробластов в миофибробласты, их пролиферации и активной выработке внеклеточного коллагена [9]. Такой ответ адвентиции может играть роль в развитии рестеноза после баллонной ангиопластики за счет кольцевого сдавления сосуда или предупреждения расширения наружной эластической мембраны (НЭМ) [10, 274, 448]. В коронарных артериях пациентов с выраженным атеросклеротическим поражением была выявлена корреляция между толщиной адвентиции и исходом ТБКА по данным гистологических исследований [9, 173].

Отдельно необходимо остановиться на процессах перестройки сосудистой стенки, приводящих к развитию рестеноза, после ангиопластики с имплантацией стента. Для увеличения эффективности транслюминальной ангиопластики была разработана новая техника эндоваскулярной реваскуляризации с установкой внутрисосудистого стента после ТБКА. Тем не менее, риск формирования рестеноза стента оставался достаточно высоким – от 10 до 20% по данным разных авторов [9, 200], что лимитировало эффективность стентирования в отдаленные сроки. В исследованиях были выявлены основные факторы, способствующие развитию рестеноза. Независимыми предикторами рестеноза признаны сахарный диабет, поражения более 20 мм и сосуды диаметром менее 2,5 мм [4, 17].

Повторное стенозирование артерии после баллонной ангиопластики происходит в течение 6 месяцев вследствие ремоделирования сосудистой стенки, тогда как основным механизмом рестенозирования после стентирования является гиперплазия ГМК, как реакция на повреждение и имплантацию инородного тела (рисунок 5) [15, 68]. Кроме того, рестенозирование стента происходит позже, а именно в течение восьми месяцев после вмешательства. При рестенозе стента в 40–50% артерий выражена пролиферация ГМК, кроме того, в месте имплантации стента отмечают миграция клеток и аккумуляция клеток лейкоцитарного ряда: макрофагов, нейтрофилов, В-лимфоцитов [175], а также, как правило, накопление ВКМ с высоким содержанием протеогликанов [140]. Таким образом, рестенозирование при стентировании происходит преимущественно за счет пролиферации клеток, воспалительной инфильтрации и синтеза внеклеточного матрикса.

Наиболее перспективным подходом к лечению рестеноза в настоящее время считается создание технологии локальной доставки лекарственного вещества с помощью внутрисосудистого эндопротеза. Для покрытия стентов в клинике использовали препараты, препятствующие свертыванию крови (гирудин, гепарин, антиагреганты), ингибиторы миграции (ингибиторы протеинкиназы С, ингибиторы матриксных металлопротеаз (батимастат), статины и эстрадиол 17β

для ускорения репарации, цитостатики паклитаксел и актиномицин D, а также дексаметазон и рапамицин или Sirolimus – иммунодепрессанты [111, 166].

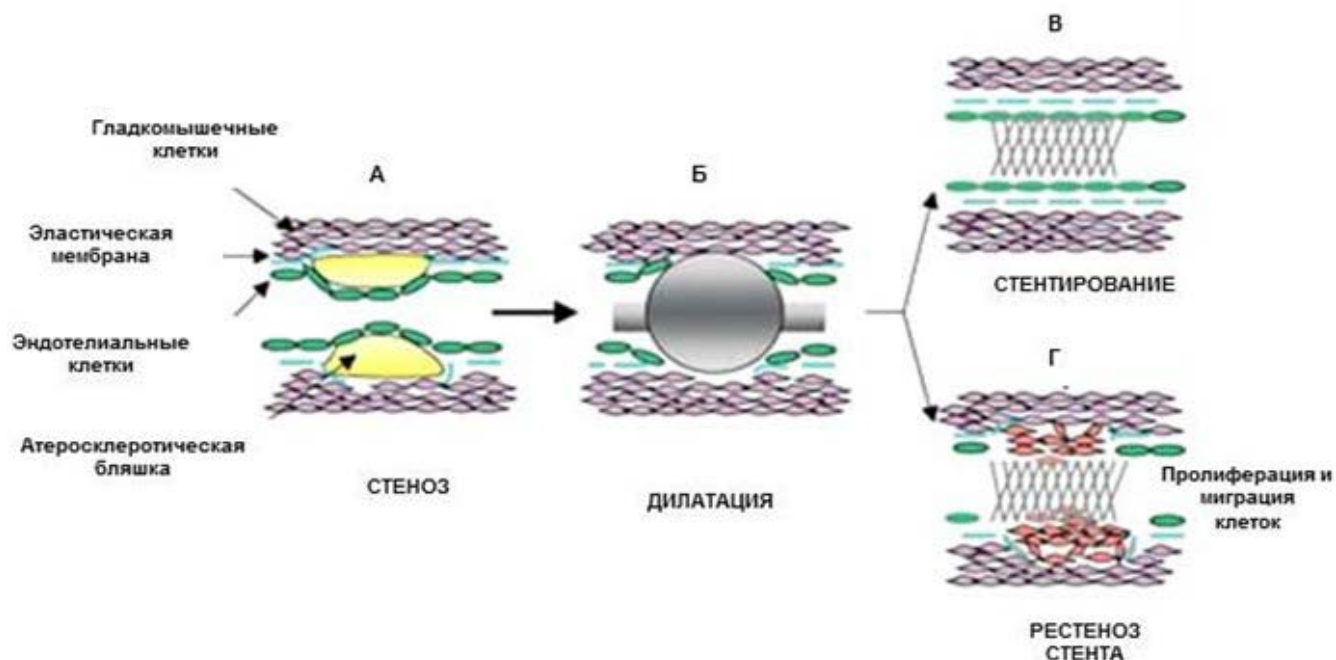


Рисунок 5 – Рестеноз стента (Обозначения: (А) Атеросклеротическая бляшка суживает просвет артерии; (Б) Расширение просвета артерии баллоном; (В) Установка стента; (Г) Рестеноз стента за счет пролиферации ГМК) (Цит. по: Agostini F. et al., 2006. P.515) [291]

Из этих препаратов покрытие стентов рапамицином было признано наиболее эффективным. Так, в исследовании SIRIUS частота рестеноза после имплантации эндопротезов, покрытых рапамицином, составила 3,2 % благодаря высокой антипролиферативной активности рапамицина [151]. Также появились рассасывающиеся стенты с лекарственным покрытием эверолимусом с частотой повторного стенозирования 2,8 % (ASSURE REGISTRY) [64]. Проводятся исследования стентов, покрытых паклитакселем (PERSEUS small vessel), в настоящее время частота рестенозов и использованием этого стента составила 14,9 % для мелких сосудов (диаметр 2,25–2,75 мм) [223]. Совершенствуются материалы, из которых изготавливают стенты, например, при использовании стентов, покрытых зотаролимусом или эверолимусом, частота рестенозов

составила 7 % и 6,5 %, соответственно [315]. Тем не менее, в настоящее время несмотря на существенный прогресс в технике вмешательств, позволивший повысить эффективность процедур и снизить число осложнений, у 8–11 % пациентов, в том числе, с поражениями более 10 см, с хронической почечной недостаточностью, при локализации бляшки в области бифуркации или в артериях голени или в сонной артерии через несколько месяцев после эндоваскулярных процедур развивается повторный стеноз или рестеноз [25, 61, 99, 121, 270, 312], а в некоторых странах частота рестенозов остается высокой и достигает 38 % [196].

Накопленные к настоящему моменту данные о применении в клинической практике стентов с лекарственным покрытием свидетельствуют о высокой эффективности данного вида эндопротезов при вмешательствах на первичных поражениях. Дальнейшие разработки в этом направлении будут способствовать решению проблемы рестеноза, в частности, рестеноза стента [9].

## **1.2. Современные стратегии коррекции ремоделирования артерий после внутрисосудистого повреждения**

Патофизиологические механизмы ремоделирования, такие как пролиферация и миграция ГМК, фенотипическая трансформация клеток, отложение ВКМ, кальцификация, воспаление, а также молекулы, регулирующие эти процессы, могут быть потенциальными кандидатами для вмешательства. Тем не менее, найти оптимальную мишень для воздействий оказалось не простой задачей в связи с множеством регуляторных механизмов и молекул-участников [9].

Основными сосудистыми клетками-продуцентами цитокинов являются ГМК, эндотелиальные клетки, лейкоциты и тромбоциты [360]. В развитии неоинтимы и ремоделировании артерий после их повреждения принимают участие большое количество молекулярных систем, в том числе, факторы роста [10] – фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) [136], трансформирующий фактор роста (TGF) [343], фактор роста тромбоцитов (PDGF) [101], фактор некроза опухолей (TNF) [119], а также система ангиотензина [433], хемокины и их

рецепторы [332], система матриксных металлопротеиназ (ММП), система свертывания и система плазминогена [72].

Поскольку ремоделирование сосудистой стенки требует перемещения (миграции) клеток и реорганизации внеклеточного матрикса, важную роль в регуляции этого процесса также играют системы протеаз: система матриксных металлопротеиназ и, прежде всего, система активаторы плазминогена – плазмин [153]. Для локализованного движения клеток в тканях, а также ремоделирования ВКМ и активации/высвобождения ростовых факторов необходим точечный протеолиз, который и обеспечивают эти системы [14, 153, 304].

Для профилактики рестенозирования и лечения ишемии наиболее перспективным подходом, как полагают, является покрытие стентов или баллонных катетеров различными препаратами, подавляющими разные звенья реакции сосуда на повреждение, в том числе тромбоз, воспаление, миграцию и пролиферацию клеток [205, 376, 445]. Применение антибиотика рапамицина, обладающего цитостатическими и иммуносупрессивными эффектами, сопровождалось локальным подавлением пролиферации и снижением частоты рестенозов в среднем по разным данным до 3–17%, в зависимости от размера сосуда [15, 225, 240]. Было, однако, выявлено, что в отдаленном периоде имплантация эндопротезов с рапамицином сопровождается у 2–13 % пациентов развитием тромбоза [348], а также может вызывать локальные деструктивные изменения стенки сосудов и образование повышающих риск развития осложнений сосудистых аневризм [220]. В настоящее время разрабатываются подходы к решению этих проблем, в частности, с помощью двойного покрытия стентов гепарином и рапамицином [341]. Были также созданы препараты 2 поколения для покрытия эндопротезов для постепенного высвобождения лекарственного средства, такие как Биоматрикс – комбинация производного рапамицина Биолимус А9 и рассасывающегося полимера молочной кислоты естественного происхождения, который обеспечивает контролируемое высвобождение Биолимус А9, однако, существенных отличий по развитию осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы при сопоставлении с



непокрытыми стентами выявлено не было. Были также созданы эверолимус и зотаролимус, в настоящее время покрытие эверолимусом считается наиболее эффективным и безопасным с точки зрения развития тромбозов [92, 253].

В связи с сохраняющимся достаточно высоким процентом рестенозов (около 11%), по некоторым данным до 38% [196], категории пациентов с резистентными рестенозами (с сахарным диабетом, хронической почечной недостаточностью, у пациентов с кальцинированными бляшками или расположенными в области бифуркации), у которых риск развития рестенозов составляет 45–55 % [314], наличием осложнений при использовании стентов с лекарственным покрытием 1 и 2 поколений, в настоящее время активно продолжаются исследования, направленные на разработку еще более безопасных и эффективных покрытий для стентов. При этом, основным вопросом является выбор патогенетического звена и мишени для воздействия, как для локального введения препарата, так и для системного.

Одним из возможных путей борьбы с атеросклерозом и рестенозом является нейтрализация провоспалительных цитокинов, например, нейтрализация интерлейкина 18 на животной модели [251]. Для подавления провоспалительных цитокинов предпринимались попытки использовать антагонисты их рецепторов, а также антитела против цитокинов и химерные конструкции растворимых рецепторов цитокинов с химерными белками человека, например, ингибиторы фактора некроза опухолей [396]. Успешным для подавления атеросклероза и улучшения ремоделирования артерий оказалось подавление гена фермента, активирующего фактор некроза опухолей [159]. Подавление активности цитокинов, однако, может сопровождаться нарушением иммунологического баланса и защиты от инфекций. Проводится II фаза исследования внутривенного введения препарата Ксилоникс, представляющего собой антитела к интерлейкину 1 $\alpha$ ; после ангиопластики, исследование не завершено, предварительно результаты позитивные [31]. В настоящее время начаты клинические исследования нескольких противовоспалительных препаратов, результаты которых позволят оценить перспективность данного направления терапии [47].

Блокирование эффектов моноцитарного хемоаттрактанта 1 предотвращало развитие рестеноза на животной модели [48], а также блокирующие антитела к макрофагальному антигену 1 ( $\beta$ 2-интегрину CD11b/CD18) подавляли рост неоинтимы после имплантации стентов [321]. В то же время терапевтическое применение подобных антител у пациентов вызывает сложности, так как хемокины участвуют в подавлении инфекций, поэтому длительное их ингибирование небезопасно. Интересны исследования противовоспалительного белка активированного протеина С, которым покрывали стенты на животной модели, что приводило к снижению развития рестеноза [176]. Еще одной мишенью был Р-селектин, блокирование которого антителами подавляло развитие неоинтимы после баллонирования у животных [327]. В клинической практике в настоящее время активно оценивается использование стентов с покрытием дексаметазоном [111].

Продолжаются исследования влияния антиоксидантов на развитие негативного ремоделирования артерий. Получены данные о подавлении роста неоинтимы и сужения просвета артерий после применения антиоксидантов. Так, витамин С [128], антиоксиданты элсибукол [130], сукцитобукол [354] и пробукол подавляли развитие неоинтимы. Было обнаружено снижение частоты рестенозов после баллонной ангиопластики на фоне применения пробукола [294]. В клинике исследуется применение стентов с двойным покрытием сиролимусом и пробуколом с многообещающими первыми результатами о снижении частоты рестенозов [150]. Однако, пока антиоксиданты не заняли прочного места в терапевтической практике, возможно, вследствие отсутствия больших клинических испытаний. Тем не менее, это направление следует считать перспективным, поскольку в литературе накопилось множество данных о влиянии оксидативного стресса на ремоделирование сосудистой стенки, пролиферацию клеток и изменения тонуса сосудов [264, 358].

Разрабатываются подходы к ингибированию сигнальных путей, активируемых различными цитокинами [325]. Для предотвращения развития атеросклероза и рестеноза интерес вызвали белки семейства SOCS, которые,

воздействуя на интерферон- $\gamma$  и на путь сигнализации JAK/STAT, принимают участие в регуляции воспаления [345]. В недавнем исследовании было показано, что введение новой молекулы, высвобождающей монооксид углерода (CORM-2), подавляло рост неоинтимы, воздействуя на сигнальный путь PI3K/Akt/eNOS [74].

Новым перспективным подходом к регуляции ремоделирования сосудистой стенки, развития рестенозов является использование микроРНК, участвующих в регуляции экспрессии генов на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях через РНК-интерференцию [157, 188, 239].

Разрабатываются также стратегии, направленные на ингибирование эффектов факторов роста. Так, использование растворимого рецептора TNF-1, ассоциированного с полиэтиленгликолем, блокировало эффекты TNF, циркулирующего в крови и предотвращало развитие неоинтимы в поврежденной артерии [396]. Нейтрализация эффектов PDGF вызывала подавление роста неоинтимы [41, 256], также как ингибирование сигнальных путей рецептора тромбоцитарного фактора роста через PI3K и PLCgamma [116]. Ингибирование сигнального пути TGF-beta1 с помощью аденовирусной трансфекции доминант-негативного мутанта N19RhoA, подавляющего сигнализацию киназы RhoA, приводило к подавлению трансформации фибробластов в миофибробласты, периваскулярного отложения коллагена, роста неоинтимы и неблагоприятного ремоделирования поврежденной артерии [271]. Кроме того, был синтезирован специфический ингибитор рецептора TGF-beta1 (SD-208) для перорального приема, снижающий фиброз тканей [392]. Его использование представляется перспективным для регуляции фиброза и ремоделирования сосудов. Что касается фактора роста гепатоцитов (HGF), стимулятора роста эндотелиальных клеток, то трансфекция гена HGF ускоряла реэндотелизацию и ограничивала рост неоинтимы [313]. Антитела к рецептору VEGF sFlt-1 подавляли экспериментальный рестеноз после внутрисосудистого повреждения, ингибируя привлечение моноцитов в сосудистую стенку и пролиферацию клеток [48]. Ремоделирование артерии подавляет также блокада рецепторов эндотелина A, как было показано на модели снижения кровотока в сонной артерии кролика [336].

Антагонисты рецепторов ангиотензина также могут предотвращать патологическое ремоделирование стенки сосуда [433].

Активно развивается направление с введением клеток предшественников для предотвращения роста неоинтимы, например, предшественников эндотелиальных клеток [313, 362, 394]. Начаты исследования использования стентов Combo, покрытых сиролимузом и высвобождающих эндотелиальные клетки предшественники [135].

Воздействие на белки внеклеточного матрикса представляется еще одним перспективным направлением [124]. Так, локальное нанесение ингибитора полимеризации фибронектина на поврежденную артериальную стенку приводит к подавлению лейкоцитарной инфильтрации, пролиферации клеток и препятствует избыточному накоплению фибронектина и коллагена, что приводит к более благоприятному ремоделированию поврежденной артерии и уменьшению индекса толщины интима-медия [148]. Ингибирование лизил-оксидазы, фермента, отвечающего за формирование связей коллагена и эластина, приводит к развитию благоприятного положительного ремоделирования артериальной стенки [98]. Подавление гиалуронана и версикана с помощью коротких олигонуклеотидов или антител блокирует пролиферативный и миграционный ответы сосудистых клеток, а ингибирование версикана с помощью антисенсов блокирует пролиферацию ГМК [446].

Эффекты блокирования матриксных металлопротеиназ в сосудистой стенке хорошо известны [107]. Ингибиторы ММП (батимастат и маримастат) замедляли рост неоинтимы и подавляли миграцию ГМК [237]. Аналогично, введение в поврежденную стенку сосуда аденовируса с геном TIMP-1 подавляло рост неоинтимы и уменьшало миграцию ГМК [290].

Новым разрабатываемым подходом является ингибирование эффектов ингибитора активаторов плазминогена в сосудистой стенке – ПАИ-1 [272, 340]. Поскольку у трансгенных животных, лишенных гена тканевого активатора плазминогена, было обнаружено усиление неблагоприятного ремоделирования артерий [113], были оценены эффекты гиперэкспрессии тканевого активатора

плазминогена. При этом как его локальное введение в аденовирусном векторе, так и системное введение приводили к усилению роста неоинтимы и неблагоприятному ремоделированию артерий кроликов после баллонирования [133]. На этой же модели совместная трансфекция VEGF165 и тканевого активатора плазминогена вызывала подавление роста неоинтимы [388]. Исследований в этом направлении очень мало, в связи с чем механизмы влияния тканевого активатора плазминогена на сосудистую стенку требуют дальнейшего изучения.

При обилии разработок и подходов, а также учитывая сложность механизмов, верный выбор специфической мишени дает возможность очень избирательно влиять на процесс ремоделирования. В связи с тем, что наиболее эффективным, лишенным побочных эффектов, является воздействие на специфические ключевые звенья процесса, находящиеся в конце сигнального каскада, то в поиске такой мишени исследователи обратили внимание на урокиназный активатор плазминогена (урокиназу).

### **1.3. Урокиназа как многофункциональный регулятор жизнедеятельности клеток кровеносных сосудов**

Урокиназный активатор плазминогена (урокиназа, uPA) является многофункциональным белком, играющим особую регуляторную роль в сосудистой стенке и обладающим способностью запускать протеолитические и сигнальные каскады. В 60-е годы в связи с прогрессом в медицине особое внимание исследователей привлекли процессы фибринолиза. В 1952 году в моче были обнаружены “киназы”, способные превращать плазминоген в плазмин [59]. В 1954 году удалось выделить и очистить фермент, непрерывно выделяемый с мочой, названный в связи с этим урокиназой или урофиринолизокиназой [287]. Этот фермент был способен вызывать фибринолиз аналогично известной к тому времени стрептокиназе, действуя не прямо как фибринолитический фермент, а через активацию плазминогена [333]. С тех пор урокиназа непрерывно привлекала

к себе внимание исследователей и к настоящему времени опубликовано большое количество статей, посвященных этому ферменту. К настоящему времени известно, что урокиназа представляет собой мультидоменный многофункциональный белок, превращающий плазминоген в плазмин, который помимо регуляции фибринолиза осуществляет активацию факторов роста, модуляцию цитокинов, шеддинг рецепторов, фенотипическую трансформацию клеток, экспрессию белков и активацию протеолитических каскадов. Эти механизмы обеспечивают стимуляцию миграции и пролиферации клеток под действием урокиназы, – ключевых процессов ремоделирования артерий, прогрессирования атеросклероза, рестеноза после процедур реваскуляризации и ангиогенеза при ишемии тканей.

### **1.3.1. Структура урокиназы**

Урокиназу синтезируют эндотелиальные, эпителиальные клетки, ГМК сосудистой стенки, фибробласты, клетки моноцитарно-макрофагального ряда, а также клетки злокачественных опухолей разных типов [10, 305]. В структуре урокиназы выделяют три домена: домен, подобный эпидермальному фактору роста – N-концевой; крингл-домен и C-концевой каталитический домен (рисунок 6). Урокиназа секретируется клетками в виде одноцепочечного полипептида с молекулярной массой 54 кДа, состоящего из 411 аминокислотных остатков [10, 305]. Одноцепочечная урокиназа не обладает протеолитической активностью в отношении синтетических субстратов, но расщепляя плазминоген превращает его в плазмин.

Плазмин же активировывает урокиназу и превращает одноцепочечную форму урокиназы в двухцепочечную. Двухцепочечная урокиназа обладает протеолитической активностью, как в отношении синтетических субстратов, так и плазминогена, при этом скорость расщепления плазминогена двухцепочечной формой урокиназы более, чем в 200 раз выше, чем одноцепочечной формой [10, 279]. В сосудистой стенке плазмин способствует растворению тромбов,

расщепляя фибрин, и наряду с урокиназой участвует в индукции протеолитического каскада, активируя матриксные металлопротеиназы.

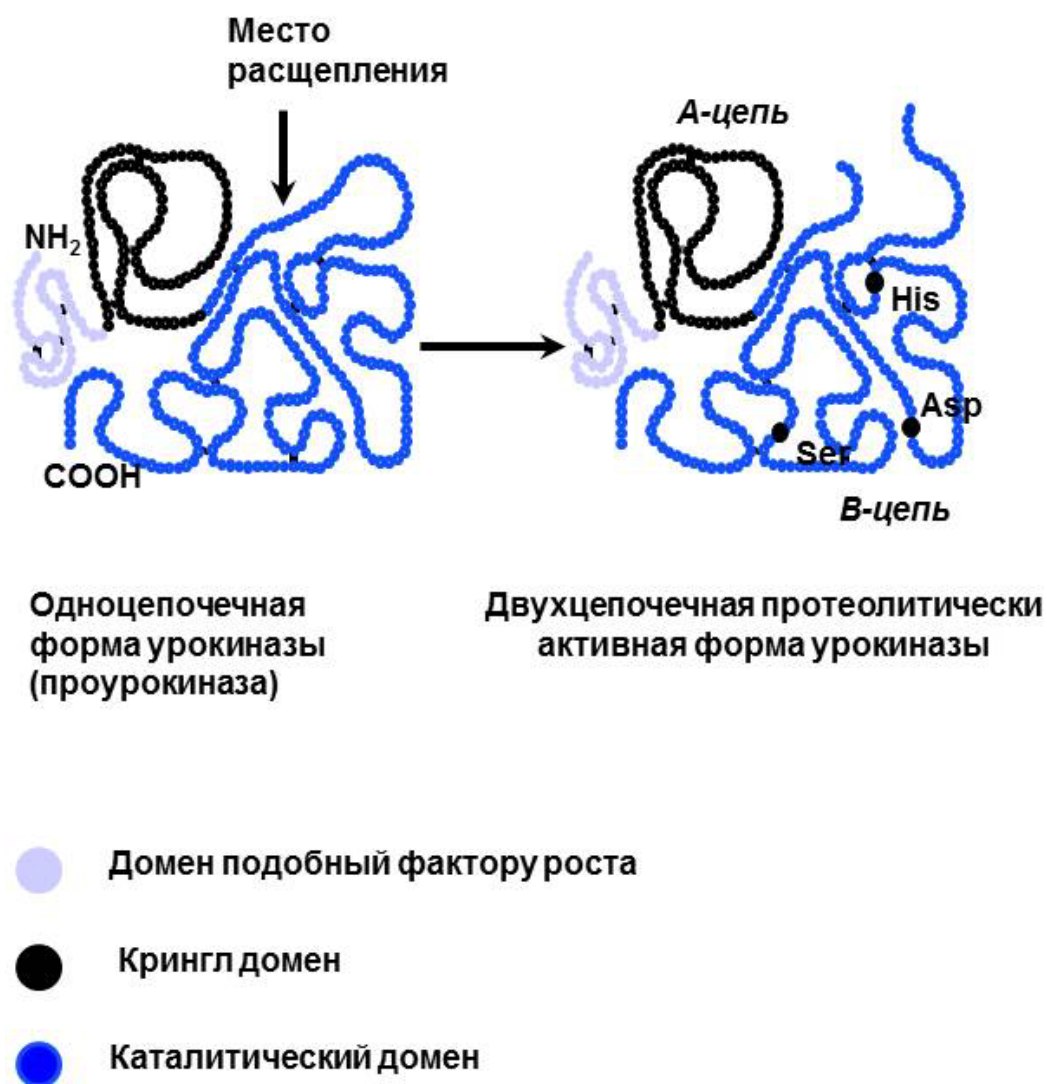


Рисунок 6 – Схема активации проурокиназы (Обозначения: Представлены домены молекулы урокиназы и указаны аминокислоты активного центра фермента)

ММП обеспечивают расщепление белков ВКМ, включая факторы роста, и компонентов базальной мембраны, таких как коллаген, фибронектин и ламинин [10, 107]. Такой протеолитический каскад необходим для разрушения межклеточных контактов, локального расщепления ВКМ и перемещения клеток. Кроме того, активация и/или высвобождение латентных и связанных с матриксом

факторов роста также способствует усилению хемотаксиса, миграции и пролиферации сосудистых клеток.

В двухцепочечной урокиназе полипептидные цепи, А (легкая) и Б (тяжелая), соединены между собой дисульфидной связью Cys148-Cys279. А-цепь включает в себя “ростовой” домен, подобный фактору роста (growth factor like domain; GFD) и крингл-домен, а протеолитический домен входит в состав цепи Б [10]. Домен, подобный фактору роста, схож по структуре с мышинным эпидермальным фактором роста и трансформирующим фактором роста  $\alpha$  [347]. Крингл-домен вносит свой вклад в промиграционные эффекты урокиназы [365], а также может взаимодействовать с гепарином через аминокислотные остатки аргинина в позициях 108, 109, 110 [169]. Крингл содержит участки связывания с ингибитором активаторов плазминогена ПАИ-1 [318] и интегринами [195, 371]. Также обнаружено, что крингл урокиназы обеспечивает стабилизацию комплекса урокиназы с ее рецептором [372]. По своей структуре он гомологичен крингл-доменам таких белков, как активатор плазминогена тканевого типа, плазминоген, протромбин, фактор XII и аполипопротеин В [82]. Наибольшая гомология наблюдается со вторым крингл-доменом тканевого активатора плазминогена. Однако второй крингл тканевого активатора плазминогена связывается с положительно заряженным остатком лизина фибрина, тогда как крингл урокиназы взаимодействует с полианионными молекулами, такими как гепарин, что делает крингл урокиназы уникальным по сравнению со всеми остальными кринглами. Протеолитический домен включает в себя активный центр урокиназы, состоящий из 3 аминокислот – His204, Asp255, Ser356. Он обеспечивает превращение плазминогена в плазмин, протеазу с широкой субстратной специфичностью, а также активацию ряда факторов роста и матриксных металлопротеиназ.

### 1.3.2. Сигнализация урокиназы

Домен, подобный фактору роста, обеспечивает высокоаффинное связывание урокиназы с ее рецептором uPAR/CD87 ( $K_d \sim 10^{-10}$ – $10^{-9}$  М) [10, 374]. Рецептор



урокиназы локализован в кавеолах, – впячиваниях цитоплазматической мембраны, содержащих гликофинголипиды, сфингомиелин, полифосфоинозитиды и холестерин. У рецептора урокиназы отсутствуют трансмембранные участки, он зафиксирован в мембране через гликолипид гликозилфосфатидилинозитольный якорь, что обеспечивает его высокой степенью подвижности в плазматической мембране [374]. Он состоит из трех доменов, гомологичных по структуре (рисунок 7).

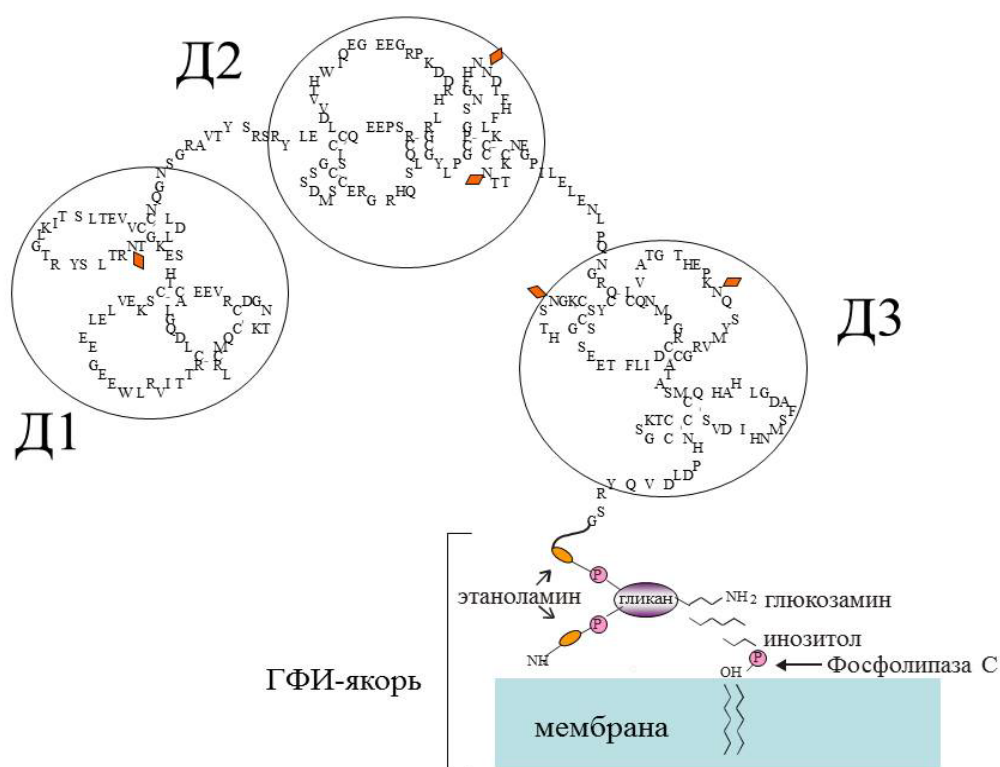


Рисунок 7 – Схема структуры рецептора урокиназы (Обозначения: Представлена последовательность аминокислотных остатков доменов рецептора (Д): 1–77 – Д1, 93–177 – Д2, 193–272 – Д3; ГФИ якорь – гликозилфосфатидилинозитольный якорь) (Цит. по: Ткачук В.А. и др., 2013. С. 21) [11]

$\beta$ -Слои трех доменов рецептора имеют правозакрученную ориентацию и образуют глобулу с центральной полостью в форме конуса, имеющей глубину 19 ангстрем. Для связывания с урокиназой третий домен смещается приблизительно на 12 ангстрем, второй и первый домены сближаются и происходит взаимодействие между His 47 и Asn 259, а также Arg 53 и Asp 254 [351]. За

связывание с рецептором, как традиционно полагали, в домене, подобном фактору роста, урокиназы отвечают аминокислотные остатки, расположенные с одной стороны плоскости  $\Omega$ -петли Asn22, Tyr2425, Ile28, и Trp30 [355]. Недавно был предложен новый механизм взаимодействия рецептора и домена, подобного фактору роста, урокиназы, при котором наличие четкой вторичной структуры урокиназы не было критически важным [16]. При таком взаимодействии все три домена участвуют в формировании высокоаффинного участка связывания с урокиназой. Было показано, что при связывании рецептора с урокиназой за счет приближения первого и третьего доменов, рецептор замыкается в кольцо и обнажается участок SRSRY, расположенный между доменами D1 и D2 [353]. Обнажаются также участки, запускающие сигнализацию и образующие сайты связывания урокиназы и рецептора с интегринами и белками ВКМ. В другом исследовании авторы показали, что рецептор урокиназы со сшивкой между первым и вторым доменами обладал идентичной константой связывания, что и нативный рецептор [106]. Кроме того, были получены данные, указывающие на то, что при взаимодействии рецептора и урокиназы на крингле урокиназы обнажаются сайты связывания с другими мишенями, что может быть одним из механизмов стимуляции миграции под действием урокиназы [3]. Таким образом, взаимодействие урокиназы и ее рецептора вызывает изменения функциональных свойств обоих участников, как урокиназы, так и ее высокоаффинного рецептора.

Связанная с рецептором одноцепочечная урокиназа активируется плазмином более эффективно, чем свободная [70]. В комплексе с высокоаффинным рецептором урокиназа медленнее подвергается протеолизу под действием плазмина. Форма урокиназы, лишенная домена, подобного фактору роста, не может связываться с рецептором, а также подвергается быстрому эндоцитозу и внутриклеточной деградации. Таким образом, связывание с рецептором увеличивает времени «полужизни» активной полноразмерной молекулы урокиназы на поверхности клетки [10, 278].

Для запуска внутриклеточных сигнальных каскадов необходимо формирование комплекса uPAR/CD87 с трансмембранными белками [10, 70],

например, такими как витронектин [369], интегрины [380], кавеолин [80] или L-селектин [216]. Взаимодействие урокиназы с рецептором на клетке активирует системы сигнализации, регулирующие пролиферацию и миграцию клеток [370], а также сигнальные пути регуляции реорганизации цитоскелета: MAP-киназы, паксиллина, киназы фокальных контактов, Hsk-киназы, белка p130CAS [204], активаторы транскрипции STAT1 и STAT2, протеинкиназу Ce, осуществляющую фосфорилирование цитокератинов [109], некоторые факторы транскрипции – AP1, c-Jun, c-Myc и c-fos [156, 186]. Рецептор может взаимодействовать с различными интегринными, такими как лейкоцитарный  $\beta 2$ -интегрин CD11b/CD18, а также  $\beta 1$ ,  $\beta 3$  интегрины и с рецептором витронектина  $\alpha(v)\beta 5$  [10, 398, 400], а также  $\alpha(v)\beta 3$  интегринными [115, 356]. Связывание урокиназы с высокоафинным рецептором индуцирует сигнальные каскады, которые опосредуют миграцию ГМК, фибробластов и других клеток, а также адгезию, пролиферацию и дифференцировку клеток [10]. Урокиназа может взаимодействовать на поверхности клетки одновременно с двумя рецепторами - через домен, подобный фактору роста, с uPAR/CD87 и через крингл и протеолитический домены с интегрином CD11b/CD18 [195]. Крингл урокиназы может также взаимодействовать с другим неизученным специфическим рецептором урокиназы [365], как полагают некоторые авторы, этим рецептором могут выступать интегрины [356]. Крингл урокиназы также может запускать внутриклеточную сигнализацию и индуцировать адгезию и миграцию клеток [77, 259].

A-цепь урокиназы может взаимодействовать с рецепторами, обеспечивающими интернализацию урокиназы в комплексе с ее ингибитором через окаймленные клатрином ямки. Так она может взаимодействовать с рецептором липопротеидов очень низкой плотности (VLDLR) и белком LRP/ $\alpha 2$ -MR, связанным с рецептором липопротеидов низкой плотности, рецептором  $\alpha 2$ -макроглобулина [10, 67]. Сродство урокиназы к этим рецепторам ( $K_d \sim (1-2) \cdot 10^{-8}$  М) хуже, чем сродство к рецептору uPAR/CD87 ( $10^{-10}-10^{-9}$  М), в связи с этим высокоафинное взаимодействие урокиназы с uPAR/CD87 может предотвращать связывание урокиназы с LRP/ $\alpha 2$ -MR и последующую ее деградацию [301].

Эндоцитоз урокиназы через LRP/  $\alpha$ 2-MR или VLDLR индуцирует также внутриклеточную сигнализацию и адгезию и миграцию клеток [10, 397, 441].

Внутриклеточная сигнализация, запускаемая урокиназой, может быть опосредована через ее высокоафинный рецептор uPAR, через LRP/ $\alpha$  2-MR, а также через другие белки-партнеры (рисунок 8) [66].

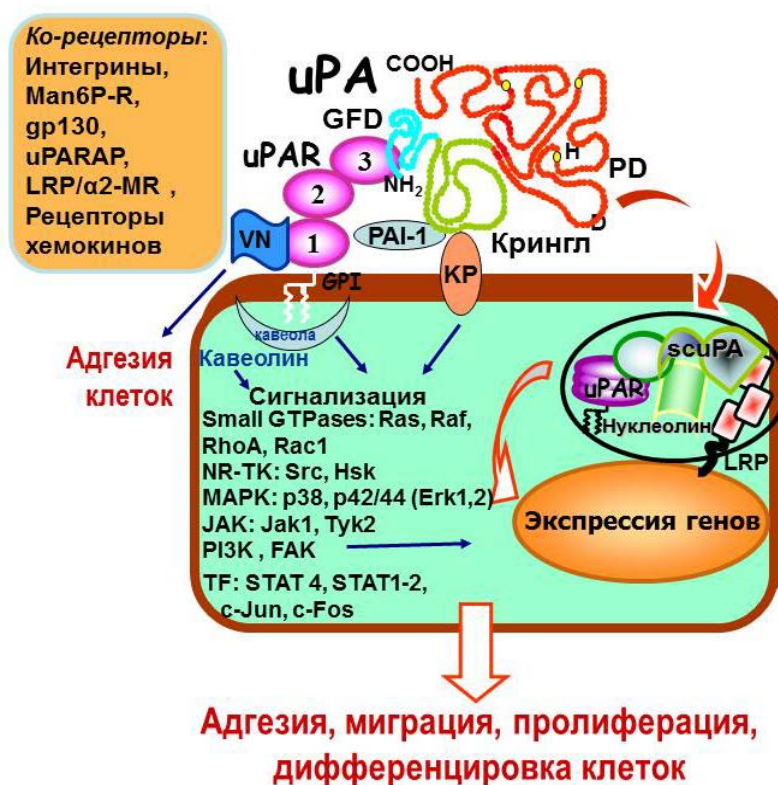


Рисунок 8 – Взаимодействие урокиназы с рецептором (uPAR/CD87) и крингл-связывающим белком (КР) индуцирует внутриклеточные сигнальные каскады, ведущие к адгезии, миграции, пролиферации и дифференцировке клеток (*Обозначения:* GFD – домен, подобный фактору роста; PD – протеолитический домен; GPI – гликозилфосфатидилинозитольный якорь; VN – витронектин; PAI-1 – ингибитор активаторов плазминогена; scuPA – одноцепочечная урокиназа; LRP – рецептор липопротеидов низкой плотности; LRP/ $\alpha$  2-MR - белок, связанный с рецептором липопротеидов низкой плотности/рецептор  $\alpha$ 2-макроглобулина; MAPK – митоген, активируемые протеинкиназы; JAK – тирозиновые протеинкиназы; STAT – ДНК-связывающие активаторы транскрипции; TF – факторы транскрипции; PI3K – фосфоинозитид-3-киназа; FAK – киназа фокальных контактов; NR-TK – нерепторная тирозинкиназа; Man6P-R – манноза-6-фосфат/рецептор инсулиноподобного фактора роста II; gp130 – сигнальный посредник интерлейкина 6; uPARAP – белок, ассоциированный с урокиназным рецептором) (Цит. по: Ткачук, В.А. и др., 2013. С. 23) [11]

Показано, что промиграционные эффекты урокиназы сопровождаются активацией Src- и Janus киназ [10, 416]. uPAR/CD87 совместно преципитируется с тирозиновыми протеинкиназами Hsk, Fyn, Lyn, Frg, Jak1, и Tyk2 [10, 370]. Хемотаксис, индуцируемый урокиназой, опосредован G-белками (ГТФ-связывающими белками) [319]. Связывание урокиназы с uPAR/CD87 приводит к активации киназ Hsk, FAK, MAP-киназ (p38, ERK1,2 (p42/44)), паксиллина, протеинкиназы C $\epsilon$  (PKC $\epsilon$ ), фосфорилированию цитокератинов 8 и 18, белка p130CAS и ДНК-связывающих активаторов транскрипции STAT-1 и STAT-2 [10, 146]. Связывание урокиназы с LRP/ $\alpha$ 2-MR ведет к активации протеинкиназы A с вовлечением Gs-белков [421]. Для индукции крингл-зависимой миграции под действием урокиназы необходима специфическая активация p38 MAP и ERK 1/2 киназных каскадов с участием PI3-киназы, сопряженной с G-белком [329]. В клетках эндотелия урокиназа активирует MAP-киназную и FAK-киназную сигнализацию посредством связывания с uPAR/CD87 [383].

Рецептор uPAR/CD87 был идентифицирован в комплексе с некоторыми семействами интегринов, такими как  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3 и  $\beta$ 5 [115, 398, 400, 422]. Компоненты матрикса способствуют выборочной ассоциации урокиназного рецептора с членами семейства интегринов. Так, рецептор урокиназы и интегрины  $\beta$ 3 не формируют комплексы на фибронектине, ламинине, полилизине, а только на витронектине. Рецептор урокиназы был локализован совместно с  $\alpha$ 5-интегрином на фибронектине, с интегринными  $\alpha$ 5 и  $\alpha$ v — на витронектине, а  $\alpha$ 3 и  $\beta$ 6 — на ламинине [427]. Взаимодействие рецептора урокиназы с витронектином способствует адгезии клеток, тогда как его связывание с  $\beta$ 1-интегринными подавляет их проадгезивные свойства. Обнаружена корреляция между образованием на мембране комплекса урокиназного рецептора с  $\beta$ 1 интегринными и кавеолином и вызванной uPAR адгезией клеток на витронектине [307]. В индукцию миграции раковых клеток MCF-7 под действием урокиназы вовлечены  $\beta$ 1-интегрины и витронектин [248]. Образование комплекса урокиназного рецептора с  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 интегрином под действием урокиназы на фибронектине и коллагене 1 типа вызывает распластывание клеток MDA-MB-231 и

фосфорилирование белка фокальной адгезии FAK [415]. На клетках эпителия комплекс  $\alpha 3\beta 1$ -интегрин и рецептора урокиназы активирует киназу Src и подавляет экспрессию кадгерина E, а также нарушает межклеточные контакты [117]. Урокиназный рецептор может способствовать межклеточному взаимодействию и клеточной адгезии, связываясь с интегринными соседней клетки, такими, как  $\alpha 4\beta 1$ -интегринными, а также  $\alpha 6\beta 1$ -,  $\alpha 9\beta 1$ -интегринными. Взаимодействие урокиназного рецептора с интегринным  $\alpha 5\beta 1$  активирует ERK1/2 и индуцирует адгезию клеток карциномы HEP-3. При этом взаимодействии в интегрине  $\alpha 5\beta 1$  обнаруживается дополнительный участок связывания фибронектина помимо основного участка RGD. Во взаимодействии uPAR с интегринным участком участвуют все домены рецептора, при этом во втором домене был идентифицирован участок связывания 130–142 а.о. с интегринным  $\alpha 5\beta 1$  [296].

Показано функциональное взаимодействие uPAR с  $\beta 2$ -интегринными, например, рецептором комплемента 3 типа CD11 $\beta$ /CD18 [328]. uPAR/CD87, CD11 $\beta$ /CD18 и Src-киназы (p60fyn, p53/56lyn, p58/64hck, p59fgr) образуют единый рецепторный комплекс на поверхности моноцитов [409]. Взаимодействие uPAR с CD11 $\beta$ /CD18 предотвращает связывание CD11 $\beta$ /CD18 фибриногеном, его собственным лигандом, так как сайты связывания фибриногена и рецептора близко расположены [178]. Трехмолекулярный комплекс uPA – uPAR – CD11 $\beta$ /CD18 регулирует клеточную адгезию, миграцию и фибринолиз и усиливает опосредованную урокиназой активацию плазминогена. Взаимодействие uPAR с рецепторами хемотаксиса fMLF-R необходимо для обеспечения миграции клеток, зависимой от fMLF и осуществляется через хемотактический участок, находящийся в линкерном участке uPAR DI–DII, называемом последовательностью SRSRY (аминокислоты 88–92) [366].

Белковый ингибитор урокиназы ПАИ-1 связывается и инактивирует uPA–uPAR комплексы. Это не только ограничивает протеолиз, но и освобождает Mac-1 от ингибирования, опосредованного uPA–uPAR. ПАИ-1 может также полностью блокировать как uPAR- так и  $\alpha v$ -интегрин-опосредованное связывание витронектина, указывая тем самым, что все три рецептора могут связывать

витронектин сходным образом. В гладкомышечных клетках сосудов урокиназа и uPAR вызывают фосфорилирование витронектина киназой-2, которое улучшает связывание витронектина с интегринами и урокиназным рецептором [417]. Был обнаружен мембранный белок, ассоциированный с uPAR (uPARAP или Endo180), который принимает участие в интернализации коллагена для его внутриклеточной деградации. Комплекс uPAR с uPARAP играет ключевую роль в деградации матрикса [63].

Крингл урокиназы принимает участие в обеспечении промиграционных эффектов урокиназы [365] и обеспечивает стабилизацию комплекса урокиназы с ее высокоафинным рецептором [87, 353]. Кроме того, крингл урокиназы и форма урокиназы, лишенная ростового домена, не связываясь с uPAR/CD87, активируют MAP-киназы p38 и p42/44 и стимулируют миграцию клеток. Крингл урокиназы на поверхности гладкомышечных клеток взаимодействует с мишенью, отличной от uPAR/CD87 и интегринов, и стимулирует миграцию независимо от высокоафинного рецептора урокиназы [365]. При этом рекомбинантная форма урокиназы, лишенная крингла, но способная связываться с uPAR, не стимулировала хемотаксис клеток. При сравнении эффектов разных рекомбинантных форм урокиназы было обнаружено, что нативная урокиназа и урокиназа без ростового домена проявляют хемотаксическую активность, взаимодействуя или только с крингл-связывающим белком, или с урокиназным рецептором и крингл-связывающим белком.

Помимо новой мишени, связывающей крингл урокиназы, были обнаружены дополнительные сайты связывания, обеспечивающие взаимодействие урокиназы с клетками через ее протеазный домен [278]. Кроме того, было обнаружено, что на поверхности клеток образуется форма урокиназы без ростового домена, не способная связываться с высокоафинным урокиназным рецептором. Урокиназа лишённая ростового домена быстро элиминировалась, благодаря эндоцитозу с участием LRP [278]. В результате многолетних исследований была обнаружена новая мишень связывания урокиназы на поверхности клеток, отличная от

uPAR/CD87, – интегрин-связывающий белок внеклеточного матрикса фибулин-5 [149], который взаимодействует с протеолитическим доменом урокиназы.

Было показано, что для взаимодействия с урокиназой необходим С-глобулярный домен фибулина-5, а именно сайт связывания 320 – 448 а.о. Кроме того, было доказано, что для взаимодействия фибулина-5 и урокиназы необходимы все пять интактных кальций-связывающих повторов, гомологичных эпидермальному фактору роста, которые входят в состав фибулина-5 [149]. Хотя урокиназа связывает фибулин-5 через протеолитический домен, фибулин-5 не является ее субстратом и не оказывает влияния на амидолитическую активность урокиназы, однако, фибулин-5 предотвращал активацию одноцепочечной урокиназой плазминогена. Связывание с фибулином концентрировало одноцепочечную связанную с матриксом урокиназу и препятствовало ее активации плазмином. Было обнаружено также, что отсутствие гена фибулина-5 снижало активность урокиназы в лизированных клетках. Фибулин-5 предотвращал эффекты ПАИ-1 на снижение активности урокиназы, препятствуя образованию ковалентного комплекса ПАИ-1 с активным центром урокиназы, последующему эндоцитозу и элиминации комплекса uPA-uPAR с поверхности клетки. Было выдвинуто предположение, что при миграции клетки на ее лидирующем крае образуется комплекс урокиназы, фибулина-5 и урокиназного рецептора, ассоциированного с интегринами. Повышение экспрессии фибулина-5 снижало подвижность клеток и подавляло хемотактические свойства урокиназы [149]. Ранее было показано, что в стромальных клетках мышцы фибулин-5 ингибировал зависимую от  $\beta 1$  интегрина и фибронектина гиперэкспрессию ММП-9 [142]. Кроме того, известно, что фибулин-5 в сосудистой стенке связан с тропоэластином, который взаимодействует с интегринами и локализуется на эластических волокнах [439]. Отсутствие фибулина 5 у трансгенных мышей приводило к нарушению эластических свойств сосудистой стенки, что может иметь значение при ремоделировании сосудов, однако, эти аспекты требуют дальнейшего изучения. Было показано *in vitro* и *in vivo*; что фибулин-5 может блокировать ангиогенез, индуцируя антиангиогенный тромбоспондин-1 и



препятствуя сигнализации VEGF165 и фибронектина, связываясь и блокируя альфа5 бета1-интегриновый рецептор фибронектина [450]. Также известно, что при связывании урокиназы с uPAR происходит взаимодействие uPAR с альфа5бета1-интегрином, ведущее к сигнализации и стимуляции адгезии и миграции клеток [115]. В связи с вышеизложенным обнаруженный механизм может иметь значение для регуляции процессов ангиогенеза и ремоделирования сосудов.

Важными представляются полученные недавно данные о том, что крингл урокиназы способен связываться с альфа5 бета3-интегринами и вызывать внутриклеточную сигнализацию, активацию и адгезию нейтрофилов [306]. Эти данные говорят о том, что крингл домен урокиназы вовлечен в реализацию ее про-воспалительных эффектов, что необходимо учитывать при создании препаратов, ингибирующих эффекты урокиназы. Кроме того, тот факт, что крингл-домен урокиназы способен связываться с интегринными привел некоторых исследователей к заключению, что вероятно на поверхности клетки при взаимодействии урокиназы с ее классическим рецептором uPAR, интегринны взаимодействуют одновременно с крингл доменом урокиназы и с ее рецептором uPAR, вместе этот комплекс и вызывает внутриклеточную сигнализацию [356].

### 1.3.3. Протеолитический каскад, индуцируемый урокиназой

Способность активировать пламиноген, превращая его в плазмин расщеплением связи  $\text{Arg}^{561} - \text{Val}^{562}$  в пламиногене, является одним из важнейших свойств урокиназы. Плазмин является внеклеточной протеазой с широкой субстратной специфичностью и обладает фибринолитическими свойствами. Тканевой активатор пламиногена является основным для осуществления фибринолитической функции и регуляции гемостаза, тогда как урокиназа активирует пламиноген на клеточной поверхности. Как правило, для активации урокиназой пламиногена необходимо ее связывание с uPAR на поверхности клеток [37]. Проурокиназа на поверхности клетки активируется плазмином, превращаясь в двухцепочечную форму [11], и положительная обратная связь

замыкается, так, как и плазмин, и двухцепочечная урокиназа активируют плазминоген и проурокиназу. Взаимодействие урокиназы с uPAR ограничивает его подвижность и локализует его и протеолитическую активность урокиназы в области межклеточных контактов и на лидирующем крае движущейся клетки [86]. Плазмин принимает участие не только в расщеплении фибрина, но и фибриногена, ламинина и коллагена – белков ВКМ и базальной мембраны [153, 201]. Кроме того, плазмин активирует матриксные металлопротеиназы (коллагеназу, стромелизин и желатиназу В) [236, 408]. Благодаря активации плазмينا урокиназа способствует расщеплению компонентов ВКМ, ослаблению межклеточных контактов и миграции клеток, важнейших процессов для ремоделирования сосудов, ангиогенеза и онкогенеза.

Было обнаружено, что урокиназа способствует образованию и высвобождению 92 kDa матриксной металлопротеиназы ММП-9/желатиназы Б в моноцитах и этот эффект опосредуется активацией MAP-киназного сигнального пути MEK1/ERK1,2, а также происходит при участии арахидоновой кислоты, образующейся в результате реакции, катализируемой цитозольной формой фосфолипазы А2 [402]. Экспрессия ММП-9 в клетках ТНР-1 под действием урокиназы не зависит от образования плазмينا, и не воспроизводится при действии на клетки тканевого активатора плазминогена. Каталитическая активность урокиназы не является обязательным условием для экспрессии ММП-9 клетками ТНР-1, обработанных урокиназой, по-видимому, в этот процесс вовлечены другие домены урокиназы. Конечной точкой приложения этого пути может являться активация транскрипционного фактора NFκB, активирующего работу гена ММП-9, а также, возможно, ряда других провоспалительных генов. Авторы полагают, что фактор некроза опухолей, являющийся мощным провоспалительным агентом, мог также являться промежуточным звеном процесса передачи внутриклеточного сигнала, вызывающего образование ММП-9, поскольку этанерцепт, блокирующий взаимодействие фактора некроза опухолей с его клеточными рецепторами, подавлял образование ММП-9 под действием урокиназы.

Урокиназа также обеспечивает активацию факторов роста, связанных с белками межклеточного матрикса. В частности, урокиназа способна активировать одноцепочечный биологически неактивный предшественник фактора роста гепатоцитов [326]. Кроме того, урокиназа принимает участие в активации VEGF-189 [138] и, плазмин-зависимым образом, в активации TGF- $\beta$  [391] и рецептора эпидермального фактора роста [122].

#### **1.3.4. Урокиназа и адгезия и миграция клеток**

Урокиназа стимулирует хемотаксис и миграцию эндотелиальных, гладкомышечных, эпителиальных клеток [77, 379, 397], моноцитов [414], мезенхимальных стромальных клеток [426] независимо от ее протеолитической активности. Рецептор урокиназы может обеспечивать миграцию клеток, образуя комплексы с интегринами и молекулами сигнальных каскадов, способствуя сигнализации от рецепторов интегринов [369, 380, 398].

Крингл урокиназы принимает участие в стимуляции миграции гладкомышечных клеток [365]. Так, и крингл-домен урокиназы, форма урокиназы без ростового домена, не связываясь с высокоафинным рецептором урокиназы uPAR, индуцируют миграцию клеток, активируя MAP-киназы p38 и p42/44. Было показано, что урокиназа активирует серин-треониновые киназы ERK/MAPK [146, 329], при ингибировании которых урокиназа и ее крингл не стимулируют миграцию [36]. Благодаря связыванию крингл-домена на поверхности гладкомышечных клеток с белком, отличным от рецептора урокиназы и интегринов, крингл-домен индуцирует миграцию без вовлечения uPAR [365]. Более того, форма урокиназы без крингл-домена, но способная связываться с uPAR, не стимулирует миграцию [365]. Однако, для стимуляции миграции нативной урокиназой необходимо взаимодействие обоих доменов – домена, подобного фактору роста и крингл-домена со своими рецепторами – uPAR и белком, связывающим крингл [356].

Было показано, что процессы миграции клеток под действием урокиназы включают в себя несколько ключевых моментов. Так, взаимодействие урокиназы

с ее высокоафинным рецептором на ГМК и клетках эндотелия активирует путь сигнализации Jak/Stat. На лидирующем крае движущейся клетки образуется комплекс урокиназа-рецептор-киназы Janus (Jak1 и Tyk2), что индуцирует перемещение в ядро клетки Stat1, Stat2 и Stat4 факторов [418, 420]. Собственно, миграция клетки опосредована киназами Tyk2, PI3-K, RhoA/Rho. Более поздние сигнальные ответы зависят от взаимодействия рецептора урокиназы с рецептором PDGFR  $\beta$ , который может индуцировать путь сигнализации через Tyr740, Tyr751 и PI3-K киназы. Причем, активация урокиназой Stat1 не требует участия PI3-K и зависит от взаимодействия рецептора урокиназы и киназной активности рецептора PDGF. На гладкомышечных клетках было показано, что после взаимодействия комплекса урокиназа – рецептор с рецептором PDGFR  $\beta$  он активируется и димеризуется. При этом наличие или отсутствие протеазного домена урокиназы не оказывало влияния на эти процессы [420]. Кроме того, рецептор PDGFR  $\beta$  может связываться со Stat1 и его фосфорилировать. Как полагают, основной механизм влияния Stat1 заключается в замедлении клеточного цикла и увеличении времени миграции гладкомышечных клеток под действием урокиназы (рисунок 9).

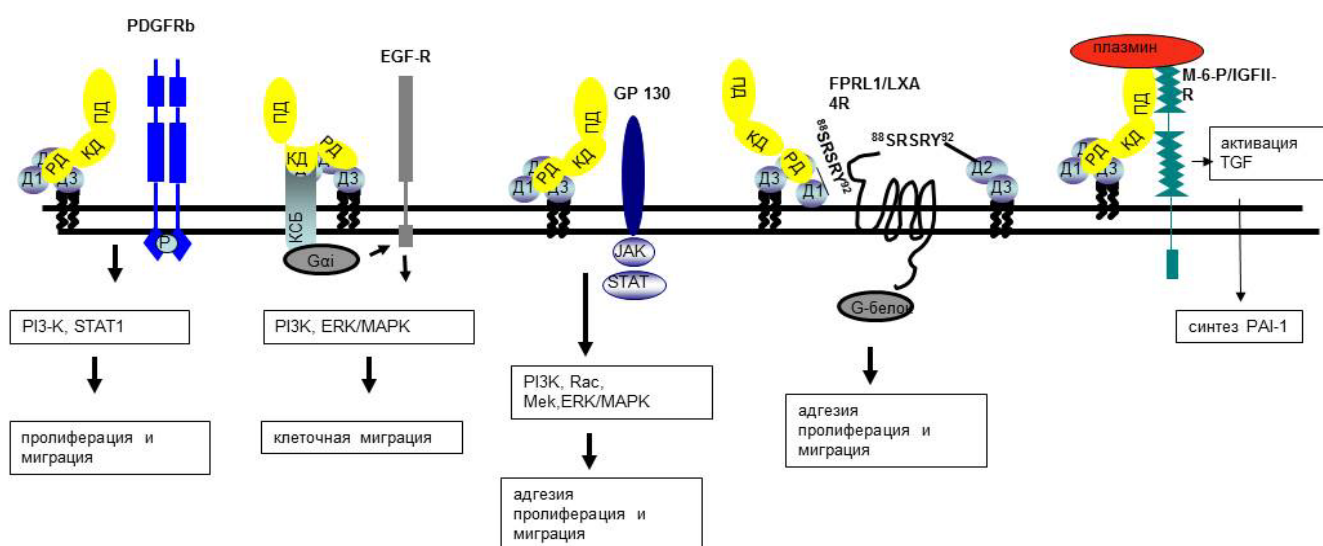


Рисунок 9 – Некоторые важные взаимодействия урокиназы и ее рецептора, ведущие к адгезии, миграции и пролиферации клеток (Обозначения: РД – ростовой домен; КД – крингл домен; ПД – протеолитический домен) (Цит. по: Ткачук, В.А. и др., 2011. С. 29) [11]

Было выявлено, что образование комплекса урокиназного рецептора с рецептором EGF может активировать ERK [255]. Кроме того, урокиназный крингл может стимулировать миграцию клеток при участии рецептора EGF с вовлечением Gαi и активацией киназ PI3-K, ERK1/2 и MAP-киназы p38 [329]. Интересно, что миграция клеток, индуцированная кринглом урокиназы, была зависимой от плазмينا и матриксных металлопротеиназ. Это указывает на присутствие двух механизмов, обеспечивающих движение клетки под действием урокиназы; так, взаимодействие урокиназы с ее высокоафинным рецептором uPAR обеспечивает направленный протеолиз на лидирующем крае клетки, при этом крингл-домен урокиназы индуцирует внутриклеточную сигнализацию, способствующую миграции.

Еще один сигнальный каскад может быть вовлечен в миграционный ответ на урокиназу. Было обнаружено, что при миграции клеток MCF-7 под действием урокиназы происходит взаимодействие рецептора урокиназы с интегринами β1 и активация сигнализации Ras/MEK/ERK/MLCK [248]. Кроме того, при формировании комплекса рецептора урокиназы с фибронектином и с рецептором фибронектина интегрином αβ1 активируется ERK, стимулируя миграцию клеток [377].

Также рецептор uPAR/CD87 может связываться с нерецепторными тирозиновыми киназами Src (p59<sup>fyn</sup>, p53/56<sup>lyn</sup>, p53/59<sup>hsk</sup>, p55<sup>fgr</sup> [370], p60<sup>fyn</sup>, p53/p56<sup>lyn</sup>, p56&p59<sup>hck</sup>, p59<sup>fgr</sup>) [409].

На клетках эндотелия почек TCL было обнаружено, что образование комплекса урокиназы с ее рецептором способствует взаимодействию рецептора с JAK1, что приводило к фосфорилированию и димеризации Stat1 и его ядерной транслокации и связыванию с участками ДНК. С рецептором урокиназы взаимодействовал интерлейкин-6-рецептор-β (gp130), также способный опосредовать передачу сигнала внутрь клетки [413]. gp130 представляет собой рецептор цитокинов, в том числе IL-6, и активирует пути сигнализации Src и

Jak/Stat [370], позволяя gp130 служить трансмембранным адаптором и передавать сигнал при взаимодействии урокиназы и uPAR.

Взаимодействие рецептора урокиназы с интегринами индуцирует активацию сигнальных путей и может приводить к адгезии и миграции клеток. Нарушение связывания uPAR с интегринами блокирует взаимодействие  $\beta$ -интегринов с киназами Src, которое необходимо для индукции адгезии и миграции клеток. Так, было обнаружено, что киназы Src соединены через кавеолин-1 с  $\beta$ -интегринными, а урокиназный рецептор стабилизирует комплекс интегрин с кавеолином [425].

Для миграции клеток необходимы белки, обеспечивающие связь ВКМ с цитоскелетом, и эту роль играют рецепторы внеклеточного матрикса – интегрины. Участки адгезии клетки называют фокальными контактами, в участках фокальных контактов со стороны цитоплазматической мембраны с помощью винкулина, паксиллина и талина прикреплен актин [437]. При движении клетки разрушаются контакты с внеклеточным матриксом, и на лидирующей край клетки перемещаются интегрины, а с ними и рецептор урокиназы [39]. Интеграцию сигналов между ВКМ и цитоскелетом, необходимую для движения клетки осуществляет киназа фокальных контактов (ФАК). Было выявлено, что рецептор урокиназы взаимодействует с киназами Src и ФАК, участвуя в активации сигнальных каскадов, необходимых для миграции клеток [219].

При взаимодействии с витронектином рецептор урокиназы активирует путь сигнализации p130Cas/Rac, участвующий в перестройке актинового цитоскелета и адгезии, миграции клеток [203].

Был показан еще один механизм влияния урокиназы на миграцию клетки. Он заключается в сближении доменов 1 и 3 рецептора при взаимодействии uPA с uPAR. При этом обнажается последовательность SRSRY между 1 и 2 доменами, которая стимулирует миграцию моноцитов, фибробластов и гладкомышечных клеток. Протеолитически активная урокиназа при ее взаимодействии с рецептором может расщеплять участок между 1 и 2 доменами uPAR и экспонировать SRSRY. SRSRY способен стимулировать миграцию клеток с

участием гомолога fMLP рецептора (FPRL1) [366, 381]. Что касается способности активировать внутриклеточную сигнализацию, было обнаружено, что стимуляция клеток SRSRY активирует через G-белки киназы p56/p59hck [33].

Известно, что при элиминации урокиназы с помощью рецепторов подобных LDL происходит запуск внутриклеточной сигнализации и активация киназ внутри клетки [440]. Так, рецепторы, родственные рецептору липопротеидов низкой плотности, связываются с белком цитоплазмы Dab-1 и активируют Src/Abl нерцепторные тирозиновые киназы [447] и тау-белок, стабилизирующий микротрубочки [451]. Рецепторы семейства липопротеидов низкой плотности также способны активировать сигнальный каскад MAP-киназ и, таким образом, принимать участие в регуляции адгезии клеток [224]. LRP/ $\alpha$ 2-MR также может активировать протеинкиназу A (PKA) во взаимодействии с G-белками [421]. Интернализация урокиназы вызывает активацию PKA. Кроме того, рецептор урокиназы может участвовать в регуляции активации Ras1 зависимым от LRP образом [91]. Интересно также отметить, что после LRP-зависимой интернализации комплекса uPA-uPAR-ПАИ-1 и его разрушения в лизосомах, рецептор урокиназы возвращается на поверхность клетки в основном в фокальные контакты на движущемся конце клетки [373]. Для миграции клетки необходим процесс эндоцитоза комплекса урокиназа-uPAR-ПАИ-1 с дальнейшим перераспределением рецептора на лидирующий край клетки. Была показана также одновременная интернализация урокиназного рецептора и интегрин бета1 [435].

### **1.3.5. Урокиназа, пролиферация и апоптоз клеток**

Было показано, что урокиназа способна стимулировать деление клеток разных типов [153], в том числе, клеток эпидермиса, меланомы, почек и раковых клеток почек [11, 382]. Комплекс урокиназы и ее высокоафинного рецептора стимулирует пролиферацию опухолевых клеток при участии интегринов, активируя MAP-киназу p38 [412]. Было обнаружено, что у мышей, нокаутированных по гену урокиназы, подавлена способность к делению T-клеток [424]. Кроме того, домен урокиназы, подобный фактору роста, может

стимулировать пролиферацию остеобластоподобных клеток [43], клеток меланомы [241], клеток остеосаркомы человека SaOs-2 и раковых клеток молочной железы [182, 423]. Для реализации этого эффекта урокиназы было критично фукозилирование Thr18 в домене, подобном фактору роста [352]. Было также показано, что стимуляция пролиферации под действием урокиназы осуществляется за счет активации интегринами пути сигнализации ERK/MAP-киназ [423]. Также митогенные эффекты урокиназы могут быть опосредованы активацией комплекса урокиназный рецептор-казеинкиназа-2- нуклеолин [419]. Нуклеолин принимает участие в регуляции транскрипции ДНК и делении клеток [259]. Урокиназа также способна стимулировать пролиферацию гладкомышечных клеток без участия ее протеазной активности и связывания с высокоафинным рецептором [187, 241].

Злокачественные клетки нередко характеризуются устойчивостью к апоптозу, в частности, раковые клетки желудка, молочной железы, прямой кишки, остеосаркомы и легкого [207]. Была установлена взаимосвязь между чувствительностью к апоптозу и системой урокиназа – рецептор. Было показано, что при имплантации клеток фибросаркомы T241 в мышь с нокаутом по урокиназе уменьшается пролиферация клеток опухоли и повышается индукция апоптоза [395]. Ингибирование урокиназы с помощью векторной антисенсной siRNA приводило к подавлению пролиферации и стимуляции апоптоза раковых клеток молочной железы, а увеличение концентрации урокиназы в среде инкубации этих клеток активировала киназы ERK/MAP [182]. Более того, инкубирование этих клеток с антителами к урокиназе, блокирующими связывание урокиназы с рецептором, снижало уровень фосфорилирования киназ ERK/MAP и стимулировало апоптоз [131]. При блокировании специфическими антителами uPA или uPAR происходило одинаковое повышение апоптоза клеток. Экспрессию урокиназы и ее рецептора стимулировала активация киназ MAPK и ERK. Исследователи полагают, что подавление апоптоза под действием киназ ERK и MAPK происходит за счет киназ Rsk, способных фосфорилировать фактор транскрипции CREB (cAMP response element binding protein), вовлеченный в



контроль выживания клетки, и BAD белок, участвующий в регуляции апоптоза [144]. Была обнаружена корреляция между экспрессией урокиназы и ММП и экспрессией Bcl-2 в клетках глиомы, указывающая на то, что Bcl-2 может принимать участие в регуляции миграции и инвазии злокачественных клеток, воздействуя на экспрессию урокиназы и матриксных металлопротеиназ [125]. Лиганд FasL важного рецептора, опосредующего апоптоз Fas, повышал подвижность и инвазию злокачественных клеток, причем этот эффект блокировался антителами к урокиназе. Было показано, что FasL может стимулировать генную транскрипцию NF- $\kappa$ B, ERK/MAPK и uPA [81]. Установлено, что в пигментных клетках эпителия сетчатки и эмбриональных клетках эпителия почки экспрессия урокиназы коррелировала с устойчивостью к апоптозу. Взаимодействие урокиназы с ее рецептором через сигнальные пути MEK/ERK и фосфатидилинозитол-3-киназу/Akt приводило к активации транскрипции фактора Bcl-xL, который необходим для зависимой от урокиназы анти-апоптозной активности [40, 302].

### **1.3.6. Тканевой активатор плазминогена: структура и функции**

Тканевой активатор плазминогена (tPA) обеспечивает большую часть фибринолитической активности крови [7], его активно синтезируют эндотелиальные клетки [1]. Он экспрессируется в виде одноцепочечного предшественника, который превращается в двухцепочечную форму под действием плазмина. Синтез тканевого активатора плазминогена регулируется факторами роста и тромбином. Молекулярная масса tPA около 70 кДа; его активный центр tPA образуют аминокислотные остатки His-322, Asp-371, Ser-478 [331].

Различия между тканевым и урокиназным активторами в структуре тяжелой А-цепи определяют их функциональные различия. Так, tPA обладает способностью связываться с фибрином через пальцевидный домен F и через свой второй крингл домен [222]. Его первый крингл домен выполняет структурную функцию. Домен, подобный фактору роста, отвечает за взаимодействие tPA с

рецепторами на поверхности клетки и находится между пальцевидным и крингльдоменами. Скорость активации плазминогена под действием tPA втрое выше в присутствии фибрина. В то же время урокиназа таким средством к фибрину не обладает.

Рецепторы тканевого активатора плазминогена принимают участие в обеспечении фибринолитической функции или в элиминации tPA из крови. Взаимодействие tPA с такими белками как аннексин 2, коллаген 4, ламинин 1 и тромбоспондин усиливает активацию плазминогена под действием tPA [78].

Было показано, что tPA способствует пролиферации ГМК сосудов [158], причем этот эффект является дозозависимым [449]. Кроме того, тканевой активатор плазминогена обладает способностью стимулировать пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток [387].

### **1.3.7. Система активаторов плазминогена и заболевания сосудов**

К настоящему времени имеется много фактов, свидетельствующих о значении компонентов системы гемостаза как факторов риска ишемической болезни сердца и других сосудистых заболеваний [7, 9]. Повреждения (разрывы) атеросклеротической бляшки с последующим тромбозом является одной из основных причин развития осложнений атеросклероза [102]. При ишемической болезни сердца, как правило, наблюдается снижение фибринолитической активности плазмы крови [386], являющееся важным фактором, способствующим дальнейшему прогрессированию атеросклероза [310]. Фибринолитическая активность определяется соотношением активаторов плазминогена и их ингибиторов, регулирующих образование плазмينا. Эпидемиологические исследования показали, что существует положительная связь между активностью ингибитора активаторов плазминогена 1-го типа и частотой повторных инфарктов миокарда, а также выраженностью поражения коронарных артерий [281]. Дисбаланс между тканевым активатором плазминогена и ПАИ-1 может быть связан с процессом стенозирования в коронарной артерии, а повышение активности ПАИ-1 может свидетельствовать об активности атеросклеротического

процесса [281, 286]. Кроме того, выявлено, что факторы риска развития атеросклероза, такие, как ожирение, инсулин-независимый сахарный диабет, гиперлипидемия и артериальная гипертензия, коррелируют с повышенным уровнем ПАИ-1 [283]. Генетический анализ пациентов, перенесших инфаркт миокарда, выявил полиморфизм в промоторе гена ПАИ-1, который может оказывать влияние на частоту возникновения тромботических осложнений у этих лиц [34, 311, 368]. Также показано, что у пациентов с ИБС со стабильной стенокардией в крови повышена функциональная активность ингибитора активаторов плазминогена 1-го типа по сравнению со здоровыми лицами [411].

Повышенная экспрессия ПАИ-1 обнаружена в самой атеросклеротической бляшке. Он экспрессируется гладкомышечными клетками интимы, макрофагами и пенстыми клетками, одновременно с повышенной экспрессией тканевого фактора, тромбина, фибрина и витронектина [184, 185, 218]. Причем уровень мРНК ПАИ-1 коррелировал с выраженностью атеросклеротического поражения [185]. Повышенная экспрессия ингибитора активаторов плазминогена - 1 эндотелиальными клетками при атеросклерозе может приводить к подавлению фибринолиза и являться одной из причин тромботических осложнений [184, 192], также было показано, что экспрессия ПАИ-1 возрастала в нестабильных бляшках [137]. Гипоксия и цитокины, присутствующие в атеросклеротической бляшке, могут способствовать подавлению плазмин-зависимого протеолиза, стимулируя экспрессию ПАИ-1 и подавляя экспрессию тканевого активатора плазминогена [126, 134, 434].

В то же время было показано, что в атеросклеротической бляшке повышена экспрессия тканевого активатора плазминогена, которая также коррелирует с тяжестью поражения [262]. У пациентов с коронарным атеросклерозом выявлена положительная корреляция между повышенным уровнем тканевого активатора плазминогена в плазме крови, инфарктом миокарда и общей смертностью [112, 168, 338]. В популяционном исследовании повышение tPA в плазме крови ассоциировалось с появлением ранних признаков атеросклероза [56]. Наличие взаимосвязи между уровнем ПАИ-1 и tPA может свидетельствовать в пользу того,

что увеличение синтеза tPA отражает защитную реакцию организма на повышение образования тромбина [7]. Генетический анализ пациентов с инфарктом миокарда обнаружил полиморфизм в интроне h гена тканевого активатора плазминогена, который может оказывать влияние на частоту возникновения тромботических осложнений [386]. Подавление фибринолитической активности в результате повышения уровня ПАИ-1 в атеросклеротической бляшке и плазме крови может способствовать развитию и/или прогрессированию атеросклероза, вызывая тромбообразование.

Необходимо отметить, что наибольшее внимание исследователей уделяется ПАИ-1 и тканевому активатору плазминогена, тогда как об экспрессии урокиназы и ее рецептора данные в литературе существуют лишь фрагментарно. У пациентов с атеросклерозом коронарных артерий было выявлено наличие повышенного уровня урокиназы в плазме крови [411]. В атеросклеротической бляшке повышен уровень мРНК тканевого и урокиназного активаторов плазминогена, а также их активность [280]. Активация плазмин-зависимого протеолиза через его эффекты на разрушение ВКМ, а также на миграцию и пролиферацию клеток может приводить к ее дестабилизации и индуцировать ее разрыв или приводить к формированию аневризмы [102]. Полагают, что тканевому активатору плазминогена принадлежит основная роль в активации внутрисосудистого фибринолиза, но не активации протеолиза в межклеточном пространстве. Данные, полученные в экспериментах на трансгенных животных, согласуются с существующими представлениями. Так, показано, что отсутствие гена тканевого активатора плазминогена не влияло на развитие атеросклеротического поражения у животных, получавших обогащенную холестерином пищу [75].

Атеросклеротическая бляшка содержит большое количество моноцитов/макрофагов и Т-лимфоцитов, инфильтрирующих стенку сосуда, особенно на ранних стадиях своего развития [44, 108, 349]. Содержание рецептора урокиназы на макрофагах и гладкомышечных клетках неоинтимы в атеросклеротической бляшке в 9 раз выше, чем в нормальном сосуде [284]. Было

выявлено, что в атеросклеротической бляшке урокиназу экспрессируют преимущественно активированные макрофаги [404]. В то же время известно, что "нестабильные", склонные к разрыву, потенциально наиболее опасные бляшки инфильтрированы пенистыми клетками и моноцитами/макрофагами [9, 27, 102, 330]. Повышенная экспрессия урокиназы и ее рецептора обнаруживается в атеросклеротической бляшке и также может способствовать усиленному протеолизу, обуславливающему нестабильность бляшки [9, 102, 404]. Помимо этого, являясь фактором хемотаксиса для гладкомышечных клеток, лейкоцитов и моноцитов/макрофагов, урокиназа [9, 69], экспрессированная в атеросклеротической бляшке, может способствовать миграции ГМК, еще большему привлечению моноцитов/макрофагов в бляшку и, таким образом, приводить к росту и "дестабилизации" бляшки. Урокиназа может активировать матриксные металлопротеиназы и высвободить связанные с матриксом факторы роста, в частности, трансформирующий фактор роста  $\beta$  (TGF- $\beta$ 1), основной фактор роста фибробластов и гранулоцит-макрофаг колонийстимулирующий фактор, которые активно участвуют в процессах атерогенеза [9, 66, 153]. В то же время сами факторы роста и интерлейкины стимулируют миграцию и хемотаксис клеток и способны повышать экспрессию урокиназы моноцитами/макрофагами и гладкомышечными клетками [9, 139, 242]. Экспрессия урокиназы макрофагами также стимулируется липопротеидами низкой плотности [143].

Таким образом, как и подавление, так и стимуляция протеолиза, зависящего от плазмина, могут воздействовать на разных этапах на развитие атеросклероза. Участие фибринолитической системы в развитии и прогрессировании атеросклероза на сегодняшний день не вызывает сомнений. Однако, многие аспекты, в частности, сведения об экспрессии активаторов плазминогена и их ингибитора 1-го типа в слоях сосудистой стенки на разных стадиях атеросклеротического поражения присутствуют в литературе лишь фрагментарно.

Клинические исследования, посвященные изучению роли компонентов фибринолитической системы в развитии рестеноза после баллонной ангиопластики базируются на сопоставлении их уровней в крови с частотой

развития рестеноза. Разные работы выявили, что прогностическое значение для развития рестеноза имеют изменение уровней урокиназы и ингибитора активаторов плазминогена 1-го типа. Так, было установлено, что повышенный уровень антигена урокиназы в плазме крови может рассматриваться как независимый фактор риска развития рестеноза после баллонной ангиопластики [276]. Что касается тканевого активатора плазминогена, первые исследования выявили повышение уровня антигена тканевого активатора плазминогена при рестенозе после баллонной ангиопластики у пациентов с коронарным атеросклерозом [181], но впоследствии в проспективных исследованиях было показано, что уровень тканевого активатора плазминогена и комплекса тканевого активатора плазминогена / ПАИ-1 не отличается у пациентов с рестенозом и без рестеноза после коронарной баллонной ангиопластики [180, 276] и баллонной ангиопластики периферических артерий [323]. Содержание в периферической крови комплекса альфа2-антиплазмин/плазмин также не коррелировало с возникновением рестеноза [217]. В проспективных исследованиях показано, что повышение ПАИ-1 связано с риском развития рестеноза после баллонной ангиопластики коронарных [277, 292] и периферических артерий [84]. После атерозектомии у пациентов с коронарным атеросклерозом рестеноз коррелировал с повышением уровня ПАИ-1 [96] и также у пациентов после имплантации современных стентов, покрытых паклитакселом или сиролимусом [282]. Существуют также данные об отсутствии различий в уровне ПАИ-1 у пациентов с рестенозом и без рестеноза, полученные, однако, при исследовании меньшей группы пациентов [164]. Таким образом, изменения уровней компонентов фибринолитической системы сопровождают развитие рестеноза после баллонной ангиопластики, однако, данные о предикторной значимости ПАИ-1 противоречивы, тогда как уровень урокиназы после баллонной ангиопластики оценивался только в одном исследовании в мире [276].

В исследованиях на экспериментальных моделях также были получены указания на значение урокиназы в развитии экспериментального рестеноза. Возрастание активности урокиназы было выявлено на ранних сроках – через

сутки после баллонного повреждения сонной артерии крысы [85]. Одновременно отмечали резкое снижение активности тканевого активатора плазминогена, возможно, связанное с деэндотелизацией [85]. Другие авторы показали, что на четвертые сутки после повреждения значительно возрастает активность активаторов плазминогена, обусловленная в основном возрастанием активности урокиназы. Этот срок точно совпадает со временем, когда начинается миграция ГМК из меди в интиму [94]. Сходные данные были получены на 5-е сутки после повреждения баллонным катетером: было выявлено увеличение экспрессии мРНК урокиназы, ее рецептора и тканевого активатора плазминогена в стенке сосуда [308, 342]. Несмотря на полученные ранее данные о том, что ГМК артерии после баллонирования экспрессируют урокиназу во время пика пролиферации, а тканевой активатор плазминогена во время пика миграции [342], в настоящее время участие тканевого активатора плазминогена в формировании неоинтимы представляется сомнительным. Данные, полученные на трансгенных животных, свидетельствуют о том, что дефицит гена тканевого активатора плазминогена не влияет на формирование неоинтимы, в то время как дефицит гена урокиназы предотвращает развитие неоинтимы при экспериментальном повреждении артерии [194, 401]. У животных, лишенных гена плазминогена, образование неоинтимы после внутрисосудистого повреждения было подавлено, но в меньшей степени, чем при отсутствии гена урокиназы, что позволило предположить роль непротеолитических свойств uPA в реализации этого эффекта [154]. Гладкомышечные клетки uPA-дефицитных мышей обладали сниженной способностью к миграции, тогда как способность к пролиферации оставалась интактной. Подавление роста неоинтимы после повреждения на фоне дефицита гена uPA сопровождалось пониженной экспрессией матриксных металлопротеиназ 2, 3, 9, 12 и 13 во всех слоях сосудистой стенки [361], указывая на возможность участия урокиназы в контроле экспрессии ММП, способствующих миграции клеток. Отсутствие гена урокиназного рецептора у трансгенных животных не влияло на рост неоинтимы в поврежденном сосуде, указывая на преимущественную роль в этом процессе свойств урокиназы, не

зависящих от рецептора [300]. Дефицит uPAR не оказывал влияния на способность к пролиферации и миграции сосудистых клеток, а также на фибринолитический потенциал и скорость реэндартализации [300]. Дефицит гена ПАИ-1 приводил к противоположным эффектам и способствовал образованию неоинтимы в поврежденном сосуде, не оказывая влияния на пролиферацию клеток и скорость реэндартализации [193, 194]. При этом отмечалось повышение миграционной способности гладкомышечных клеток, что свидетельствует о большом значении миграции в процессах формирования неоинтимы. Дефицит гена альфа2-антиплазмина не влиял на рост неоинтимы [42, 213].

Таким образом, урокиназа и ингибитор активаторов плазминогена 1-го типа безусловно являются важными регуляторами процессов развития рестеноза и формирования неоинтимы после эндоваскулярного повреждения, однако механизмы их воздействия на эти процессы требуют дальнейшего изучения.

В связи с вышеизложенным, необходимо дальнейшее прояснение механизмов участия и роли системы активаторов плазминогена в ремоделировании сосудов и развитии рестенозов *in vivo*.

#### **1.4. Заключение по обзору литературы**

Ремоделирование сосудов представляет собой распространенную или локальную перестройку структуры сосудов, которая не только обеспечивает их адаптацию к изменениям условий и репарацию после повреждения, но также играет ключевую роль в патогенезе и исходах многих болезней сердца и сосудов, в том числе атеросклеротических заболеваний, артериальной гипертензии, рестенозировании после внутрисосудистой реваскуляризации, а также хронических заболеваний легких и почек [9, 430]. Артериальное ремоделирование является основным фактором, определяющим сужение просвета по всему сосудистому руслу. Распространенность и клинические проявления поражений могут отличаться в зависимости от локализации. Клеточные и молекулярные механизмы патологического ремоделирования сосудистой стенки активно



изучаются. Тем не менее, механизмы, определяющие тип ответа и направление ремоделирования сосуда (положительное или отрицательное) остаются неясными. Ключевыми механизмами ремоделирования артерий являются миграция, пролиферация и апоптоз клеток сосудистой стенки, синтез и ремоделирование внеклеточного матрикса, а также воспаление и оксидативный стресс. Эти процессы управляются многочисленными биологически активными молекулами, включая цитокины, факторы роста и протеазы сосудистой стенки [9].

Последние два десятилетия ознаменовались развитием и внедрением в практику лечения пациентов со стенозирующим атеросклерозом эндоваскулярных вмешательств – ангиопластики и атерэктомии. Однако эффективность этих процедур ограничивает развитие, как правило, в течение 6 месяцев, рестенозов – повторного стенозирования сосудов, частота которого составляет в среднем в 8–11%, а в отдельных данных до 38% [9, 25, 61, 99, 121, 196, 270, 312]. При этом, на участке вмешательства просвет сосуда вновь суживается и возвращаются симптомы ишемии органа. В основе развития стеноза/рестеноза лежит аномальная локальная пролиферация и миграция ГМК сосудистой стенки из меди (средняя оболочка сосуда), в интиму (внутренняя оболочка сосуда), а также избыточный синтез белков внеклеточного матрикса этими клетками в ответ на повреждение сосуда [9]. Все это ведет к формированию объемной неоинтимы, возникающей на месте старой интимы, которая вновь уменьшает просвет сосуда, а также неоадвентиции, возникающей на наружной поверхности сосуда на месте прежней адвентиции, что дополнительно способствует сужению его просвета.

Многочисленными исследованиями показано, что урокиназа играет важную роль в регуляции миграции и пролиферации различных клеток, а, следовательно, в регуляции таких процессов как воспаление, ремоделирование тканей, ранозаживление, рост сосудов и метастазирование. Однако к началу данного исследования не существовало четких представлений о динамике экспрессии урокиназы и ее рецептора на разных сроках после повреждения артерии, а также данных о том, как она соотносится с пролиферацией и миграцией клеток сосудистой стенки. Были накоплены весьма противоречивые данные о роли

разных доменов урокиназы в миграции и пролиферации сосудистых клеток в культуре, полностью отсутствовали сведения об эффектах урокиназы *in vivo*. Не было известно, как локальное изменение уровня урокиназы может влиять на структуру артерии. Не было представлений об участии урокиназы в ремоделировании артерии после повреждения.

Важным в отношении подходов к регуляции ремоделирования артерий является выбор специфической мишени для воздействий [9]. В настоящее время проводятся разработки препаратов на основе множества активных молекул. Особый интерес вызывает урокиназа, так как представляет собой многофункциональный мультидоменный белок, который не только регулирует фибринолиз, ремоделирование ВКМ и клеточную миграцию и пролиферацию, но также ассоциирован с развитием серьезных острых и хронических патологических состояний [9, 10]. Изучение роли урокиназы в регуляции ремоделирования сосудистой стенки важно для понимания механизмов ремоделирования и разработки новых эффективных подходов к предотвращению неблагоприятного ремоделирования сосудов.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Экстракция, хранение и классификация аутопсийного материала

Оценку экспрессии урокиназы, рецептора урокиназы, ингибитора активаторов плазминогена 1-го типа (ПАИ-1) в стенке сосуда при разных типах атеросклеротического поражения проводили методом двойного иммуногистохимического окрашивания срезов сегментов аорты человека, взятых при аутопсии. Аутопсийный материал был любезно предоставлен лабораторией Молекулярной и клеточной кардиологии ИЭК РКНПК Минздрава РФ.

Взятие аутопсийного материала производили не позднее 4–6 ч после смерти от лиц (n=19), погибших по разным причинам, исключая острые и хронические инфекционные и онкологические заболевания, течение которых могло бы повлиять на экспрессию исследуемых белков. Аорты вскрывали продольно и визуально оценивали общую степень поражения атеросклерозом [24]. Условно нормальными считали сосуды, в которых общая площадь липидных полос и пятен была не более 20% люменальной поверхности. Пораженными считали аорты, в которых липидные полосы, липофиброзные бляшки, фиброзные бляшки и осложненные поражения занимали 21–100 % люменальной поверхности. Из аорт вырезали нормальные участки и участки с разными типами атеросклеротических поражений. Образцы, погруженные в гель для замораживания (O.C.T. Compound, TissueTek®), замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C. Для исследований на парафиновых срезах сегменты аорты фиксировались 4% формалином, дегидратировали в растворах спирта в восходящих концентрациях, затем в хлороформе и заливали в парапласт (Sigma).

Для классификации атеросклеротических поражений проводили окрашивание масляным красным "О" по методике Лилли [79] поперечных замороженных срезов аорт с разными атеросклеротическими поражениями. Срезы фиксировали формалином 4% в фосфатном буфере, промывали водой и инкубировали 20 мин с раствором масляного красного "О" [0.3% масляного

красного О (Oil Red O, Merk) в изопропиловом спирте 60% (Реахим, чда)]. После этого дифференцировали в изопропиловом спирте 60%. Затем окрашивали ядра гематоксилином Майера и срезы заключали в водорастворимый Aquamount (Gurr).

Атеросклеротические поражения подразделяли на 4 типа, в соответствии с классификацией Н. Stary [26], а именно: 8 типов атеросклеротических поражений были объединены в группы: липидная полоса; липофиброзное поражение; фиброзная бляшка; осложненная бляшка [24]. Поражения первых трех типов составили группу липидных полос, макроскопических изменений поверхности сосудов или не было, или были только желтоватые пятна и/или полосы липидных инфильтратов. Микроскопически в интиме обнаруживались липиды, которые вытесняли или замещали ГМК, протеогликаны и волокнистые структуры, чаще внутри групп макрофагов, в слоях пенистых клеток, отдельных ГМК и ВКМ как мелкие капли или нечеткие массы под слоем пенистых клеток. К липофиброзным поражениям были причислены поражения 4 и 5-го типов, которые визуально могли быть описаны как оформленные возвышения округлой формы белого цвета над люменальной поверхностью аорты, нередко с включениями пятен и желтым окаймлением. На таких поражениях не отмечали тромбов, разрывов или изъязвлений поверхности. Микроскопически обнаруживали некротическое ядро из липидов и клеточного детрита. По границам ядра визуализировали большое количество макрофагов, пенистых клеток, лимфоцитов и других лейкоцитов. В интиме могли быть слои ГМК и несколько слоев волокон межклеточного матрикса. В группу осложненных атеросклеротических бляшек вошли поражения 6-ого типа с разрывами, повреждениями, трещинами, тромбами, изъязвлениями и кровоизлияниями на поверхности. На микроскопическом уровне такие бляшки могут выглядеть многослойными, нередко оттесняющими медию. К фиброзным бляшкам были отнесены поражения 8-го типа. Внешне они выглядят, как уплотнения белого цвета округлой формы, а микроскопически видно, что липидного ядра в нем, как правило, нет, а макрофагов и лейкоцитов очень мало. Во внутренней оболочке присутствуют ГМК и множество слоев волокон ВКМ.

Поражения 7-го типа со значительной минерализацией интимы – обызвествленные, а также поражения 6-го и 8-го типов в данном исследовании не рассматривались.

## **2.2. Характеристика пациентов с ишемической болезнью сердца и исследование компонентов фибринолитической системы**

В исследование были включены 60 пациентов (46 мужчин, 14 женщин), подвергшихся коронарной ангиопластике, 25–73 лет (средний возраст  $50,5 \pm 9,9$  лет). Критериями включения было наличие ИБС со стабильной стенокардией, стенозом коронарных артерий более 70%, запланированная коронарная ангиопластика. В исследование не включались больные с сахарным диабетом, нестабильной стенокардией, инфарктом миокарда сроком до 1 месяца, с антикоагулянтной терапией, терапией стероидными гормонами, сопутствующими системными заболеваниями, после операции аорто-коронарного шунтирования, с исходными нарушениями внутрижелудочковой проводимости, затрудняющими интерпретацию ЭКГ (блокада левой ножки пучка Гиса, синдром WPW). Все пациенты получали аспирин 125 мг/сут, антиангинальную терапию (бета-блокаторы или антагонисты кальция) постоянно до и после процедуры, тиклопидин 500 мг/сут за 5 дней и в течение 1 месяца после стентирования. Во время ангиопластики вводился гепарин, с последующей внутривенной инфузией в течение 8–24 часов. Баллонная дилатация выполнялась с использованием общепринятого инструментария по методу A. Gruentzig. Ангиопластика считалась успешной, если резидуальный стеноз просвета дилатируемого сегмента составлял менее 50%, и при этом не развивались осложнения (смерть, острый инфаркт миокарда, экстренное коронарное шунтирование).

Велоэргометрию или тредмил-тест проводили по стандартной методике исходно и в течение недели после ангиопластики, а также через 3, 6, 12 месяцев. При возобновлении приступов стенокардии или положительной нагрузочной пробе больному проводилась повторная коронароангиография. Ангиографически

рестеноз определяли, как наличие стеноза более 50% на участке проведения коронарной ангиопластики. Диагноз рецидива стенокардии после успешной коронарной ангиопластики определяли при сочетании типичной клиники стенокардии, отрицательной динамики ЭКГ (горизонтальная или косонисходящая депрессия сегмента ST на 1 мм и более), зарегистрированной при проведении нагрузочных тестов (велоэргометрия, тредмил-тест), при необходимости нагрузочные тесты проводились с радиоизотопной томосцинтиграфией миокарда с таллием-201, и признаков рестеноза дилатированных артерий или прогрессирования атеросклероза коронарных артерий при повторном коронароангиографическом обследовании.

Образцы периферической крови брали за сутки до проведения коронарной ангиопластики, а также на вторые сутки и через 3 и 6 месяцев после процедуры. Для изучения особенностей уровня антигена урокиназы, активности ПАИ-1 у пациентов с коронарным атеросклерозом, в сравнении со здоровыми донорами, были использованы пробы периферической крови здоровых людей и пациентов с ИБС со стабильной стенокардией. Группу здоровых доноров (14 человек) составили добровольцы, не имевшие факторов риска ИБС и не получавшие лекарственных препаратов.

Активность тканевого активатора плазминогена определяли по методу M. Ranby (1989) [179]. Калибровку проводили по стандарту одноцепочечного тканевого активатора плазминогена (Chromogenix).

Содержание антигена урокиназы в плазме крови определяли с помощью иммуноферментного метода, использовали наборы IMUBIND uPA ELISA Kit (American Diagnostica, USA), которые позволяют выявлять как свободные низкомолекулярные и высокомолекулярные формы урокиназы, так и связанную с урокиназным рецептором или с ПАИ-1 и ПАИ-2 урокиназу.

Функциональную активность ПАИ-1 оценивали фотометрическим методом в условных единицах по ингибированию стандарта тканевого активатора плазминогена плазмой крови. Количество ПАИ, которое ингибировало одну

международную единицу стандарта тканевого активатора плазминогена (Kabi, Sweden), соответствовало одной условной единице ПАИ-1 (МЕ/мл).

## **2.3. Экспериментальные модели**

### **2.3.1. Рекомбинантные формы урокиназы**

В работе использовали рекомбинантные формы проурокиназы: 1) форма урокиназы "дикого" типа, uPA (wt), с молекулярной массой (Mr) 52 kDa и активностью 103800 МЕ/мг; 2) модифицированная каталитически неактивная форма урокиназы с заменой His204 на Gln в активном центре, uPA H/Q с Mr 52 kDa; 3) форма урокиназы с заменой 24 N-концевых аминокислот домена подобного фактору роста, SNELHQVPSNCDCLNGGTCVSNKY, случайной последовательностью из 13 аминокислот ITPSLHACRSTLD, неспособная связываться с рецептором урокиназы (uPA/GFD) с Mr 43 kDa и активностью 100000–120000 МЕ/мг (рисунок 10).

Бактериальные культуры клеток *E.coli*, трансформированные плазмидами, содержащими различные формы урокиназы, были любезно предоставлены лабораторией Генной инженерии ИЭК РКНПК МЗ РФ. Выделение, очистка и характеристика рекомбинантных белков были проведены в лаборатории Молекулярной эндокринологии ИЭК РКНПК МЗ РФ по методике, описанной ранее [13]. Правильность конформации белков после ренатурации определялась по их способности взаимодействовать с набором специфических моноклональных антител, узнающих разные эпитопы молекулы урокиназы, а также по их протеолитической активности. Чистота всех рекомбинантных форм урокиназы составляла 95–98% согласно данным SDS электрофореза.

Мы также использовали в экспериментах коммерческие препараты урокиназы Ukidan (Industria Farmaceutica, USA) и Saruplasa (Gruntal, Germany), а также альфа<sub>2</sub>-антиплазмин (Sigma), тканевой активатор плазминогена (Boehringer Ingelheim Pharma KG) и ингибитор липополисахарида – полимиксин В (Sigma).

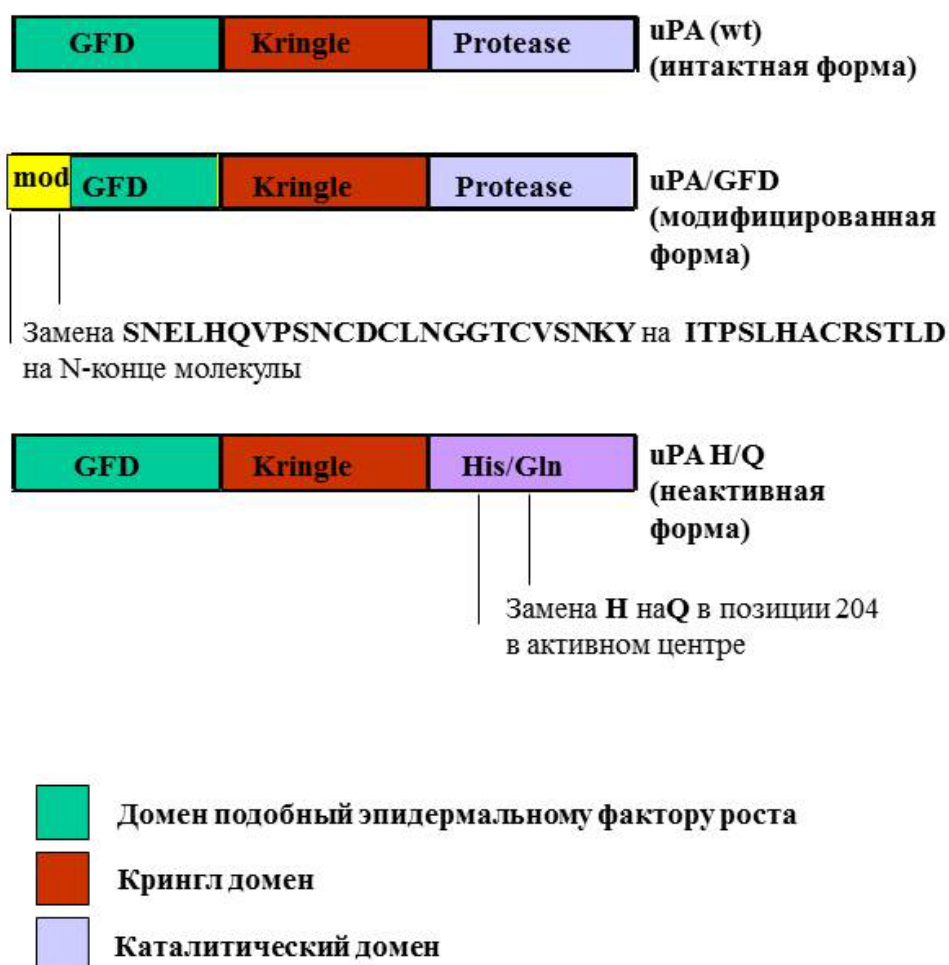


Рисунок 10 – Доменная организация урокиназы и ее рекомбинантных форм (Обозначения: Схематически изображены домены молекулы урокиназы и модификации, внесенные в структуру урокиназы при создании ее рекомбинантных форм)

### 2.3.2. Модели ремоделирования артерий

На модели баллонирования общей сонной артерии и модели периадвентициального повреждения сонной артерии использовали крыс самцов линии Вистар-Киото (вес 300–400 г), предоставленных биоклиникой РКНПК Минздрава РФ. Для моделирования снижения кровотока в сонной артерии использовались мыши линий FVB и C57 Black 6J (C57Bl) с разными ответами ремоделирования артерий на снижение кровотока. Все процедуры с животными были одобрены Этическим комитетом.



Для баллонирования общей сонной артерии эмболэктомическим баллонным катетером Fogarty 2F (Baxter) проводили общую анестезию калипсолом 10 мг/кг (Гедеон Рихтер) интраперитонеально, лидокаин применяли местно [94]. При этом, эндотелий удалялся полностью, а качество деэндотелизации выявляли окрашиванием 5% синькой Эванса (Sigma) в физиологическом растворе, для этого за 10 минут до извлечения сосудов внутривенно вводили 0,3 мл раствора синьки. Кроме того, данный способ внутрисосудистого повреждения нарушает внутреннюю, а иногда и наружную эластическую мембрану и медию [94].

Для повреждения адвентиции общей сонной артерии проводили общую анестезию калипсолом 10 мг/кг (Гедеон Рихтер) интраперитонеально, лидокаин применяли местно. Адвентицию левой общей сонной артерии повреждали с помощью лапчатого пинцета (Fine Science Tools Inc., Heidelberg, Germany) трехкратным процарапыванием по кругу как описано ранее [406]. При этом, по данным гистологии наружная эластическая мембрана и медиa оставались неповрежденными.

Для оценки влияния различных веществ на ранние процессы формирования неоинтимы и неоадвентиции сразу после проведения баллонного или периадвентициального повреждения сонной артерии на поврежденный сосуд периадвентициально наносили препараты в плевроническом (Pluronic F-127) геле, 0,5 мл, 40% (BASF). Раствор плевронического геля в 0,9% физиологическом растворе при 0<sup>o</sup>C является жидкостью, тогда как при температуре +37<sup>o</sup>C он превращается в полимерный гель, что способствует постепенному высвобождению препаратов [127], обеспечивая увеличение периода их действия по сравнению с введением раствора препарата местно или парентерально.

Высвобождение урокиназы и ее рекомбинантных форм оценивали через 2 суток и 4 суток после периадвентициального нанесения на поврежденные артерии в плевроническом геле рекомбинантной урокиназы, конъюгированной с биотином. Присутствие экзогенной урокиназы в стенке сосуда выявляли с помощью вестерн-блоттинга с использованием нейтравидина, конъюгированного с пероксидазой хрена (Pierce). Для иммуногистохимической визуализации на

парафиновых срезах проникшей экзогенной урокиназы использовали реакцию авидин-пероксидаза (реактивы Vector Laboratories). Проникновение нейтрализующих антител к урокиназе оценивали на парафиновых срезах с использованием преадсорбированных к крысиной ткани биотинилированных лошадиных антител к иммуноглобулинам мыши и реакции авидин-биотин-пероксидаза хрена (реактивы Vector Laboratories). Как отрицательный контроль использовали лошадиные антитела к иммуноглобулинам козы. Экзогенная рекомбинантная урокиназа была выявлена в поврежденных участках сосуда в меди и адвентиции на 2-е сутки после повреждения, тогда как на 4-е сутки ее присутствия не было выявлено. Нейтрализующие антитела к урокиназе также детектировались в сосуде на 2-е сутки после повреждения и не были выявлены на 4-е сутки после операции.

Нейтрализующие моноклональные антитела к урокиназе для локального нанесения на поврежденный сосуд были получены по методике, описанной ранее [5] и любезно предоставлены нам группой Инженерной иммунологии ИЭК РКНПК МЗ РФ).

Использовали модель снижения кровотока, описанную ранее [206]. Для общей анестезии интраперитонеально вводили кетамин, 130 мг/кг и ксилазин, 8,8 мг/кг. Кровоток по левой общей сонной артерии был снижен перевязкой внутренней и наружной ветвей общей сонной артерии шелковой нитью (рисунок 11).

Методом плетизмографии (Visitech System) 7 дней до операции и 3 дня после нее регистрировали систолическое артериальное давление и пульс в хвостовой артерии мыши. Еженедельно животных взвешивали. Кровоток измеряли ультразвуковым флуометром (Transonic System) и показатели анализировали с использованием программы Power Lab System. Напряжение сдвига рассчитывали по стандартной формуле  $\tau$  (дин/см<sup>2</sup>)=4 $\eta$ V/D, где  $\eta$  – вязкость, выраженная в пуаз, V – скорость кровотока, выраженная см/сек, а D – это внутренний диаметр, выраженный в сантиметрах. Диаметр просвета артерий оценивали на срезах сосудов при морфометрии. В работу вошло 250 мышей.

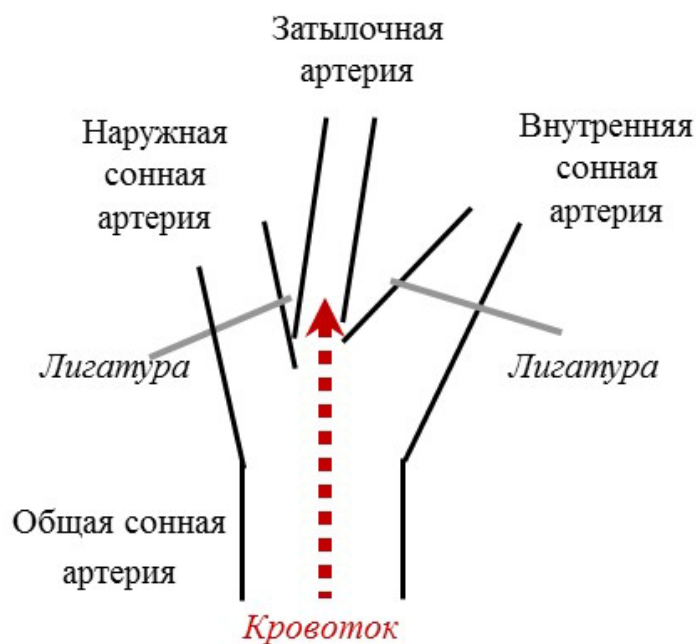


Рисунок 11 – Моделирование снижения кровотока

Экстракцию и хранение тканей проводили в соответствии с задачами. На первом этапе работы определяли динамику экспрессии эндогенной урокиназы и ее рецептора в сонной артерии крысы после повреждения баллонным катетером. Выделение обеих общих сонных артерий крысы проводили под общей анестезией калипсолом 20 мг/кг через 4 часа, 6 часов, 1, 2, 4, 10 и 14 суток после вмешательства, при этом в каждой подгруппе было минимум 7 животных. Артерии промывали в растворе Хэнкса (+4<sup>0</sup>С), после чего сегменты 5–7 мм заливали в матрикс O.C.T.Compaund (Tissue Teck®), замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -70<sup>0</sup>С. Для иммуногистохимии на криостате готовили срезы толщиной 4 мкм. Экспрессию белков урокиназы и ее рецептора исследовали с помощью иммуногистохимии и сравнивали с экспрессией в неповрежденных правых сонных артериях.

Экспрессию мРНК урокиназы и ее рецептора определяли на 2 и 4-е сутки после баллонирования с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией. Выделение обеих общих сонных артерий крысы проводили под общей анестезией калипсолом 20 мг/кг через 2 и 4 суток после операции (на

каждую точку не менее 3 артерий, в группах по 5 точек и более). Артерии промывали в растворе Хэнкса (+4<sup>0</sup>С), после чего сегменты длиной 10–12 мм погружали в жидкий азот, температура хранения -70<sup>0</sup>С.

Для исследования процессов формирования неоинтимы и неоадвентиции под действием активаторов плазминогена на 1, 2 и 4 сутки после баллонирования общей сонной артерии проводили общую анестезию пентобарбиталом 2 мг/кг, и из кровотока перфузией раствора 0,9% NaCl 2 мин, 120 мм рт ст, вымывали кровь, затем сосуды фиксировали перфузией формальдегида, 4%, 10 мин, 120 мм рт ст. После этого сонные артерии выделяли, дегидратировали иммерсией в водных растворах этанола возрастающих концентраций (90%, 95%, 100%, 100%), смеси хлороформ-этанол, в хлороформе и помещали в парапласт, Sigma. Использовали срезы 4 мкм – для иммуногистохимии и 10 мкм – для морфометрии. Артерии мышей для оценки ремоделирования при снижении кровотока фиксировали 10% формалином в фосфатном буфере (рН=7,0), затем артерии заключали в парафин.

### 2.3.3. Гистологические методы

*Метод окраски срезов на коллагеновую ткань по методу Ван-Гизона*

В ксилене и этаноле убывающих концентраций срезы артерий (10 мкм) депарафинировали и проводили окрашивание гематоксилином (3 мин). Промывали дистиллированной и проточной водой в течение 10 мин и окрашивали раствором пикрофуксина в течение 5 мин (на 100 мл насыщенного водного раствора пикриновой кислоты 5–7,5 мл 2% раствора кислого фуксина, перед употреблением к 60 мл этой смеси добавляли 7 капель уксусной кислоты). Затем на 2–4 секунды срезы помещали в раствор: 60 мл дистиллированной воды с 2,5 мл подкисленного раствора пикрофуксина. Срезы дегидратировали в растворах этанола возрастающих концентраций – 90%, 95%, 100%, 100% ксилене – 5 мин двукратно и помещали в Канадский бальзам (Sigma). Адвентицию определяли, как ткань, содержащую большое количество коллагена, и проводили морфометрию.

### *Морфометрический анализ*

Для морфометрии в ксилене и этаноле убывающих концентраций депарафинировали срезы артерий (10 мкм) и проводили окрашивание 0,1% толуидиновым синим 3–4 мин, дегидратировали в растворах этанола возрастающих концентраций – 90%, 95%, 100%, 100%, ксилене – 5 мин двукратно и помещали в Канадский бальзам (Sigma) [46].

Морфометрические измерения площадей структур сосудистой стенки: внутренней оболочки – неоинтимы, средней оболочки – меди, наружной оболочки – адвентиции, а также наружной эластической мембраны и просвета, измерения толщины меди и интимы на срезах сонных артерий проводили с помощью программного обеспечения KS-100 2.0, Kontron Elektronik, и Optimas 6.1., Optimas Corporation.

### *Иммуногистохимия*

Иммуногистохимическую визуализацию белков проводили стандартно на срезах артерий замороженных и заключенных в парафин. Для иммуногистохимического окрашивания использовали моноклональные антитела к урокиназе человека (Inpharm), поликлональные антитела кролика к рецептору урокиназы (American Diagnostica), моноклональные антитела мыши к ядерному антигену пролиферирующих клеток (PCNA, PC 10) (Santa Cruz Biotechnology), моноклональные антитела мыши к  $\alpha$ -актину гладкомышечных клеток (Dako, Glostrup, Denmark), моноклональные антитела мыши к тяжелой цепи гладкомышечного миозина (SM-myosin heavy chain (G-4), Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), моноклональные антитела мыши к ED-1 (антиген моноцитарных/макрофагальных/дендритных клеток) (Serotec, Dusseldorf, Germany), моноклональные антитела мыши к смузелину (Chemicon, Hofheim, Germany), моноклональные антитела мыши к гладкомышечному h-кальдесмону (Sigma-Aldrich, Moscow, Russia), поликлональные антитела кролика к ПАИ-1 человека (Dionova), козью сыворотку (ICN), контрольные неиммунные моноклональные антитела мыши и кролика Vector Laboratories (Grunberg,

Germany), преадсорбированные к крысиной ткани биотинилированные лошадиные антитела против IgG мыши и биотинилированные козы антитела к IgG кролика (Vector Laboratories). Антитела на мишенях визуализировали взаимодействием авидин-биотин-пероксидазы хрена (Vector Laboratories) с диаминобензидином тетрагидрохлоридом (Sigma) [190]. Замороженные срезы фиксировали в ацетоне в течение 20 мин при  $-20^{\circ}\text{C}$ , промывали фосфатным буфером (pH 7,4). Парафиновые срезы депарафинировали в ксилене и этаноле убывающих концентраций, подавляли эндогенную пероксидазную активность инкубацией в перекиси водорода (3 % в фосфатном буфере, 20 мин, температура комнатная). Инкубировали 30 мин с блокирующей сывороткой (10% в фосфатном буфере) и 60 мин с первыми антителами (10% в сыворотке) в разведении для антител к урокиназе и ядерному антигену пролиферирующих клеток 1:1000 для замороженных срезов и 1:200 для парафиновых срезов и для рецептора урокиназы 1:200 и 1:50 для замороженных и парафиновых срезов, соответственно. Контрольные срезы инкубировали с 10% раствором сыворотки. После связывания антител с белками-мишенями на срезы наносили вторые антитела в разведении 1:200 в 10% растворе сыворотки в течение 60 мин при комнатной температуре. Затем срезы инкубировали с комплексом авидин / пероксидаза [в разведении 1:100 с реагентом А (авидин DH) и реагентом В (пероксидаза хрена H) в 10% растворе блокирующей сыворотки в фосфатном буфере] 60 мин, t комнатная. 0.5 мг/мл с 0,01%  $\text{H}_2\text{O}_2$  тетрагидрохлорида диаминобензидина фильтровали (0,22 мкм фильтр, Millipore, USA) и наносили на 1–3 мин, затем проводили окрашивание срезов водным раствором гематоксилина. Ополаскивали водопроводной водой, дегидратировали в растворах этанола возрастающих концентраций – 90%, 95%, 100%, 100%, ксилене (5 мин двукратно) и помещали в Канадский бальзам (Sigma). Если было необходимо последующее выявление второго антигена на тех же срезах, то несвязавшийся диаминобензидин отмывали и повторяли обработки сывороткой, авидином и биотином. Заново проводили инкубации с первыми и вторыми антителами,

визуализировали с помощью комплекса стрептавидин – щелочная фосфатаза и заключали в бальзам, как описано выше.

#### *Оценка миграции клеток в неоинтиму*

Миграцию ГМК оценивали по аккумуляции окрашенных  $\alpha$ -актином клеток в неоинтиме на 4 сутки после баллонирования артерии.

#### *Оценка экспрессии антигенов в тканях животных*

Оценку экспрессии урокиназы и ее рецептора проводили после иммуногистохимии полуколичественным способом, описанным ранее [22, 403], при этом использовали условные единицы – отсутствие антигена (0), слабое или непостоянное окрашивание (1), постоянное окрашивание разной степени интенсивности (2–4). Для оценки пролиферации клеток поврежденных и неповрежденных сосудов использовали ядерный маркер пролиферирующих клеток (PCNA), белок, ассоциированный с  $\delta$ -полимеразой, который синтезируется в раннюю G1 и синтетическую (S) фазы клеточного цикла [372]. Подсчет числа антиген – позитивных клеток и общего числа клеток проводили под световым микроскопом (увеличение 20 $\times$  раз). Индексы пролиферации рассчитывали по формуле: Индекс = Число антиген-позитивных клеток  $\times$  100 / Общее число клеток [243]. Индексы пролиферации клеток интимы, меди и адвентиции поврежденных левых общих сонных артерий сравнивали с таковыми интактных правых общих сонных артерий. Аналогично рассчитывали долю альфа-актин позитивных клеток на срезах левых и правых общих сонных артерий после периадвентициального повреждения.

#### *Оценка экспрессии антигенов в тканях человека*

Использовали световой микроскоп с увеличением 40 $\times$  и в интиме и меди аорты при разных типах атеросклеротического поражения считали долю клеток, окрашенных на антиген; расчет проводили по формуле: Индекс = число окрашенных клеток  $\times$  100 / общее число клеток. Экспрессия антигенов сопоставлялась с результатами клеточного типирования (экспрессией альфа-актина гладкомышечных клеток и антигена макрофагов CD 68). Мы также

анализировали сококализацию антигенов на клетках сосудистой стенки разных типов [404].

С помощью стандартной методики иммуногистохимии на парафиновых срезах сосудов визуализировали белки урокиназного и тканевого активаторов плазминогена, ММП и ингибитора ММП; а также проводили оценку пролиферации клеток и подсчет клеток, экспрессирующих лейкоцитарный антиген. На данном этапе работы использовали следующие первые антитела: MMP 2 антитела козы (Research Diagnostics), MMP 2 антитела мыши (Oncogen Research), MMP 9 антитела кролика (Research Diagnostics), MMP 9 антитела кролика (Santa Cruz Biotechnology), TIMP 2 антитела мыши (Santa Cruz Biotechnology), Ki-67 антитела крысы (Dako), uPA антитела кролика (American Diagnostica), tPA антитела козы (American Diagnostica), CD45 антитела мыши (BD PharMingen). Использовали также вторые лошадиные антитела к мышинным антителам, козы антитела к кроличьим антителам и кроличьи антитела к козым антителам (Vector Lab Inc) для стандартной процедуры в рекомендованном разведении 1:200 (15мкг/мл) и для экспресс-окрашивания 1:100 (30 мкг/мл).

#### **2.3.4. Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией**

Для получения суммарной РНК использовали 3 общие сонные артерии. Очищенные и промытые 70% этанолом артерии замораживали в жидком азоте. Далее все процедуры проводили в условиях, приближенных к стерильным, при +4°C. Суммарную РНК выделяли по стандартному методу Chomczynski и Sacchi [90], для предотвращения контаминации ДНК проводилась инкубация экстрактов РНК с 2U ДНКазы (Stratagene) [190].

Замороженные артерии измельчали до состояния мелкой пудры в ступке, охлажденной жидким азотом. В пудру, полученную из трех артерий, добавляли 450  $\mu$ л раствора Д (2М гуанидин-изотиоционат, 2% саркозинат натрия, 25 мМ цитрат натрия, рН 7,0) и гомогенизировали. Для экстракции суммарной РНК из гомогената добавляли 300  $\mu$ л смеси фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (объемные соотношения: 49:1:1), 45  $\mu$ л 2 М ацетата натрия (рН 4,0), интенсивно



перемешивали, инкубировали 15 мин при +4° и центрифугировали при 14000g в течение 30 мин при +4°С. К фракции, обогащенной РНК, добавляли изопропанол (объемное соотношение 1:1). Суспензию инкубировали в течение 30 мин при -20°, РНК осаждали центрифугированием при 14000g 15 мин при +4°С. Осадок ресуспендировали в 300  $\mu$ л раствора Д и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Вторично осаждали РНК, добавляя 300  $\mu$ л изопропанола и центрифугируя при 14000g 15 мин при +4°С. Осадок промывали 70%-ным этанолом, осаждали центрифугированием при 14000g 15 мин при +4°С, затем подсушивали при +37°С 30 мин и ресуспендировали в 20  $\mu$ л H<sub>2</sub>O, обработанной ингибитором РНКаз диэтилпирокарбонатом. Полученный раствор использовали для проведения реакций обратной транскрипции. С помощью метода спектрофотометрии по поглощению (длина волны 260 нм) определяли концентрацию РНК. Методом электрофореза в агарозном геле в денатурирующих условиях исследовали качество РНК. 4  $\mu$ г РНК в 10  $\mu$ л стерильной воды держали на водной бане при +60°С 15 мин. Затем раствор помещали на лед на 2 мин, добавляли 2  $\mu$ л раствора для осаждения РНК [0,05 ЭДТА, 50% глицерин и бромфенол синий]. Смесь помещали в гель [1% агароза/(2,2 М/Л) формальдегид], содержащий этидиум бромид в буфере MOPS [1 мМ ЭДТА, 4,2% 4 морфолинпропансульфоновая кислота, 0,41% ацетат натрия]. Проводили электрофорез и гель обесцвечивали в течение ночи в дистиллированной воде, затем РНК детектировали в ультрафиолетовом свете с длиной волны 302 нм.

Реакцию обратной транскрипции РНК проводили с помощью набора RT-PCR, "Perkin Elmer", USA. Готовили реакционную смесь (5  $\mu$ л): суммарная РНК 250 нг, праймеры (случайные гексамеры) 2,5  $\mu$ М, обратная транскриптаза MoMuLV 12,5 IU, dATP, dTTP, dGTP, dCTP по 1 мМ, ингибитор РНКаз 5 IU, MgCl<sub>2</sub> 50 мМ и трис-HCl (pH 8,3) 10 мМ. На реакционную смесь наслаивали минеральное масло 20  $\mu$ л во избежание испарения. Смесь инкубировали при комнатной температуре 10 мин, при температуре +36°С 60 мин, затем охлаждали

на льду. Полученную кДНК амплифицировали с помощью полимеразной цепной реакции.

Полученные фрагменты кДНК амплифицировали методом полимеразной цепной реакции в Omnigene TM термоциклере, используя олигонуклеотидные праймеры, специфичные по отношению к урокиназе, рецептору урокиназы и рибосомальному белку L7 по описанной ранее методике [190]. Каждый цикл включал денатурацию при +94°C в течение 30 сек, отжиг при +63°C – 1 мин и наращивание цепей амплификатов при +72°C – 2 мин. В последнем цикле продолжительность финальной стадии составила 8 мин при +72°C. Оптимальное число циклов было выбрано для каждого праймера так, чтобы соотношение продукта амплификации к мРНК было линейным [190]. Для урокиназы число циклов составило 28, а для ее рецептора - 26. Подтверждение того, что одинаковые количества РНК использовались в каждой реакции, было получено с помощью амплификации (23 цикла) фрагмента кДНК L7, рибосомального белка, кодируемого геном, экспрессия которого не зависит от фаз клеточного цикла. Продукты реакции анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле. Амплифицированные фрагменты кДНК фотографировали в ультрафиолетовом свете (302 нм) на пленку Polaroid 667.

Праймеры конструировали с помощью "Primer Detective" (TMJ Lowe, Clontech Labs). Праймеры имели следующую структуру: урокиназа (Genbank № 65651) sense: 5'-TCGTGAATCAGCCAAAGAAGGAAGAA TACG-3' (680–709 п.о. в к ДНК), antisense: 5'-CAACTGACATTTTCAGGTTC-3' (993–1012 п.о. в к ДНК), амплифицируемый фрагмент состоял из 333 п.о.; урокиназный рецептор (Genbank № X71899), sense: 5'-CAGAACACTGTATTGAAG TGGTGACGCTCC-3' (431–460 п.о. в к ДНК), antisense: 5'-TCCAAGCACTGATT CATTTGGTCCCCG-3' (712–737 п.о. в к ДНК), амплифицируемый фрагмент состоял из 307 п.о. Использовали также олигонуклеотидный праймер для белка L7 [190].

Другие праймеры были сконструированы с помощью "Синтол"(Москва). Праймеры имели следующую структуру: металлопротеиназа-2 sense: 5'-CATGGGGCTGGAACAСТААСА-3' (1224–1244 п.о. в кДНК), antisense: 5'-

AACCGGGGTCCATTTTCCCCTTTA-3' (1810–1787 п.о. в кДНК), амплифицируемый фрагмент состоял из 587 п.о.; металлопротеиназа 9 sense: 5'-ACGACATAAAAGGCATCCAGCATC-3' (1304–1327 п.о. в кДНК), antisense: 5'-GAGCCTAGCCCCAACTTATCCAGA-3' (1832–1809 п.о. в кДНК), амплифицируемый фрагмент состоял из 529 п.о.

### 2.3.5. Зимография

С помощью метода зимографии определяли активность матричных металлопротеиназ. Обе общие сонные артерии экстрагировали под общей анестезией (калипсол 20 мг/кг) на 2 или 4-е сутки после баллонирования (в каждой группе минимум 7 животных). Артерии промывали в растворе Хэнкса +4<sup>0</sup>С, погружали в жидкий азот и помещали на хранение при 0<sup>0</sup>С. Замороженные артерии измельчали до состояния мелкой пудры в ступке, охлажденной жидким азотом. К образцам добавляли лизис-буфер RIPA 80  $\mu$ l, содержащий 1% Nonidet P-40, 10 мМ Трис-НСl, рН 7,4, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, фенилметилсульфонил фторид 1 мМ и 12,5% коктейль ингибиторов протеаз, размешивали, центрифугировали (4000g) 3 мин, затем использовали супернатант для экспериментов.

Концентрацию белка определяли методом Брэдфорда [54]. Пробы, содержащие по 50 мкг белка в 0,05 мл и 0,95 мл красителя Кумасси G-250 бриллиантовый синий, готовили в SDS-буфере [бромфеноловый синий, Трис-НСl (рН 7,0) 250 мМ, SDS 4%, глицерин 40%,  $\beta$ -меркаптоэтанол 10%] и кипятили 3 мин. Строили калибровочный график: для этого в пробу объемом 1 мл добавляли от 1 до 8 мкг урокиназы. Разделяли белки электрофоретически.

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) проводили по стандартной методике [209]. Для разделения белков использовали ПААГ/SDS 7,5% с желатином 0,2 %. Затем гель промывали раствором Тритона-100 2,5% 1 час при комнатной температуре и инкубировали 18 часов при +37<sup>0</sup>С в буфере [трис/НСl (рН 8,0) 50 ммоль, NaCl 50 ммоль, Бридж 35 0,05%, CaCl<sub>2</sub> 10 ммоль]. Гель окрашивали по Кумасси раствором [СВВ R-250 0,25%, метанол 40%, уксусная

кислота 10%] 1 час. Отмывали раствором, содержащим этанол 12%, глицерин 10%, уксусная кислота 5%. Денситометрию зимограммы проводили с помощью программы Science Image и выражали в произвольных единицах измерения.

### **2.3.6. Метод транскрипционных матриц**

Для оценки изменений в экспрессии генов, вызываемых активаторами плазминогена в стенке артерии, методом транскрипционных матриц (микрочипов) было проведено баллонирование сонной артерии крысы. Было прооперировано 150 животных. Обе общие сонные артерии были экстрагированы и приготовлены гомогенаты артерий.

Общая РНК была экстрагирована из гомогенизированных образцов. Для каждой гибридизации использовали смешанный материал, полученный от трех животных, по три гибридизации в каждой группе. Мечение проб и гибридизация были проведены в соответствии с рекомендациями производителя [155]. Для анализа микрочипов был использован геном крысы Affymetrix U34A для олигонуклеотидных микроэстреев, состоящий из 8799 известных генов и неаннотированных последовательностей (Santa Clara, CA ([www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com))). Гибридизация, окрашивание и сканирование проводились в соответствии с протоколом производителя. Стрептавидин фикоэритрин (SAPE, Molecular Probes) использовали в качестве флуоресцентного конъюгата для обнаружения гибридизированных последовательностей-мишеней. Оценка мишеней гибридизации была проведена на сканере для микрочипов (Hewlett Packard/Affymetrix).

Перед анализом данных было оценено качество гибридизации. В смесь для гибридизации были внесены контрольные транскрипты для контроля эффективности гибридизации и чувствительности. Чтобы оценить вариабельности данных между микрочипами использовали программное обеспечение Affymetrix (Microarray Analysis Suite (MAS 5.0)), и массивы данных были нормированы с помощью глобального подхода шкалирования с целевой интенсивностью 500 во всех наборах зондов [155].

Для уменьшения ошибки при анализе данных микрочипов, а также для уменьшения числа ложных обнаружений и количества мишеней для дальнейшего статистического анализа были рассчитаны индексы для идеального обнаружения экспрессии с использованием программного обеспечения DNA-Chip Analyzer (dChip) [212]. Перед анализом был использован метод инвариантной нормализации. Процент экспрессированных генов во всех зондах составлял более 40%. Значение непросчитываемых экспрессий во всех массивах данных не превышало 5%, что указывало на отсутствие существенного загрязнения изображения или образцов гибридизации в исследованных массивах. Были также отфильтрованы и исключены из анализа гены, которые отсутствовали в большинстве образцов. Была оценена и подтверждена незначительная вариабельность данных между массивами (SD менее 2%) от среднего сигнала (по 5% сигналов были исключены с обеих высокой и низкой сторон сигналов). В результате фильтрации в последующий анализ вошли 4458 генов-мишеней.

Для оценки достоверности различий в экспрессии генов между группами была использована программа SAM (significance analysis of microarrays) [444]. Достоверность различий в экспрессии генов между группами была также оценена с помощью параметрического теста ANOVA и Т-теста в модификации Вельша в программе GeneSpring Software (Silicon Genetics, Redwood City, CA, USA). Для получения максимально надежных результатов значимыми признавались только те изменения экспрессии генов, которые были подтверждены обоими тестами (SAM и Т-тест в модификации Вельша) [174]. Были использованы статистические алгоритмы Microarray Suite 5.0 с параметрами по умолчанию для определения сигналов. Пакет программного обеспечения DNA-Chip Analyzer был предоставлен лабораторией вычислительной биологии Департамента биостатистики Гарвардской школы общественного здравоохранения ([www.dchip.org](http://www.dchip.org)). Данные, полученные в Microarray Suite и DNA-Chip Analyzer были экспортированы в Microsoft Excel для дальнейшего анализа в программе SAM. SAM был предоставлен департаментом статистики Стэнфордского университета

(<http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/>). Использовано программное обеспечение GeneSpring 5,0 (Silicon Genetics, <http://www.silicongenetics.com/>).

### **2.3.7. Количественная полимеразная цепная реакция**

Количественный анализ проводили с использованием системы детекции последовательности ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems). Подготовку и очистку двухцепочечной кДНК проводили с помощью набора Ambion MessageAmp aRNA kit. Праймеры и Master Mix from RT2 Real-Time Gene Expression Assay kits (SuperArray) были получены для 6 генов крысы: бета-актина (V01217), супероксиддисмутазы-2, содержащей марганец (manganese-containing SOD-2, AA926129), фактора некроза опухолей-альфа (TNF-alpha, L00981), TNF-альфа превращающего фермента (TACE) (AJ012603), ММП-2 (U65656), цАМФ фосфодиэстеразы 4В (PDE4B) (M25350). Каждая проба содержала 2 мкл SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) и 2 мкл разбавленной кДНК (1: 100). Полимеразная цепная реакция (ПЦР) состояла из начальной стадии активации фермента при +95 ° С в течение 15 минут, с последующими 40 циклами при +95 ° С в течение 30 сек, +55 ° С в течение 30 сек и +72 ° С в течение 30 сек.

### **2.4. Клеточно-биологическое исследование**

Использовали фибробласты, выделенные из кожи человека. Фибробласты культивировали в среде роста DMEM (Gibco), содержащей (100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 10 % фетальной бычьей сыворотки в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при +37<sup>0</sup>С, меняя среду роста каждые 2 дня. Для пассирования клеток использовали 0,1% раствор трипсина в растворе Версена. В экспериментах использовали клетки 8–9 пассажей.

Фибробласты линии NIH 3T3 культивировали в среде DMEM с нормальным содержанием глюкозы, 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС), 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, при +37<sup>0</sup>С в 5% CO<sub>2</sub>. По достижении 80-90% конфлюентности клетки пассировали раствором трипсин-ЭДТА. Для

получения клеток, обедненных по митохондриальной ДНК, клеточную линию культивировали и пассировали в среде, содержащей дополнительно 250 нг/мл бромистого этидия, 50 мкг/мл уридина и 110 мкг/мл пирувата натрия, в течение 7–14 дней.

*Стимуляция трансформации фибробластов кожи в миофибробласты in vitro*

Клетки культивировали до достижения 70% монослоя и инкубировали в течение 24 ч в среде с заменой 10% ФБС на 0,1% ФБС, затем добавляли рекомбинантную урокиназу в различных концентрациях (1 нМ, 5 нМ, 10 нМ, 20 нМ, 50 нМ, 100 нМ) и продолжали инкубацию в течение 48 ч [406].

*Экстракция гладкомышечного альфа-актина из культивируемых клеток*

После стимуляции клетки охлаждали во льду, промывали трижды в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) и соскребали в этом же буфере. Затем суспензию клеток центрифугировали 5 мин при 1000 g, к клеточному осадку добавляли лизирующий буфер [трис-НСI 100 мМ, рН 8,1, ЭДТА 5 мМ, ФМСФ 1 мМ] (100 мкл на культуральную чашку с диаметром 100 мм) и инкубировали 10 мин при 0°C. Полученные лизаты центрифугировали 30 мин в микроцентрифуге при 14000 g. Супернатанты отделяли от осадка и определяли в них концентрацию белка методом Брэдфорд. Образцы для электрофореза готовили следующим образом: к 75 мкл лизата добавляли 25 мкл 4х-кратного буфера для образцов (0,5 М трис/НСI, рН 6,8, 4% ДСН, 40% глицерин, 4% β-меркаптоэтанол) и инкубировали в течение 5 мин при +100°C. Образцы, содержащие равное количество белка (80–100 мкг), разделяли с помощью ДСН-электрофореза в ПААГ и переносили на нитроцеллюлозную мембрану методом электроэлюции. Содержание альфа-актина в полученных образцах оценивали с помощью иммуноблоттинга с антителами к α-актину человека (Sigma, А 2547).

Определение концентрации белка в пробах проводили по методике Бредфорда [54]. 100 мг Кумасси G-250 бриллиантового синего растворяли в 50 мл 95 % этилового спирта, добавляли 100 мл 85 % фосфорной кислоты и доливали воду до 1 л. Пробы, содержавшие от 1 до 10 мкг белка в 0,1 мл, смешивали с 1 мл готового реагента. Измерения проводили относительно чистого реагента через 15

мин при 595 нм. Концентрацию белка определяли по градуировочному графику, построенному для раствора белка с известной концентрацией.

Электрофорез в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) проводили согласно методике Лемли [209]. Окраску белков в геле производили с помощью раствора 0,25% Кумасси Бриллиантовый синий R-250, 50% метанол, 10% уксусная кислота. Молекулярные массы белков определяли, используя график зависимости длины пробега белков-стандартов от десятичного логарифма молекулярных масс.

### *Иммуноблоттинг*

Перенос белков с ПААГ на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли электроэлюцией по методу Тобина [389]. После переноса мембрану инкубировали с блокирующим буфером (3% обезжиренное молоко в ФСБ) 1 ч при +25°C или в течение ночи при +4°C. Затем мембрану инкубировали с первыми антителами в блокирующем буфере 1 час при +25°C и промывали 3 раза по 10 мин в этом же буфере. Затем мембрану инкубировали со вторыми антителами (конъюгат с пероксидазой) в блокирующем буфере 1 час при +25°C и промывали 3 раза по 10 мин в ФСБ. После этого добавляли субстратную смесь: 6 мг 3,3' – диаминобензидин, 9 мл 50 mM трис-НСl (рН 7,6), 1 мл 0.3% NiCl<sub>2</sub>, 10 мкл 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и инкубировали до развития окраски. Реакцию останавливали, отмывая нитроцеллюлозную мембрану дистиллированной водой. После окраски мембрану сканировали с помощью цифровой видеокамеры (Kodak) и интенсивность окрашивания определяли в программе PCBAS 2.08.

### *Зимография культивируемых фибробластов*

Перед проведением зимографии фибробласты депривировали в среде культивирования, содержащей 0,1% ФСБ, в течение ночи, затем, в зависимости от эксперимента, инкубировали в присутствии 100 нМ урокиназы (American Diagnostica), 50 нг/мл фактора некроза опухолей-альфа (R&D Systems) и/или 3 мкМ эбселена в течение 24 часов. После инкубации собирали кондиционированные клеточные среды, смешивали их с буфером для образца (0,0625 M трис-НСl, рН 6,8, 2% ДСН, 10% глицерина (об/об), 0,001%



бромфеноловый синий) и подвергали электрофорезу в 7,5% ДСН-полиакриламидном геле, содержащем 0,1% желатина. После электрофореза гели промывали 3 раза по 100 мл 2,5% тритоном X-100 и выдерживали в течение 18 часов при +37<sup>0</sup>С в буфере, состоящем из 50 мМ трис-НСl (рН 8,0), 50 мМ NaCl, 0,05% Бридж 35 и 10 мМ CaCl<sub>2</sub>. После инкубации гели окрашивали 0,25% Кумасси бриллиантовым синим G-250 в 40% (об/об) метанола и 10% (об/об) уксусной кислоты, с последующей отмывкой избытка красителя смесью 40% (об/об) метанола и 10% (об/об) уксусной кислоты. Зимограммы подвергались денситометрическому анализу с использованием программы ImageJ. Протеолитическая активность оценивалась по неокрашенным пятнам на фоне окрашенного желатина и выражалась в относительных единицах.

#### *Измерение образования уровня активных форм кислорода*

НИН 3Т3 фибробластами проводили с помощью флуоресценции гидроэтидина. Клетки, культивируемые в 35-мм чашках Петри, депривировали в среде культивирования, содержащей 0,1% ФСБ, в течение ночи, затем инкубировали в течение 60 мин в присутствии 100 нМ uPA или 50 нг/мл фактора некроза опухолей-альфа. Среду меняли на сбалансированный солевой раствор Хэнкса, содержащий 1,3 мМ CaCl<sub>2</sub>, 5,5 мМ глюкозу и 5 мкМ гидроэтидина, и инкубировали в течение 10 мин при +37<sup>0</sup>С в защищенной от света увлажненной камере. Затем проводили смену раствора Хэнкса и фотографировали клетки с помощью флуоресцентного микроскопа Olympus BX51 при увеличении x40, длине волны возбуждения 488 нм и эмиссии – 610 нм. Контрольные образцы анализировали параллельно.

В качестве независимого метода измерения концентрации O<sub>2</sub><sup>-</sup> в ГМК использовали хемилюминесценцию люцигенина. После депривации клетки снимали с пластиковой подложки обработкой раствором трипсин/ЭДТА, полученную суспензию клеток вносили в пробирки, содержавшие люцигенин (5 мкмоль/л) в растворе Хэнкса. К клеткам добавляли рекомбинантную урокиназу в концентрации 5–200 нМ. Регистрацию хемилюминесценции проводили в течение 4 часов каждые 15 мин с использованием хемилюминометра (LS 7000, Beckman

Instruments, Inc). При обработке данных вычитали фоновую хемилюминесценцию (образцы без клеток), данные приводили к интенсивности хемилюминесценции на 1 миллион ГМК.

## 2.5. Статистическая обработка

Данные исследования представлены как средние с ошибкой репрезентативности ( $M \pm m$ ). Для статистической обработки данных использовали программу Jandel SigmaStat; достоверности отличий оценивали с помощью теста Стьюдента-Ньюмана-Коула для множественных сравнений (One Way ANOVA) с уровнем значимости  $p \leq 0,05$ . Анализ результатов, полученных при обследовании пациентов с ИБС, проводили с использованием пакета для анализа данных SAS PROC PHREG (Statistical Analysis System Institute Inc., USA) с помощью стандартных алгоритмов вариационной статистики. Для многомерного анализа использовали регрессионный анализ, в том числе, пошаговые регрессионные модели. Для каждого количественного показателя рассчитывали среднее значение, стандартную ошибку, среднеквадратичное отклонение, интервал вариации (минимум и максимум). Данные представляли как  $M \pm m$ . Также использовали стандартные тесты (Т-тест, F-тест, хи квадрат): результаты первоначально обрабатывались с помощью одномерного дисперсионного анализа и критерия F-Фишера (для двухфакторного – с помощью t-критерия Стьюдента). Достоверными считались различия при  $p < 0,05$ . Была использована макропроцедура, позволяющая тестировать на значимость множество непрерывных, категориальных или категоризованных показателей как клинических, так и биохимических при учете влияния заведомо значимых показателей (таких как возраст), насильственно включаемых в модель. Значимость тестируемых переменных определялась с помощью асимптотического критерия хи-квадрат. Многомерный анализ проводился в режимах вперед и назад для дополнительной проверки полученных результатов, в обоих случаях результаты анализа были идентичны.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 3.1. Урокиназа и заболевания сосудов у человека

В основе патогенеза многих заболеваний сердечно-сосудистой системы лежат патологические изменения сосудистой стенки. В плазме крови пациентов с атеросклерозом коронарных артерий было выявлено повышение уровня урокиназы в сравнении со здоровыми добровольцами того же пола и возраста [411]. Изучение экспрессии белков системы урокиназы при различных типах атеросклеротического поражения, определение их локализации и колокализации в сосудистой стенке может способствовать дальнейшему пониманию механизмов атерогенеза и разработке подходов к предотвращению прогрессирования атеросклероза и его осложнений.

#### 3.1.1. Экспрессия компонентов системы фибринолиза в стенке аорты человека при разных типах атеросклеротического поражения

Было проведено определение экспрессии урокиназы, ее рецептора и ингибитора активаторов плазминогена 1-го типа в стенке аорты человека и сопоставление данных параметров с выраженностью атеросклеротического поражения.

##### *Иммуногистохимическая детекция урокиназы, ее рецептора и ингибитора активаторов плазминогена 1-го типа в непораженной аорте*

В непораженной аорте отмечалась слабая экспрессия урокиназы гладкомышечными клетками интимы и меди. Клетки, экспрессирующие урокиназу, были локализованы в протеогликановом слое интимы (рисунок 12). В мышечно-эластическом слое интимы и в меди специфическое окрашивание на урокиназу наблюдалось не только в клетках, но и в межклеточном матриксе сосудистой стенки.

Экспрессия урокиназного рецептора (uPAR) отмечалась на ГМК протеогликанового и мышечно-эластического слоев нормальной интимы (рисунок

13). Также наблюдалось интенсивное окрашивание клеток, содержащих рецептор урокиназы, в меди на границе с адвентицией, а также в клетках vasa vasorum. Специфическое окрашивание на ингибитор активаторов плазминогена 1-го типа (ПАИ-1) отмечалось на эндотелиальных клетках, ГМК, перицитах и в межклеточном матриксе интимы (рисунок 14) и меди нормальной аорты.

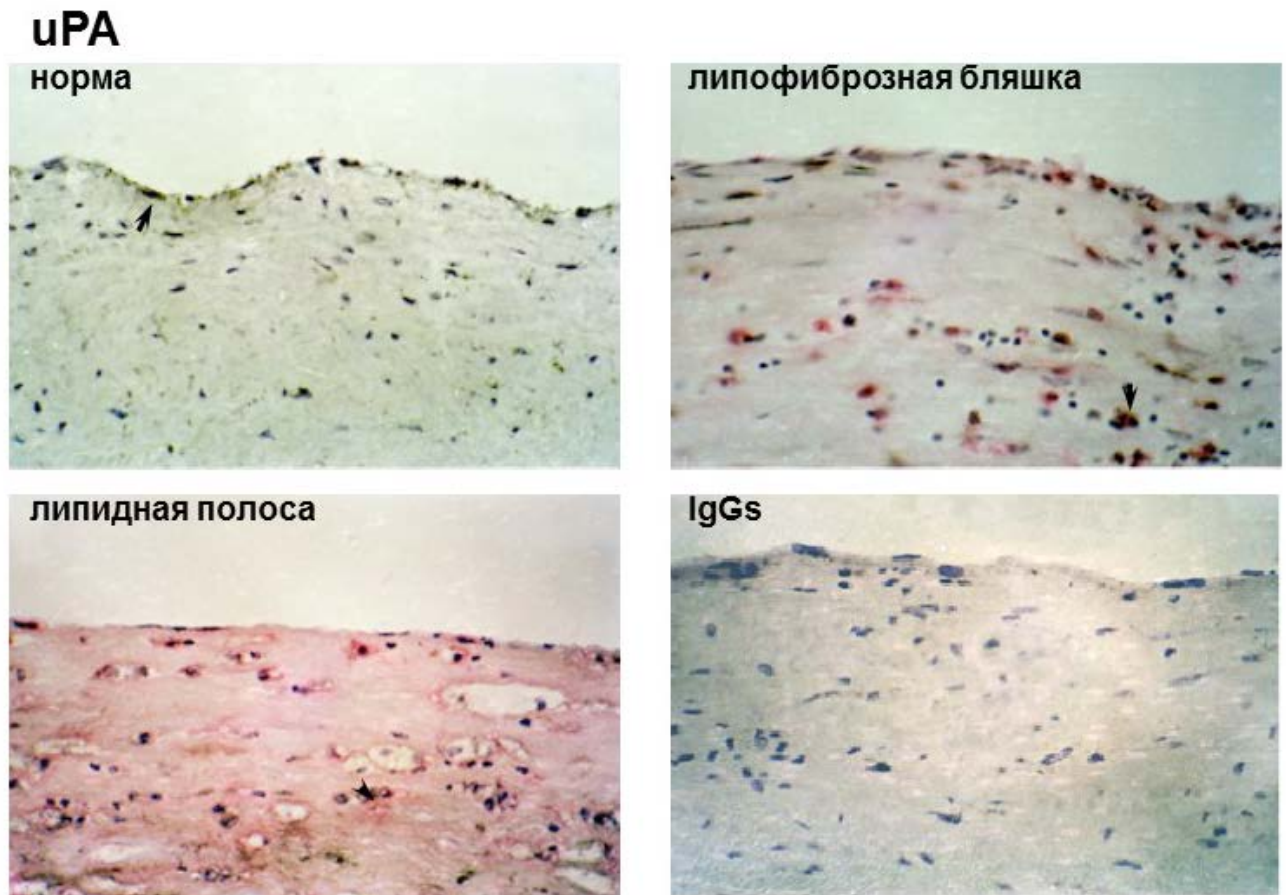


Рисунок 12 – Иммуногистохимическая окраска на антиген урокиназы (uPA) в непораженной аорте, липидной полосе и липофиброзной бляшке аорты человека  
 (Обозначения: Специфическое окрашивание на урокиназу представлено темно-коричневым цветом, на маркер макрофагов (CD68) – красным. Отрицательный контроль – неиммунные иммуноглобулины G мыши (IgGs). Стрелки указывают на клетки, экспрессирующие uPA. Ядра клеток окрашены гематоксилиновым синим, ув. x540)

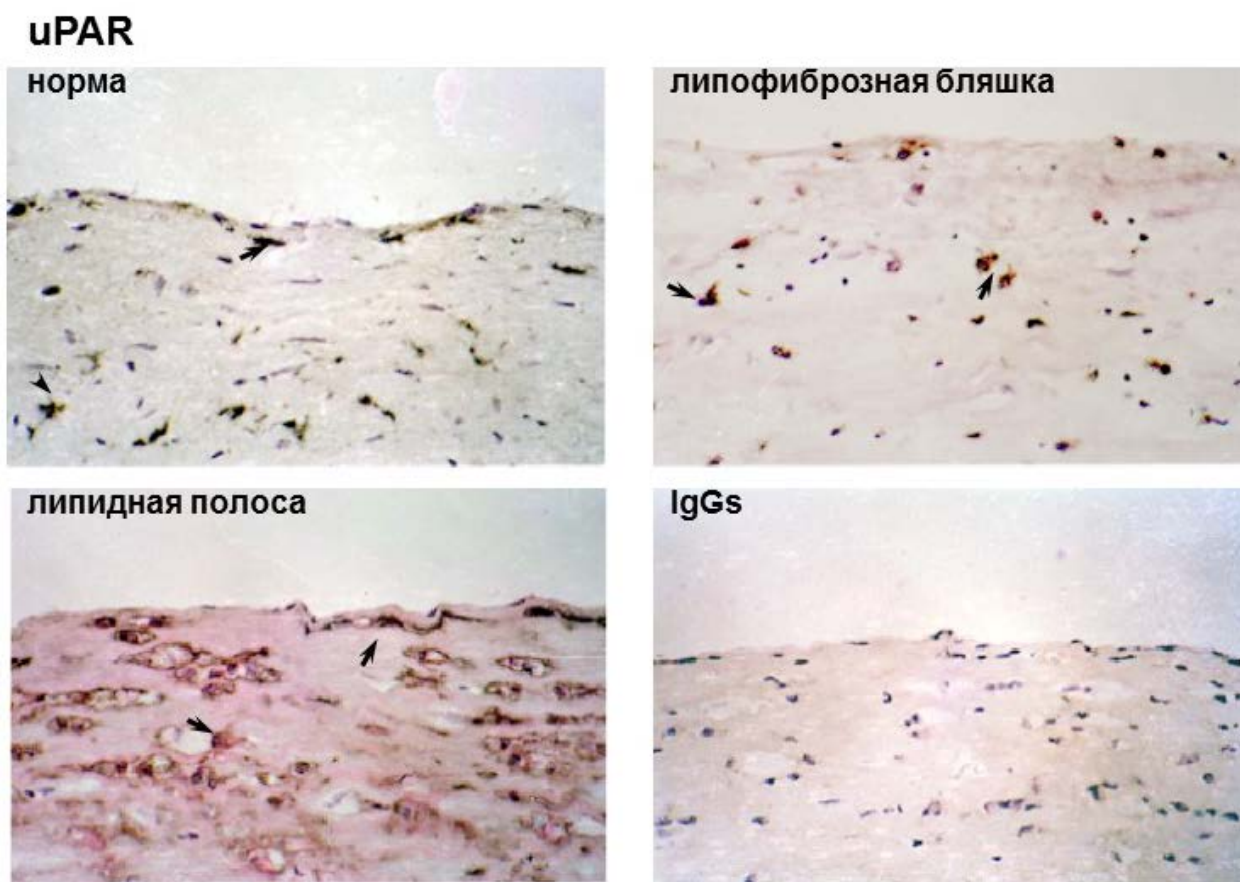


Рисунок 13 – Иммуногистохимическая окраска на антиген рецептора урокиназы (uPAR) в непораженной аорте, липидной полосе и липофиброзной бляшке аорты человека (Обозначения: Специфическое окрашивание на урокиназный рецептор представлено темно-коричневым цветом, на маркер макрофагов (CD68) – красным. Отрицательный контроль – неиммунные иммуноглобулины G мыши (IgGs). Стрелки указывают на клетки, экспрессирующие uPAR. Ядра клеток окрашены гематоксилиновым синим, ув. x540)

*Иммуногистохимическая детекция урокиназы, ее рецептора и ингибитора активаторов плазминогена 1-го типа в липидной полосе*

В липидной полосе окрашивание на урокиназу было более интенсивным, чем в непораженной аорте. Урокиназа локализовалась в ГМК и макрофагах интимы (рисунок 12) и меди. При этом типе поражения около 70 % всех клеток интимы были окрашены на антиген CD-68, ассоциированный с клетками макрофагального происхождения. Большинство этих клеток ( $\approx 60$  %) экспрессировали урокиназу (рисунок 15). В меди урокиназа локализовалась в

основном в межклеточном матриксе и ее содержание было меньшим по сравнению с непораженной аортой.

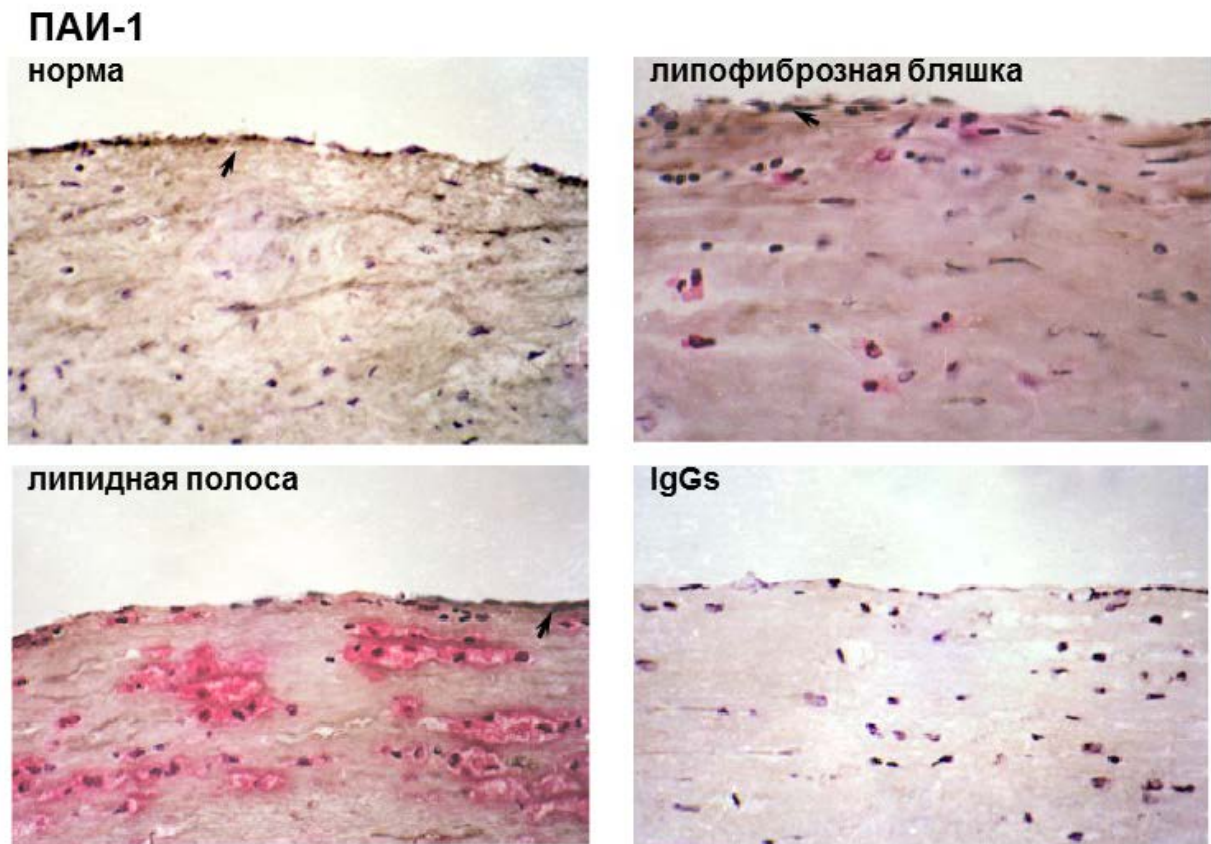


Рисунок 14 – Иммуногистохимическая окраска на антиген ингибитора активаторов плазминогена 1-го типа (ПАИ-1) в непораженной аорте, липидной полосе и липофиброзной бляшке аорты человека (*Обозначения*: Специфическое окрашивание на ингибитор активаторов плазминогена 1-го типа представлено темно-коричневым цветом, на маркер макрофагов (CD68) – красным. Отрицательный контроль – неиммунные иммуноглобулины G кролика и мыши (IgGs). Стрелки указывают на клетки, экспрессирующие ПАИ-1. Ядра клеток окрашены гематоксилиновым синим, ув. x540)

Окрашивание на урокиназный рецептор в липидной полосе было более интенсивным по сравнению с непораженной аортой (рисунок 13). В интиме липидной полосы около 75 % клеток были uPAR-позитивными. uPAR активно экспрессировали как ГМК ( $\approx 80$  % от общего числа ГМК), так и макрофаги ( $\approx 65$  % от общего числа макрофагов) интимы (рисунок 15). При двойном иммуногистохимическом окрашивании была выявлена колокализация урокиназы

и ее рецептора в основном на макрофагах интимы (рисунок 13). В меди морфологическая картина была сходной с непораженной аортой.

Окрашивание на ингибитор активаторов плазминогена 1-го типа было более интенсивным по сравнению с непораженным сосудом на эндотелии и в межклеточном матриксе липидной полосы (рисунок 14).

*Иммуногистохимическая детекция урокиназы, ее рецептора и ингибитора активаторов плазминогена 1-го типа в липофиброзной бляшке*

В липофиброзной бляшке отмечалось интенсивное окрашивание на урокиназу и ее рецептор на ГМК и макрофагах интимы (рисунок 12). При этом большая часть макрофагов, ГМК и пенистых клеток макрофагального происхождения интимы окрашивались на uPA и uPAR (рисунок 15). В меди специфического окрашивания на урокиназу и ее рецептор выявлено не было. При сравнении количества клеток, окрашенных на uPA и uPAR в липидной полосе и липофиброзной бляшке, существенных различий не наблюдалось (рисунок 15).

Содержание ПАИ-1 в липофиброзной бляшке по интенсивности окрашивания и распределению антигена существенно не отличалось от липидной полосы (рисунок 14).

Таким образом, при развитии атеросклеротического поражения происходит увеличение содержания урокиназы и ее рецептора в интимае [24]. Также происходит увеличение экспрессии ингибитора активаторов плазминогена 1-го типа. Достоверных отличий по интенсивности окрашивания на урокиназу и ее рецептор в липофиброзной бляшке по сравнению с липидной полосой выявлено не было (рисунок 16). В меди наблюдалась обратная тенденция: при прогрессировании атеросклеротического поражения содержание урокиназы и ее рецептора снижалось вплоть до полного исчезновения в липофиброзной бляшке (рисунок 16).

Повышенная экспрессия ингибитора активаторов плазминогена 1-го типа эндотелиальными клетками при атеросклерозе может приводить к подавлению фибринолиза и являться одной из причин тромботических осложнений [184, 192], в то же время, усиленная экспрессия урокиназы и ее рецептора макрофагами и

ГМК может активировать локальный протеолиз, способствовать разрушению межклеточного матрикса, высвобождению факторов роста и активации миграции и пролиферации сосудистых клеток [232].

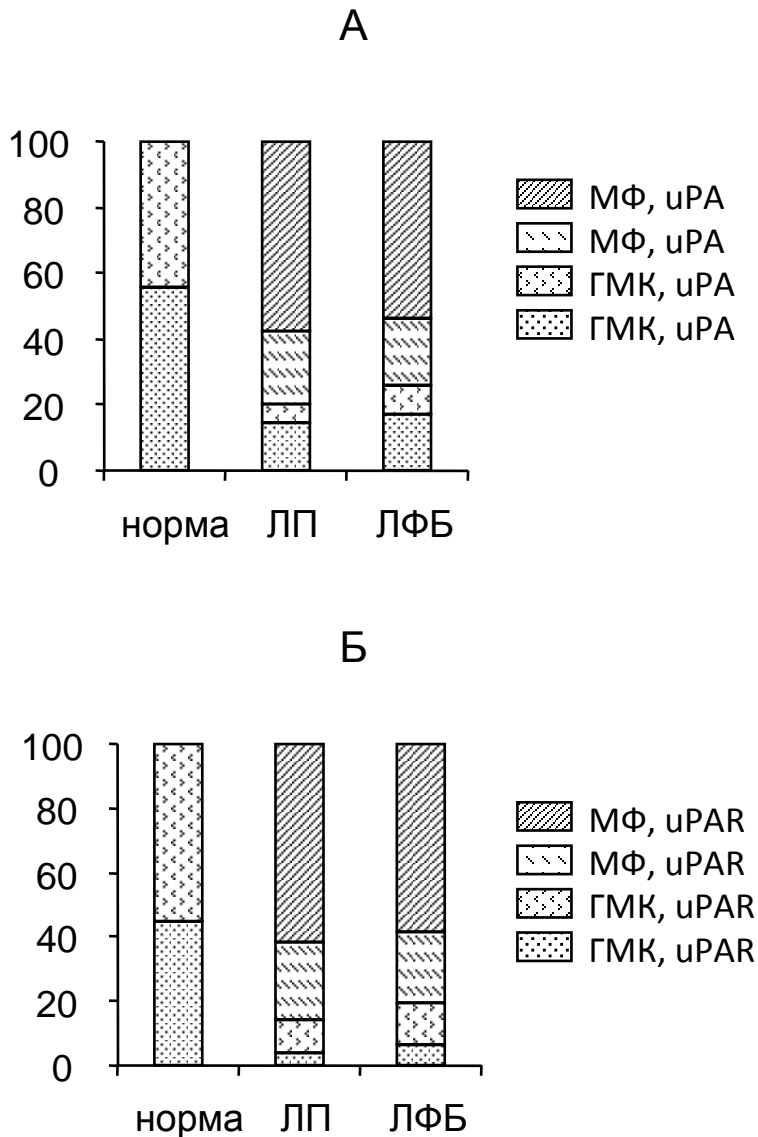


Рисунок 15 – Изменение соотношения клеток, экспрессирующих урокиназу (uPA) (А) и ее рецептор (uPAR) (Б), в нормальной интиме аорты и в разных типах атеросклеротических поражений (средний % от общего числа клеток) (Обозначения: ЛП – липидная полоса; ЛФБ – липофиброзная бляшка; ГМК – гладкомышечные клетки; МФ – макрофаги. Представлены средние данные 5 аорт по 3 среза с каждой аорты)



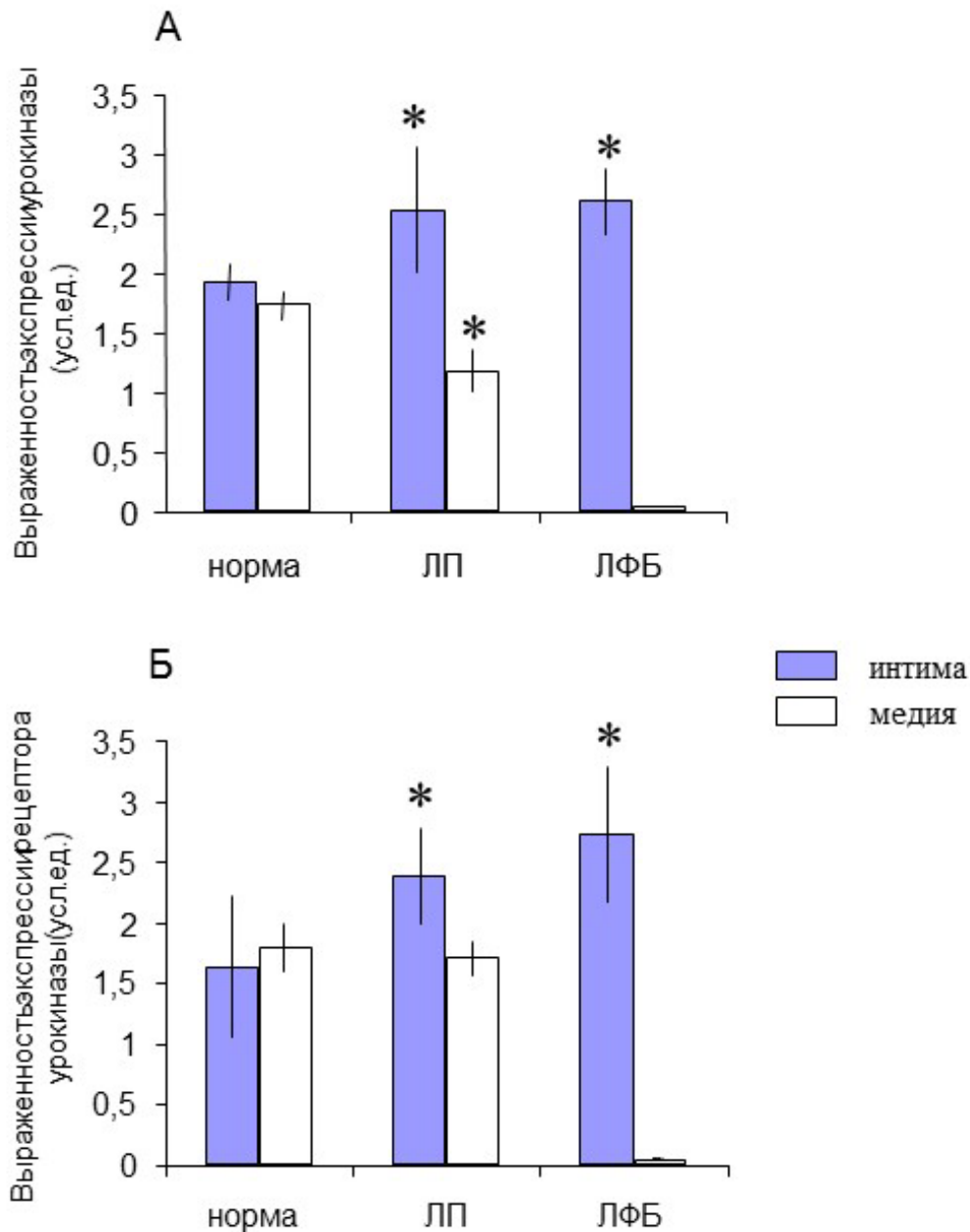


Рисунок 16 – Выраженность экспрессии урокиназы (А) и ее рецептора (Б) в стенке аорты (*Обозначения:* Оценку выраженности иммуногистохимического окрашивания проводили в условных единицах. \* $p < 0,05$  (по сравнению с неповрежденной аортой. Представлены средние данные 5 аорт по 3 среза с каждой аорты)

### 3.1.2. Частота рецидива стенокардии и рестеноза и компоненты системы фибринолиза у пациентов с ишемической болезнью сердца после коронарной ангиопластики

Рестеноз или повторное сужение просвета артерии в участке повреждения нередко рассматривают как одну из форм “ускоренного” атеросклероза,

сопровождающегося неблагоприятным ремоделированием сосуда, суживающим его просвет. В клинической практике одной из основных проблем у пациентов после успешной баллонной ангиопластики является возврат стенокардии, проявляющейся возобновлением ангинозных приступов и проведением повторных реваскуляризационных процедур. Многие исследования показали, что баллонная ангиопластика пораженного атеросклерозом сосуда вызывает активацию системы коагуляции и фибринолиза [276, 282, 292]. В связи с тем, что компоненты системы фибринолиза являются потенциальными кандидатами в предикторы возобновления стенокардии после процедур эндоваскулярной реваскуляризации, было проведено изучение компонентов системы фибринолиза как предикторов возобновления стенокардии после успешной коронарной ангиопластики [275].

#### *Клинические характеристики пациентов с ИБС*

Через год после успешной ангиопластики 53 пациента были разделены на 2 группы: А, без возобновления стенокардии после ангиопластики (n=37, 69,8%), и группу Б – с рецидивом стенокардии после процедуры (n=16, 30,2%). Клиника стенокардии у пациентов возобновилась от 3 до 11 месяцев после коронарной ангиопластики, в среднем через  $6,5 \pm 2,2$  месяца. Повторное ангиографическое обследование было проведено в среднем через  $7,4 \pm 1,6$  месяца. У всех 16 пациентов группы Б выявлены гемодинамически значимые стенозы: из них рестеноз выявлен у 11 пациентов (68,8% из пациентов с рецидивом стенокардии и 20,8% из всех пациентов), у 5 пациентов (31,1%) выявлено гемодинамически значимое атеросклеротическое поражение в другом коронарном сосуде. У пациентов с ангиографически подтвержденным рестенозом возобновление приступов стенокардии отмечалось через 3–7 месяцев после ангиопластики (в среднем через  $5,3 \pm 1,3$  месяца), что достоверно раньше, чем у пациентов с прогрессированием коронарного атеросклероза (через 8–11 месяцев, в среднем через  $9,2 \pm 1,1$  месяца,  $p < 0,05$ ). Из клинических характеристик, только наличие в анамнезе стенокардии продолжительностью более 12 месяцев при однофакторном анализе было связано с возобновлением стенокардии после коронарной

ангиопластики, но при многофакторном анализе этот признак не имел прогностического значения. Группы пациентов не имели существенных отличий по локализации дилатируемого сегмента, по проценту диаметра стеноза артерии до и непосредственно после ангиопластики, по проводимой медикаментозной терапии после вмешательства, по показателям общего и биохимического анализов крови, а также по мощности и величине “двойного произведения” при нагрузочной пробе исходно и через 7 дней после коронарной ангиопластики ( $p > 0,05$ ).

*Частота рецидива стенокардии и рестеноза в сопоставлении уровнями активаторов плазминогена тканевого и урокиназного типов, активности ингибитора активаторов плазминогена 1-го типа у пациентов с ИБС до ангиопластики*

До вмешательства активность ПАИ-1 была значительно выше у пациентов с рецидивом стенокардии (Б) при сопоставлении с пациентами без рецидива стенокардии (А) после успешной коронарной ангиопластики,  $p < 0,05$  (рисунок 17). При разделении пациентов на группы в соответствии с исходным уровнем ПАИ-1, большая частота рецидива стенокардии также отмечена в верхних квинтилях (50 и 54 %), по сравнению с нижними (27% и 9%),  $p < 0,05$  (таблица 1).

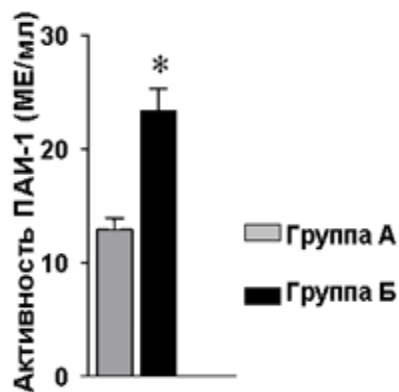


Рисунок 17 – Активность ингибитора активаторов плазминогена 1 типа (ПАИ-1) у пациентов с рецидивом стенокардии после успешной коронарной ангиопластики (Обозначения: (Б) по сравнению с пациентами без рецидива стенокардии (А) до баллонной ангиопластики, \*  $p < 0,05$ )

Активность тканевого активатора плазминогена до ангиопластики достоверно не отличалась в группах пациентов,  $p > 0,05$ .

Таблица 1 – Частота и относительный риск возврата стенокардии (с учетом возраста) в соответствии с уровнями антигена урокиназы и активности ПАИ-1 до баллонной ангиопластики

Квинтили	Частота возврата стенокардии, %	Относительный риск и доверительный интервал (95%)
<b>Урокиназа</b>		
1-2 (< 0,8 нг/мл)	4,6	1
3 (0,8 - 1 нг/мл)	9	2,12 (0,13, 34,2)
4 (1 – 1,2 нг/мл)	60	15,4 (1,8, 131,1)
5 (> 1,2 нг/мл)	80	27,5 (3,4, 222,9)
<b>ПАИ-1</b>		
1-2 (< 13,7 МЕ/мл)	4.5%	1
3 (13,7 – 18 МЕ/мл)	30%	6,7 (0,68, 66,3)
4 (18 – 24,5 МЕ/мл)	50%	13,5 (1,6, 112,8)
5 (> 24,5 МЕ/мл)	75%	20,8 (2,5, 174,8)

До коронарной ангиопластики антиген урокиназы был выше в крови у пациентов с рецидивом стенокардии (Б) по сравнению с пациентами без рецидива стенокардии (А),  $p < 0,05$  (рисунок 18). Частота и относительный риск рецидива стенокардии после успешной ангиопластики возрастали с увеличением концентрации урокиназы плазмы в квинтилях исходно до процедуры (таблица 1). При этом относительный риск рецидива стенокардии для 4-го и 5-го квинтилей составил 15,4 и 27,5 по отношению к нижним квинтилям, соответственно.

Таким образом, определение таких маркеров как урокиназа и ПАИ-1 в крови пациентов перед проведением коронарной ангиопластики позволяет выявить группу высокого риска развития рецидива стенокардии после вмешательства.

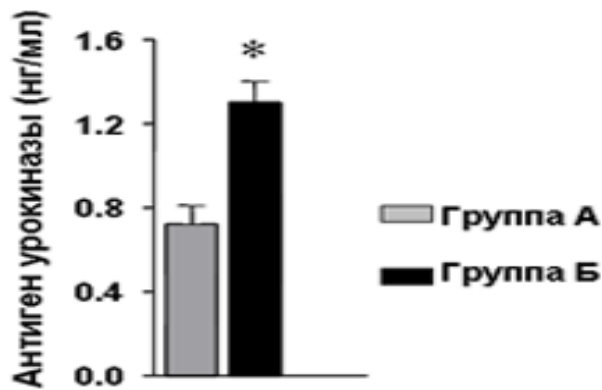


Рисунок 18 – Содержание урокиназы в плазме крови у пациентов с рецидивом стенокардии после успешной коронарной ангиопластики (Б) по сравнению с пациентами без рецидива стенокардии (А) до баллонной ангиопластики, \*  $p < 0,05$

*Частота рецидива стенокардии и рестеноза в сопоставлении с динамикой активаторов плазминогена тканевого и урокиназного типов, активностью ингибитора активаторов плазминогена 1-го типа, у пациентов с ИБС после успешной коронарной ангиопластики*

Активность ПАИ-1 была значительно выше у пациентов с рецидивом стенокардии (Б) в сопоставлении с пациентами без рецидива стенокардии (А) как исходно, так и через 3 и 6 месяцев после успешной коронарной ангиопластики,  $p < 0,05$  (рисунок 19). Напротив, на 2-е сутки после ангиопластики различия между группами не были достоверными,  $p > 0,05$ . Во всей обследуемой группе пациентов, уровень активности ПАИ-1 не изменялся в контрольных точках после процедуры по сравнению с исходным уровнем (таблица 2).

Активность тканевого активатора плазминогена в динамике после коронарной ангиопластики достоверно не отличалась в группах пациентов,  $p > 0,05$ .

Уровень антигена урокиназы был достоверно выше не только исходно, но и на 2-е сутки после ангиопластики, а также через 3 и 6 месяцев после процедуры ( $p < 0,05$ ) в крови у пациентов с рецидивом стенокардии (Б) по сравнению с пациентами без рецидива стенокардии (А),  $p < 0,05$  (рисунок 20). Во всей

обследуемой группе не отмечено тенденции к изменению уровня урокиназы после процедуры по сравнению с исходным.

Таблица 2 – Динамика уровня ПАИ-1 и активатора плазминогена урокиназного типа у пациентов с рецидивом стенокардии (группа Б) и без нее (группа А) до и после коронарной ангиопластики \*  $p < 0,05$

	<b>Показатель</b>	<b>Группа А (пациенты без возврата стенокардии) (n=37)</b>	<b>Группа Б (пациенты с возвратом стенокардии) (n=16)</b>
<b>Исходно</b>	ПАИ-1, МЕ/мл	13,9 ± 7,7	23,3 ± 8,5*
	урокиназа, нг/мл	0,7 ± 0,3	1,3 ± 0,5*
<b>Через 2 дня после ангио- пластики</b>	ПАИ-1, МЕ/мл	16,9 ± 8,5	21,6 ± 7,7
	урокиназа, нг/мл	0,7 ± 0,3	1,4 ± 0,5*
<b>Через 3 месяца после ангио- пластики</b>	ПАИ-1, МЕ/мл	15,5 ± 7,5	22,3 ± 7,2*
	урокиназа, нг/мл	0,7 ± 0,2	1,2 ± 0,5*
<b>Через 6 месяцев после ангио- пластики</b>	ПАИ-1, МЕ/мл	15,7 ± 7,9	25,0 ± 7,9*
	урокиназа, нг/мл	0,7 ± 0,3	1,1 ± 0,6*

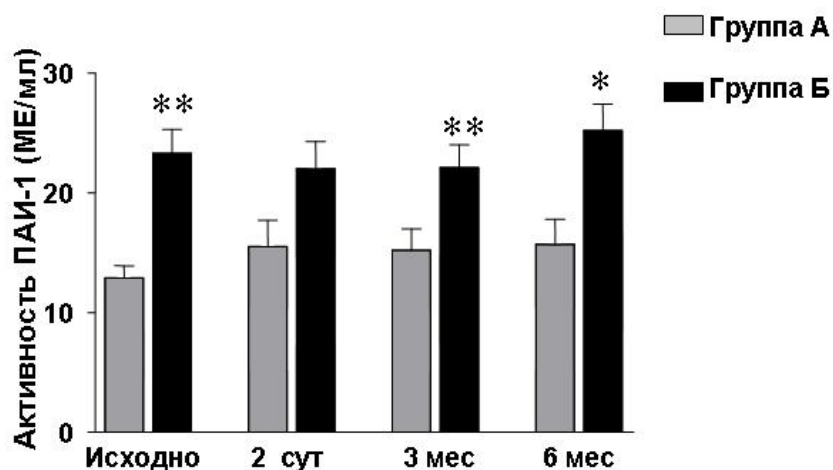


Рисунок 19 – Динамика уровня активности ингибитора активаторов плазминогена 1 типа (ПАИ-1) у пациентов с рецидивом стенокардии после успешной коронарной ангиопластики (Б) по сравнению с пациентами без рецидива стенокардии (А), \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$

После проведения корреляционного анализа по Спирману с предварительным приведением вариационного ряда к нормальному распределению антиген урокиназы коррелировал с уровнем активности ПАИ-1 с коэффициентом корреляции 0,59 ( $p=0,0001$ ).

Клинические, биохимические и ангиографические показатели (всего 36) были включены в однофакторный и многофакторный анализ с использованием пошаговой пропорциональной модели регрессии Кокса [275]. Значимыми предикторами возврата стенокардии при однофакторном анализе из клинико-биохимических параметров были только анамнез стенокардии продолжительностью более 12 месяцев ( $\chi^2 = 5,74$ ;  $p=0,017$ ), антиген урокиназы крови исходно ( $\chi^2 = 17,11$ ;  $p=0,0001$ ) и активность ПАИ-1 исходно ( $\chi^2 = 9,37$ ;  $p=0,002$ ) (таблица 1).

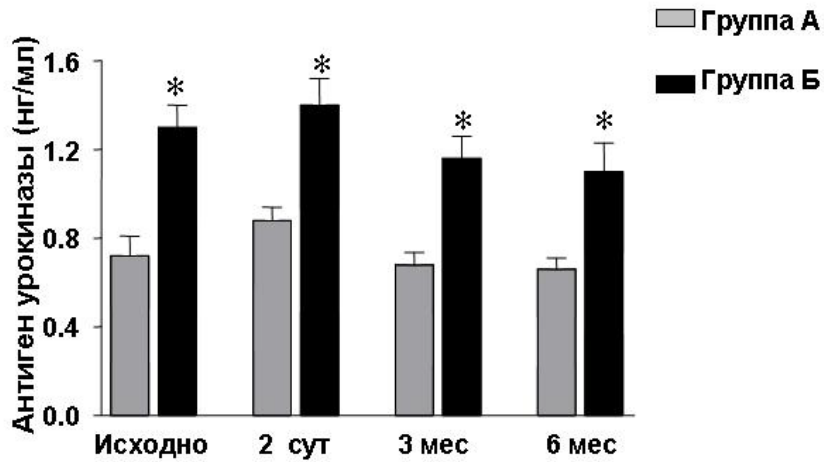


Рисунок 20 – Содержание урокиназы в динамике в плазме крови у пациентов с рецидивом стенокардии после успешной коронарной ангиопластики (Б) по сравнению с пациентами без рецидива стенокардии (А), \*  $p < 0,05$

При разделении пациентов на группы с рецидивом стенокардии после ангиопластики и без при проведении многофакторного анализа наибольшей предикторной значимостью обладал уровень антигена урокиназы крови ( $\chi^2 = 8,2$ ;  $p=0,004$ ; относительный риск 6,2; 95% доверительный интервал 1,7–21,7), что говорит о том, что при уровне урокиназы крови исходно до ангиопластики более 1,2 нг/мл риск возобновления стенокардии после процедуры возрастает в 6,2 раза, так у пациентов, вошедших в 5 квинтиль риск возврата стенокардии составил 80%.

Таким образом, уровень урокиназы в крови пациентов после успешной процедуры эндоваскулярного вмешательства коррелирует с возобновлением стенокардии и является независимым предиктором возобновления стенокардии, что имеет большое значение для пациентов, которым показано проведение эндоваскулярной реваскуляризации.



### **3.2. Роль активаторов плазминогена в регуляции ремоделирования сосудистой стенки после повреждения**

Как для роста неоинтимы, так и для ремоделирования сосудистой стенки ключевыми процессами являются миграция и пролиферация клеток и перестройка внеклеточного матрикса [268, 317, 364]. Важнейшую роль в регуляции этих процессов играет система активаторы плазминогена – плазмин, ответственная за внеклеточный протеолиз и обеспечивающая направленное перемещение клеток, активацию ростовых факторов и ремоделирование ВКМ [75, 236]. Урокиназный активатор плазминогена является одним из ключевых факторов, участвующих в каскаде реакций артерии на повреждение [305]. Выключение урокиназного гена предотвращает рост неоинтимы и стенозирование артерий после экспериментального повреждения [401], тогда как трансгенное повышение содержания урокиназы стимулирует констриктивное ремоделирование артерии при экспериментальном атеросклерозе [183]. В ходе предыдущего этапа мы показали, что повышенное содержание урокиназы в крови пациентов коррелирует с высоким риском возврата стенокардии и развития рестенозов после ангиопластики коронарных артерий. Однако механизмы, определяющие влияние активаторов плазминогена на рост неоинтимы, ремоделирование и рестеноз артерий оставались неясными. В связи с вышеизложенным нами было изучено значение активаторов плазминогена для стенозирования артерий после баллонной ангиопластики и развития неблагоприятного ремоделирования для разработки новых подходов к его предотвращению.

#### **3.2.1. Экспрессия урокиназы в стенке сосуда после повреждения**

На данном этапе работы на модели экспериментального баллонирования мы определяли временную и пространственную динамику экспрессии эндогенной урокиназы и ее рецептора в сонной артерии животных на разных временных точках после повреждения сосуда.

*Динамика экспрессии урокиназы и урокиназного рецептора в стенке сосуда после экспериментальной баллонной ангиопластики*

На срезах неповрежденных сосудов отмечалась слабая экспрессия урокиназы во всех слоях меди и вокруг ГМК. После баллонирования экспрессия урокиназы в меди возрастала через 4 часа, становилась максимальной на вторые сутки (рисунок 21, 22). На четвертые сутки, соответствующие началу миграции ГМК из меди в неоинтиму [94, 342], экспрессия урокиназы в меди оставалась повышенной, но становилась более диффузной. В это же время на внутренней поверхности эластической мембраны появлялись клетки формирующейся неоинтимы с интенсивным специфическим окрашиванием на урокиназу вокруг них. В адвентиции экспрессия урокиназы регистрировалась через 24 часа после баллонирования, достигала максимума на 2-е сутки. К 14-м суткам экспрессия урокиназы снижалась до исходного уровня в меди и исчезала в неоинтими и адвентиции (рисунок 21).

В меди неповрежденных сосудов отмечалась слабая экспрессия урокиназного рецептора (рисунок 22). Динамика экспрессии урокиназного рецептора на ранних этапах после повреждения (4 ч, 6 ч, 24 ч, 2 и 4 суток) практически совпадала с динамикой экспрессии урокиназы. На более поздних этапах (10-е, 14-е сутки) экспрессия урокиназного рецептора снижалась до исходного уровня только в адвентиции, а в меди и неоинтими она несколько снижалась, но оставалась повышенной по сравнению с неповрежденным сосудом (рисунок 21, 22) [23].

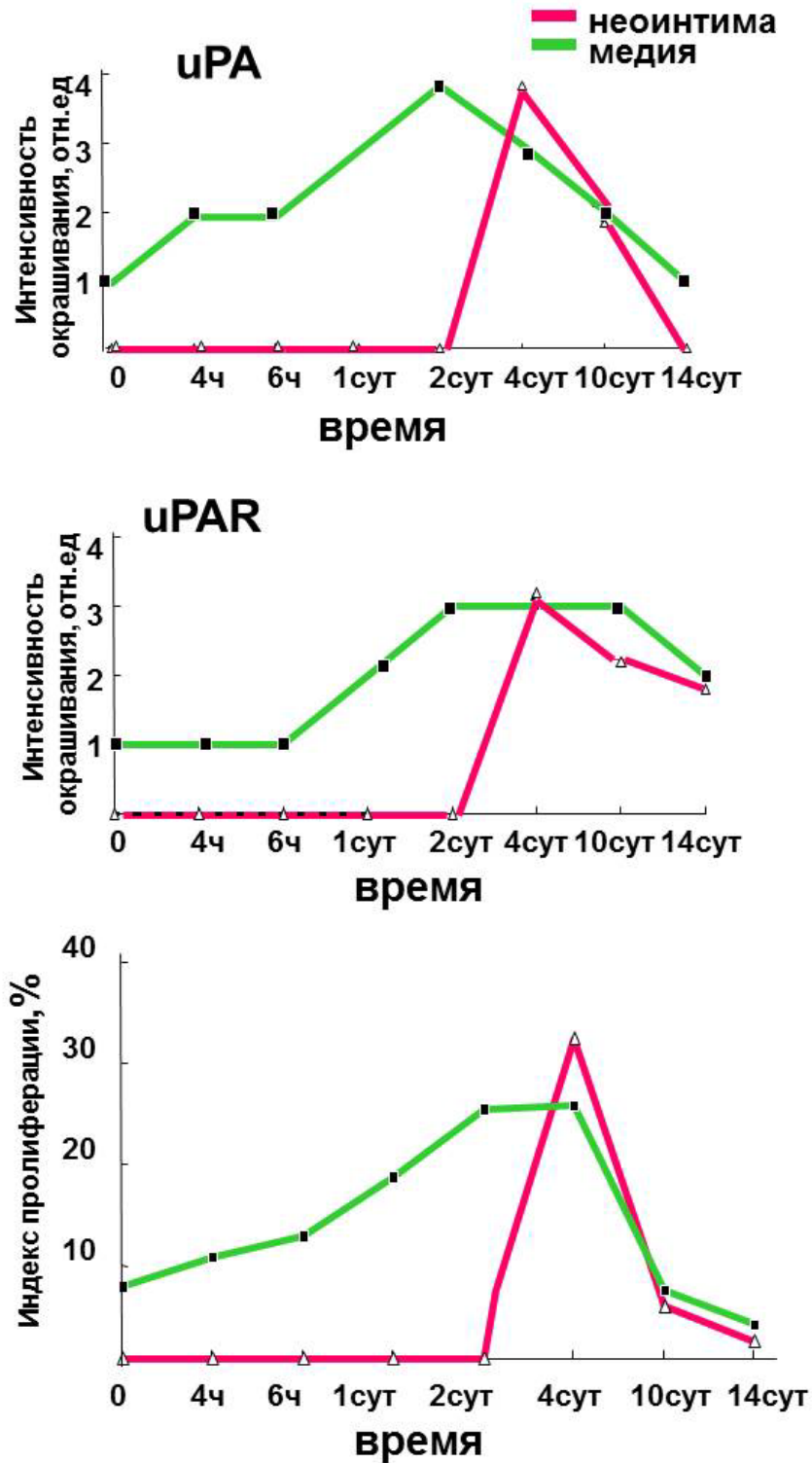


Рисунок 21 – Возрастание экспрессии урокиназы (верхняя панель), рецептора урокиназы (средняя панель) в сопоставлении с индексом пролиферации (нижняя панель) в интимае и медиате общей сонной артерии после баллонной ангиопластики (репрезентативные тренды, демонстрирующие динамику) (Обозначения: Оценку выраженности иммуногистохимического окрашивания проводили в условных единицах)

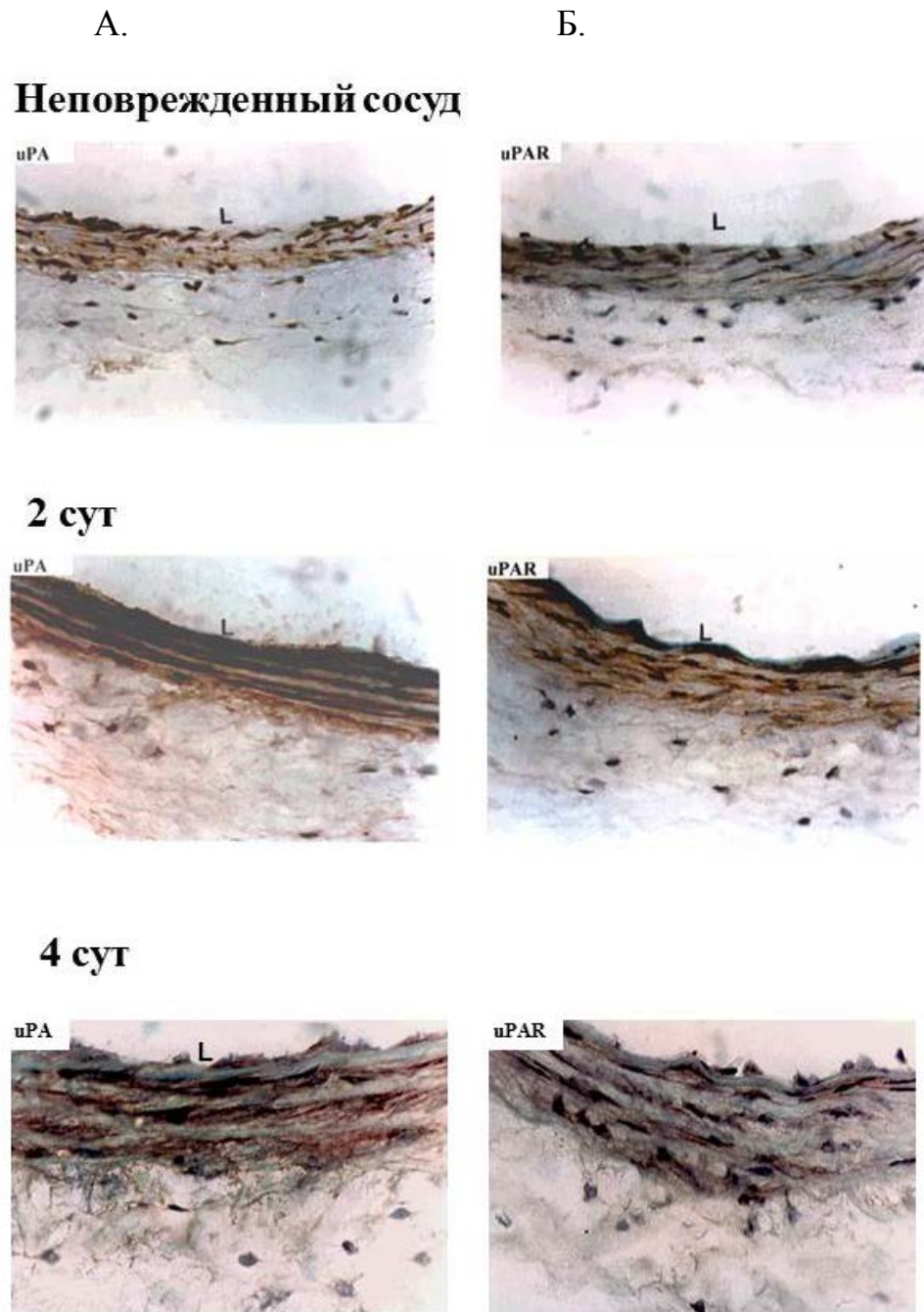


Рисунок 22 – Микрофотографии срезов общей сонной артерии крысы до баллонной ангиопластики и на 2-е и 4-е сутки после повреждения (Обозначения: Иммуногистохимическая окраска на замороженных срезах на антиген (А) урокиназы (uPA) и (Б) рецептора урокиназы (uPAR). Ядра клеток окрашены гематоксилиновым синим, увеличение x450)

*Экспрессия мРНК урокиназы и урокиназного рецептора в сосудистой стенке  
после экспериментальной баллонной ангиопластики*

Возрастание экспрессии урокиназы и урокиназного рецептора регистрировали также по образованию соответствующих мРНК, что свидетельствует об увеличении синтеза этих белков в стенке сосуда после повреждения. В меди неповрежденных сосудов отмечалась слабая экспрессия мРНК урокиназы и урокиназного рецептора, которая усиливалась на 2-е и 4-е сутки после баллонирования по сравнению с неповрежденным сосудом (рисунок 23).

### **3.2.2. Динамика индекса пролиферации в поврежденной артерии**

Динамика экспрессии урокиназы в стенке сосуда совпадала с динамикой индекса пролиферации, оцениваемого по экспрессии ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA). PCNA синтезируется в раннюю G1 и S фазы клеточного цикла и является хорошим маркером пролиферирующих клеток [357]. Период полужизни PCNA составляет 20 часов, что необходимо учитывать при интерпретации полученных данных.

В меди и адвентиции максимальные индексы пролиферации наблюдались на 2-е сутки, они оставались повышенными на 4-е сутки, а к 10-м суткам после операции снижались до исходного уровня. В неоинтимае максимум индекса пролиферации наблюдался на начальных этапах ее формирования – на 4-е сутки, когда клетки формирующейся неоинтимы появлялись на поверхности внутренней эластической мембраны, к исходному уровню он возвращался на 14-е сутки (рисунок 21).

Таким образом, урокиназа и ее рецептор экспрессируются в стенке сосуда уже в первые часы после баллонирования. Эта экспрессия в значительной степени обусловлена повышением синтеза этих белков клетками сосудистой стенки, о чем свидетельствует увеличение экспрессии мРНК. При этом наблюдается корреляция между выраженностью экспрессии урокиназы, урокиназного рецептора и

миграцией и пролиферацией гладкомышечных клеток сонной артерии крысы после экспериментального баллонирования [22, 93].

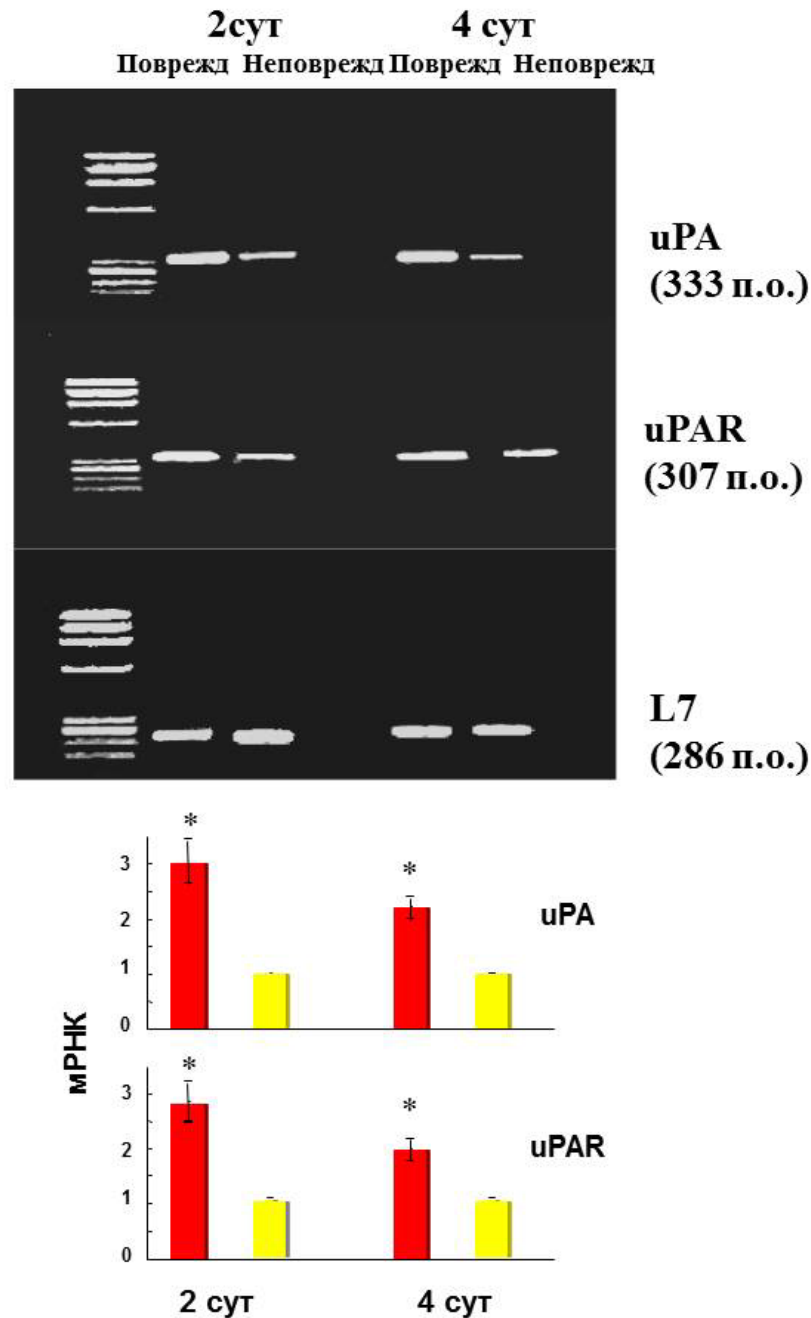


Рисунок 23 – Экспрессия мРНК урокиназы, урокиназного рецептора и рибосомального белка L7 (контроль) до и после баллонирования (*Обозначения:* Верхняя панель – экспрессия урокиназы клетками неповрежденной и поврежденной сонной артерии на 2-е и 4-е сутки после баллонирования, определенная методом полимеразной цепной реакции. На средней и нижней панелях – экспрессия рецептора урокиназы и L7, соответственно, в тех же сосудах (верхняя панель). Суммированы данные 8 экспериментов (нижняя панель) \* – достоверные изменения ( $p < 0,05$ ))

### 3.2.3. Урокиназа и ранние процессы формирования неоинтимы после баллонного повреждения

В связи с тем, что урокиназа и ее рецептор максимально экспрессированы в поврежденном баллонным катетером сосуде на ранних этапах формирования неоинтимы и неоадвентиции, в следующей части нашей работы мы исследовали, как локальное увеличение уровня урокиназы в сосудистой стенке влияет на ранние процессы перестройки сосуда после повреждения. Принимая во внимание, что урокиназа *in vitro* способна стимулировать миграцию и пролиферацию клеток, мы также исследовали ее влияние на раннюю аккумуляцию ГМК в неоинтимае, отражающую миграцию клеток из меди и в интиму [335] и изменение индекса пролиферации в слоях сосудистой стенки.

#### *Локальное нанесение рекомбинантной урокиназы*

Периадвентициальное нанесение на поврежденный при баллонировании сосуд полной формы рекомбинантной урокиназы в плуроническом геле достоверно увеличивало площадь неоинтимы, площадь меди и площадь адвентиции и вызывало большее уменьшение просвета артерии при сопоставлении с контролем (нанесение чистого геля) (рисунок 24, 25) [405].

Уменьшение просвета артерии под действием урокиназы сопровождалось сокращением площади наружной эластической мембраны (НЭМ), что указывает на ремоделирование стенки сосуда и сужении его просвета не только вследствие роста неоинтимы, но и благодаря уменьшению диаметра просвета сосуда (рисунок 26).

Также мы исследовали влияние урокиназы на соотношение площади медиальной оболочки к площади просвета артерии, косвенно отражающее процессы ремоделирования сосуда, и отношение площади интимы к площади меди, позволяющее дополнительно оценить выраженность роста неоинтимы. После нанесения рекомбинантной урокиназы было выявлено достоверное увеличение абсолютных значений обоих соотношений (рисунок 26).

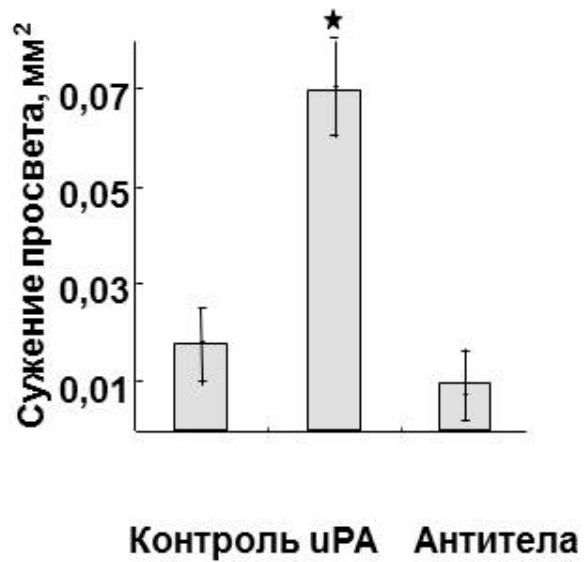
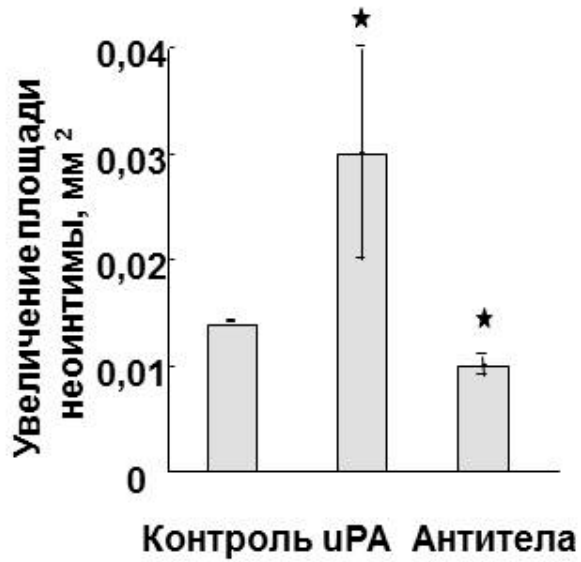


Рисунок 24 – Изменения площади неоинтимы и просвета сонной артерии на четвертые сутки после баллонирования и нанесения урокиназы (uPA) или ингибирующих антител к урокиназе (Обозначения: Контроль – нанесение чистого геля. \*  $p < 0,05$  (отличие от контроля); суммированы данные минимум 6 экспериментов)



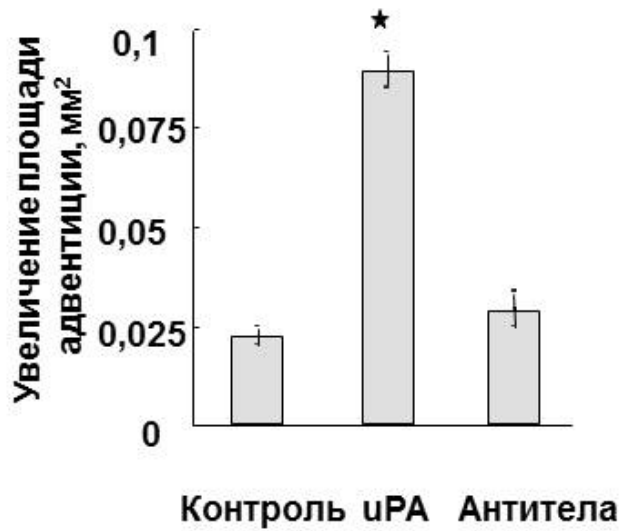
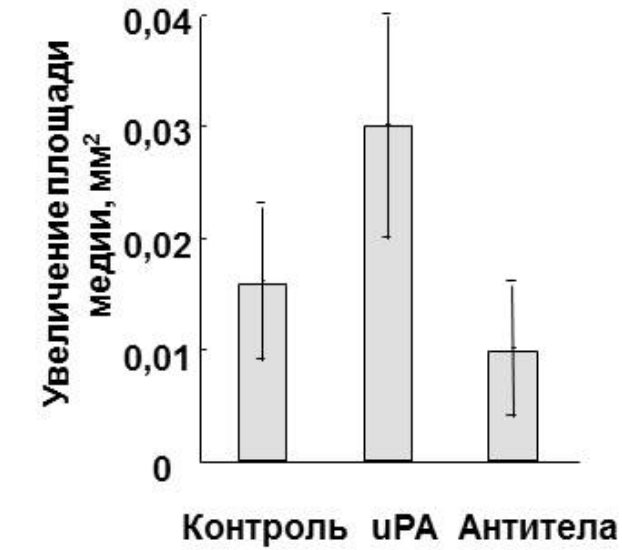


Рисунок 25 – Изменения площади меди и адвентиции сонной артерии на четвертые сутки после баллонирования и нанесения урокиназы (uPA) или ингибирующих антител к урокиназе (Обозначения: Контроль – нанесение чистого геля. \*  $p < 0,05$  (отличие от контроля); суммированы данные минимум 6 экспериментов)

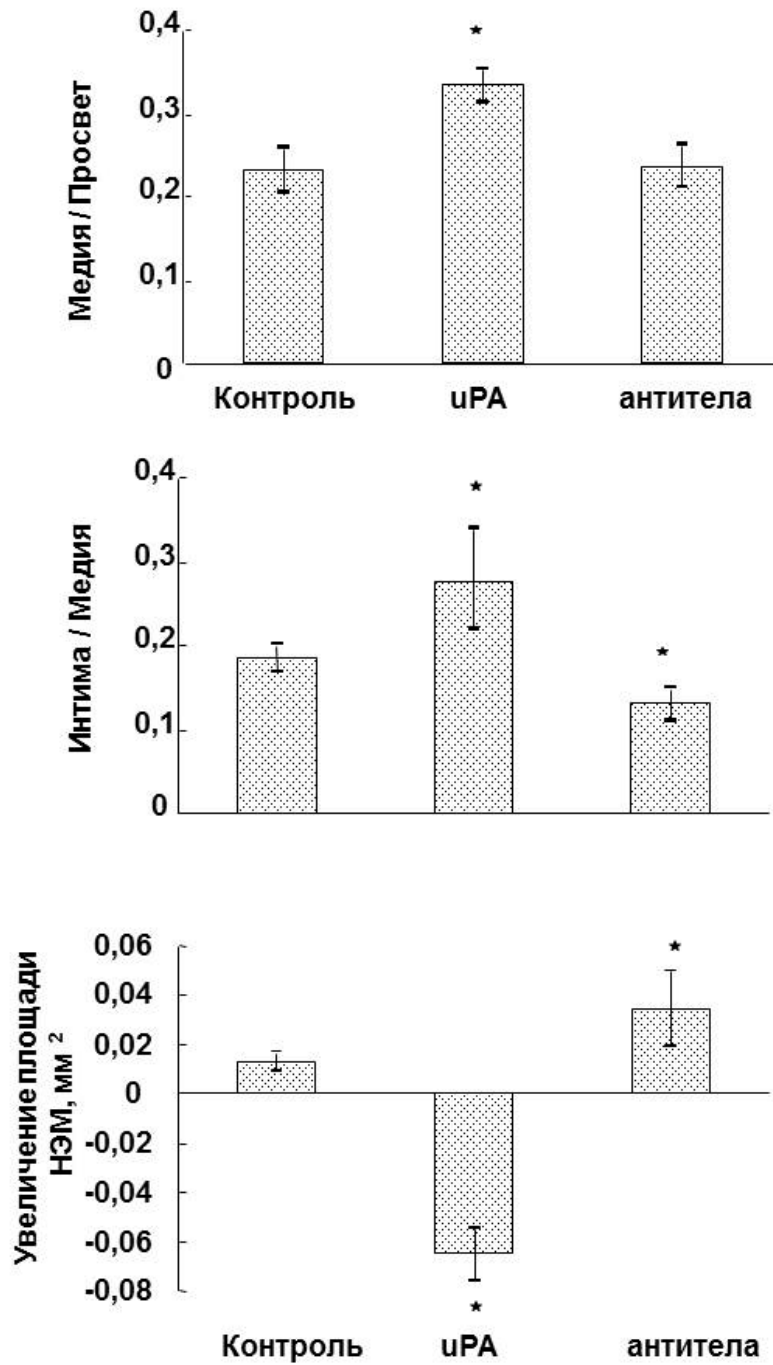


Рисунок 26 – Изменения показателей ремоделирования сонной артерии на четвертые сутки после баллонирования и нанесения урокиназы (uPA) или ингибирующих антител к урокиназе (Обозначения: НЭМ – наружная эластическая мембрана. Контроль – нанесение чистого геля. \* $p < 0,05$  (отличие от контроля); суммированы данные минимум 6 экспериментов)

Введение урокиназы увеличивало вдвое число клеток неоинтимы, наполовину число клеток меди и на 70% – адвентиции в сравнении с контрольным введением геля (рисунок 27).

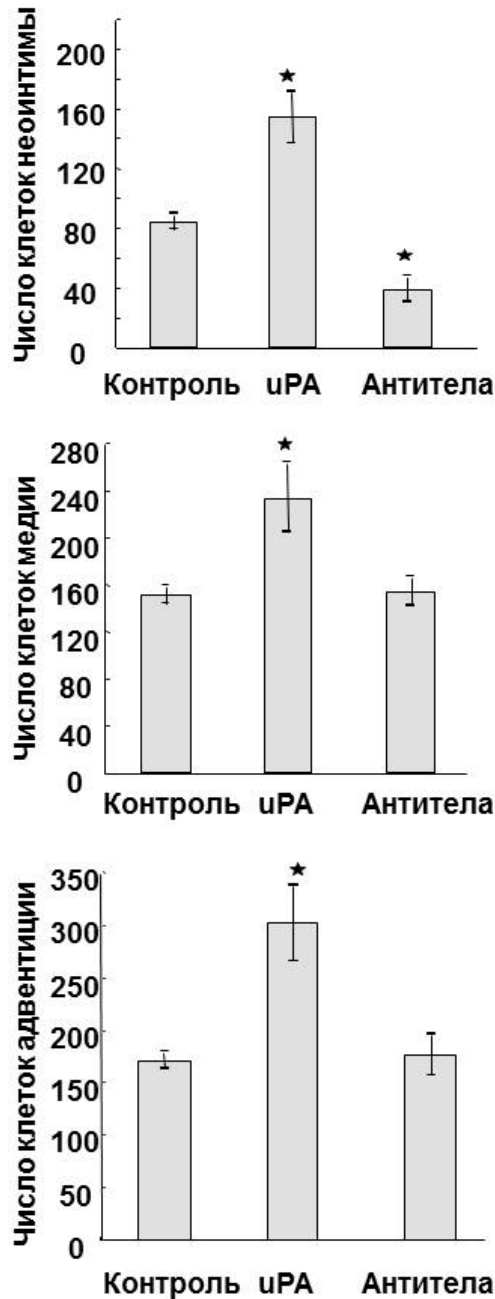


Рисунок 27 – Изменения общего числа клеток в слоях сосудистой стенки сонной артерии на четвертые сутки после баллонирования и нанесения урокиназы(uPA) или ингибирующих антител к урокиназе (Обозначение: Контроль – нанесение чистого геля. \*  $p < 0,05$  (отличие от контроля); суммированы данные минимум 6 экспериментов)

Нанесение экзогенной урокиназы также стимулировало пролиферацию клеток в неоинтимае, и доля делящихся клеток (индекс пролиферации) в неоинтимае была достоверно выше  $36,9 \pm 2,3\%$  по сравнению с  $26,7 \pm 1,4\%$  в контроле ( $p < 0,05$ ).

Эффекты коммерческих препаратов урокиназы Ukidan (Industria Farmaceutica, USA) и Saruplasa (Grünental, Germany) значимо не отличались от эффектов рекомбинантной урокиназы дикого типа. Одновременное нанесение ингибитора липополисахарида полимиксина В не оказывало достоверного влияния на эффекты рекомбинантной урокиназы, что указывает на отсутствие вклада липополисахарида в наблюдаемые эффекты.

#### *Локальное нанесение ингибирующих антител к урокиназе*

Периадвентициальное нанесение ингибирующих антител к урокиназе достоверно уменьшало площадь неоинтимы, не влияя существенно на площадь меди и адвентиции (рисунок 24, 25). Просвет артерии на четвертые сутки после баллонной ангиопластики уменьшался недостоверно после аппликации геля, содержащего ингибирующие урокиназу антитела. При этом на данных сроках нанесение антител вызывало увеличение площади НЭМ (рисунок 26), что указывает на положительное ремоделирование стенки сосуда и увеличение его диаметра.

Отношение площади меди к площади просвета сосуда достоверно не менялось по сравнению с контролем ( $p > 0,05$ ), тогда как отношение площади интимы к площади меди уменьшалось после нанесения ингибирующих антител к урокиназе (рисунок 26).

Нанесение ингибирующих урокиназу антител достоверно уменьшало число клеток в неоинтимае более чем на 50% в сравнении с контролем, не влияя на количество клеток в меди и адвентиции (рисунок 27).

Существенных изменений индекса пролиферации в неоинтимае при введении антител к урокиназе не отмечено.

Итак, под действием экзогенной урокиназы площади неоинтимы и меди, соотношения меди к просвету и интимы к меди увеличивались, просвет сосуда

уменьшался, доля делящихся клеток, а также общее число ГМК неоинтимы возрастали, что свидетельствует о потенциальной способности урокиназы стимулировать миграцию и пролиферацию ГМК на ранних этапах после повреждения стенки сосуда. Уменьшение площади формирующейся неоинтимы после введения ингибирующих урокиназу антител и соотношения интима/просвет сосуда, а также уменьшение аккумуляции гладкомышечных клеток в неоинтимае может свидетельствовать о подавлении миграции клеток из меди и указывает на значение эндогенной урокиназы в регуляции этих процессов [405].

#### *Роль структурных доменов урокиназы в ремоделировании артерий*

Известно, что урокиназа в культуре клеток способна стимулировать миграцию и пролиферацию ГМК через механизмы, как связанные, так и не связанные с ее протеолитической активностью [278, 365]. Принимая во внимание этот факт, а также то, что урокиназа и ее рецептор активно экспрессируются в стенке сосуда на ранних этапах после повреждения сосудистой стенки, в следующей части нашей работы для оценки относительного значения рецептор-связывающих и протеолитических свойств урокиназы для реализации ее эффектов *in vivo*, было исследовано влияние трех форм рекомбинантной урокиназы на ранние процессы формирования неоинтимы.

#### *Протеолитическая активность урокиназы и ее влияние на морфологию сосуда после баллонирования*

Периадвентициальное нанесение на поврежденный сосуд рекомбинантной урокиназы, имеющей мутацию в рецептор-связывающей области молекулы (формы, которая *in vitro* не стимулировала хемотаксис ГМК и не связывалась с урокиназным рецептором) вызывало эффекты сходные с теми, которые наблюдались при нанесении полной формы урокиназы. Площадь неоинтимы, а также площади меди и адвентиции достоверно увеличивались, тогда как просвет артерии суживался более выраженно при сопоставлении с контролем (нанесение чистого геля) (рисунок 28), хотя в сравнении с эффектом рекомбинантной формы урокиназы "дикого" типа это сужение было менее выраженным.

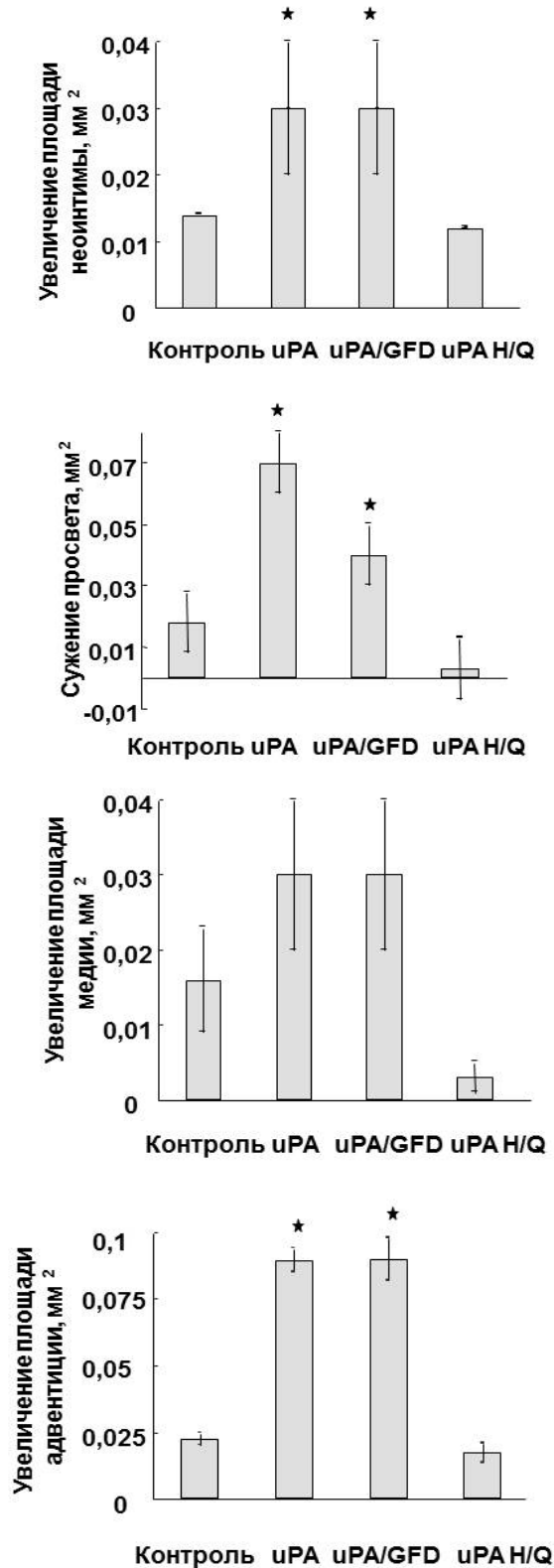


Рисунок 28 – Изменения морфологии сонной артерии на четвертые сутки после баллонирования и нанесения рекомбинантных форм урокиназы (uPA – нативной урокиназы или uPA/GFD – формы урокиназы с измененным ростовым доменом или uPA H/Q – протеолитически неактивной формы урокиназы) (Обозначения: Контроль – нанесение чистого геля. \*  $p < 0,05$  (отличие от контроля); суммированы данные минимум 6 экспериментов)

Нанесение этой формы урокиназы также увеличивало отношение площади меди к площади просвета сосуда и отношение площади интимы к площади меди, но не влияло на площадь НЭМ (рисунок 29).

В противоположность двум протеолитически активным формам неактивная протеолитически урокиназа не усиливала рост неоинтимы (площадь неоинтимы не отличалась от контроля) (рисунок 28). Эта форма урокиназы не увеличивала также и площадь меди и адвентиции, не оказывала влияния на соотношения медия/просвет сосуда и интима/медия и площадь НЭМ (рисунок 29) и, что особенно важно, не вызывала уменьшения просвета артерии (рисунок 28) в отличие от контроля, где после баллонирования и нанесения чистого геля просвет артерии достоверно суживался уже на 4-е сутки после операции.

*Протеолитическая активность урокиназы и ее влияние на число клеток в неоинтимае и неоадвентиции*

Мы также исследовали влияние трех форм рекомбинантной урокиназы на раннюю аккумуляцию ГМК в неоинтимае и неоадвентиции.

Рекомбинантная урокиназа с измененным рецептор-связывающим доменом вызывала такое же увеличение числа клеток в неоинтимае как и полная форма урокиназы; достоверно увеличивала число клеток в адвентиции на 50%, однако в меди это увеличение в среднем на 25% не было достоверным (рисунок 30).

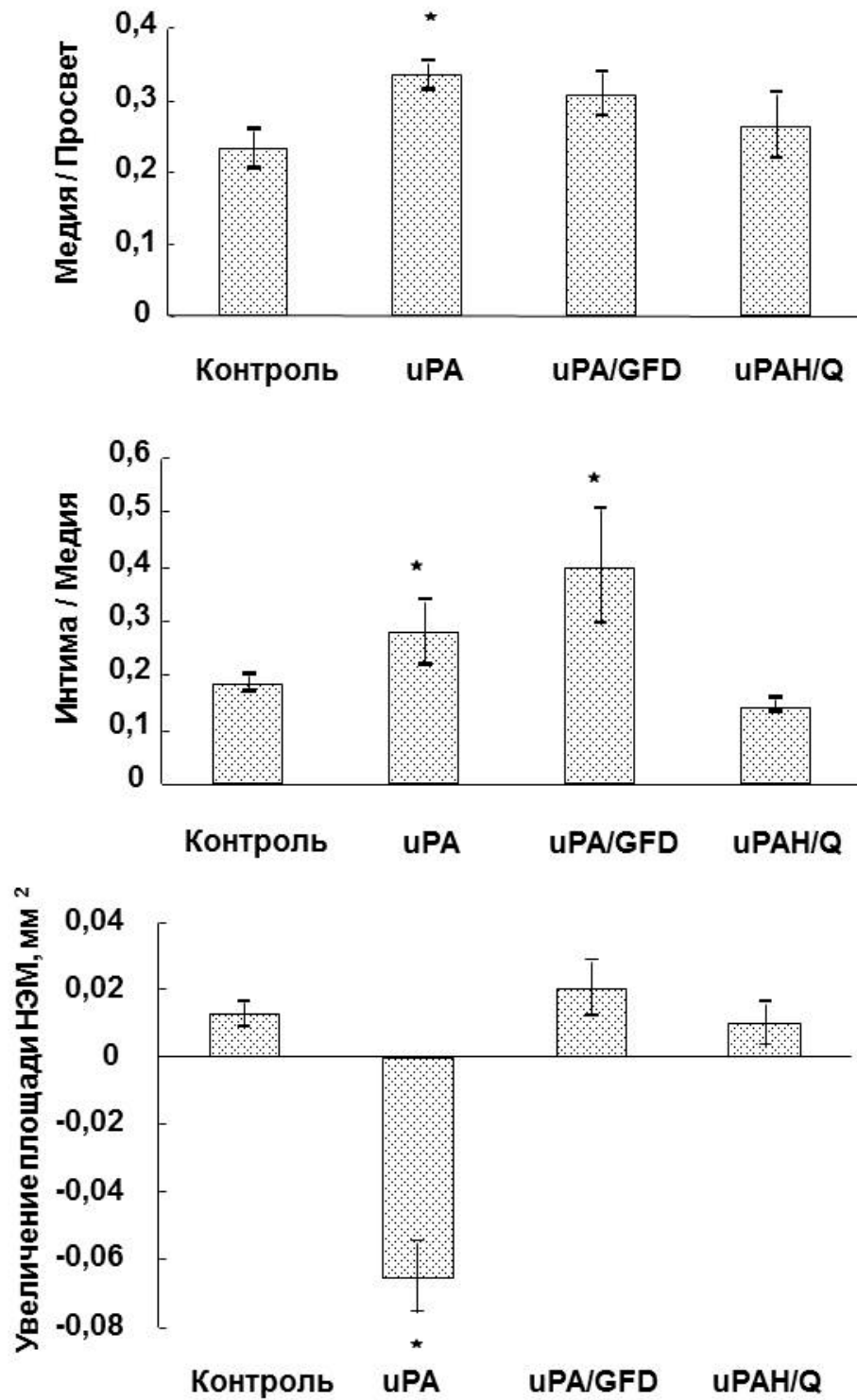


Рисунок 29 – Изменения показателей ремоделирования сонной артерии на четвертые сутки после баллонирования и нанесения рекомбинантных форм урокиназы (uPA –нативной урокиназы или uPA/GFD – формы урокиназы с измененным ростовым доменом или uPA H/Q – протеолитически неактивной формы урокиназы) (Обозначения: НЭМ – наружная эластическая мембрана. Контроль – нанесение чистого геля. \*  $p < 0,05$  (отличие от контроля); суммированы данные минимум 6 экспериментов)



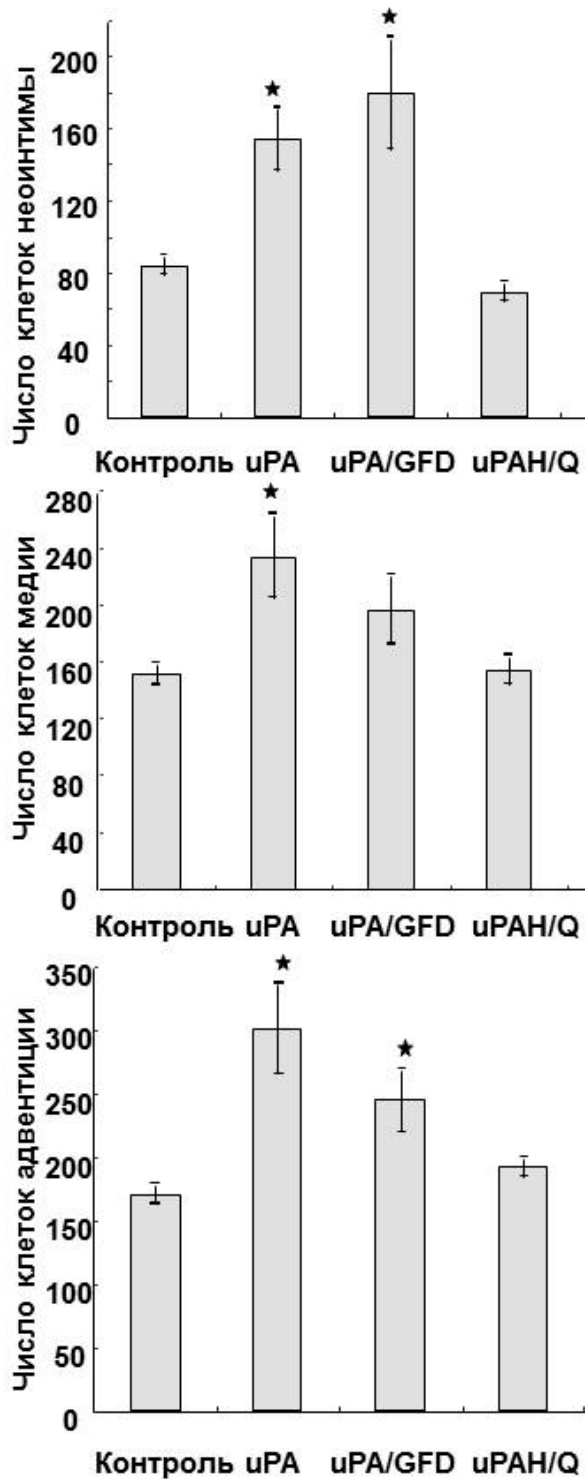


Рисунок 30 – Изменения общего числа клеток в слоях сосудистой стенки сонной артерии на четвертые сутки после баллонирования и нанесения рекомбинантных форм урокиназы (uPA – нативной урокиназы или uPA/GFD – формы урокиназы с измененным ростовым доменом или uPA H/Q – протеолитически неактивной формы урокиназы) (Обозначения: Контроль – нанесение чистого геля. \*  $p < 0,05$  (отличие от контроля); суммированы данные минимум 6 экспериментов)

Мы обнаружили, несмотря на то, что эта форма урокиназы *in vitro* не стимулировала миграцию сосудистых ГМК и не связывалась с урокиназным рецептором [407], ее эффект *in vivo* существенно не отличался от эффекта полной формы урокиназы, она также стимулировала рост неоинтимы и аккумуляцию в ней ГМК.

В противоположность эффектам активных протеолитически форм урокиназы нанесение на поврежденную артерию формы урокиназы без протеолитической активности, не изменяло число клеток в неоинтимае, меди и адвентиции поврежденной артерии (рисунок 30).

Для выяснения значения протеолитической активности урокиназы для ее влияния на деление клеток неоинтимы, мы также исследовали индекс пролиферации в неоинтимае на 4-е сутки после баллонирования. Аналогично полной форме урокиназы, урокиназа с измененным рецептор-связывающим доменом и сохраненной протеолитической активностью увеличивала индекс пролиферации в неоинтимае с  $26,7 \pm 1,4\%$  в контроле до  $35,7 \pm 2,3\%$  ( $p < 0,05$ ). Существенных изменений индекса пролиферации в неоинтимае при введении протеолитически неактивной урокиназы не выявлено.

Таким образом, протеолитически неактивная рекомбинантная урокиназа, которая *in vitro* связывается с урокиназным рецептором и стимулирует миграцию ГМК в культуре [88], в поврежденном сосуде не стимулирует пролиферацию гладкомышечных клеток, их миграцию и рост неоинтимы в противоположность активным протеолитически формам урокиназы. Необходимо отметить, что рекомбинантная урокиназа, имеющая множественные мутации в рецептор-связывающей области молекулы и поэтому не связывающаяся с урокиназным рецептором и не стимулирующая миграцию ГМК в культуре [407], при нанесении на баллонированную артерию усиливает рост неоинтимы, миграцию гладкомышечных клеток и их пролиферацию, аналогично полной форме урокиназы. Полученные данные указывают на то, что протеолитическая активность урокиназы в поврежденном сосуде *in vivo*, по-видимому, определяет

основной механизм ее стимулирующего влияния на образование неоинтимы [403].

### **3.2.4. Влияние локального введения $\alpha_2$ -антиплазмина на морфологию сосуда после баллонирования**

Поскольку основной функцией урокиназы как протеазы является превращение плазминогена в плазмин, мы исследовали, как нанесение альфа<sub>2</sub>-антиплазмина влияет на изменение структуры сосуда после баллонирования.

Периадвентициальное нанесение  $\alpha_2$ -антиплазмина достоверно уменьшало площадь неоинтимы, существенно не влияя на площадь меди и адвентиции. Просвет артерии на четвертые сутки после баллонной ангиопластики и нанесения геля, содержащего  $\alpha_2$ -антиплазмин, достоверно увеличивалась (рисунок 31).

Кроме того, нанесение  $\alpha_2$ -антиплазмина значительно уменьшало отношение площади интимы к площади меди, однако, в отличие от эффектов антител к урокиназе, не оказывало влияния по сравнению с контролем на важные показатели ремоделирования стенки артерии – площадь НЭМ и соотношение медиа/просвет (данные не представлены).

Нанесение  $\alpha_2$ -антиплазмина достоверно уменьшало число клеток в неоинтимае более чем на 50% в сравнении с контролем. Число клеток в меди и адвентиции существенно не изменялось. Достоверных изменений индекса пролиферации в неоинтимае при введении  $\alpha_2$ -антиплазмина не отмечено (данные не представлены) [104].

Таким образом, уменьшение площади неоинтимы, подавление аккумуляции гладкомышечных клеток в неоинтимае после введения  $\alpha_2$ -антиплазмина, а также увеличение площади просвета сосуда по сравнению с контрольным нанесением геля свидетельствует о подавлении миграции клеток из меди в интиму на фоне ингибирования плазмина, что указывает на участие эндогенного плазмина, образующегося под действием активаторов плазминогена, в стимуляции пролиферации клеток и их миграции на ранних этапах после повреждения сосуда.

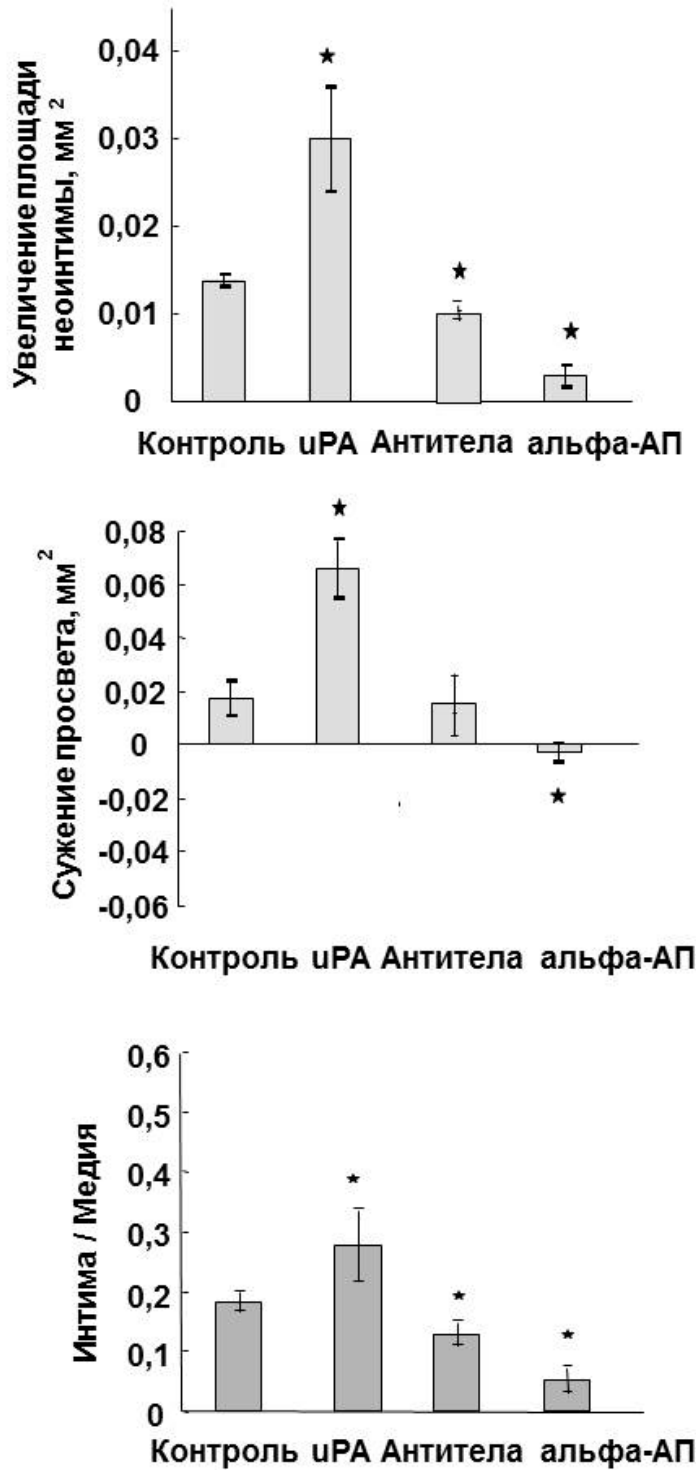


Рисунок 31 – Изменения морфологии сонной артерии на четвертые сутки после баллонирования и нанесения урокиназы или ингибирующих антител к урокиназе или альфа<sub>2</sub>-антиплазмина (альфа-АП) (Обозначения: Контроль – нанесение чистого геля. \*  $p < 0,05$  (отличие от контроля); суммированы данные минимум 6 экспериментов)

### **3.2.5. Противоположное влияние урокиназного и тканевого активаторов плазминогена на ремоделирование сосудистой стенки**

Поскольку мы подтвердили значение протеолитической активности урокиназы для ее эффектов на ремоделирование стенки поврежденной артерии мы оценили влияние второго активатора плазминогена – tPA, на процессы перестройки поврежденной стенки артерии. При исследовании изменений структуры баллонированного сосуда через 4 суток после введения урокиназного и тканевого активаторов плазминогена мы выявили их контрастное влияние не только на образование неоинтимы, но и на ремоделирование артерии.

Урокиназа, нанесенная периадвентициально на поврежденный сосуд, стимулировала рост как неоинтимы, так и меди (рисунок 32). Соотношение площадь интимы/площадь меди, отражающее интенсивность роста неоинтимы, также возрастало после нанесения урокиназы. Возрастание толщины интимы и меди сопровождалось снижением площади НЭМ и уменьшением просвета артерии. Увеличивалось также соотношение площадь меди/площадь просвета сосуда, являющееся также показателем ремоделирования артерии. Все это свидетельствовало о развитии констриктивного ремоделирования артерии (inward remodeling).

Нанесение на артерию тканевого активатора плазминогена вызывало другой эффект: на четвертый день размер неоинтимы был меньшим, чем в контрольных артериях, площадь меди и адвентиции достоверно не изменялась, а отношение площади интимы к площади меди было меньше в сопоставлении с контролем, что свидетельствовало о подавлении формирования неоинтимы. Соотношение площадь меди/площадь просвета артерии было меньше, а площадь НЭМ увеличивалась, что отражало развитие положительного (outward) ремоделирования сосуда под влиянием тканевого активатора плазминогена (рисунок 32).

Поскольку при использовании плуронического геля растворенные в нем белки детектируются в стенке сосуда не более, чем в течение четырех дней эффекты урокиназного и тканевого активаторов на ранних этапах после

экспериментальной баллонной ангиопластики и нанесения белков вероятно обусловлены в значительной мере непосредственным действием этих белков на клетки сосудистой стенки.

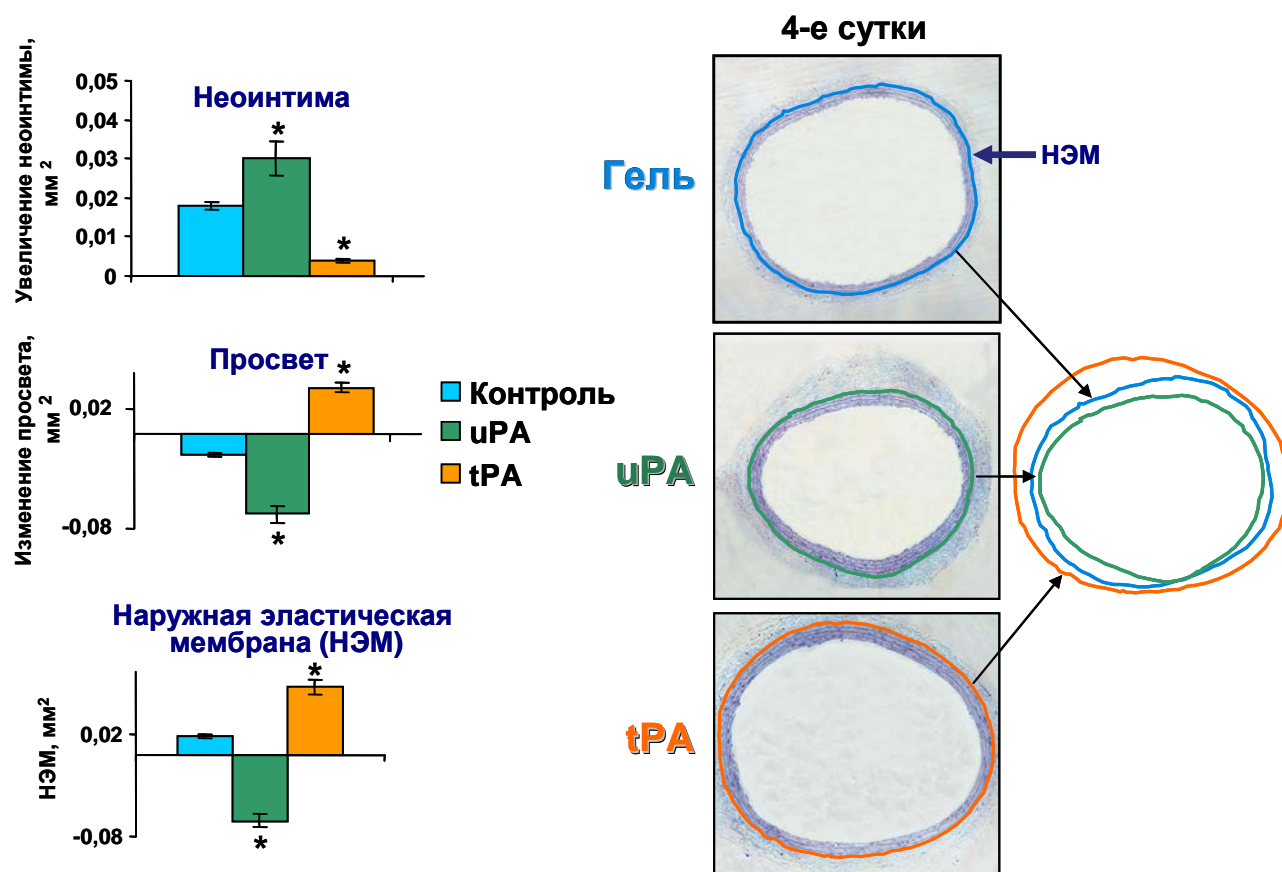


Рисунок 32 – Противоположное влияние урокиназного и тканевого активаторов плазминогена на структуру сонной артерии на четвертые сутки после баллонирования и нанесения урокиназы (uPA) или тканевого активатора плазминогена (tPA) (Обозначения: НЭМ – наружная эластическая мембрана. Контроль – нанесение чистого геля. \*  $p < 0,05$  (отличие от контроля); суммированы данные минимум 6 экспериментов)

Для того чтобы понять, сохраняются ли эти эффекты в отдаленные сроки, когда сами белки уже не присутствуют в сосудистой стенке, иными словами, запускают ли урокиназа и тканевой активатор плазминогена какие-то процессы, влияющие на структуру артерии в отдаленные сроки после их нанесения, мы проанализировали структурные изменения сосуда через 14 и 28 суток после баллонирования.

Оказалось, что в контрольной группе толщина интимы/медии продолжала возрастать к 14 и 28 дню, когда заканчивалось формирование неоинтимы (рисунок 33).

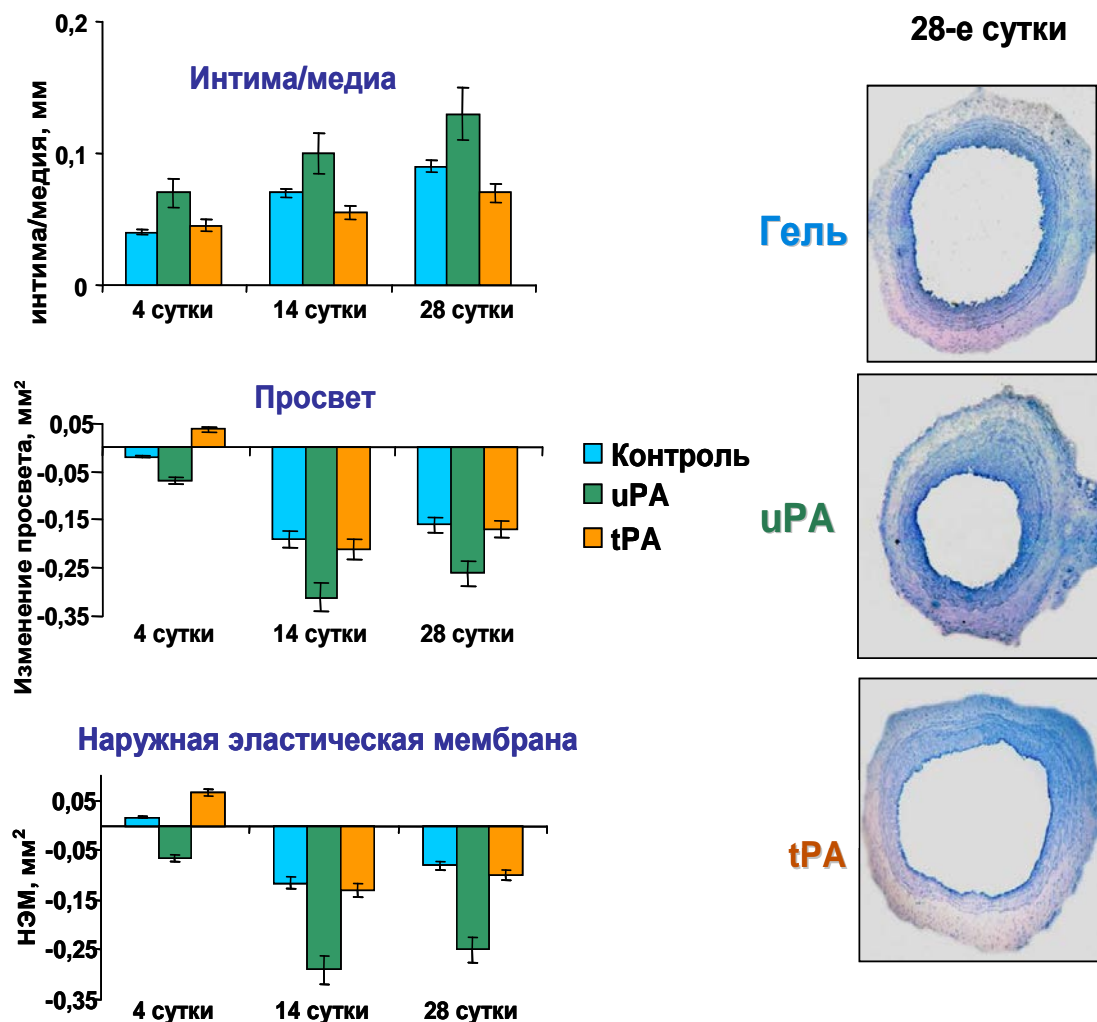


Рисунок 33 – Изменения структуры общей сонной артерии на поздних этапах после внутрисосудистого повреждения и нанесения урокиназы (uPA) или тканевого активатора плазминогена (tPA) (Обозначения: НЭМ – наружная эластическая мембрана. Контроль – нанесение чистого геля. \*  $p < 0,05$  (отличие от контроля); суммированы данные минимум 6 экспериментов)

Такая же динамика наблюдалась и в группе животных, где наносили урокиназу, но толщина интимы/медии на всех сроках оставалась большей, чем в контроле. В группе животных, где наносили тканевой активатор плазминогена, толщина интимы/медии также увеличивалась к 14 и 28 дню, но оставалась и на

поздних сроках меньше, чем в контрольной группе. На поздних сроках положительное ремоделирование (увеличение площади внутри НЭМ и просвета артерии) в группе tPA исчезало, а более выраженное негативное ремоделирование при нанесении урокиназы сохранялось [20, 104].

Таким образом, стимуляция роста неоинтимы и констриктивного ремоделирования при нанесении на сосуд урокиназы сохраняется длительное время, что, вероятно, обусловлено запуском механизмов, поддерживающих эти процессы. Положительное ремоделирование, вызванное нанесением тканевого активатора плазминогена, исчезает на отдаленных сроках.

### **3.2.6. Урокиназа и ремоделирование адвентиции**

Результаты предыдущего этапа исследования показывают, что урокиназа стимулирует констриктивное ремоделирование сосуда уже на ранних этапах после баллонирования. Работы последних лет показывают, что в ремоделировании стенки сосуда после баллонной ангиопластики активное участие принимают фибробласты адвентиции, которые при активации трансдифференцируются в миофибробласты, пролиферируют, а также мигрируют в другие слои сосудистой стенки, в том числе в неоинтиму [274, 448]. Согласно нашим данным, периадвентициальное нанесение урокиназы на баллонированный сосуд увеличивает площадь адвентиции и число клеток в ней (выше раздел 3.2.3).

Для выяснения в какой степени эти эффекты могут быть связаны с влиянием урокиназы на трансдифференцировку адвентициальных фибробластов в миофибробласты, мы исследовали, как нанесение урокиназы на небаллонированный сосуд влияет на пролиферацию клеток в поврежденной адвентиции, ее площадь и количество в ней клеток сократительного фенотип, и как урокиназа влияет на превращение фибробластов в миофибробласты в культуре клеток.

#### *Урокиназа и миофибробласты адвентиции*

Для оценки роли урокиназы в формировании неоадвентиции мы изучили влияние урокиназы на аккумуляцию клеток сократительного фенотипа в



адвентиции и ранние процессы формирования неоадвентиции после ее повреждения *in vivo*.

На первом этапе исследовали экспрессию урокиназы в адвентиции на 4-е сутки после периадвентициального повреждения левой общей сонной артерии и сравнивали с таковой в интактной артерии.

В адвентиции неповрежденных сосудов (правые сонные артерии опытных животных) экспрессия урокиназы практически отсутствовала (рисунок 34). После повреждения в контрольной группе экспрессия эндогенной урокиназы значительно возрастала и была равномерно распределена в адвентиции (рисунок 34). Количество клеток, экспрессирующих урокиназу возрастало до  $47,4 \pm 3,2\%$  после повреждения ( $p < 0,05$ ) по сравнению с неповрежденной артерией ( $1,4 \pm 0,5\%$ ). Индекс пролиферации адвентиции также значительно увеличивался и в поврежденных сосудах составил  $16,6 \pm 3,2\%$  по сравнению с  $5,1 \pm 2,5\%$  в адвентиции неповрежденных сосудов ( $p < 0,05$ ).

Для определения фенотипа клеток адвентиции мы использовали антитела к гладкомышечному  $\alpha$ -актину, также к маркерам ГМК (тяжелой цепи гладкомышечного миозина (SM-MHC), h-кальдесмону и смузелину) и к моноцитарно-макрофагальному маркеру ED-1 (таблица 3). Экспрессия гладкомышечного  $\alpha$ -актина в адвентиции значительно возрастала через 4 дня после повреждения по сравнению с неповрежденной адвентицией ( $p < 0,05$ ) (рисунок 35, таблица 3). Экспрессия SM-MHC не определялась в неповрежденной адвентиции и значительно возрастала после повреждения ( $p < 0,05$ ) (таблица 3). Адвентициальные клетки не экспрессировали ни h-кальдесмон, ни смузелин до и после повреждения (таблица 3). Доля ED-1 позитивных клеток достоверно возрастала на 4 сут после повреждения по сравнению с неповрежденной артерией (рисунок 35, таблица 3). Около  $10 \pm 3,7\%$   $\alpha$ -актин позитивных клеток были также ED-1 позитивными (рисунок 35, отмечены стрелками).

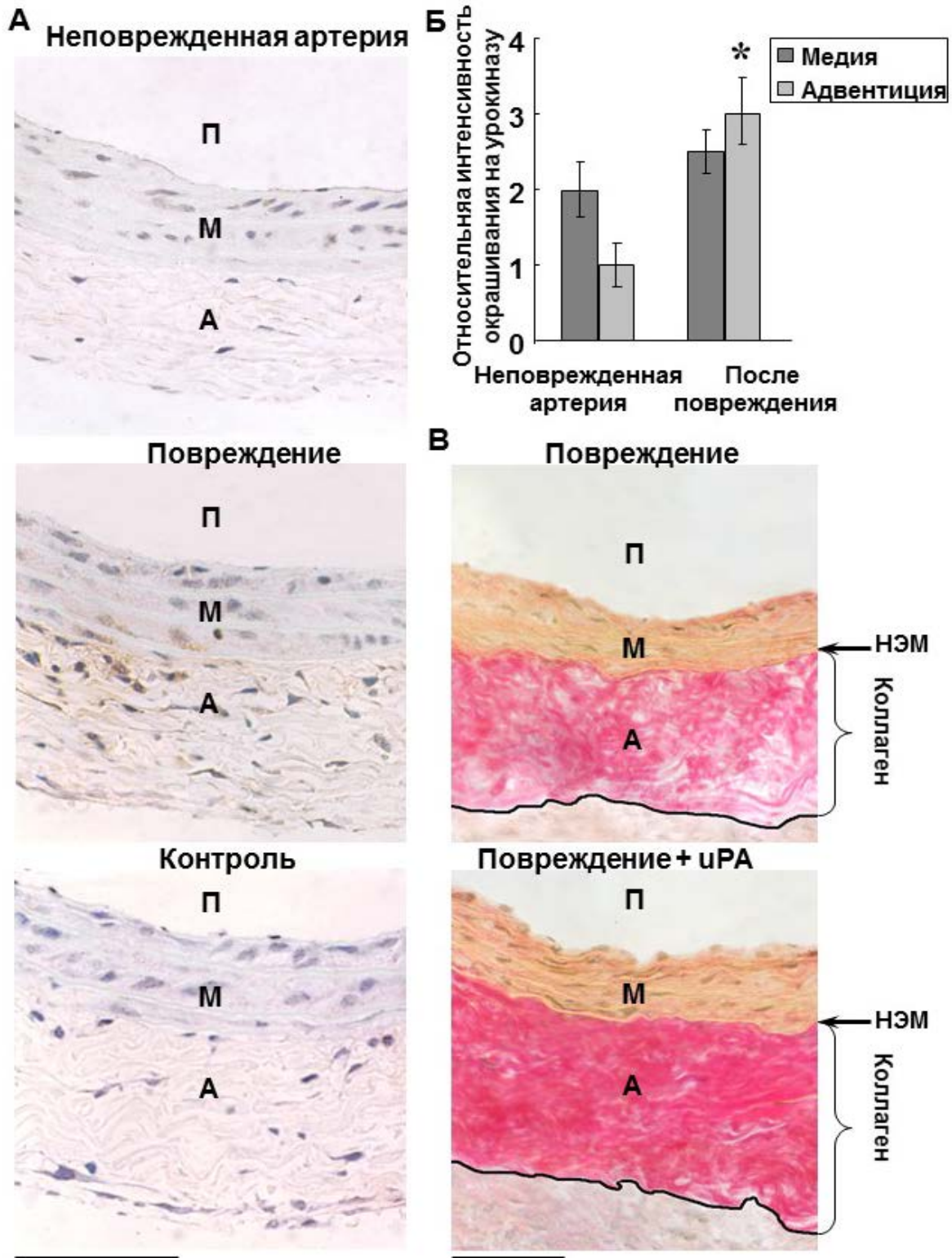


Рисунок 34 – (А) микрофотографии, показывающие иммунолокализацию урокиназы (uPA) (Обозначения: Верхняя панель, в нормальной сонной артерии окрашивание на uPA отсутствует в адвентиции. Средняя панель, на 4 сутки после повреждения – выраженное окрашивание на uPA в гиперклеточной меди. Нижняя панель, контроль – неиммунные IgG мыши. Ядра клеток окрашивали гематоксилином. П – просвет, М – медия, А – адвентиция. Масштабная линейка 30  $\mu$ m. (Б). Экспрессия uPA в неповрежденных артериях и на 4-е сутки после

повреждения сонной артерии. Интенсивность окрашивания оценивали от 0 до 4; результаты представлены как  $M \pm m$ , 7 животных в каждой группе. \*  $p < 0,05$  по сравнению с неповрежденной артерией. (С) Микрофотографии срезов артерий после нанесения uPA (нижняя панель) на адвентицию сонной артерии на 4 сутки после повреждения. Верхняя панель - контроль. Срезы окрашены по Ван-Гизону НЭМ – наружная эластическая мембрана. Масштабная линейка 30  $\mu\text{m}$ )

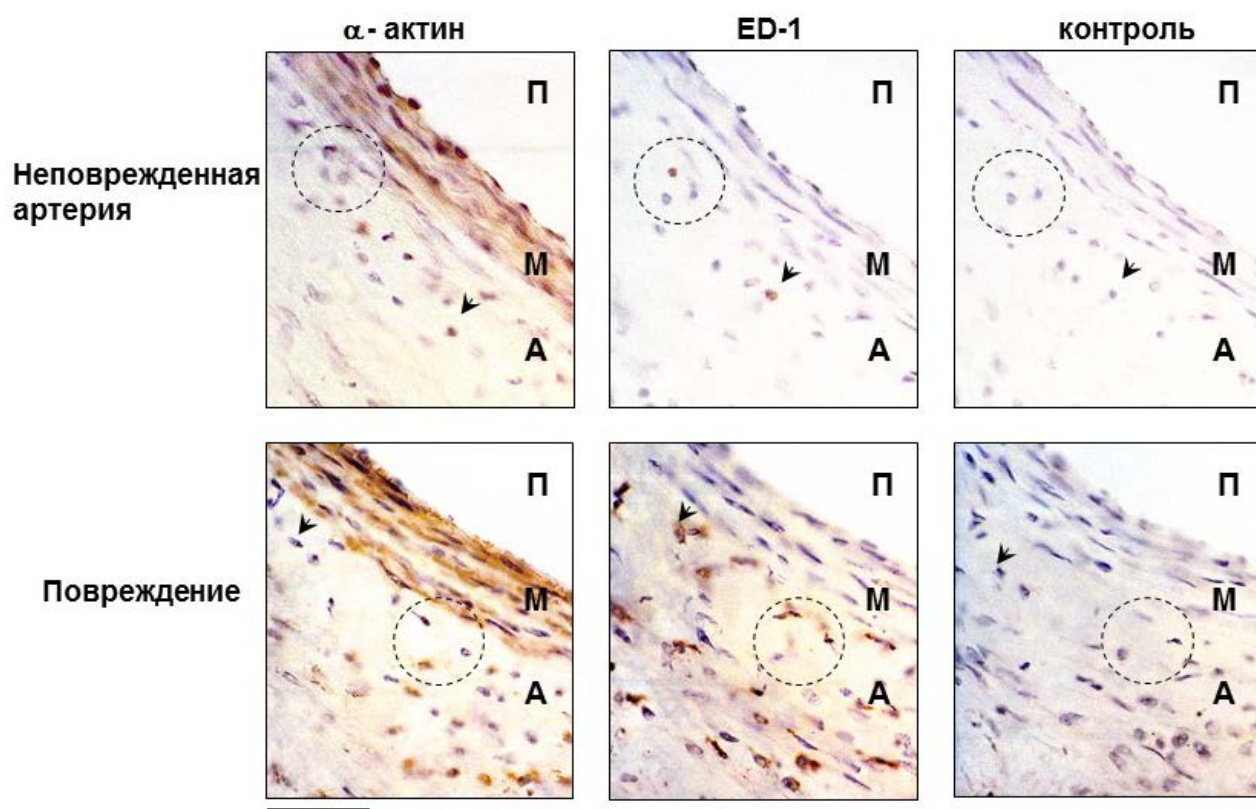


Рисунок 35 – Экспрессия гладкомышечного альфа-актина и макрофагального антигена ED-1 на серийных срезах (Обозначения: Неповрежденная артерия – верхняя панель; экспрессия антигенов на 4 сутки после повреждения – нижняя панель. Контроль – неиммунные IgG мыши. П – просвет, М – медиа, А – адвентиция. Стрелки и кружки указывают на разное окрашивание миофибробластов и лейкоцитов. Ядра окрашены гематоксилином. Масштабная линейка 50  $\mu\text{m}$ )

Повреждение адвентиции и нанесение чистого геля приводило также к увеличению площади адвентиции ( $p < 0,05$  по сравнению с интактным сосудом) (таблица 3).

После повреждения общее число клеток адвентиции также увеличивалось и составило  $165,5 \pm 8,1$  клеток/срез по сравнению с  $104,5 \pm 12$  клеток/срез в неповрежденном сосуде ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, после повреждения в адвентиции возрастает экспрессия урокиназы, происходит стимуляция пролиферации адвентициальных клеток, возрастает доля  $\alpha$ -актин позитивных клеток, что может указывать на трансформацию фибробластов в миофибробласты, и увеличивается площадь адвентиции параллельно с сужением просвета сосуда.

Сам по себе этот факт не свидетельствует о безусловной взаимосвязи между экспрессией эндогенной урокиназы и пролиферацией и трансформацией адвентициальных клеток после повреждения, но полученные данные позволяют предполагать участие урокиназы в регуляции этих процессов, являющихся ключевыми для ремоделирования сосуда [274, 448].

*Урокиназа и ранние процессы формирования неоадвентиции после  
периадвентициального повреждения*

Для выяснения роли урокиназы и значения ее протеолитической функции в процессах трансформации фибробластов адвентиции в клетки сократительного фенотипа и формировании неоадвентиции после повреждения сосуда *in vivo* мы исследовали влияние периадвентициального нанесения рекомбинантных форм урокиназы: протеолитически активной и неактивной, с заменой гистидина в активном центре в позиции 204 на глутамин и нейтрализующих моноклональные антител к урокиназе на фенотип клеток в адвентиции, индекс пролиферации и площадь адвентиции (таблица 3).

Таблица 3 – Доля клеток, экспрессирующих различные маркеры в адвентиции, и общее число клеток адвентиции до и после повреждения и нанесения урокиназы или антител к урокиназе

Маркер	Неповрежденная адвентиция	Контроль	uPA	uPA H/Q	Антитела к урокиназе
$\alpha$ -актин	1,8 $\pm$ 1,1	25,2 $\pm$ 5,4 <sup>#</sup>	55,7 $\pm$ 6,8*	30,1 $\pm$ 5,9	12,6 $\pm$ 3,5*
SM-МНС	0	8,4 $\pm$ 1,2 <sup>#</sup>	14,3 $\pm$ 4,3*	7,9 $\pm$ 2,2	5,6 $\pm$ 2,1*
h-каль-десмон	0	0	0	0	0
Смузелин	0	0	0	0	0
ED-1	1,5 $\pm$ 1,1	25,0 $\pm$ 5,2 <sup>#</sup>	33,1 $\pm$ 4,5*	26,2 $\pm$ 6,1	16,7 $\pm$ 3,1*
Общее число клеток	104,5 $\pm$ 12,0	165,5 $\pm$ 8,1 <sup>#</sup>	243,5 $\pm$ 26,1*	170,5 $\pm$ 25,5	124,5 $\pm$ 15,5*
Площадь адвентиции, мм <sup>2</sup>	0,077 $\pm$ 0,006	0,103 $\pm$ 0,011 <sup>#</sup>	0,138 $\pm$ 0,013*	0,094 $\pm$ 0,008	0,089 $\pm$ 0,004

Данные представлены как  $M \pm m$  долей адвентициальных клеток, экспрессирующих либо гладкомышечный альфа-актин ( $\alpha$ -SM актин), либо тяжелые цепи гладкомышечного миозина (SM-МНС), либо тяжелую изоформу кальдесмона (H-caldesmon), либо смузелин или маркер моноцитов / макрофагов (ED-1), а также общее число адвентициальных клеток на поперечном срезе и изменения площади адвентиции (минимальное число 7 артерий в группе) через 4 суток после периадвентициального повреждения сонной артерии и нанесения рекомбинантной урокиназы (uPA), протеолитически неактивной рекомбинантной урокиназы (uPA H/Q) или антител, нейтрализующих урокиназу. Контроль – сосуды, на которые наносили только плуронический гель. Поврежденная артерия – левые сонные артерии ложнопериоперированных животных. <sup>#</sup> $p < 0,05$  контрольные артерии по сравнению с неповрежденными артериями. \*  $p < 0,05$  в сравнении с контролем.

#### *Урокиназа и фенотип клеток адвентиции*

Нанесение нативной формы урокиназы приводило к значительному увеличению доли  $\alpha$ -актин позитивных клеток ( $p < 0,05$ ) (таблица 3), тогда как антитела, нейтрализующие урокиназу, уменьшали долю  $\alpha$ -актин позитивных

клеток ( $p < 0,05$ ) (таблица 3). В адвентиции сосудов, на которые наносили протеолитически неактивную урокиназу, существенных отличий от контрольной группы (чистый гель) выявлено не было ( $p > 0,05$ ) (таблица 3). Клетки адвентиции не экспрессировали h-кальдесмон или смузелин ни в одной группе (таблица 3). После нанесения нативной урокиназы на поврежденную адвентицию значительно возрастала экспрессия SM-МНС ( $p < 0,05$ ) (таблица 3), тогда как антитела, нейтрализующие урокиназу, ее подавляли ( $p < 0,05$ ) (таблица 3). Протеолитически неактивная урокиназа uPA(H/Q) не оказывала влияния на экспрессию тяжелых цепей гладкомышечного миозина – SM-МНС. После нанесения нативной урокиназы uPA доля ED-1 позитивных клеток значительно возрастала ( $p < 0,05$ ) (таблица 3), неактивная урокиназа uPA(H/Q) подобного эффекта не оказывала ( $p > 0,05$ ) (таблица 3). Антитела, нейтрализующие урокиназу, уменьшали долю ED-1 позитивных клеток ( $p < 0,05$ ) (таблица 3).

Полученные данные свидетельствуют о том, что клетки, экспрессирующие  $\alpha$ -актин, не являлись гладкомышечными. В то же время происходило их накопление после повреждения наряду с аккумуляцией клеток воспалительного типа.

#### *Урокиназа и площадь адвентиции*

Для уточнения роли протеолитических свойств урокиназы в регуляции ремоделирования адвентиции мы сравнили площадь адвентиции, пролиферацию миофибробластов и общее число клеток адвентиции под влиянием разных форм урокиназы. После нанесения нативной урокиназы uPA площадь адвентиции увеличивалась ( $p < 0,05$  по сравнению с нанесением чистого геля, Таблица 3), тогда как антитела, нейтрализующие урокиназу, достоверного влияния не оказывали ( $p = 0,05$  по сравнению с контролем) (таблица 3). Нанесение протеолитически неактивной урокиназы uPA H/Q не влияло на площадь адвентиции ( $p > 0,05$ ) (таблица 3). Нанесение разных форм урокиназы и нейтрализующих антител не вызывало изменений площади меди и просвета ( $p > 0,05$ ).

В поврежденных сосудах общее число клеток было достоверно больше, чем в адвентиции неповрежденных сосудов ( $p < 0,05$ ) (таблица 3). После нанесения нативной урокиназы общее число клеток адвентиции возрастало почти вдвое по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ) (таблица 3), тогда как неактивная урокиназа uPA H/Q подобного эффекта не оказывала ( $p > 0,05$ ) (таблица 3). Нейтрализующие урокиназу антитела достоверно уменьшали число клеток адвентиции ( $p < 0,05$ ) (таблица 3).

Нанесение на адвентицию нативной урокиназы приводило к увеличению индекса пролиферации адвентиции (индекс PCNA) до  $51,3 \pm 6,1\%$  ( $p < 0,01$  по сравнению с  $16,6 \pm 3,2\%$  в контрольной группе). В то же время ни протеолитически неактивная урокиназа uPA H/Q, ни антитела, нейтрализующие урокиназу не изменяли индекс пролиферации адвентиции по сравнению с контролем ( $p > 0,1$ ;  $p > 0,05$ , соответственно).

Таким образом, результаты демонстрируют участие урокиназы в активации фибробластов, их последующей дифференцировке в миофибробласты и усилении пролиферативного ответа адвентиции на повреждение. Это участие *in vivo* осуществляется преимущественно за счет специфической протеолитической активности урокиназы, что может быть впоследствии использовано при поиске мишеней для регуляции процессов ремоделирования стенки артерии.

Урокиназа и трансформация фибробластов в миофибробласты в культуре клеток

Для того чтобы подтвердить потенциальную способность урокиназы стимулировать трансдифференцировку фибробластов в миофибробласты, мы исследовали влияние рекомбинантной урокиназы с нативной структурой на трансформацию фибробластов кожи человека в миофибробласты в культуре, для чего определяли относительное количество маркера клеток сократительного фенотипа альфа –актина (рисунок 36).

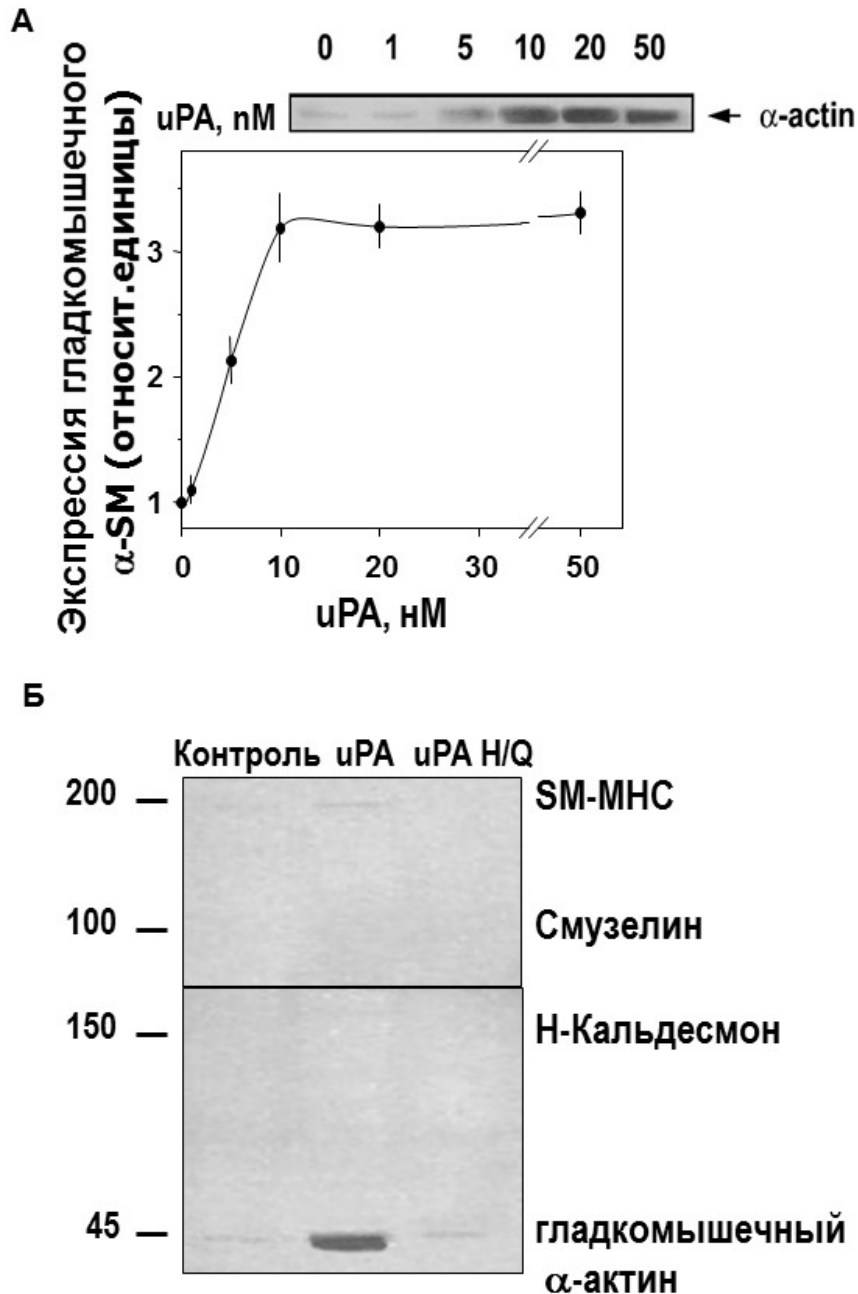


Рисунок 36 – (А) Концентрационно-зависимое влияние урокиназы (uPA) (1–50 nM) на содержание гладкомышечного альфа-актина в культивируемых фибробластах кожи человека (Обозначения: Результаты представлены в относительных единицах как отношение к содержанию  $\alpha$ -актина в контрольных клетках, которое условно принимали за 1 для каждого эксперимента (M + m для 4 экспериментов). (Б) Пример типичного иммуноблоттинга, демонстрирующего экспрессию маркеров гладкомышечной дифференцировки (SM-MHC – тяжелые цепи гладкомышечного миозина, смузелин, высокомолекулярный кальдесмон и гладкомышечный  $\alpha$ -актин) в культивируемых фибробластах кожи человека после инкубации с нативной урокиназой (uPA) или протеолитически неактивной урокиназой uPA(H/Q) (10 nM))



Через 48 часов после стимуляции урокиназой (от 1 нМ до 50 нМ) определяли содержание гладкомышечного  $\alpha$ -актина в полученных экстрактах с помощью иммуоблоттинга. На рисунке 36 видно, что после стимуляции урокиназой содержание  $\alpha$ -актина в клетках возрастало с увеличением концентрации урокиназы от 1 нМ до 50 нМ, что свидетельствует об увеличении доли клеток сократительного фенотипа в культуре и указывает на трансформацию фибробластов в миофибробласты. Максимальное увеличение экспрессии  $\alpha$ -актина наблюдалось при концентрации урокиназы 10 нМ и выше.

При этом культивируемые фибробласты не экспрессировали маркеры гладкомышечной дифференцировки (тяжелые цепи гладкомышечного миозина, h-кальдесмон, смузелин), тогда как после стимуляции нативной урокиназой uPA (10 нМ) наблюдалась слабая экспрессия тяжелых цепей гладкомышечного миозина и значительное возрастание экспрессии гладкомышечного  $\alpha$ -актина. Экспрессия h-кальдесмона и смузелина в культивируемых фибробластах не менялась. Напротив, протеолитически неактивная урокиназа uPA(H/Q) не вызывала изменений в экспрессии исследованных маркеров.

Полученные данные свидетельствуют о способности урокиназы стимулировать трансформацию фибробластов в миофибробласты *in vitro* и *in vivo* [406].

### **3.2.7. Влияние урокиназы на экспрессию генов в поврежденной сосудистой стенке**

Механизмы, определяющие подобные различия в эффектах активаторов плазминогена на развитие стеноза артерии при их локальном нанесении на сосуд после экспериментального баллонирования до конца не ясны. Их исследование имеет большое значение для выявления новых перспективных мишеней для предотвращения рестенозов.

В связи с этим, были оценены изменения в экспрессии генов в стенке артерии после локального нанесения урокиназного и тканевого активаторов

плазминогена на разных этапах после баллонирования с помощью метода микрочипов (транскрипционных матриц).

Использовали модель баллонирования сонной артерии крысы. Урокиназный или тканевой активатор плазминогена в плуроническом геле (20 нмоль/кг веса) наносили на поврежденную баллонным катетером сонную артерию животного. На артерии животных контрольной группы наносили только плуронический гель. На разных сроках после баллонирования из гомогенизированных правых и левых общих сонных артерий экстрагировали РНК.

Для анализа микрочипов был использован геном крысы Affymetrix U34A для олигонуклеотидных микроэстреев, состоящий из 8799 известных генов и неаннотированных последовательностей (Santa Clara, CA ([www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com))). Для уменьшения ошибки при анализе данных микроэстреев была использована программа DNA-Chip Analyzer (dChip). Для оценки достоверности различий в экспрессии генов между группами была использована программа SAM (significance analysis of microarrays). Достоверность различий в экспрессии генов между группами была также оценена с помощью Т-теста, адаптированного для малых выборок, в программе GeneSpring.

Для контроля качества гибридизации мы оценили экспрессию 7 конститутивно экспрессируемых генов (housekeeping genes) в том числе рибосомальных белков L18, L18a и S9, альфа-тубулина, тимозина бета-4, убиквитина, бета-актина. Экспрессия этих генов была стабильной и сопоставимой во всех исследованных образцах, включая неповрежденные артерии, ложно-оперированные, контрольные оперированные (баллонирование с нанесением чистого геля) и экспериментальные артерии (рисунок 37).

При анализе экспрессии генов через 1 сутки после баллонирования и нанесения урокиназы было выявлено 150 транскриптов, в том числе, 62 известных гена и 88 неаннотированных последовательностей, экспрессия которых достоверно ( $p \leq 0,05$ ) отличалась от экспрессии в контрольной группе (таблица 4).

Через 1 сутки после баллонирования и нанесения урокиназы экспрессия 34 (54,8 %) известных генов была достоверно повышена и 28 (45,2 %) генов понижена по сравнению с контрольной группой. На 4-е сутки после операции экспрессия 65 транскриптов (31 известный ген) (таблица 5) достоверно ( $p \leq 0,05$ ) отличалась от экспрессии в контрольной группе. Экспрессия 8 (25,8 %) генов была достоверно понижена и 23 (74,2 %) генов достоверно повышена по сравнению с контролем.

Конститутивные гены	Неповр артерия			1 день			4 дня		
				ложн	гель	uPA	ложн	гель	uPA
убиквитин; D17296	■	■	■	■	■	■	■	■	■
рибосомальный белок L18; 20156	■	■	■	■	■	■	■	■	■
альфа-тубулин; V01227	■	■	■	■	■	■	■	■	■
рибосомальный белок S9; X66370	■	■	■	■	■	■	■	■	■
рибосомальный белок L18a; X14181	■	■	■	■	■	■	■	■	■
бета-актин; V01217	■	■	■	■	■	■	■	■	■
тимозин бета-4; M34043	■	■	■	■	■	■	■	■	■

< 0,05	0,05–0,2	0,2–0,4	0,4–0,8	>0,8
--------	----------	---------	---------	------

#### Интенсивность сигнала (относительные единицы)

Рисунок 37 – Транскрипционный профиль высоко экспрессируемых конститутивных генов в сонной артерии крысы (Обозначения: Каждая ячейка представляет паттерн экспрессии гена из одной пробы. Для каждого гена интенсивность сигнала нормализовали к среднему сигналов всех 7 конститутивных генов и представляли в соответствии с уровнем интенсивности по серой шкале, представленной снизу)

Таблица 4 – Урокиназа индуцирует изменение экспрессии 62 известных генов в поврежденной сонной артерии через 1 сутки после баллонирования

Аннотация гена	Номер в генбанке	p (t-тест Вельша) / направление изменений	Аннотация гена
<b>Адгезия &amp; Внеклеточный матрикс</b>			
Остеонектин (SPARC)	U75928	0,02	↓ Анти-адгезивный Анти-пролифератив Ремоделирование матрикса
Препро костный морфогенетический белок 3	D63860	0,001	↓ Ремоделирование матрикса
Костный морфогенетический белок 3	S77492	0,01	↓ Ремоделирование матрикса
Коллаген альфа1 тип I	Z78279	0,01	↓ Ремоделирование матрикса
Энхансер проколлаген С-протеиназы	AF016503	0,018	↓ Рост и дифференцировка клеток
Люмикан	X84039	0,006	↓ Ремоделирование матрикса
MT3-MMP-del	D63886	0,03	↓ Ремоделирование матрикса
Эмбигин	AJ009698	0,01	↑ Взаимодействие клеток с матриксом
Zn-пептидазаминопептидаза N	M25073	0,01	↑ Клеточная инвазия
<b>Миграция &amp; Цитоскелет</b>			
Бета-тропомиозин и тропомиозин фибробластов 1	L00382	0,03	↓ Клеточная подвижность
Тубулин	AB015946	0,007	↓ Миграция, адгезия, пролиферация
Сосудистый альфа-актин	X06801	0,03	↓ Фенотип ГМК
Нервный фактор роста	E03082	0,01	↓ Про-миграционный
Урокиназа	X63434	0,001	↑ Про-миграционный

Синдекан (ядерный белок гепарансульфатпротеогликана)	S61865	0,02	↑	Про-миграционный
GAS-7 белок	AJ131902	0,03	↑	Реорганизация микрофиламентов
<b>Пролиферация &amp; Апоптоз</b>				
Защитник от клеточной смерти 1 (DAD-1)	Y13336	0,03	↓	Анти-апоптотич
Тромбоцитарный фактор роста цепь А	D10106	0,016	↓	Митогенный Про-миграционный
Блок теплового шока 70	L16764	0,03	↓	Анти-апоптотич
PRG1 ген	X96437	0,01	↑	Митогенный, Про-апоптотич
двухцепочечная РНК-специфичная аденозиндеаминаза	U18942	0,03	↑	Про-апоптотич
<b>Воспаление</b>				
Интерлейкин-15	U69272	0,003	↓	Про-воспалительн
Протеин S (кофактор активированного протеина С)	S78744	0,03	↓	Про-воспалительн
Ассоциированный с естественной защитой макрофагальный белок 2 (Nramp2)	AF008439	0,007	↑	Про-воспалительн
Конвертирующий фермент интерлейкина 1 бета (ICE, caspase-1)	U14647	0,005	↑	Про-воспалительн Про-апоптотич
Конвертирующий фермент фактора некроза опухоли альфа (TACE)	AJ012603	0,03	↑	Про-воспалительн Про-апоптотич
Общий антиген лейкоцитов (L-CA, CD45 / T200)	M25823	0,04	↑	Про-воспалительн
Инвариантная цепь, ассоциированная с МНС классом II	X14254	0,03	↑	Про-воспалительн
Альфа-1 цепь МНС класса I	M31038	0,02	↑	Про-воспалительн
Белок С-типа МНС класса I RT1	L40362	0,02	↑	Про-воспалительн

Белок О-типа МНС класса I RT1	L40364	0,04	↑	Про-воспалительн
Антиген МНС класса I (RT1.ЕС3)	AF074609	0,03	↑	Про-воспалительн
<b>Транскрипция</b>				
ТС фактор транскрипции (HLH/PAS семейство)	AF015953	0,02	↓	Циркадный фактор транскрипции
Гистон (H2A.Z)	M37584	0,02	↓	Регуляция транскрипции
Ретиноидный X рецептор гамма (RXRgamma)	AF016387	0,03	↑	Фактор транскрипции
MSS1 белок	U13895	0,005	↑	Регуляция транскрипции
Индущий ген белка ангиотензиногена 1, связывающийся с энхансером	M65251	0,03	↑	Регуляция экспрессии генов
Протеинфосфатаза 1 ядерная субъединица (PNUTS)	AF040954	0,02	↑	Ядерная функция
<b>Сигнализация</b>				
Фосфолипаза С	J03806	0,007	↓	Пролиферация
Фосфолипаза С (BETA4)	L15556	0,02	↓	Пролиферация
Протеинтирозинфосфатаза, связанная с рецептором	L19180	0,01	↓	Дифференцировка/ Воспаление
Фосфолипаза С-бета 1	L14323	0,009	↓	Фиброз
сАМФ фосфодиэстераза (PDE4)	M25350	0,035	↓	Пролиферация
Frizzled (гомолог гена полярности дрозофилы)	L02529	0,003	↓	Анти-пролиферативный
сАМФ-регулируемый гуаниннуклеотид обменный фактор II (сАМФ-GEFII) (малая ГТФаза Rap1)	U78517	0,04	↓	Нет данных
Протеинфосфатаза 2А, регуляторная субъединица А	D14418	0,04	↑	Анти-апоптотич Про-пролиферат Про-оксидатив
МАР-киназфосфатаза (срг21)	AF013144	0,007	↑	Анти-пролиферат Про-миграцион
lun протеин	L14951	0,002	↑	Пролиферация

нерецепторная киназа				
<b>Метаболизм &amp; Разное</b>				
L-глутаминамидогидролаза	J05499	0,02	↓	Оксидативный стресс/воспаление
Альдегиддегидрогеназа	J03637	0,016	↓	Вазорелаксация
Вариант V1b рецептора вазопрессина	AF064541	0,04	↑	Вазоконстрикция
Липопротеинлипаза	L03294	0,04	↓	Нет данных
P-гликопротеинподобный АТФ-связывающий кассетный транспортер	AF106563	0,03	↓	Нет данных
Оксидоскваленциклаза	U31352	0,016	↓	Нет данных
rPER2	AB016532	0,03	↓	Нет данных
Drs (ген, подавляемый v-src)	D78359	0,04	↓	Нет данных
Глобулин альфа-2 подчелюстных желез	J00738	0,03	↓	Нет данных
Гомолог белка дрозофилы slit (MEGF5)	AB011531	0,003	↓	Нет данных
BEST5 (гипотетический белок)	Y07704	0,01	↑	Нет данных
Сульфатированный гликопротеин 1 (SGP-1)	M19936	0,03	↑	Нет данных
Аквапорин	AB013112	0,003	↑	Нет данных
S-аденозилметионин	J05571	0,02	↑	Нет данных

Таблица 5 – Урокиназа индуцирует изменение экспрессии 31 известного гена в поврежденной сонной артерии через 4 суток после баллонирования по сравнению с контролем

Аннотация гена	Номер в генбанке	p (t-тест Вельша) / направление изменений	Эффекты, связанные с ремоделированием сосудов
<b>Адгезия &amp; Внеклеточный матрикс</b>			
Остеонектин (SPARC)	U75928	0,04	↑ Анти-адгезивный Анти-пролифератив Ремоделирование матрикса

Плакоглобин	U58858	0,03	↑	Про-адгезивный
<b>Миграция &amp; Цитоскелет</b>				
Альфа-актинин 2 ассоциированный ЛИМ белок	AF002281	0,04	↑	Мышечное сокращение
Желатиназа А (MMP-2)	U65656	0,02	↑	Про-миграционный
Плектин	X59601	0,04	↑	Про-миграционный
<b>Воспаление</b>				
CCR10-связанный рецептор	U92803	0,04	↓	Хемотаксис лейкоцитов
Предшественник фактора индуцирующего интерферон гамма (IGIF; IL-18)	U77777	0,03	↓	Про-воспалительный
циклофиллин с	C07012	0,04	↑	Про-воспалительный
<b>Пролиферация &amp; Апоптоз</b>				
ICE-подобная цистеинпротеаза (Lice)	U49930	0,01	↓	Про-апоптотический
Ингибитор тканевого фактора	D10926	0,02	↓	Про-апоптотический / Анти-тромботический
Трансформирующий фактор роста бета-3	U03491	0,01	↑	Клеточный рост и дифференцировка
<b>Транскрипция</b>				
VL30 элемент	M91234	0,002	↓	Регулятор транскрипции
Протеасомная АТФаза (MSS1)	D50694	0,04	↑	Регулятор транскрипции
<b>Сигнализация</b>				
Фосфолипаза С-1	M20636	0,03	↓	Вазоконстрикция/ Пролиферация
Sky киназа	D37880	0,02	↑	Пролиферация / Анти-апоптотическ
Фосфатидилинозитолсинт аза	D82928	0,047	↑	Пролиферация
Аденилилциклаза тип V (белок активирующий ГТФазу)	M96159	0,02	↑	Нет данных
Белок, высвобождающий гуаниннуклетид (mss4) (регуляция ГТФазы)	L10336	0,02	↑	Нет данных
Пренилированный rab акцептор 1 (PRA1) (связывает Rab ГТФазу)	AF025506	0,005	↑	Нет данных



eIF-2B бета субъединица (GEF)	U31880	0,02	↑	Нет данных
Белок p34 (активируется семейством Rho ГТФаз)	D13623	0,02	↑	Пролиферация
Аннексин VI (белок, связывающий ГТФ)	X86086	0,035	↑	Адгезия
<b>Метаболизм &amp; Разное</b>				
Предшественник сериновой протеиназы rPC7	U36580	0,04	↓	Миграция \ воспаление
Фосфофруктокиназа М (PKF-M)	D21869	0,04	↓	Гликолиз
Альфа-растворимый NSF связывающий белок	X89968	0,04	↑	Нет данных
Гомолог Tat-связывающего белка Sata	U77918	0,03	↑	Нет данных
Гликогенин	U96130	0,01	↑	Нет данных
Пиридоксин 5 –фосфат оксидаза	U91561	0,08	↑	Нет данных
Цепь бета ассоциированного с клатрином белкового комплекса AP-1	M77245	0,02	↑	Нет данных
Специфический белок мозга (RB109)	D26154	0,03	↑	Нет данных
Специфический транспортный белок печени	L27651	0,04	↑	Нет данных

*Влияние урокиназы на экспрессию генов, регулирующих воспаление*

Урокиназа в отличие от тканевого активатора плазминогена стимулирует экспрессию большой группы про-воспалительных генов, что может быть важным для процессов ремоделирования стенки артерии, в том числе регуляции миграции и пролиферации клеток. В эту группу вошли гены, кодирующие белки, участвующие в регуляции воспаления, том числе интерлейкин 18 (интерферон гамма, индуцирующий фактор), фермент, конвертирующий фактор некроза опухолей (TACE), фермент, конвертирующий интерлейкин-1, макрофагальный белок естественной резистентности (Nramp 2), матриксная металлопротеиназа 2

(ММП-2). Экспрессия этих генов была достоверно повышена по сравнению с контролем. Ранее мы обнаружили, что урокиназа способствует привлечению воспалительных клеток к зоне повреждения артерии, в частности, макрофагов. Увеличение числа этих клеток в сосудистой стенке может объяснять повышение экспрессии про-воспалительных генов в сосудистой стенке. Так, известно, что макрофаги и нейтрофилы активно экспрессируют CD45 и Nramp 2 (таблица 4), а лимфоциты CCR10 (таблица 5). В то же время экспрессия многих про-воспалительных генов может быть индуцирована в гладкомышечных клетках, например, конвертирующего фермента интерлейкина 1 бета (ICE, каспаза-1) или конвертирующего фермента фактора некроза опухолей (TACE) (таблица 4). Кроме того, метод транскрипционных матриц также подтвердил ранее показанное нами повышение экспрессии матриксной металлопротеазы 2 – обязательного участника воспалительного процесса, участвующего в регуляции миграции клеток и ремоделировании сосудистой стенки.

Неожиданной находкой оказалось значительное ( $p \leq 0,0005$ ) повышение экспрессии гена урокиназы (GeneBank # X63434), что может указывать на наличие положительной обратной связи и определять триггерный механизм действия урокиназы в поврежденной стенке артерии.

Изменение экспрессии генов, принимающих участие в регуляции воспаления, под действием урокиназы и отсутствие подобного эффекта у тканевого активатора плазминогена позволяет полагать, что воспалительный каскад, возможно, вовлечен в стимуляцию формирования неоинтимы, негативное констриктивное ремоделирование и, как следствие, сужение просвета артерии под влиянием урокиназы. Требуют дальнейшего исследования механизмы сигнализации и определение факторов транскрипции, на которые может оказывать влияние урокиназа, регулируя таким образом воспалительный ответ в сосудистой стенке.

#### *Урокиназа и гены оксидативного стресса*

Урокиназа вызывает достоверные изменения в экспрессии группы генов, участвующих в регуляции оксидативного стресса в клетках артериальной стенки

(таблица 6), возникающего в ответ на повреждение, что может стимулировать рост неоинтимы и сужение просвета артерии. Через 1 сутки после баллонирования и нанесения урокиназы экспрессия 13 генов (включая 8 митохондриальных генов) была достоверно ( $p \leq 0,05$ ) понижена и 5 генов достоверно повышена по сравнению с контрольной группой. В отличие от урокиназы нанесение на баллонированную артерию тканевого активатора плазминогена вызывало минимальные изменения в экспрессии генов оксидативного стресса. tPA снижал экспрессию гена тиоредоксин пероксидазы и повышение экспрессии гена СУР3А1.

Через 4 суток после операции и нанесения урокиназы была повышена экспрессия 2 генов, участвующих в регуляции оксидативного стресса, а после нанесения tPA – 4 генов.

Таблица 6 – Урокиназа индуцирует изменение экспрессии генов, участвующих в регуляции метаболизма митохондрий и оксидативного стресса, в поврежденной сонной артерии через 1 сутки после баллонирования

Аннотация гена	Номер в генбанке	p (t-тест Вельша) / направление изменений	Группа
<b>1 сут после повреждения: урокиназа vs контроль</b>			
NADH убихинон оксидоредуктаза Fe-S белок 6	L38437	0,02	↓ Митохондр. комплекс I
митохондриальный разобщающий белок 1	A04674	0,02	↓ Митохондр. комплекс IV
цитохром c оксидаза субъединица VIa полипептид 2	X12554	0,01	↓ Митохондр. комплекс IV
цитохром c оксидаза субъединица VIa	X72757	0,003	↓ Митохондр. комплекс IV
АТФ синтаза гамма субъединица	L19927	0,01	↓ Митохондр. комплекс V
металлотионин 2 & металлотионин 1	M11794	0,01	↓ Анти-оксид. стресс
глутатион-S-трансфераза субъединица 8	X62660	0,04	↓ Анти-оксид.

				стресс
индуцибельная карбонил-редуктаза	D89069	0,001	↓	Анти-оксид. стресс
альфа Б кристаллин-ассоциированный белок	D29960	0,001	↓	Анти-оксид. стресс
фумарил ацетоацетат гидролаза	M77694	0,04	↓	Анти-оксид. стресс
пируватдегидрогиназна	L22294	0,001	↓	Про-оксид. стресс
циклооксигеназа 1	U03388	0,03	↓	Про-оксид. стресс
L-глутаминамидогидролаза	J05499	0,02	↓	Про-оксид. стресс
митохондриальный разобщающий белок 2	AB010743	0,004	↑	Анти-оксид. стресс
протеинфосфатаза 2А регуляторная субъединица	D14418	0,04	↑	Анти-оксид. стресс?
шаперонин 60 & шаперонин 10	U68562	0,04	↑	Анти-оксид. стресс
супероксид-дисмутаза-2	AA926129	0,02	↑	Анти-оксид. стресс
тестостерон 6-бета-гидроксилаза (СУР3А1)	L24207	0,04	↑	Про-оксид. стресс
<b>4 сут после повреждения: урокиназа vs контроль</b>				
алкогольдегидрогиназа	M15327	0,003	↑	Про-оксид. стресс
альдозредуктаза	M60322	0,01	↑	Про-оксид. стресс

Полученные нами данные о том, что урокиназа может регулировать экспрессию генов, участвующих в развитии оксидативного стресса, в поврежденной артерии после баллонирования указывают на новый механизм действия урокиназы, который может оказаться важнейшим в регуляции

пролиферации сосудистых клеток, роста неоинтимы и развитии неблагоприятного ремоделирования артерии.

*Влияние тканевого активатора плазминогена на экспрессию генов в поврежденной артерии*

Мы также оценили влияние тканевого активатора плазминогена на экспрессию генов после баллонирования.

Через 1 сутки после баллонирования и нанесения тканевого активатора плазминогена была изменена по сравнению с контролем экспрессия 95 транскриптов (41 известный ген), из них экспрессия 18 (43,9 %) известных генов была достоверно повышена и 23 (56,1 %) генов понижена по сравнению с контрольной группой. На 4-е сутки после операции экспрессия 53 транскриптов (28 известных генов) достоверно ( $p \leq 0,05$ ) отличалась от экспрессии в контрольной группе. Экспрессия 5 (17,9 %) генов была достоверно понижена и 23 (82,1 %) генов достоверно повышена по сравнению с контролем.

Совпадающие гены, экспрессия которых менялась под влиянием обоих активаторов плазминогена, были представлены минимально.

Таблица 7 – Совпадающие гены, экспрессия которых менялась под влиянием обоих активаторов плазминогена (uPA и tPA) по сравнению с контрольными сосудами, на которые наносили только плуронический гель, через 1 сутки после операции

Аннотация гена	Номер в генбанке	uPA		tPA		Группа
		значение	направление	значение	направление	
конвертирующий фермент фактора некроза опухолей (TACE)	AJ012603	0,03	↑	0,02	↑	Про-воспалительн Про-апоптотич
тестостерон 6-бета-гидроксилаза (CYP3A1)	L24207	0,04	↑	0,02	↑	Про-оксид. стресс
rPER2	AB016532	0,03	↓	0,04	↓	Нет данных

Под влиянием тканевого активатора плазминогена менялась экспрессия других групп генов, в частности, генов, регулирующих функционирование нервной ткани, в частности, фактор, высвобождающий кортикотропин, глутаматсвязывающая субъединица рецептора NMDA, калпаин, кальпаин II, субстанция P, молекула адгезии нейронных клеток L1, дигидропиримидиназа, глициновый транспортер (GLYT-1), связанный с эмбриональным белком Bdm1/NDRG4, атаксин 3. Также менялась экспрессия группы генов, участвующих в регуляции тонуса сосудов, в частности, протеинкиназа альфа RAC, кальмодулин, рецептор тромбксана A2, рецептор ангиотензина II типа 1, неселективный рецептор эндотелина; эти изменения могут иметь значение для обнаруженного нами положительного ремоделирования под действием тканевого активатора плазминогена на ранних сроках после баллонного повреждения.

Таблица 8 – Совпадающие гены, экспрессия которых менялась под влиянием обоих активаторов плазминогена (uPA и tPA) по сравнению с контрольными сосудами, по сравнению с контрольными сосудами, на которые наносили только плуронический гель, через 4 суток после операции

Аннотация гена	Номер в генбанке	uPA		tPA		Группа
		0,03	↑	0,03	↑	
Специфический белок мозга (RB109)	D26154	0,03	↑	0,03	↑	Нет данных
Аденилилциклаза тип V (белок активирующий ГТФазу)	M96159	0,02	↑	0,01	↑	Нет данных
Альфа-растворимый NSF связывающий белок	X89968	0,04	↑	0,01	↑	Нет данных
Предшественник сериновой протеиназы rPC7	U36580	0,04	↓	0,01	↓	миграция/воспаление

Полученные результаты доказывают, что урокиназа и тканевой активатор плазминогена воздействуют на экспрессию разных генов и активируют разные сигнальные пути, что и определяет различия в их эффектах на ремоделирование сосудистой стенки.

Дальнейший анализ полученных данных может помочь получить представления о внутриклеточных сигнальных каскадах, активируемых активаторами плазминогена в клетках сосудистой стенки, что будет способствовать более глубокому пониманию молекулярных механизмов действия активаторов плазминогена в сосудистой стенке. Полученные в работе результаты позволяют определить новые мишени для возможной терапевтической коррекции неблагоприятной структурной перестройки артерий при патологиях [260]. Данные о противоположном влиянии активаторов плазминогена на рост неоинтимы могут служить основой для разработки подходов к предотвращению развития рестенозов на основании использования ингибиторов урокиназы, например, для включения их в биополимерное покрытие внутрисосудистых стентов, при использовании которых развитие рестенозов сопряжено именно с пролиферацией неоинтимы.

### **3.2.8. Влияние урокиназы на протеолитический каскад при ремоделировании стенки сосуда**

Во многих работах показана связь между ремоделированием сосудов и экспрессией матриксных металлопротеиназ, прежде всего ММП-2 и ММП-9, осуществляющих деградацию внеклеточного матрикса [10, 107, 304]. Показано также наличие тесного функционального взаимодействия систем активаторов плазминогена и ММП [65, 361]. Мы исследовали, связаны ли наблюдаемые различия в эффектах тканевого и урокиназного активаторов плазминогена на ремоделирование сосудистой стенки с их влиянием на экспрессию и активацию ММП-2 и ММП-9 в баллонированных сонных артериях крысы.

*Урокиназа и экспрессия матриксных металлопротеиназ в поврежденной  
сосудистой стенке*

В неповрежденном сосуде специфическое окрашивание на ММП-2 было невыраженным и отмечалось только в меди, а окрашивание на ММП-9 не выявлялось. На вторые сутки после баллонирования в контрольных сосудах интенсивность иммуногистохимического окрашивания на ММП-2 в меди увеличивалась и еще больше возрастала на четвертые сутки. В клетках развивающейся неоинтимы на 4-е сутки также определялось окрашивание на ММП-2. Иммуногистохимическое окрашивание на ММП-9 было выявлено на 2-е и 4-е сутки после нанесения чистого геля, но было менее интенсивным, чем окрашивание на ММП-2 (таблица 9).

Таблица 9 – Влияние активаторов плазминогена на экспрессию матричных металлопротеиназ в сонной артерии крысы после экспериментальной баллонной ангиопластики

	Неповрежденная артерия	2 сут			4 сут					
		Медия			Медия			Неоинтима		
		Контроль	uPA	tPA	Контроль	uPA	tPA	Контроль	uPA	tPA
<b>ММП-2</b>	1,25 ±	2,5 ±	3,75 ±	2,0 ±	2,75 ±	3,75 ±	1,75 ±	2,75 ±	3,5 ±	1,75 ±
	0,25	0,3	0,25*	0,4	0,25	0,25*	0,25*	0,25	0,3*	0,25*
<b>ММП-9</b>	0	1,5 ±	2,5 ±	1,5 ±	1,75 ±	2,75 ±	1,5 ±	1,75 ±	2,75 ±	1,5 ±
		0,3	0,3*	0,25	0,25	0,25*	0,3	0,25	0,25*	0,3

*Примечание:* Содержание ММП -2 и ММП-9 на 2-е и 4-е сутки после баллонирования и нанесения урокиназы или тканевого активатора плазминогена. Контроль – нанесение чистого геля. Выраженность экспрессии антигенов оценивали в условных единицах: 0 - отсутствие антигена, 1 - слабое или непостоянное окрашивание, 2 - 4 - постоянное окрашивание разной степени интенсивности. В каждой группе минимум 4 животных (\* p < 0.05 по сравнению с контролем)

В сосудах, на которые после баллонирования наносили урокиназу, интенсивность окрашивания на ММП-2 и на 2-е, и на 4-е сутки была значительно



выше во всех слоях сосудистой стенки по сравнению с контрольными сосудами, что свидетельствовало об увеличении содержания этой матричной металлопротеазы под влиянием урокиназы (рисунок 38).

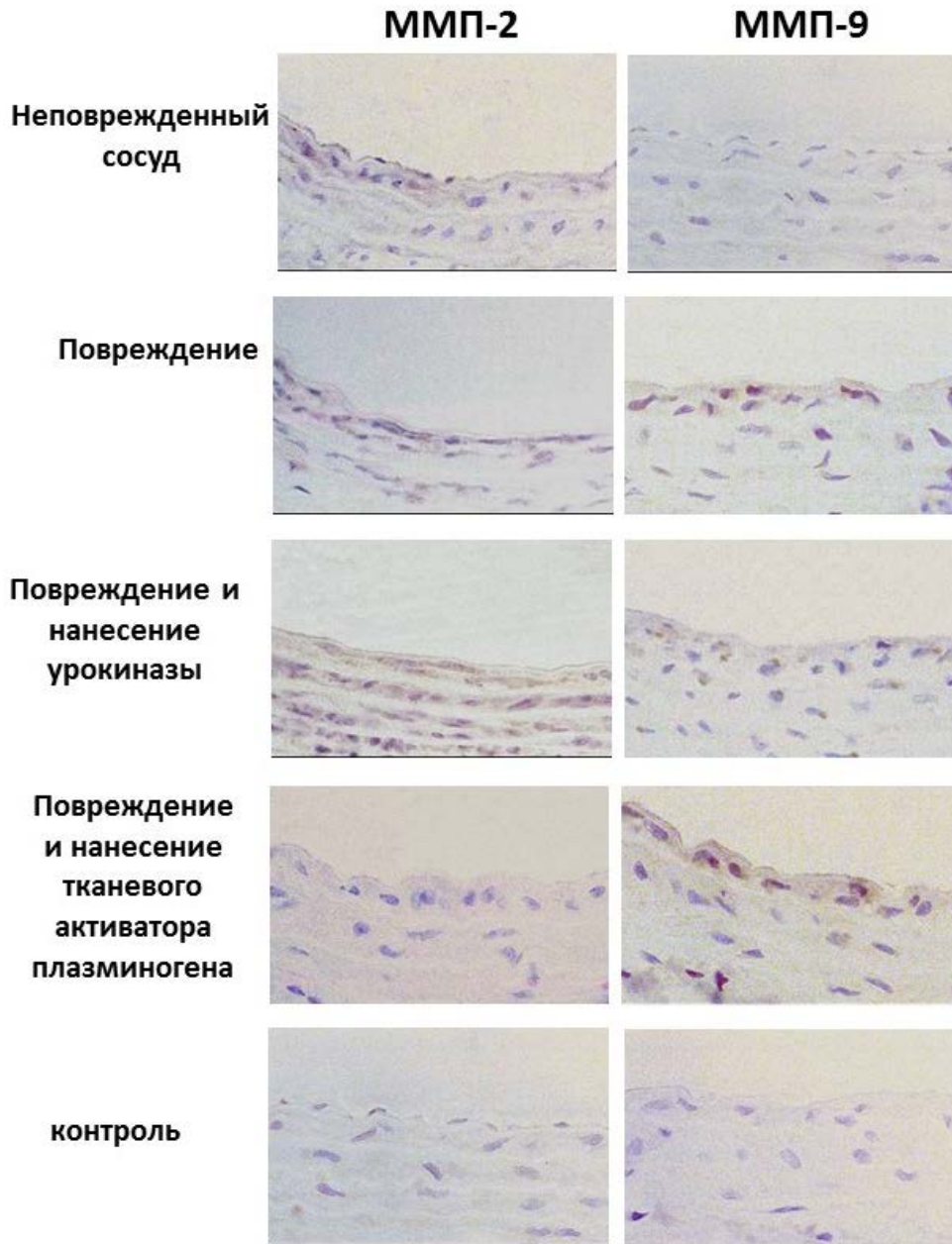


Рисунок 38 – Типичные микрофотографии иммуногистохимического окрашивания на ММП -2 и ММП-9 срезов сонной артерии крысы после баллонирования и нанесения урокиназы или тканевого активатора плазминогена на 2-е сутки. Контроль – неиммунные иммуноглобулины

После нанесения тканевого активатора плазминогена, напротив, интенсивность окрашивания на ММП-2 снижена по сравнению с контролем. Содержание ММП-9 также было больше в сосудах, на которые был нанесен урокиназный активатор плазминогена.

Таким образом, мы показали, что периадвентициальное нанесение рекомбинантной урокиназы в плуроническом геле на поврежденную артерию увеличивало содержание матриксных металлопротеаз ММП-2 и ММП-9 на 2-е и 4-е сутки после баллонирования. Нанесение тканевого активатора плазминогена не вызывало возрастания экспрессии ММП, напротив, отмечалась тенденция к снижению интенсивности окрашивания на ММП-2 в медиі по сравнению с контролем.

Для подтверждения этих результатов мы исследовали активность матриксных металлопротеиназ в белковых экстрактах сосудов с помощью зимографии. На 2-е сутки после баллонирования в экстрактах сонных артерий детектировалась неактивная ММП-2 и не детектировалась активная форма, которая появлялась в контрольных сосудах только на 4-й день. Количество неактивной ММП-2 на 2-й день было выше в 2 раза в лизатах артерий, на которые наносили урокиназу. На 4-е сутки это различие было выражено меньше (+30% по сравнению с контролем), однако активной формы ММП-2 было больше при нанесении урокиназы. Тканевой активатор плазминогена существенного влияния на количество активной и неактивной ММП-2 не оказывал, за исключением небольшого уменьшения количества неактивной ММП-2 на 2-й день после баллонирования (рисунок 39).

Активность ММП-9 не определялась в экстрактах неповрежденных сосудов и на 2-е сутки после повреждения и появлялась только на 4-е сутки. Содержание неактивной формы ММП-9 было одинаковым во всех группах. В то время как содержание активной формы было достоверно выше в сосудах, на которые была нанесена урокиназа, по сравнению с сосудами на которые был нанесен tPA или гель. Данные зимографии показывают, что увеличение содержания активной урокиназы в сосуде после баллонирования приводит к увеличению количества

активных форм ММП-2 и ММП-9, а также увеличивает количество неактивной ММП-2. В тоже время тканевой активатор плазминогена подобного эффекта не оказывает.

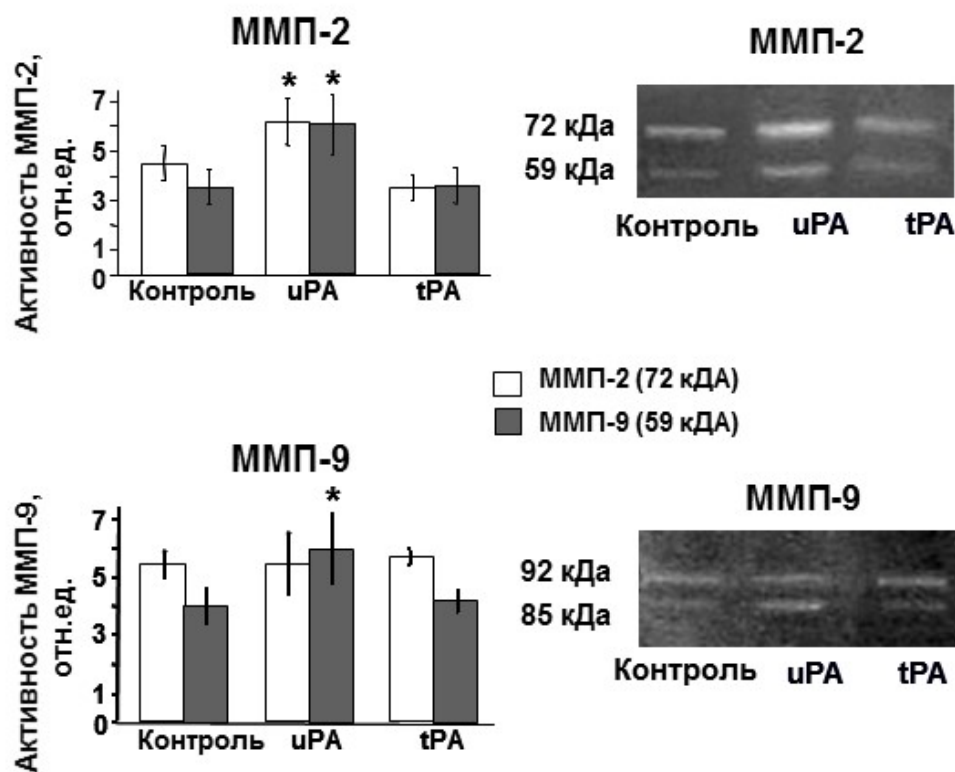


Рисунок 39 – Влияние активаторов плазминогена на активность ММП-2 и ММП-9 в поврежденных сонных артериях на четвертые сутки после экспериментального баллонирования (Обозначения: Белые столбики – неактивные формы ММП-2 и ММП-9. Серые столбики – активные формы ММП-2 и ММП-9. \*  $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой. В каждой группе минимум 6 животных. Справа даны примеры зимограмм. Видно, что значительно урокиназа увеличивала активность ММП-2 и в меньшей степени ММП-9)

Ранее было показано влияние урокиназы на уровень мРНК ММП-9 в клетках линий моноцитов [402]. Увеличение количества неактивной ММП-2 в сосудах под влиянием урокиназы и, напротив, ее уменьшение под влиянием tPA позволяет предполагать, что оба активатора плазминогена могут действовать на экспрессию этой металлопротеиназы. Для проверки этого предположения мы

исследовали содержание в лизатах баллонированных сосудов мРНК ММП-2 и ММП-9 с помощью полимеразной цепной реакции (рисунок 40).

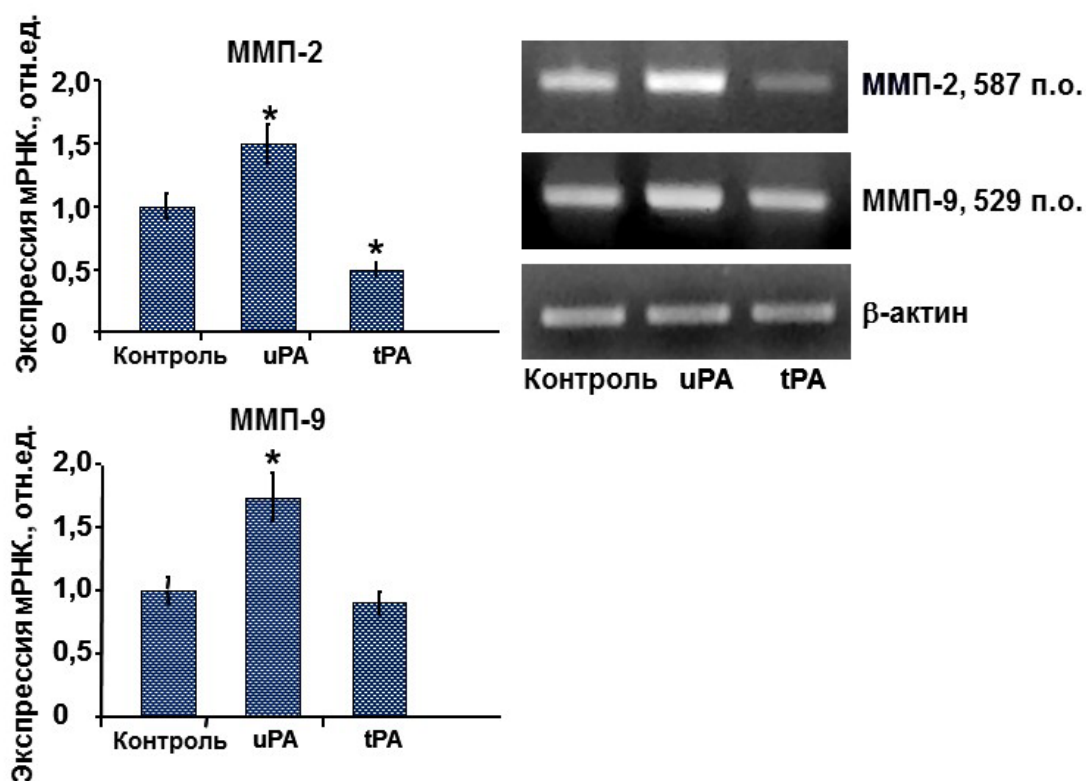


Рисунок 40 – Влияние активаторов плазминогена на экспрессию мРНК матриксных металлопротеиназ 2 и 9 в сонных артериях после баллонирования (Обозначения: \*  $p < 0,05$  – по сравнению с контролем, в каждой группе минимум 6 животных)

Было обнаружено, что и на вторые и на четвертые сутки количество мРНК ММП-2 в сосудах, на которые наносили урокиназу, увеличено, а в сосудах, на которые наносили tPA, отмечалась тенденция к уменьшению мРНК ММП-2 по сравнению с контрольными сосудами. Небольшое увеличение мРНК ММП-9 также обнаружено в лизатах сосудов при нанесении урокиназы. Эти данные позволяют предполагать, что урокиназа и tPA либо прямо, либо опосредовано влияют на экспрессию мРНК ММП-2. Причем это влияние разнонаправленное.

Обобщая полученные данные, можно заключить, что урокиназный и тканевой активаторы плазминогена оказывают разное влияние на активацию и

экспрессию матричных металлопротеиназ – ММП-2 и ММП-9, после повреждения сосуда. Так, увеличение концентрации урокиназы в участке баллонирования артерии увеличивает содержание ММП-2 и ее активной формы, а также активной формы ММП-9 на ранних этапах после повреждения. Противоположно урокиназе возрастание концентрации активатора плазминогена тканевого типа подавляет экспрессию ММП-2 и не оказывает влияния на образование активных форм ММП-2 и ММП-9.

Мы полагаем, что урокиназный и тканевой активаторы плазминогена оказывают влияние на ремоделирование артерий, регулируя разные процессы [21]. Так, урокиназа индуцирует сужение просвета артерии, утолщение неоинтимы и констриктивное негативное ремоделирование, вероятно, стимулируя деление клеток, накопление клеток моноцитарного ряда и синтез и активацию ММП в сосудистой стенке. Каковы механизмы, обеспечивающие замедление формирования неоинтимы и положительное ремоделирование на ранних сроках после повреждения артерии под действием тканевого активатора плазминогена, остается неясным.

*Урокиназа и экспрессия матричных металлопротеиназ при разных типах ремоделирования артерий*

Клинические исследования показали, что констриктивное ремоделирование и увеличение толщины интимы и меди сонных артерий ассоциированы с худшим прогнозом у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями [32, 364]. Кроме того, было обнаружено, что варианты ремоделирования артерий обусловлены генетически [160, 171]. В ходе предыдущих этапов исследования мы выявили, что под действием урокиназы толщина интимы и меди в поврежденных артериях возрастает. Тогда как второй активатор плазминогена – тканевого типа подавлял рост неоинтимы. Для уточнения роли урокиназного и тканевого активаторов плазминогена, а также ММП в регуляции ремоделирования сосудов и их влияния на суммарную толщину интимы и меди как показателя ремоделирования мы оценили экспрессию этих белков в сосудах мышей инбредных линий, которые характеризуются генетически

детерминированными разными типами ремоделирования при изменении тока крови [206]. Исследование было проведено именно на данной модели, так как у мышей линий FVB и C57Bl частичная перевязка сонной артерии и снижение кровотока увеличивают толщину интимы и меди и вызывают определенное генетически геометрическое ремоделирование разных типов [165].

*Морфология сонных артерий и гемодинамические параметры у мышей инбредных линий*

Кровоток в левой сонной артерии был снижен с помощью перевязки ее ветвей (внутренней и наружной) по данным ультразвуковой флоуметрии (Transonic Systems). У животных обеих линий изменения веса и гемодинамических параметров, включая систолическое давление через 1, 2 и 4 недели после процедуры снижения кровотока достоверно не отличались, в том числе у ложноперирированных животных обеих групп.

До операции кровотоки у животных обеих линий были одинаковыми. После операции кровотоки в левых сонных артериях снижались примерно на 90 % обеих группах (таблица 10).

Таблица 10 – Кровоток в левой общей сонной артерии у животных линий FVB и C57Bl через 1, 2 и 4 недели после операции снижения кровотока

		<b>Кровоток мл/мин</b>
<b>Исходно</b>	<b>C57Bl</b>	0,57± 0,04
	<b>FVB</b>	0,47± 0,03
<b>1 нед</b>	<b>C57Bl</b>	0,06± 0,02 *
	<b>FVB</b>	0,07± 0,03 *
<b>2 нед</b>	<b>C57Bl</b>	0,05± 0,01 *
	<b>FVB</b>	0,12± 0,04 *
<b>4 нед</b>	<b>C57Bl</b>	0,13± 0,06 *
	<b>FVB</b>	0,10± 0,06 *

\* p<0,05 в сравнении с ложноперирированными мышами

Индуктором ремоделирования сосудов на данной модели является изменение в напряжении сдвига [132]. У животных обеих линий напряжение сдвига было идентичным исходно и эквивалентно менялось после процедуры снижения кровотока, уменьшаясь на 12–16% в левых общих сонных артериях и увеличиваясь в правых общих сонных артериях.

Несмотря на сходство изменений гемодинамических параметров у животных обеих групп, отмечались выраженные различия в изменениях структуры артерий (рисунок 41).

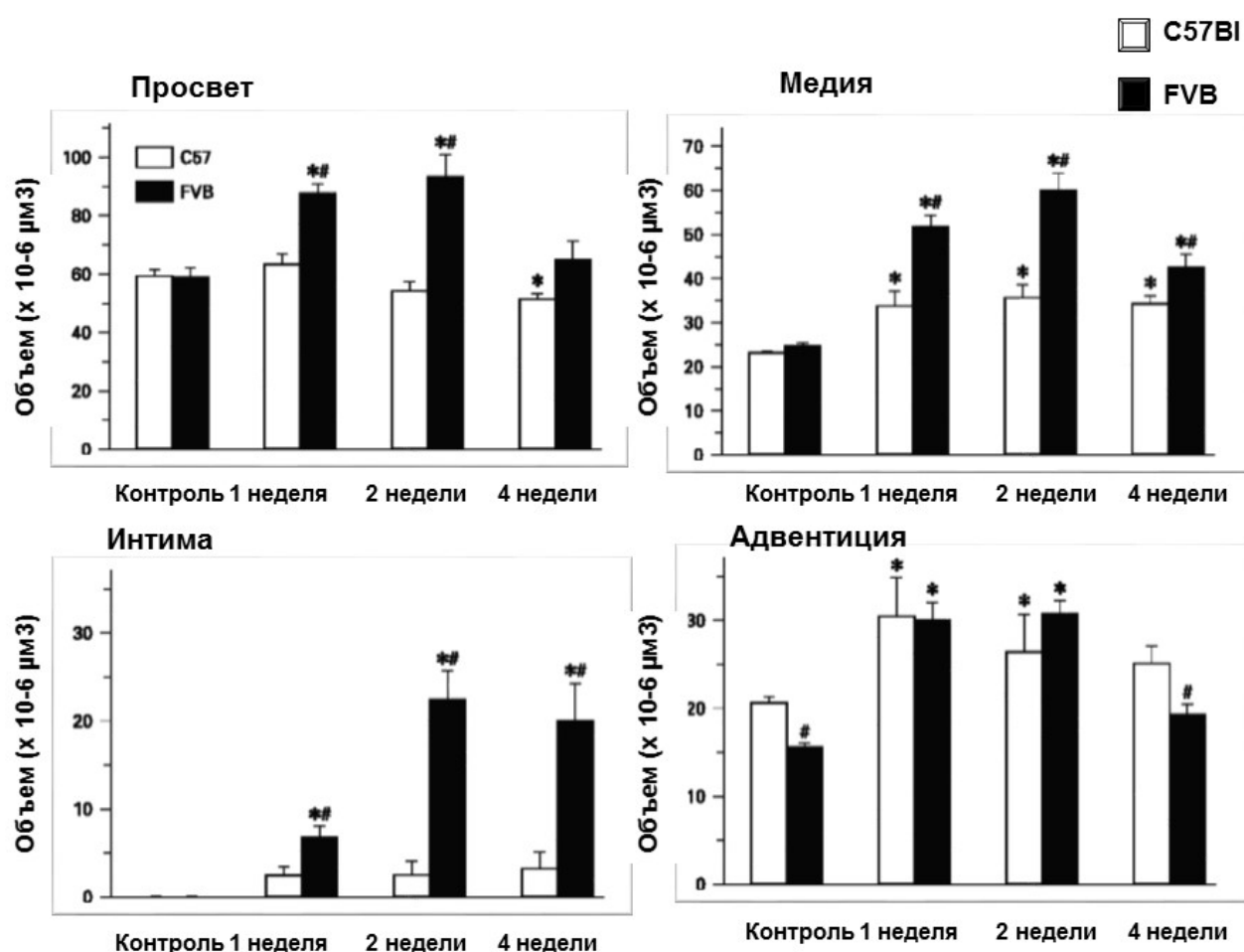


Рисунок 41 – Изменения морфологии левых сонных артерий инбредных мышей C57Bl и FVB после частичной перевязки левой сонной артерии (Обозначения: \*  $p < 0,05$  по сравнению с контролем; #  $p < 0,05$  по сравнению с C57Bl. В каждой группе не менее 6 животных)

Объем интимы левой сонной артерии у инбредных животных линии FVB после операции возрастал, становился максимальным через две недели и оставался увеличенным через четыре недели (рисунок 41). Объем меди и адвентиции у этих животных тоже увеличивался через 1 и 2 недели и уменьшался через 4 недели. При этом у животных C57Bl объем интимы оставался неизменным, объем меди возрастал, но в меньшей степени, чем в группе FVB, а объем адвентиции, как и у животных FVB, увеличивался (рисунок 41). При оценке одного из показателей ремоделирования – общего объема интимы и меди левой сонной артерии, мы обнаружили, что в группе FVB он был почти в 7 раз выше, чем в группе C57Bl,  $3,6 \pm 0,4 \times 10^{-7} \mu\text{m}^3$  и  $0,5 \pm 0,3 \times 10^{-7} \mu\text{m}^3$ , соответственно,  $p < 0,001$ ). Просвет левой сонной артерии в ответ на увеличение объемов слоев сосудистой стенки компенсаторно увеличивался в группе FVB через 1 и 2 недели после частичного лигирования ветвей артерии, а через 4 недели уменьшался и достоверно не отличался от просвета в контрольной группе (рисунок 41). В то же время в группе C57Bl просвет артерии со сниженным кровотоком несмотря на отсутствие утолщения интимы значительно уменьшался к 4 неделе после операции.

Другой важный показатель ремоделирования артерий – объем области, описываемой НЭМ, включающий объемы просвета, интимы и меди, в левых сонных артериях животных FVB достоверно увеличивался и становился максимальным через 2 недели после частичного лигирования ветвей артерии, тогда как в группе C57Bl он увеличивался значительно меньше ( $18 \times 10^{-5} \mu\text{m}^3$  и  $9 \times 10^{-5} \mu\text{m}^3$ , соответственно) по сравнению с контролем –  $8 \times 10^{-5} \mu\text{m}^3$ . Изменения этого показателя дополнительно подтверждают положительное ремоделирование левой сонной артерии у животных линии FVB. Важно, что у животных C57Bl наряду с отсутствием компенсаторного ремоделирования происходил значительный рост адвентиции, даже несколько превосходивший таковой у FVB на 7-й день после операции, что может отражать механизм, препятствовавший расширению просвета.



Объемы слоев правой общей сонной артерии достоверно не менялись, тогда как просвет артерии достоверно увеличивался через 1 неделю после операции и затем значимо не менялся в обеих группах животных (данные не представлены).

Чтобы определить взаимосвязь между двумя важнейшими показателями ремоделирования артерии: суммарным объемом интимы и меди и объемом, описываемым НЭМ, мы провели анализ корреляции между этими показателями (рисунок 42).

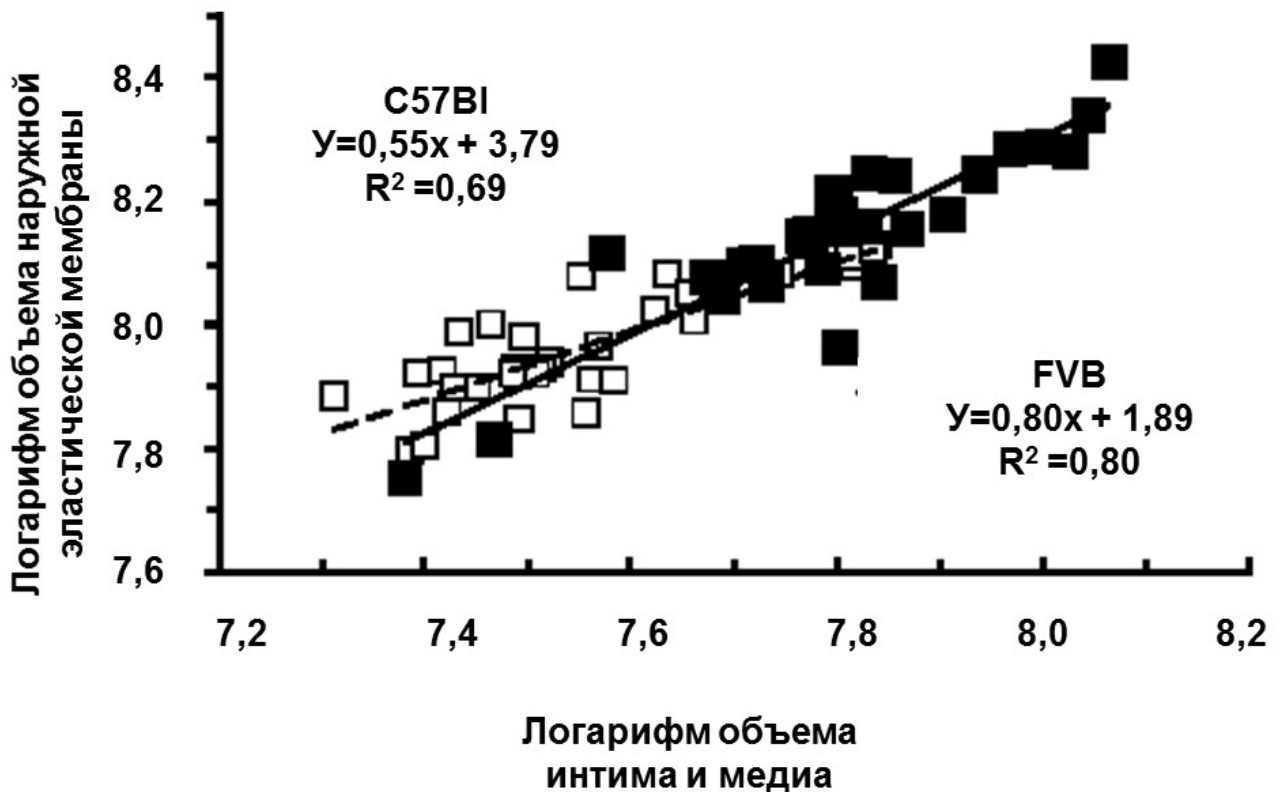


Рисунок 42 – Анализ корреляции между суммарным объемом интимы и меди и объемом области, описываемой НЭМ, в левой сонной артерии инбредных мышей после частичного лигирования ее ветвей (Обозначения: Группа FVB (n=31) показана черным цветом и сплошной линией; группа C57Bl (n=32) – белым цветом и прерывистой линией. Линии показывают линейную регрессию в группах)

Мы обнаружили достоверную корреляцию между суммарным объемом интимы и меди и объемом, описываемым НЭМ, что подтверждает ключевую роль увеличения толщины интимы и меди для ремоделирования сосудов. Тот

факт, что наклон прямой линейной регрессии был меньшим в группе C57Bl, чем в группе FVB (рисунок 42), позволяет предположить, что артерии животных линии C57Bl менее чувствительны к изменениям объема интимы и меди и менее предрасположены к компенсаторному положительному ремоделированию.

*Лейкоцитарная инфильтрация, деление клеток и ремоделирование артерий при снижении кровотока*

Для уточнения механизмов, обуславливающих разные типы ремоделирования артерий у мышей инбредных линий, мы определили количество делящихся клеток с помощью маркера Ki-67 и лейкоцитов с помощью маркера CD45 в сосудистой стенке артерий на модели снижения кровотока у животных линий FVB и C57Bl.

В левых сонных артериях животных обеих групп пролиферация клеток достоверно возрастала через 1 неделю после операции, оставалась умеренно повышенной через 2 недели и через 4 недели возвращалась к исходному уровню в группе FVB, а в группе C57Bl оставалась повышенной (рисунок 43). При этом, число делящихся клеток на пике пролиферации было достоверно больше в артериях мышей линии FVB, чем C57Bl.

Инфильтрация CD45-позитивными клетками лейкоцитарного ряда возрастала до максимума через 1 неделю после операции и оставалась умеренно повышенной через 2 недели и 4 недели в группах животных обеих линий. Количество лейкоцитов, инфильтрирующих сосудистую стенку в группе FVB было достоверно больше, чем в группе C57Bl.

В правых общих сонных артериях пролиферация клеток и инфильтрация клетками лейкоцитарного ряда не увеличивались в обеих группах.

Итак, ремоделирование сосудистой стенки в ответ на ограничение кровотока сопровождается усиленным делением клеток и аккумуляцией лейкоцитов через 1 неделю после операции, которые сохраняются до 4 недели после вмешательства. При этом оба процесса достоверно более интенсивны у животных линии FVB, чем у животных линии C57Bl, что позволяет предположить причинно-следственную взаимосвязь между лейкоцитарной инфильтрацией,

пролиферацией клеток и увеличением толщины интимы и меди, а значит отчасти и типом ремоделирования артерий при снижении кровотока.

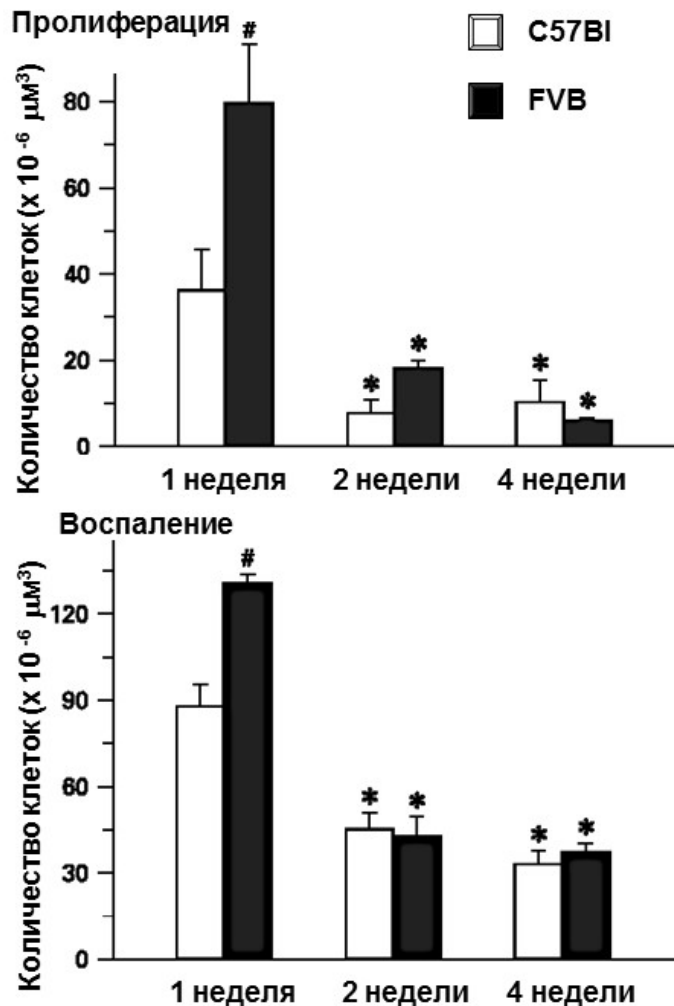


Рисунок 43 – Оценка пролиферации клеток по общему числу клеток, экспрессирующих Ki-67 и воспаления по общему числу лейкоцитов, экспрессирующих CD45, в интима и меди левой общей сонной артерии мышей инбредных линий после частичного лигирования ее ветвей (*Обозначения: \* p < 0,05 по сравнению с C57Bl. В каждой группе не менее 6 животных*)

*Активаторы плазминогена и ММП и ремоделирование артерий при снижении кровотока*

Мы оценили экспрессию тканевого и урокиназного активаторов плазминогена и ММП при разных типах ремоделирования артерий в общих сонных артериях животных обеих инбредных линий после процедуры снижения

кровотока. Оценку интенсивности иммунохимического окрашивания на трех срезах каждой артерии проводили полуколичественно.

Мы обнаружили, что динамика экспрессии тканевого активатора плазминогена значительно различалась в группах линий с разными типами ремоделирования.

В группе C57Bl после процедуры снижения кровотока его экспрессия во всех слоях стенки артерии была выражена слабо на всех сроках, тогда как у животных линии FVB экспрессия тканевого активатора плазминогена в умеренно возрастала через 7 дней после операции, становилась максимальной через 14 дней и несколько снижалась к четвертой неделе (таблица 11).

Динамика экспрессии урокиназы также была различной у этих двух линий мышей. В группе C57Bl после процедуры снижения кровотока ее экспрессия в интимае и медиэ значительно возрастала через 7 дней и снижалась в более поздние сроки, совпадая с динамикой пролиферации и лейкоцитарной инфильтрации в стенке артерии (рисунок 43). В то же время у животных линии FVB экспрессия урокиназы возрастала и оставалась высокой на всех сроках.

На рисунке 44 представлены микрофотографии типичного иммуногистохимического окрашивания срезов на активаторы плазминогена в левых сонных артериях животных линий C57Bl и FVB через 2 недели после операции снижения кровотока.

В интимае и медиэ животных FVB видна повышенная экспрессия тканевого активатора плазминогена и по данным морфометрии именно к 14 дню происходило максимальное компенсаторное расширение просвета артерии.

Таблица 11 – Выраженность экспрессии активаторов плазминогена (tPA и uPA), матриксных металлопротеиназ (ММП) и их ингибитора (TIMP-2) в левой сонной артерии мыши после процедуры снижения кровотока в интима и меди

	tPA			uPA			ММП-2			ММП-9			TIMP-2		
	7	14	28н	7	14	28	7	14	28	7	14	28	7	14	28
<b>Дни после операции</b>	7	14	28н	7	14	28	7	14	28	7	14	28	7	14	28
<b>C57Bl</b>	1+	1+	1+	3+	1+	1+	3+	3+	2+	3+	2+	2+	2+	3+	1+
<b>FVB</b>	2+	4+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	2+	3+	2+	2+	3+	3+	0

У животных с обоими типами ремоделирования динамика изменений экспрессии урокиназы по данным иммуногистохимии совпадала с таковой роста суммарного объема интимы и меди и была максимальной через 7 дней после вмешательства (рисунок 45), что позволяет предположить возможное участие урокиназы в развитии этого процесса. Кроме того, была показана корреляция между суммарным объемом интимы и меди и экспрессией урокиназы (рисунок 46).

Динамика экспрессии тканевого активатора плазминогена в стенке артерии после снижения кровотока была сходной по времени с динамикой изменений просвета артерии и объема области, описываемой наружной эластической мембраной. Максимум его экспрессии в левой сонной артерии совпадал с наибольшим расширением просвета и увеличением объема внутри наружной эластической мембраны через 14 дней после процедуры снижения кровотока (рисунок 41), что может указывать на участие тканевого активатора плазминогена в регуляции положительного ремоделирования артерий, ведущего к расширению просвета сосуда.

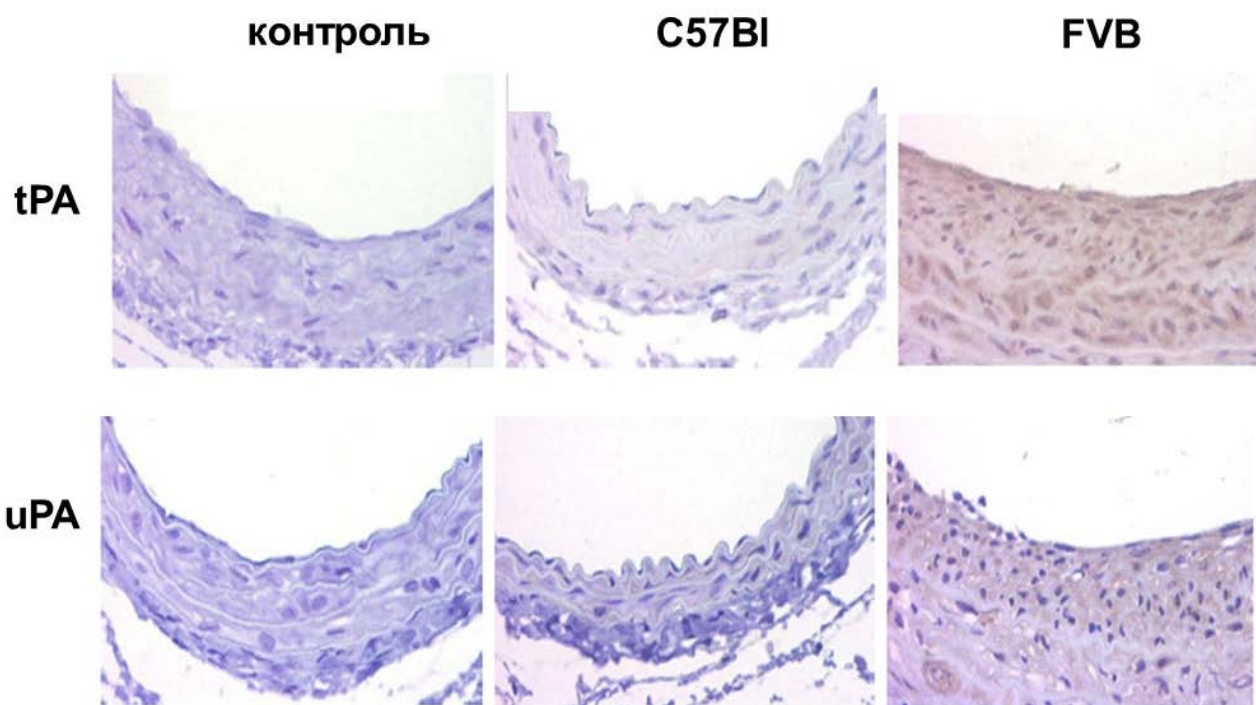


Рисунок 44 – Экспрессия тканевого и урокиназного активаторов плазминогена по данным иммуногистохимии в стенке артерии при снижении кровотока у мышей двух линий C57Bl и FVB через 2 недели после операции (Обозначения: Увеличение x40. Контроль – неиммунные иммуноглобулины)

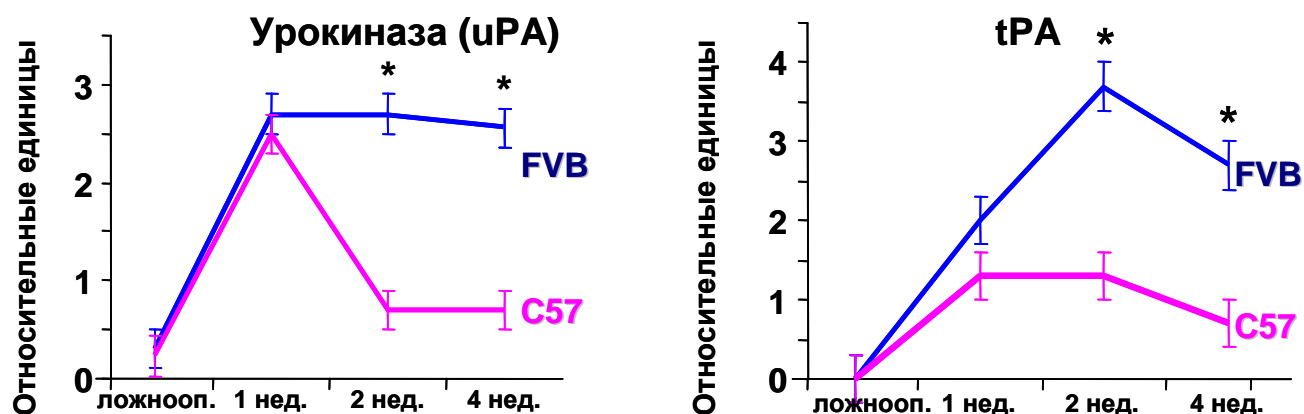


Рисунок 45 – Динамика содержания активаторов плазминогена (tPA и uPA) по данным иммуногистохимии в интима и меди левої сонной артерии мышей после частичного лигирования ее ветвей (Обозначения: Данные представлены в условных единицах в зависимости от выраженности окрашивания от 1 до 4. \*  $p < 0,05$  по сравнению с C57Bl. В каждой группе не менее 6 животных)

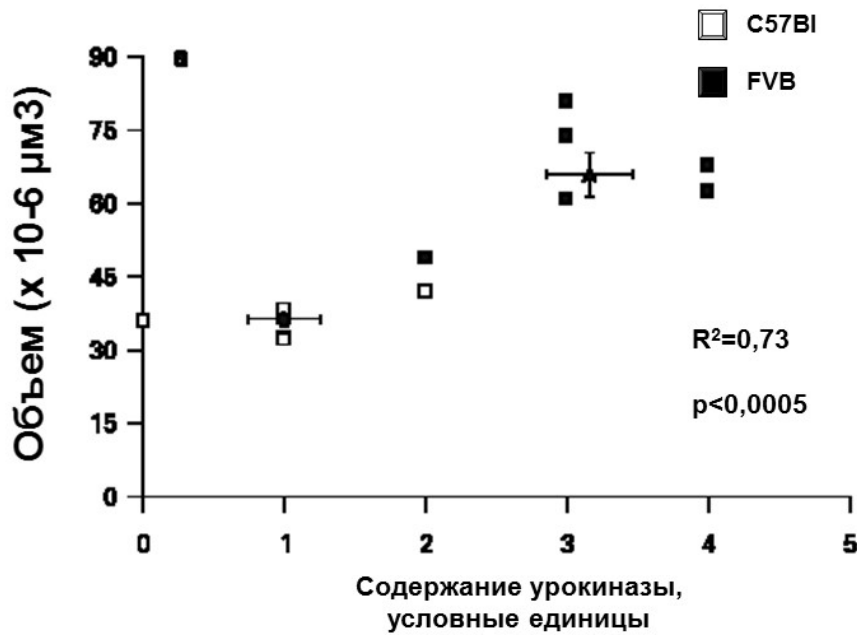


Рисунок 46 – Анализ корреляции между суммарным объемом интимы и меди и экспрессией урокиназы по данным иммуногистохимии в левой сонной артерии инбредных мышей после частичного лигирования ее ветвей (*Обозначения:* Группа FVB показана черным цветом; группа C57Bl – белым цветом. В каждой группе не менее 6 животных)

Мы исследовали также динамику экспрессии белков системы матриксных металлопротеиназ (ММП-2, ММП-9 и их ингибитора TIMP-2), которые принимают участие в регуляции процессов перестройки сосудистой стенки [304]. Через 1 неделю после процедуры снижения кровотока экспрессия ММП-2 и ММП-9 возрастала в левой общей сонной артерии, а через 4 недели снижалась у животных FVB и C57Bl. Динамика была сходной у животных обеих инбредных линий (таблица 11). Динамика экспрессии ингибитора ММП – TIMP-2 повышалась через 1 и 2 недели после вмешательства и снижалась у животных и линии C57Bl, и FVB. Достоверных различий в динамике экспрессии белков системы матриксных металлопротеиназ выявлено не было.

Таким образом, частичное лигирование ветвей общей сонной артерии и снижение кровотока, индуцирует разные клеточные ответы и типы ремоделирования артерий у мышей инбредных линий C57Bl и FVB. При этом

динамика изменений экспрессии урокиназы в стенке артерии после снижения кровотока совпадает во времени с динамикой роста суммарного объема интимы и меди, а выраженность экспрессии урокиназы коррелирует с суммарным объемом интимы и меди, что указывает на возможное участие урокиназы в процессах роста интимы и меди [2, 350]. Кроме того, максимум пролиферации и воспалительной инфильтрации также приходился на 7-й день после операции одновременно с максимумом экспрессии урокиназы. В то же время динамика экспрессии тканевого активатора плазминогена схожа по времени с динамикой изменений просвета артерии и объема области внутри наружной эластической мембраны, что свидетельствует о возможном участии тканевого активатора плазминогена в процессах положительного ремоделирования артерий и расширения просвета сосуда. Развитие ремоделирования обоих типов сопровождается повышением экспрессии матриксных металлопротеиназ и их ингибитора, что подтверждает их вовлеченность в процессы перестройки сосудистой стенки.

#### *Влияние урокиназы на экспрессию ММП-9 в фибробластах*

На предыдущем этапе мы показали, что урокиназа способна стимулировать активность ММП-2 и ММП-9 в стенке поврежденной артерии *in vivo*. Ранее было показано, что урокиназа повышает экспрессию ММП-9 в клетках линий моноцитов [402]. Учитывая важную роль фибробластов адвентиции и ее структурной перестройки, для которой необходимы ММП, было важно прояснить, какое влияние оказывает урокиназа на экспрессию ММП в фибробластах. Последние исследования показали, что активные формы кислорода (АФК) могут иметь ключевое значение и для регуляции экспрессии ММП [249, 298]. В связи с вышеизложенным было изучено влияние урокиназы на активность ММП-9 в сопоставлении с образованием АФК.

Инкубация фибробластов в присутствии 100 нМ урокиназы в течение 1 часа вызывала усиление генерации активных форм кислорода, оцениваемое по флюоресценции гидроэтидина (рисунок 47). Аналогичный эффект наблюдался



также на фоне стимуляции клеток воспалительным цитокином и индуктором оксидативного стресса, фактором некроза опухолей-альфа (TNF-alpha).

Поскольку матриксные металлопротеиназы являются значимыми участниками ремоделирования сосудистой стенки, а экспрессия ММП-9 существенным образом зависит от генерации активных форм кислорода [298], далее было исследовано возможное влияние урокиназы на активность ММП в культивируемых фибробластах. Урокиназа (100 нМ) умеренно стимулировала активность ММП-9 в фибробластах (рисунок 48, левая панель). Активность ММП-2 была выраженной и не изменялась под действием урокиназы (данные не представлены). При этом, TNF-alpha, мощный стимулятор образования АФК в клетках, стимулировал экспрессию ММП-9. Инкубация с урокиназой на фоне эбселена (3мкМ) (антиоксиданта, ингибирующего активность NADP(H) оксидаз) нивелировала повышение экспрессии ММП-9, что указывает на наличие АФК-зависимого механизма стимуляции экспрессии ММП-9 урокиназой. Инкубация с TNF-alpha на фоне эбселена приводила лишь к частичному подавлению экспрессии ММП-9, что может указывать на наличие также дополнительного механизма стимуляции экспрессии ММП-9 TNF-alpha в фибробластах, не зависящего от АФК.

Генерация активных форм кислорода ( $O_2^{\cdot-}$ ) в клетках осуществляется как благодаря НАД(Ф)Н оксидазам, так и функционированию дыхательной цепи митохондрий [110]. Для оценки вклада дыхательной цепи митохондрий в эти процессы был использован экспериментальный подход, основанный на истощении пула митохондриальной ДНК в процессе обработки клеток бромистым этидием [266]. Мы оценили образование ММП под действием TNF-alpha или урокиназы в фибробластах NIH3T3, предварительно культивированных в присутствии бромистого этидия (фибробласты EtBr250). Как видно на рисунке 48 (правая панель), инкубация с урокиназой не стимулировала образование ММП-9 в этих клетках, что указывает на существенную роль митохондриальных АФК для развития этого эффекта урокиназы в фибробластах. TNF-alpha стимулировал в этих клетках экспрессию ММП-9. В клетках с поврежденным митохондриальным

аппаратом отмечалось менее выраженное образование супероксид-радикала по флуоресценции гидроэтидина (рисунок 47, правая панель), при этом как урокиназа, так и TNF-alpha стимулировали образование АФК в этих клетках.

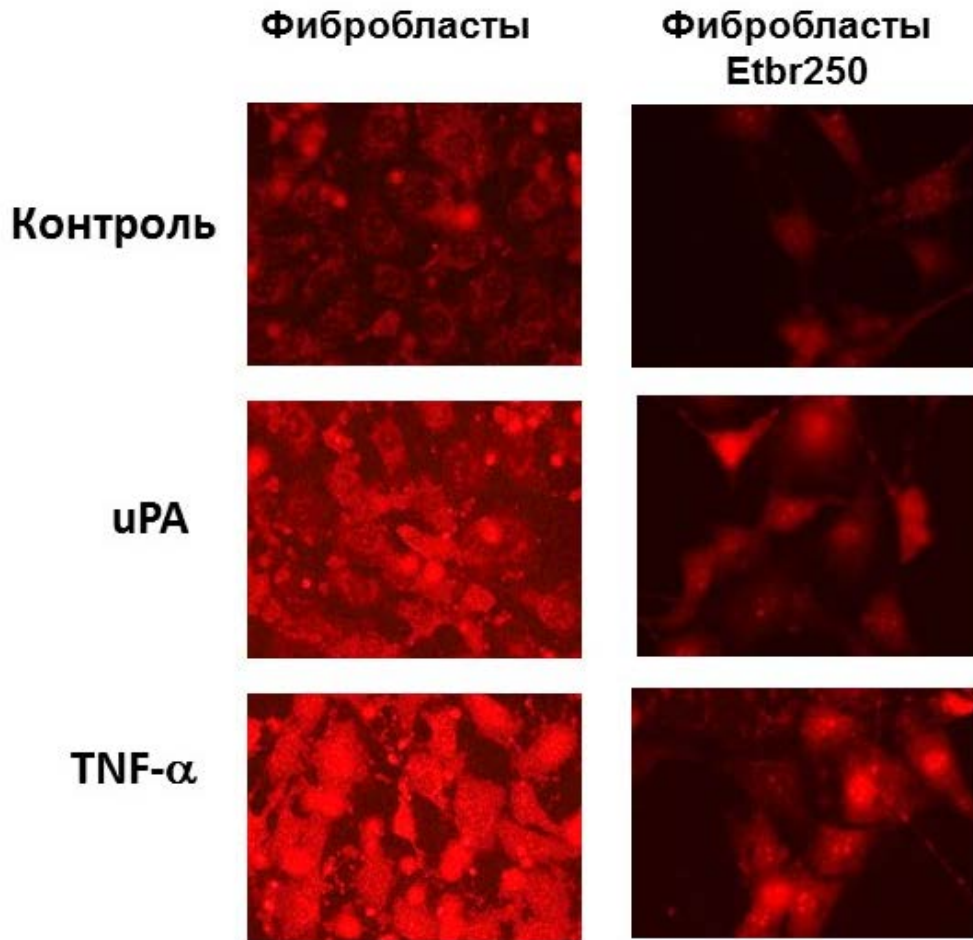


Рисунок 47 – Урокиназа (100 нМ) и фактор некроза опухолей TNF-alpha (50 нг/мл) стимулировали образование супероксид-радикала в культивируемых NIH3T3 фибробластах по флуоресценции гидроэтидина (левая панель). В фибробластах NIH3T3 EtBr250 с поврежденным митохондриальным аппаратом отмечалось менее выраженное образование супероксид-радикала (правая панель). (Обозначения: Представлены типичные микрофотографии для 4 экспериментов. Контроль – фосфатно-солевой буфер равного объема)

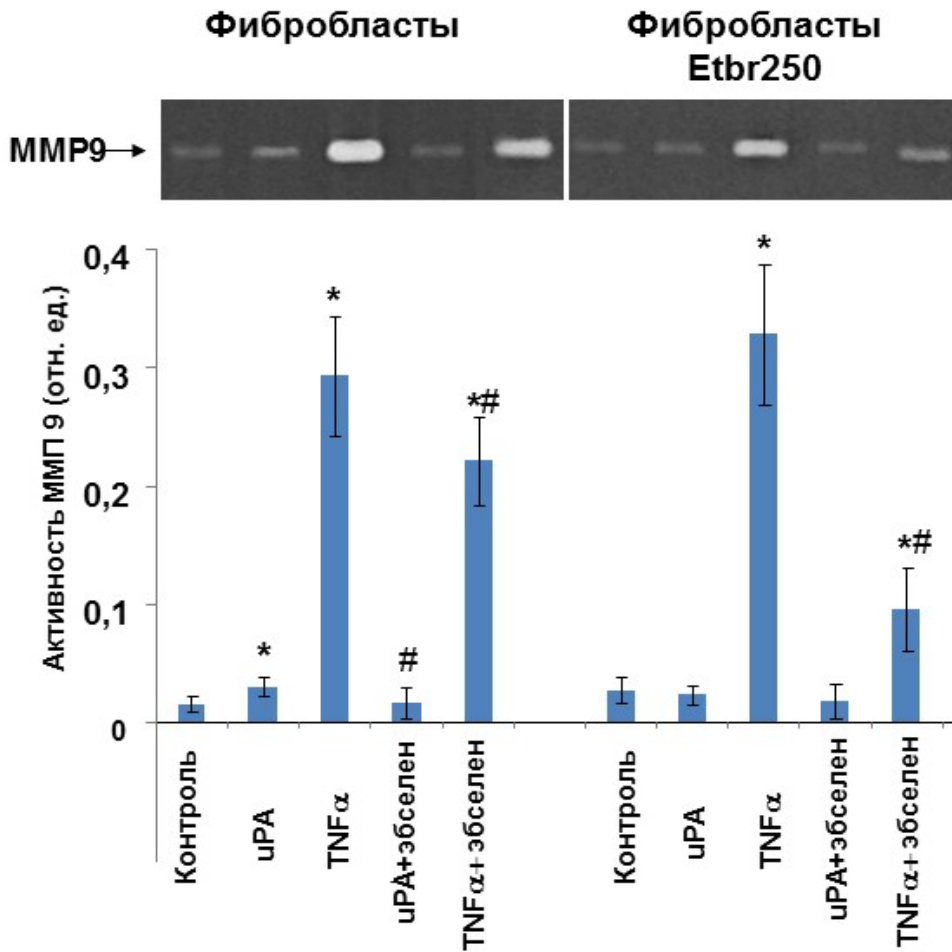


Рисунок 48 – Активность матричной металлопротеиназы 9 (ММП-9) по данным зимографии в культуре NIH3T3 фибробластов и в культуре фибробластов NIH3T3 Etbr250 с поврежденным митохондриальным аппаратом после стимуляции урокиназой (100 нМ) или TNF-alpha (50 нг/мл) в течение 24-х часов, а также при стимуляции на фоне одновременной инкубации с антиоксидантом эбселеном (3 мМ). Контроль – фосфатно-солевой буфер равного объема (Обозначения: Представлены усредненные данные 4 экспериментов. \*  $p < 0,05$  по сравнению с контролем; #  $p < 0,05$  по сравнению с инкубацией с тем же стимулятором без эбселена)

Наши данные хорошо согласуются с результатами работы Arbiser с соавторами, где было показано, что экспрессия ММП-9 в фибробластах зависит от экспрессии НАД(Ф)Н оксидазы пох-1 [298]. Известно, что экспрессия НАД(Ф)Н оксидаз повышается в стенке сосуда, в том числе в адвентиции, при повреждении, воспалении и атеросклерозе и коррелирует с негативным ремоделированием артерии [258]. В поврежденной стенке сосуда стимуляция образования АФК как в

ГМК, так и в фибробластах, а также гиперэкспрессия ММП под действием урокиназы могут способствовать усилению оксидативного стресса, стимуляции миграции и пролиферации клеток, основных процессов констриктивного ремоделирования кровеносных сосудов [19].

### **3.2.9. Урокиназа и воспаление в поврежденной сосудистой стенке**

На предыдущих этапах настоящего исследования мы показали, что активаторы плазминогена принимают участие в процессах ремоделирования сосудистой стенки. В частности, урокиназа и ее протеолитическая активность играют ключевую роль в развитии неоинтимы и сужения просвета артерии после баллонирования сонной артерии. Локальное повышение концентрации урокиназы в стенке баллонированной артерии стимулировало рост неоинтимы, пролиферацию клеток сосудистой стенки и вызывало негативное геометрическое ремоделирование, а также экспрессию матриксных металлопротеиназ. Мы провели дальнейшее изучение участия активаторов плазминогена в ремоделировании сосудистой стенки на модели баллонного повреждения сонной артерии крысы, в частности их влияния на аккумуляцию клеток и лейкоцитарную инфильтрацию, которые важны для развития отрицательного ремоделирования и сужения просвета артерии. На поврежденную баллонным катетером сонную артерию локально наносили активаторы плазминогена в плевроническом геле – рекомбинантную урокиназу или рекомбинантный тканевой активатор плазминогена (актилизу), в контрольной группе наносили плевронический гель.

#### *Активаторы плазминогена, деление клеток сосудистой стенки и моноцитарная инфильтрация*

Чтобы уточнить механизмы ремоделирования артерий под влиянием активаторов плазминогена мы оценили аккумуляцию клеток в слоях сосудистой стенки, включая, число клеток неоинтимы на 4 сутки после баллонирования, отражающее в этот момент миграцию ГМК. Мы также исследовали пролиферацию клеток и инфильтрацию сосудистой стенки моноцитами/макрофагами.

Рекомбинантная урокиназа, нанесенная в плуроническом геле, увеличивала вдвое общее число клеток неоинтимы (таблица 12), на 50% число клеток меди и на 70% – адвентиции по сравнению с контролем. Напротив, рекомбинантный тканевой активатор плазминогена достоверно снижал количество клеток неоинтимы при сравнении с контрольным нанесением чистого геля, при этом не оказывая значимого влияния на число клеток в меди и адвентиции (таблица 12).

Достоверное увеличение пролиферации клеток по сравнению с их значениями в контрольной группе (нанесение чистого геля) было обнаружено в неоинтима животных, на сонные артерии которых наносили урокиназу (таблица 12). Периадвенциальное нанесение активаторов плазминогена существенно не влияло на процент делящихся PCNA–позитивных клеток в меди и адвентиции на 4-е сутки после повреждения (таблица 12).

Таблица 12 – Влияние урокиназы и тканевого активатора плазминогена на деление, общее число клеток и аккумуляцию клеток моноцитарного ряда в поврежденной сонной артерии

	<b>Контроль</b>	<b>uPA</b>	<b>tPA</b>
<b>Неоинтима</b>			
<b>Число клеток</b>	84,7± 8,6	155,9± 33,4*	17,6± 4,9*
<b>PCNA (%)</b>	26,7±1,4	36,9±2,3*	30,0±1,9
<b>ED-1 (%)</b>	17,8±3,5	24,0±4,2	17,0±2,5
<b>Медия</b>			
<b>Число клеток</b>	152,4± 12,9	234,3± 57,6*	193,8± 45,2*
<b>PCNA (%)</b>	21,0±1,9	18,1±1,8	21,9±1,4
<b>ED-1 (%)</b>	12,9±2,1	17,2±3,5	13,5±2,4
<b>Адвентиция</b>			
<b>Число клеток</b>	171,8± 13,8	303,7± 69,7*	233,5± 45,2*
<b>PCNA (%)</b>	28,4±2,8	27,3±3,7	29,5±3,2
<b>ED-1 (%)</b>	25,0±5,2	33,1±4,5*	26,2±6,1

*Примечание:* Общее число клеток, индексы пролиферации (процент PCNA-позитивных клеток) и процент воспалительных (ED-1-позитивных) клеток по данным иммуногистохимии в стенке сонной артерии крысы на 4-е сутки после баллонирования и нанесения в плуроническом геле рекомбинантных урокиназного (uPA) и тканевого (tPA) активаторов плазминогена. Контроль – нанесение чистого геля. В каждой группе было не менее семи животных. \*  $p < 0,05$  по сравнению с контролем

В контрольной группе клетки, позитивные на антиген ED-1 (моноциты/макрофаги), были выявлены на четвертые сутки после баллонного повреждения в неоинтимае, меди и адвентиции (таблица 12). Отмечена тенденция к усиленной инфильтрации неоинтимы моноцитами/макрофагами после нанесения урокиназы.

Нанесение тканевого активатора плазминогена не вызывало изменений, отличающихся от эффектов в контрольной группе. В меди периадвенциальное нанесение активаторов плазминогена не оказывало существенного влияния на процент ED-1 позитивных клеток. В адвентиции, изменения которой считают ответственными за развитие констриктивного ремоделирования, моноцитарная инфильтрация была достоверно более выраженной в группе, где наносили урокиназу. Нанесение тканевого активатора плазминогена не индуцировало увеличения инфильтрации адвентиции воспалительными клетками по сравнению с контролем (таблица 12).

*Влияние активаторов плазминогена на экспрессию воспалительных факторов в стенке поврежденной артерии в ранние сроки после баллонирования*

Привлечение в сосуд моноцитов может быть одним из механизмов влияния урокиназы на ремоделирование сосудов, так как моноциты являются источником цитокинов и ростовых факторов [10]. Кроме того, на предыдущем этапе с помощью метода транскрипционных матриц мы обнаружили повышение экспрессии фермента, осуществляющего превращение фактора некроза опухолей альфа (TNF-alpha) в активную форму (TACE) под влиянием урокиназы. На настоящем этапе работы мы исследовали методом ПЦР экспрессию в стенке сосуда TNF-alpha и TACE, поскольку TNF-alpha является одним из основных провоспалительных факторов, секретирующихся моноцитами/макрофагами. Оказалось, что экспрессия этих белков в неповрежденном сосуде не детектировалась, но возрастала при его повреждении. Нанесение урокиназы вызывало значительное увеличение экспрессии TACE на вторые и четвертые сутки после баллонирования, а также возрастание экспрессии TNF-alpha на четвертые сутки по сравнению с уровнем в контрольной группе, в то время как

нанесение тканевого активатора плазминогена подобного влияния не оказывало (рисунок 49).

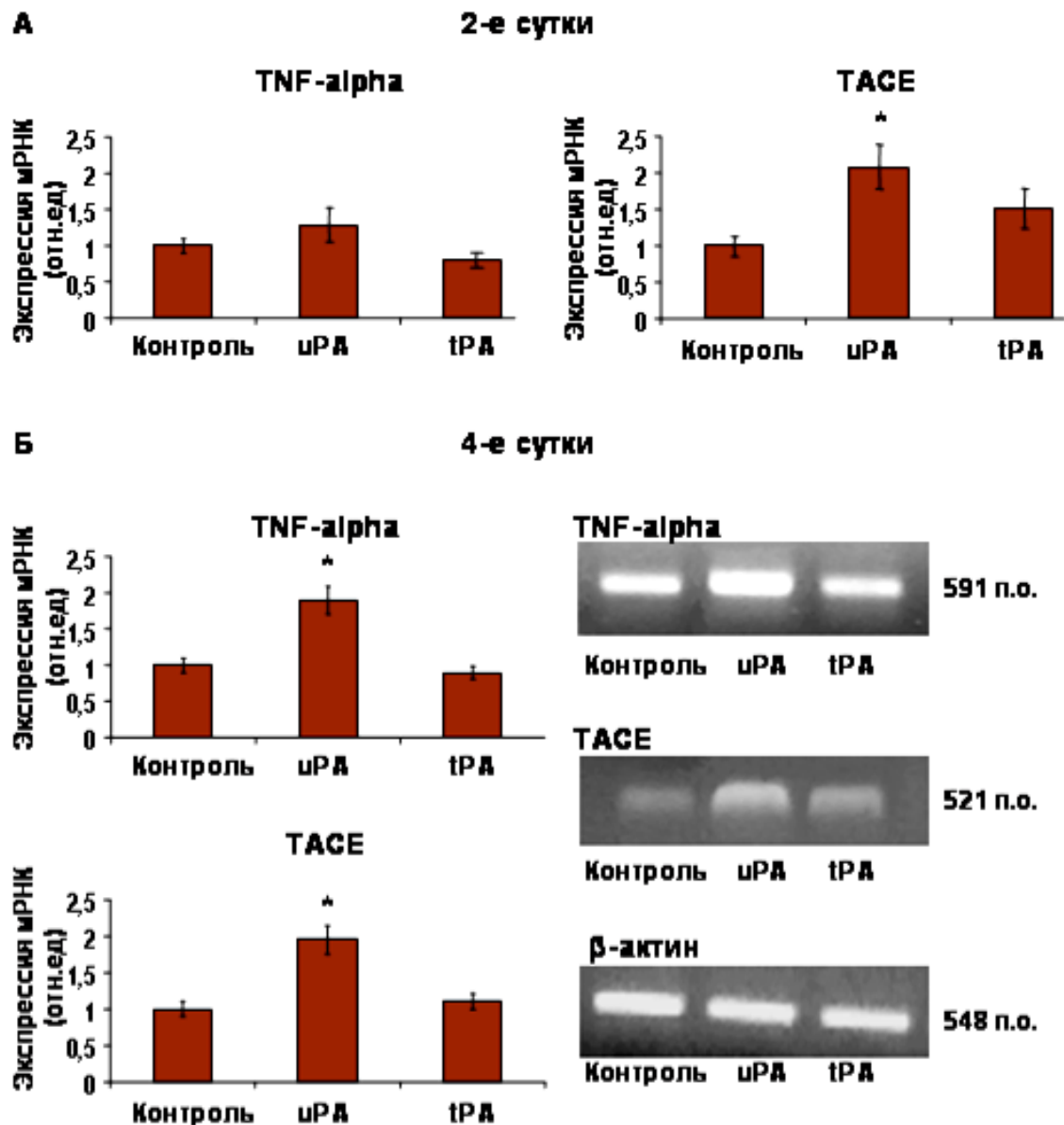


Рисунок 49 – Экспрессия фактора некроза опухолей альфа (TNF-alpha) и фермента, осуществляющего его превращение в активную форму (TACE – TNF-alpha converting enzyme) по данным полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в стенке сонной артерии крысы на 2-е (А) и 4-е сутки (Б) после баллонирования и нанесения в плевроническом геле рекомбинантных урокиназного (uPA) и тканевого (tPA) активаторов плазминогена (Обозначения: Контроль – нанесение чистого геля. \*  $p < 0,05$  по сравнению с контролем. В каждой группе было не менее шести животных)

Полученные данные свидетельствуют о том, что урокиназа является специфическим фактором, обладающим про-воспалительным действием в поврежденной сосудистой стенке, что может способствовать пролиферации клеток и развитию констриктивного ремоделирования сосудов при возрастании уровня урокиназы [18].

### **3.2.10. Новый механизм стимуляции пролиферации клеток сосудистой стенки под действием урокиназы**

На предыдущем этапе были получены данные об изменении экспрессии генов оксидативного стресса под действием урокиназы при ее локальном нанесении на сосуд. В связи с этим, нашей задачей стало исследование роли подобных изменений для ремоделирования сосудистой стенки после экспериментального баллонного повреждения артерии.

Антиоксиданты и ремоделирование сосудистой стенки под действием урокиназы

Мы оценили эффекты урокиназы на развитие неоинтимы на фоне системного введения антиоксиданта пирролидин-дитиокарбомата (PTDC), который вводился интраперитонеально 1 раз в сутки за 24 часа до операции и в течение 7 дней после операции по 200 мг/кг. Урокиназу наносили локально периадвентициально 20 нмоль/кг непосредственно после баллонирования. Мы обнаружили, что системное введение антиоксиданта существенно подавляло развитие эффектов урокиназы на ремоделирование сосудистой стенки (рисунок 50).

После нанесения урокиназы и системного введения в течение 7 дней PTDC площадь неоинтимы была достоверно меньше (рисунок 50), чем после локального введения урокиназы. При этом число клеток неоинтимы и суммарная толщина интимы и меди (индекс, отражающий ремоделирование сосудистой стенки) были также достоверно меньше в группе животных, которым вводился антиоксидант.

Полученные данные указывают на существенный вклад усиления оксидативного стресса в реализацию эффектов урокиназы в поврежденной стенке



артерии на ремоделирование, рост неоинтимы и неблагоприятное сужение просвета артерии.

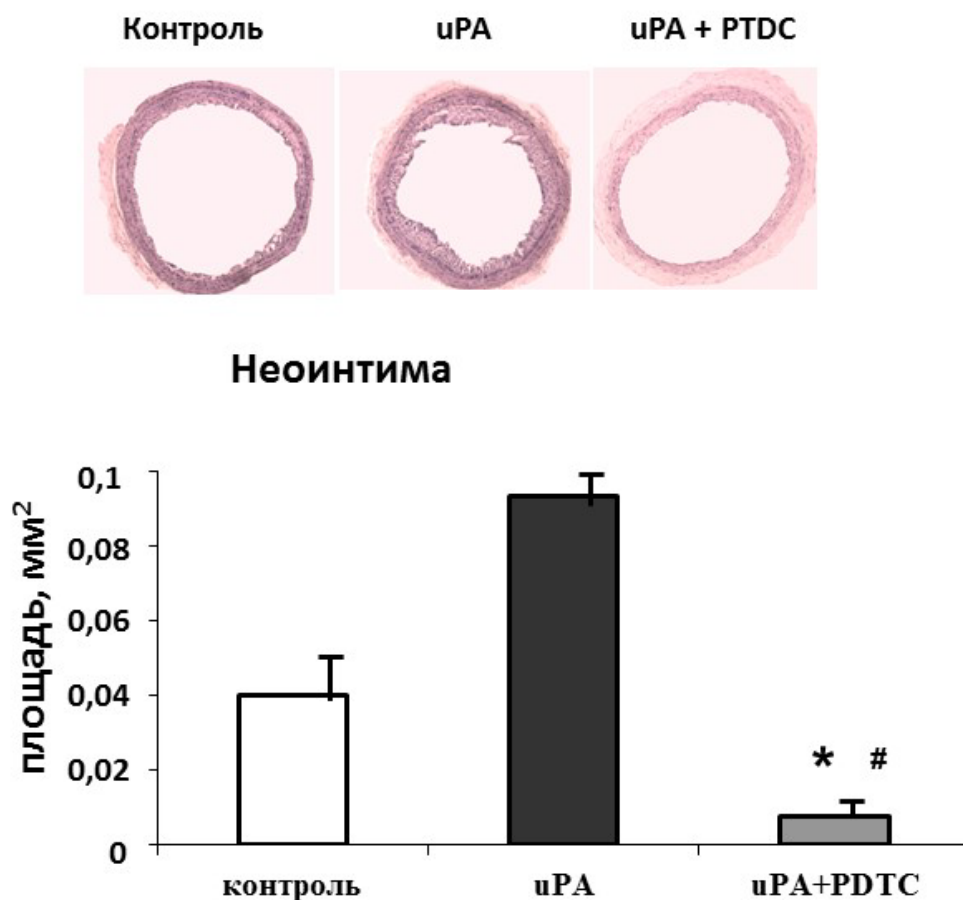


Рисунок 50 – Влияние системного введения антиоксиданта пирролидин-дителиокарбамата (PTDC) на ремоделирование сосудистой стенки под действием урокиназы (uPA) на 7 сутки после баллонирования сонной артерии крысы (Обозначения: #  $p < 0,05$  по сравнению с группой (uPA); \*  $p < 0,05$  по сравнению с группой контроля. В каждой группе не менее пяти животных)

#### *Антиоксиданты и пролиферация сосудистых ГМК под действием урокиназы*

Ранее мы установили, что урокиназа способствует пролиферации ГМК – одного из основных механизмов развития рестеноза и утолщения слоев сосудистой стенки, в то же время известно, что образование активных форм кислорода является одним из мощнейших индукторов деления клеток. Для прояснения участия активных форм кислорода в стимулирующем действии урокиназы на деление гладкомышечных клеток, мы исследовали влияние урокиназы на деление ГМК в культуре, в том числе при добавлении

антиоксиданта (эбселена). Пролиферацию исследовали методом иммунофлуоресценции с использованием антител к ядерному антигену пролиферирующих клеток (PCNA) через 24 часа после стимуляции клеток урокиназой (100 нМ). Стимуляция урокиназой приводила к увеличению индекса пролиферации гладкомышечных клеток более чем вдвое (рисунок 51).

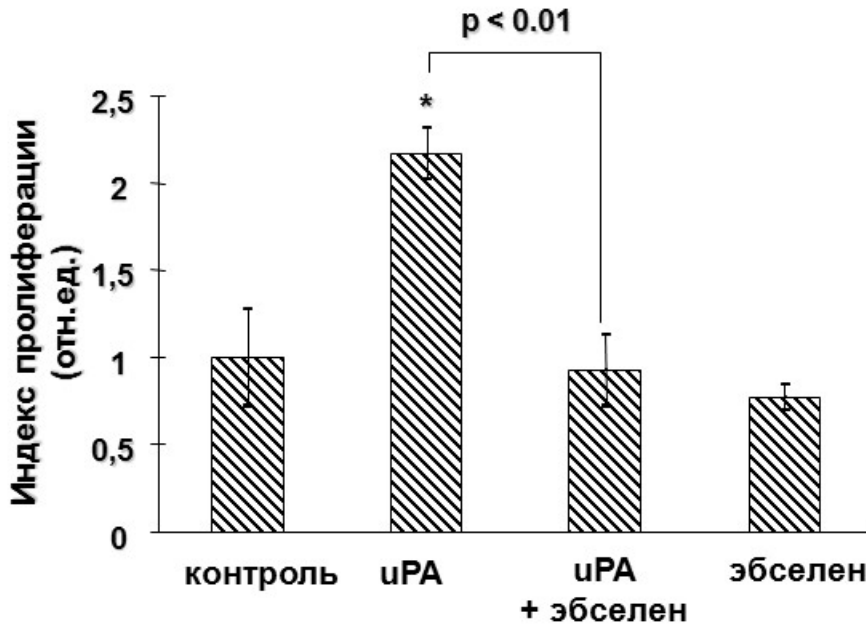


Рисунок 51 – Подавление пролиферации ГМК аорты, стимулированной урокиназой (uPA) (100 нМ), антиоксидантом эбселеном (40  $\mu$ М) (Обозначения: Пролиферацию оценивали методом иммунофлуоресценции с использованием антител к ядерному антигену пролиферирующих клеток (PCNA) через 24 часа после стимуляции клеток. Пролиферацию клеток в контроле (фосфатно-солевой буфер равного объема) принимали за единицу. Представлены усредненные данные 4 экспериментов)

Было обнаружено, что антиоксидант эбселен достоверно подавлял мощную индукцию пролиферации ГМК, возникающую под влиянием урокиназы (рисунок 51), что свидетельствует о существовании в эффектах урокиназы редокс-зависимого механизма регуляции деления клеток.

*Урокиназа увеличивает образование свободных радикалов кислорода в ГМК  
сосудов*

Для дальнейшего прояснения эффектов урокиназы мы исследовали, как инкубация с урокиназой влияет на образование активных форм кислорода (АФК) в культивируемых сосудистых ГМК. Урокиназа (5–200 нМ) стимулировала образование супероксид-радикала в ГМК, причем максимальная стимуляция по флуоресценции гидроэтидина отмечалась после инкубации с урокиназой (75–100 нМ) (рисунок 52).

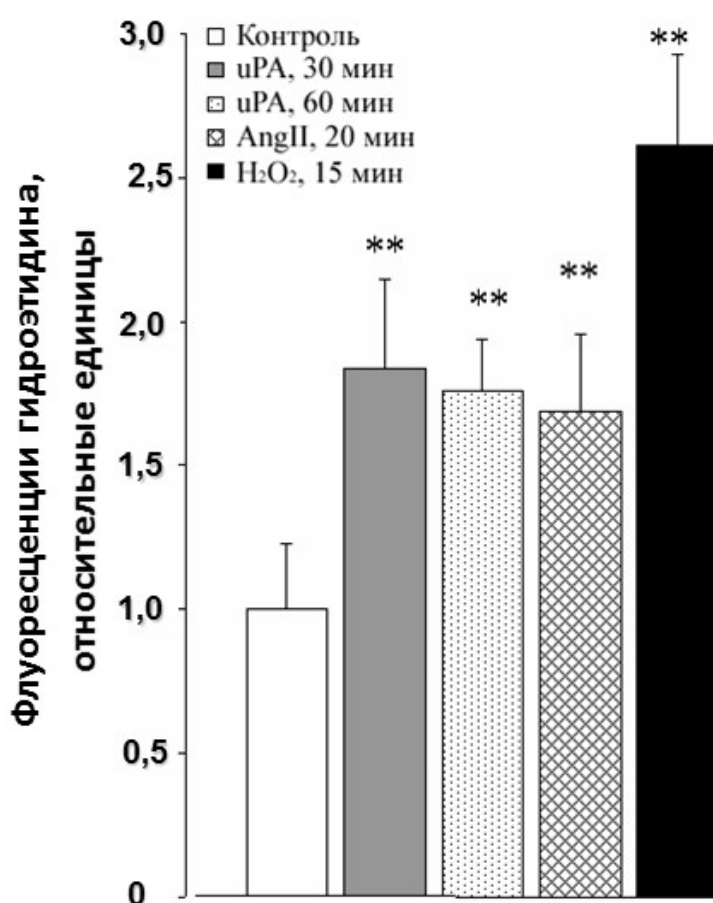


Рисунок 52 – Урокиназа (100 нМ) стимулировала образование активных форм кислорода в культивируемых ГМК аорты по данным флуоресценции гидроэтидина (Обозначения: Контроль – фосфатно-солевой буфер равного объема; положительный контроль – ангиотензин II (Ang II) и перекись (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>))

В качестве положительного контроля использовали ангиотензин II (Ang II) и перекись (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), максимум образования (АФК) – 20 мин и 15 мин, соответственно.

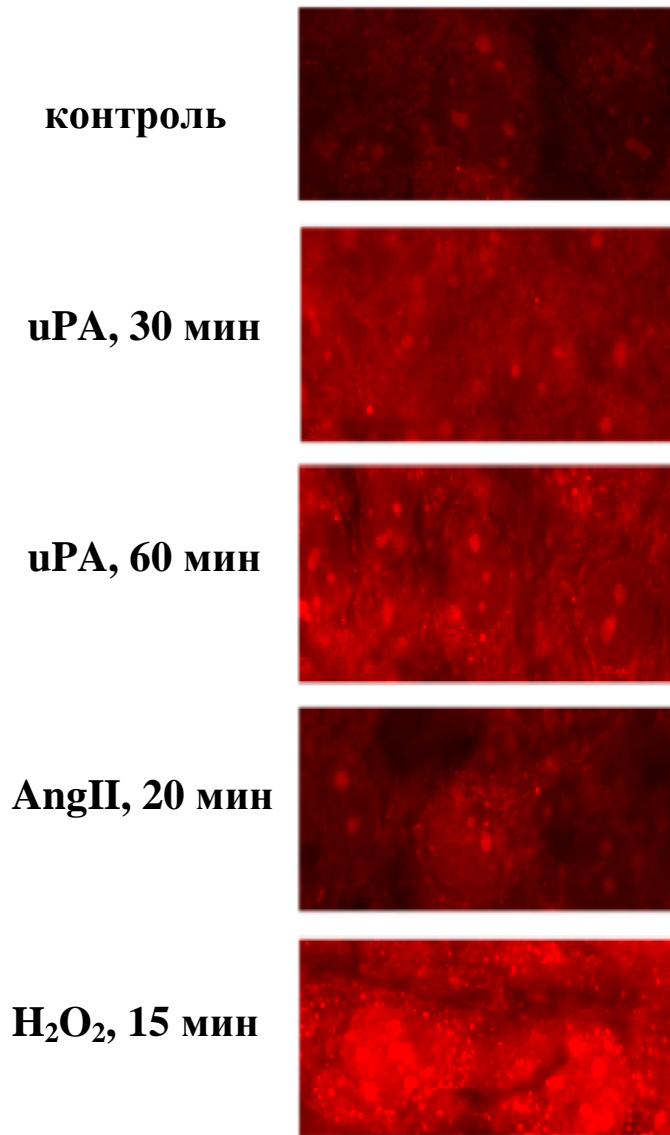
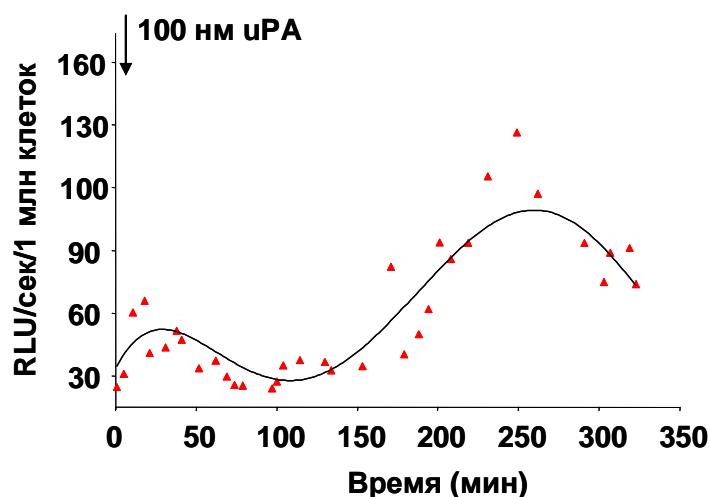


Рисунок 53 – Стимуляция образования активных форм кислорода в культивируемых ГМК аорты под действием урокиназы (100 нМ), 30 мин, по данным флуоресценции гидроэтидина (Обозначения: Контроль – фосфатно-солевой буфер равного объема; положительный контроль – ангиотензин II (Ang II) и перекись (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Представлены типичные микрофотографии для 4 экспериментов)

Мы подтвердили обнаруженный эффект с помощью хемилюминесценции люцигенина. Максимальное образование супероксид-радикала по хемилюминесценции люцигенина в интактных ГМК после добавления урокиназы (100 нМ) детектировалось в первые 4 часа (рисунок 54, А). Этот эффект

урокиназы был концентрационно-зависим (рисунок 54, Б). Добавление к реакционной смеси миметика супероксид дисмутазы (MnTPyP 100  $\mu\text{M}$ ) нивелировало эффект урокиназы на образование супероксида (данные не представлены).

А.



Б.

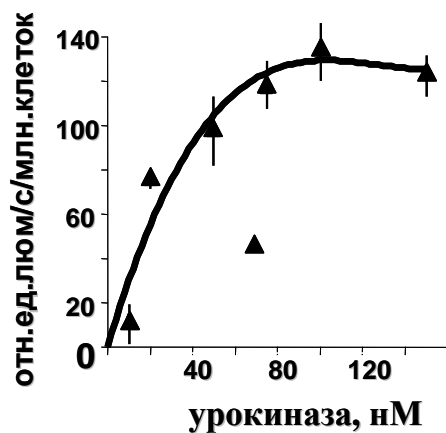


Рисунок 54 – (А). После добавления урокиназы (100 нМ) к intactным ГМК аорты максимальное образование супероксид-радикала по хемилюминесценции люцигенина детектировалось через 4 часа. (Б) Этот эффект урокиназы был концентрационно-зависим (Обозначения: Представлены усредненные данные 4 экспериментов)

Ранее было показано, что урокиназа способствует образованию [177] и высвобождению [95] супероксид-радикала нейтрофилами, однако данных о влиянии урокиназы на ГМК не было. Настоящие данные свидетельствуют о

способности урокиназы стимулировать образование активных форм кислорода в сосудистых ГМК [6].

Мы оценили влияние урокиназы на экспрессию НАД(Ф)Н-оксидаз в культивируемых ГМК. Содержание оксидаз определяли через 4 часа после стимуляции клеток урокиназой (5–100 нМ) с помощью иммуноблоттинга. Урокиназа достоверно стимулировала экспрессию НАД(Ф)Н-оксидаз *nox1* и *nox4* (рисунок 55), причем содержание оксидаз возрастало с увеличением концентрации урокиназы. Максимальное увеличение экспрессии оксидаз наблюдалось при концентрации урокиназы 75 нМ и выше.

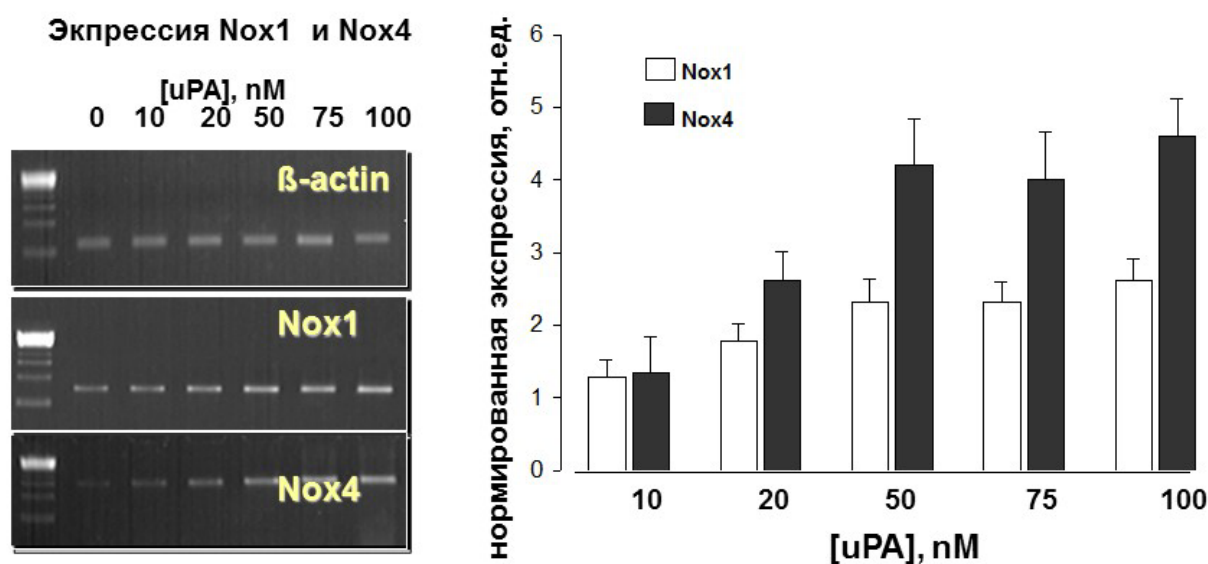


Рисунок 55 – По данным иммуноблоттинга после инкубации с урокиназой (20–100 нМ) в течение 4-х часов содержание НАДФ-оксидаз *nox1*, *nox4* в ГМК аорты возрастало с увеличением концентрации урокиназы. Содержание оксидаз оценивали относительно содержания  $\beta$ -актина в тех же гомогенатах и представляли как усредненные данные 4 экспериментов

В поврежденных артериях экспрессия НАД(Ф)Н-оксидаз значительно повышена и представляет собой важный механизм сигнализации, участвующий в регуляции роста неоинтимы и ремоделирования артерий [265]. Образование супероксид-радикала в поврежденных артериях происходит преимущественно за счет НАДФ-оксидаз *nox1*, *nox4* и *phox22* [257, 399].

Полученные данные о том, что урокиназа способна регулировать уровень НАДФ-оксидаз в сосудистых ГМК, выявляют новый механизм действия урокиназы, который может оказаться ключевым в регуляции пролиферации клеток сосудистой стенки, роста неоинтимы и ремоделирования артерии [410].

Таким образом, получены данные о том, что урокиназа повышает образование активных форм кислорода, стимулируя экспрессию НАДФ-оксидаз в сосудистых ГМК, что может способствовать оксидативному стрессу в артериальной стенке, возникающему в ответ на повреждение.

### **3.3. Обсуждение результатов**

Ремоделирование сосудов представляет собой процесс адаптации, включающий в себя множество структурных и функциональных изменений сосудистой стенки, которые возникают при заболеваниях, травмах или старении [9]. И, хотя ремоделирование артерий можно рассматривать, как естественный механизм старения сосудов, неблагоприятное ремоделирование, суживающее просвет артерии, ассоциируется со значительными гемодинамическими изменениями, сердечно-сосудистой заболеваемостью и смертностью [32, 364]. Артериальное ремоделирование осуществляется рядом сложных патофизиологических механизмов, которые тесно взаимосвязаны и воздействуют как на клеточные, так и на неклеточные компоненты сосудистой стенки. Индукторами неблагоприятной перестройки сосудистой стенки могут быть как повреждения сосудистой стенки, так и изменения давления и кровотока в сосуде [132]. Из-за сложности и множественности процессов, было трудно обнаружить ключевой регуляторный механизм, способствующий неблагоприятному ремоделированию сосудов, тем не менее, для разработки подходов к воздействию на процессы ремоделирования и терапевтических мишеней было необходимо исследование механизмов, регулирующих структурную перестройку сосудов.

Исследуя аутопсийный материал, мы показали, что экспрессия урокиназы, ее рецептора и ингибитора активаторов плазминогена 1-го типа повышена в

атеросклеротической бляшке. Повышенное содержание ПАИ-1 в стенке сосуда в совокупности с отсутствием изменений в содержании активаторов плазминогена наблюдалось в участках липидной полосы, граничащих с морфологически нормальной тканью. Напротив, в поражениях с умеренным утолщением сосудистой стенки наблюдалось либо уменьшение, либо отсутствие изменений содержания ПАИ-1, тогда как содержание активаторов плазминогена было повышенным. В сегментах с существенным атеросклеротическим поражением наблюдалось повышенное содержание как ПАИ-1, так и активаторов плазминогена. Полученные данные согласуются с результатами предыдущих исследований по изучению системы активаторов плазминогена при атеросклерозе. Так, ранее было показано, что ПАИ-1 экспрессируется гладкомышечными клетками интимы, макрофагами и пенстыми клетками [184]. Другие авторы выявили повышение его уровня в атеросклеротической бляшке по сравнению с нормальными сосудами [192, 218]. В настоящее время известно, что повышенная экспрессия ПАИ-1 ассоциируется с нестабильностью бляшки [137]. Выявленное в данном исследовании повышение экспрессии ингибитора активаторов плазминогена – 1 в атеросклеротической бляшке может приводить к локальному подавлению индуцированного плазмином протеолиза и способствовать тромботическим осложнениям, а также может приводить к накоплению внеклеточного матрикса, предотвращая его деградацию. Увеличение содержания внеклеточного матрикса в последующем может служить стимулом для миграции и пролиферации ГМК и макрофагальной инфильтрации [148].

Наши результаты дополняют имеющиеся данные о повышенной экспрессии урокиназы и ее рецептора при атеросклерозе. Ранее было выявлено, что в атеросклеротической бляшке содержание рецептора урокиназы значительно выше, чем в стенке непораженной артерии [284]. Также было показано, что урокиназу экспрессируют преимущественно активированные макрофаги [404], при этом известно, что наиболее нестабильные, склонные к разрыву бляшки обильно инфильтрированы клетками макрофагального ряда [27, 330]. Обнаруженное нами повышение экспрессии урокиназы и ее рецептора в



атеросклеротической бляшке может способствовать процессам миграции и пролиферации клеток в стенке пораженного сосуда [153, 183] и способствовать росту бляшки, суживающей просвет артерии. Важной находкой оказалась солокализация экспрессии урокиназы и ее рецептора на клетках макрофагального происхождения может приводить к активации локального протеолиза межклеточного матрикса и способствовать миграции клеток [408]. Поскольку урокиназа является хемотактическим фактором для клеток воспалительного ряда [69], наблюдаемое накопление макрофагов может быть связано с их усиленным привлечением в стенку сосуда под действием урокиназы. Адгезия клеток моноцитарно-макрофагального ряда, их миграция в поврежденной сосудистой стенке является одним из пусковых процессов, как в механизме развития атеросклероза, так и рестеноза [71, 145]. В регуляции этих патологических процессов урокиназа играет значительную роль.

Повышение экспрессии урокиназы моноцитами/макрофагами атеросклеротической бляшки может способствовать привлечению, адгезии, миграции этих клеток к стенке сосуда на участке атеросклеротического повреждения и/или повреждения сосуда после ангиопластики и последующему выделению цитокинов, способствующих активации ГМК, их миграции и пролиферации. Таким образом, полученные данные указывают на участие системы "урокиназа – рецептор" в развитии и прогрессировании атеросклеротического поражения, а также возможной регуляции стабильности атеросклеротической бляшки. Это позволяет предполагать, что дополнительное возрастание экспрессии урокиназы в поврежденной при ангиопластике бляшке может явиться важным механизмом, способствующим развитию неблагоприятной перестройки сосудистой стенки и последующего рестеноза.

На следующем этапе работы мы показали, что повышенный уровень урокиназы является независимым предиктором возврата стенокардии, а также активность ПАИ-1 коррелирует с риском возобновления стенокардии. Ранее в нескольких клинических исследованиях изучали активность и уровень компонентов системы фибринолиза в крови пациентов до и после ангиопластики.

При этом в большей части исследований оценивали активность и антиген ПАИ-1 и тканевого активатора плазминогена и только в одном исследовали урокиназу [276]. Было показано, что риск развития рестенозов после эндоваскулярной реваскуляризации коронарных [277, 292] и периферических артерий [84] ассоциирован с повышением ПАИ-1. В том числе, рестеноз после атерэктомии у пациентов со стенозирующим коронарным атеросклерозом коррелировал с повышением ПАИ-1 [96]. Кроме того, у пациентов после имплантации стентов, покрытых пактитакселом или сиролимусом, развитие рестеноза также было ассоциировано с повышением ПАИ-1 [282]. Неожиданные данные получили Strauss с соавторами [276], которые сообщили о значительно более низком уровне антигена ПАИ-1 до и сразу после ангиопластики у пациентов с рестенозом. Эти авторы также показали, что пациенты с наиболее высоким уровнем антигена урокиназы и наиболее низким уровнем ПАИ-1 представляют собой группу самого высокого риска развития рестеноза. Ранее были опубликованы данные о том, что у пациентов с рестенозом и без рестеноза ПАИ-1 не отличался, но эти данные были получены на меньшей выборке [164]. Таким образом, наши данные о том, что повышение активности ПАИ-1 ассоциировано с повышенным риском возврата стенокардии у пациентов после баллонной ангиопластики хорошо дополняют полученные ранее данные.

Проспективные исследования показали, что уровень тканевого активатора плазминогена не отличается у пациентов с рестенозом и без рестеноза после баллонной ангиопластики, как коронарных [180, 276], так периферических артерий [323]. Наши данные хорошо согласуются с литературными данными, опубликованными ранее.

Что касается исследований уровня урокиназы у пациентов с ИБС, то только в одном исследовании было показано, что повышение антигена урокиназы в плазме крови является независимым фактором риска рестенозирования после баллонной ангиопластики [276]. Еще в одном исследовании было обнаружено достоверное повышение уровня урокиназы как в крови, так и на циркулирующих моноцитах при ИБС по сравнению со здоровыми добровольцами [411]. Итак,

полученные нами данные о том, что урокиназа является независимым предиктором возврата стенокардии после баллонной ангиопластики у пациентов с ИБС являются оригинальными и хорошо дополняют имеющиеся в литературе наблюдения и рекомендованы для применения в клинической практике.

Таким образом, данные, полученные на первом этапе работы, подтверждают участие урокиназы в развитии атеросклероза и рестеноза.

Преыдушие исследования показали, что урокиназа является полифункциональным белком, регулирующим клеточную миграцию и пролиферацию посредством множества механизмов [10, 88, 308, 342, 365, 379, 397, 401]. В нашей работе мы показали, что урокиназа, а также урокиназный рецептор экспрессируются в стенке сосуда в ранние сроки после баллонирования. Это повышение связано с усиленным синтезом *de novo* этих белков клетками артериальной стенки, так как увеличение их экспрессии регистрируется и на уровне мРНК. Максимального уровня эта экспрессия достигает на 2-е сутки в меди, что совпадает с первой волной пролиферации ГМК, и на 4-е сутки – в неоинтима, что соответствует наиболее интенсивной миграции ГМК из меди в неоинтиму. Хотя сам по себе этот факт не указывает на безусловную взаимосвязь между повышением экспрессии урокиназы и пролиферацией или миграцией гладкомышечных клеток после повреждения, полученные данные позволяют предполагать участие урокиназы в регуляции пролиферации и миграции ГМК – ключевых процессов ремоделирования сосуда после повреждения.

Многие исследователи пытались определить связь между экспрессией активаторов плазминогена и функциональным состоянием клетки. Показано, что переход клеток из состояния покоя в пролиферативный статус сопровождается экспрессией урокиназы [11, 153, 382]. Инвазия многих злокачественных клеток связана с экспрессией урокиназного рецептора, его присутствием в окружающей среде или экспрессией этими же клетками [70]. Незлокачественные клетки также экспрессируют урокиназу и урокиназный рецептор во время миграции. Так, делящиеся и мигрирующие эндотелиальные клетки в области внутрисосудистого повреждения экспрессируют урокиназу и урокиназный рецептор на лидирующем

полносе клетки, и эта экспрессия прекращается одновременно с прекращением миграции [308]. При этом повышенная экспрессия урокиназы регистрировалась в меди поврежденной артерии на начальных этапах митогенеза ГМК – 16–24 часа после повреждения [342]. Было выявлено, что на пятые сутки после баллонного повреждения сонной артерии ГМК неоинтимы экспрессируют урокиназу, ее рецептор, тканевой активатор плазминогена и ингибитор активаторов плазминогена-1 [308]. Наши данные, касающиеся совпадения динамики экспрессии урокиназы, а также урокиназного рецептора с динамикой миграции и пролиферации гладкомышечных клеток после внутрисосудистого повреждения, хорошо согласуются с результатами этих работ. Взятые вместе эти данные свидетельствуют о том, что экспрессия урокиназы может быть частью программы, связанной с началом пролиферации и миграции ГМК в стенке сосуда в ответ на повреждение. То, что экспрессия урокиназы скоординирована с экспрессией урокиназного рецептора на ранних этапах формирования неоинтимы, позволяет предполагать, что одни и те же факторы могут стимулировать их синтез. Повышать экспрессию урокиназы моноцитами/макрофагами и гладкомышечными клетками могут факторы роста и интерлейкины [9, 139, 242]. Например, основной фактор роста фибробластов 2, который экспрессируется в сосудах в ранние сроки после повреждения и может увеличивать активность активаторов плазминогена [147]. Было показано, что основной фактор роста фибробластов-2 может повышать экспрессию урокиназы в ГМК [170], фибробластах [235] и индуцировать экспрессию рецептора урокиназы в эндотелиальных клетках [379]. Возможно, высвобождаясь из поврежденных ГМК, этот фактор роста, может стимулировать синтез урокиназы и ее рецептора клетками сосудистой стенки. Кроме того, сразу после вмешательства из тромбоцитов и нейтрофилов высвобождается множество активных молекул, способствующих повышению экспрессии урокиназы.

Было обнаружено, что в поврежденных артериях животных, нокаутированных по гену урокиназы, рост неоинтимы практически отсутствует [401]. Наши данные вместе с результатами, полученными на трансгенных мышях,

указывают на роль эндогенной урокиназы в стимуляции ранних процессов развития неоинтимы после повреждения сосуда. В недавнем исследовании на животной модели с ускоренным развитием атеросклероза было показано, что ингибирование урокиназы с помощью антител подавляло развитие атеросклероза [303]. Роль эндогенной урокиназы в развитии неоинтимы подтверждается и тем, что в настоящем исследовании введение ингибирующих урокиназу антител уменьшало аккумуляцию ГМК в неоинтимае, что может свидетельствовать о подавлении их миграции из меди. Помимо этого, ингибирующие антитела уменьшали площадь формирующейся неоинтимы и препятствовали уменьшению просвета артерии. Это позволяет предполагать, что подавление эффектов эндогенной урокиназы может препятствовать развитию рестенозов артерий, развивающихся после ангиопластики.

Для разработки подходов к подавлению эффектов эндогенной урокиназы в стенке сосуда необходимо знание механизмов ее влияния на формирование стеноза артерии после повреждения и роли различных доменов урокиназы в реализации ее эффектов. Исследования, проведенные *in vitro* на клеточных культурах, показывают, что урокиназа способна стимулировать миграцию клеток через механизм, не связанный с ее протеолитической активностью, а обусловленный скорее всего активацией систем внутриклеточной передачи сигнала при связывании урокиназы на поверхности клеток с урокиназным рецептором и другими белками [329, 365, 369, 380, 398, 416].

Для изучения роли отдельных доменов урокиназы в обеспечении функций этого белка в сосудистой стенке были созданы рекомбинантные конструкции, позволяющие синтезировать разные формы урокиназы и ее отдельные домены, эффекты которых исследовались на моделях миграции и пролиферации сосудистых клеток *in vitro* и моделях ремоделирования сосудов у животных *in vivo*. Мы показали, что в живом организме протеолитическая активность урокиназы в большей степени, чем взаимодействие с рецептором определяет ее стимулирующее влияние на развитие неоинтимы в поврежденном сосуде. Это доказывают следующие факты. Во-первых, протеолитически неактивная

рекомбинантная урокиназа, которая *in vitro* связывается с урокиназным рецептором и стимулирует миграцию ГМК в культуре [88], в поврежденном сосуде не увеличивала миграцию, пролиферацию гладкомышечных клеток и рост неоинтимы в противоположность протеолитически активным формам урокиназы. Во-вторых, рекомбинантная урокиназа, имеющая множественные мутации в рецептор-связывающей области молекулы и поэтому не связывающаяся с урокиназным рецептором и не стимулирующая миграцию ГМК в культуре [407], при нанесении на поврежденную артерию усиливала рост неоинтимы, пролиферацию и миграцию гладкомышечных клеток. По-видимому, различия в окружении и условиях, в которых мигрируют ГМК в культуре (*in vitro*) и в поврежденной сосудистой стенке (*in vivo*), определяют и различия в механизмах, посредством которых урокиназа стимулирует миграцию ГМК. Так, в культуре исследуют однонаправленную миграцию культивируемых ГМК на искусственно созданных подложках, например, из коллагена или других матриксных белков. В этих условиях миграция ГМК во многом зависит от изменений цитоскелета и молекул адгезии, обеспечивающих координированное прикрепление–открепление клеток на донной подложке. В сосудистой стенке компоненты межклеточного матрикса образуют барьер на пути клеток, поэтому для эффективной миграции клетка должна не только изменять свою форму, прикрепляться и открепляться, но и расщеплять матриксные белки. По-видимому, их протеолиз, обеспечивающий также высвобождение связанных в матриксе факторов роста, является одной из детерминант, определяющих скорость миграции клеток.

Наши данные о доминирующем значении протеолитических свойств урокиназы в стимуляции ранних процессов образования неоинтимы хорошо согласуются с результатами, полученными на животных, лишенных гена урокиназы и урокиназного рецептора [194, 300, 401]. Важно, что отсутствие гена урокиназного рецептора никак не влияло на рост неоинтимы в поврежденной артерии [300], а без гена урокиназы формирование неоинтимы отсутствовало [194, 401]. По-видимому, в отсутствие урокиназного рецептора эффекты урокиназы реализуются за счет ее связывания с другими белками на поверхности

клетки. Так, крингл урокиназы способен связываться с альфа5 бета3-интегринами и вызывать внутриклеточную сигнализацию, активацию и адгезию нейтрофилов [306]. Кроме того, недавно обнаружена новая мишень связывания урокиназы на поверхности клеток, отличная от урокиназного рецептора, – фибулин-5, белок связывающий, интегрины внеклеточного матрикса [149], который взаимодействует с протеолитическим доменом урокиназы.

Эти данные находятся в некотором противоречии с результатами, полученными при использовании локальной инфузии урокиназы в коронарную артерию свиньи перед проведением баллонной ангиопластики со стентированием, которая никак не влияла на частоту возникновения рестенозов [30]. Это противоречие может быть объяснено использованием разных способов введения препарата, что имеет большое значение, так как при внутривенном введении скорость элиминации урокиназы очень высока (период полужизни ~7 минут) [238]. Кроме того, основные эффекты урокиназы на формирование неоинтимы реализуются преимущественно в тканях, а не в кровотоке. Считают, что урокиназа обеспечивает рецептор-независимый фибринолиз в области секреции в межклеточном пространстве и рецептор-зависимый на поверхности клеток, тогда как тканевой активатор плазминогена, обладающий сродством к фибрину, обеспечивает около 80% фибринолитического потенциала крови и лизис внутрисосудистых тромбов [7].

Протеолитическая активность урокиназы, экспрессирующей в поврежденном сосуде, может способствовать миграции и пролиферации сосудистых клеток посредством нескольких высококоординированных механизмов. Активируя плазмин в строго определенных участках поверхности клетки, урокиназа запускает локальный внеклеточный протеолиз [86], который осуществляется не только плазмином и самой урокиназой, но и системой матриксных металлопротеиназ, переход которых из проформ в активные формы осуществляется под действием активированного урокиназой плазмина [229, 236, 408]. В результате активации протеолитического каскада, который запускается урокиназой, происходит направленная деградация белков внеклеточного матрикса

[153, 201], что необходимо для миграции клеток. Известно, что матриксные металлопротеиназы экспрессируются, как и урокиназа, на ранних этапах формирования неинтимы, когда происходит активная миграция гладкомышечных клеток в неинтиму [214, 361]. Также урокиназа способна расщеплять белки матрикса, благодаря собственной протеолитической активности, не зависящей от плазмина, в том числе фибронектин, который входит в состав базальной мембраны эндотелия и окружает ГМК меди, а также 66 kDa – белок фибробластов человека, и, таким образом, также способствовать миграции клеток [226, 442].

На модели баллонирования сонной артерии урокиназа стимулировала также пролиферацию клеток сосудистой стенки. Урокиназа способна стимулировать деление клеток как благодаря собственным сигнальным каскадам [153, 187, 241, 259], так и активируя факторы роста. В процессе деградации внеклеточного матрикса происходит высвобождение связанных в матриксе факторов роста и, прежде всего, основного фактора роста фибробластов-2 [147, 170], являющегося сильным митогеном в поврежденных сосудах. Помимо этого плазмин, образующийся из плазминогена под влиянием урокиназы, активирует латентную форму трансформирующего фактора роста  $\beta_1$  [391], который стимулирует образование неинтимы и вызывает избыточное накопление внеклеточного матрикса, стимулирует трансдифференцировку адвентициальных фибробластов в миофибробласты и способствует констриктивному ремоделированию артерии после баллонирования [346]. Исследования также показали, что для митогенного и хемотактического действия многих факторов роста на ГМК необходима экспрессия урокиназы [170].

Связь между генерацией плазмина и способностью ГМК мигрировать в неинтиму после повреждения подтверждается нашими результатами с нанесением альфа<sub>2</sub>-антиплазмина, который подавлял миграцию ГМК из меди в интиму после повреждения и приводил к уменьшению числа клеток и площади неинтимы. Данные, существующие в литературе, противоречивы. Одними авторами [213] на трангенных мышах было показано, что отсутствие гена



антиплазмина не оказывало влияния на рост неоинтимы, тогда как другие авторы обнаружили, что отсутствие гена антиплазмина приводило к подавлению роста неоинтимы [208]. Наши данные хорошо согласуются с результатами работы Jackson с соавторами [322], показавших, что введение животным в течение нескольких дней после операции синтетического ингибитора активации плазмина, связывающего плазминоген, –  $\epsilon$  - аминокaproновой кислоты, приводило к сходным изменениям в стенке сосуда – значительному уменьшению числа ГМК в неоинтимае на 4-е сутки после операции. Поскольку альфа2-антиплазмин не обладает способностью ингибировать плазмин, связанный с мембраной клеток или фибрином [250], эффекты альфа2-антиплазмина в стенке сосуда могут свидетельствовать об относительном значении внеклеточного плазмин-зависимого протеолиза в формировании неоинтимы.

Усиление роста неоинтимы оказалось специфическим свойством урокиназы, так как тканевой активатор плазминогена обладал противоположным действием на ремоделирование артерий на ранних сроках после повреждения, уменьшая аккумуляцию неоинтимальных ГМК и подавляя развитие неоинтимы. В то же время, введение тканевого активатора плазминогена аналогично урокиназе оказывало стимулирующее влияние на рост меди и адвентиции. Эти данные дополняют результаты, полученные на трансгенных мышах: в отсутствие гена урокиназы развитие неоинтимы было подавлено, а отсутствие гена тканевого активатора плазминогена не вызывало подобного эффекта [194, 401]. В предыдущих исследованиях было выявлено, что после внутрисосудистого повреждения артерии значительное увеличение толщины интимы и меди происходит благодаря усиленному делению клеток [443]. Тем не менее, хотя тканевой активатор плазминогена также как урокиназа активирует плазминоген и обладает протеазной активностью, а также является митогеном [158], в исследованиях не было обнаружено взаимосвязи между тканевым активатором плазминогена и развитием стенозирования артерии [113]. Необходимо отметить, что в данном исследовании авторы также выявили, что животные, лишённые генов урокиназы или тканевого активатора плазминогена, обладали разными

типами перестройки артериальной стенки после внутрисосудистого повреждения [113].

При изучении влияния урокиназы и тканевого активатора плазминогена на процессы ремоделирования артерии после повреждения мы впервые показали, что, во-первых, урокиназный активатор плазминогена не только стимулирует развитие неоинтимы, но также, в отличие от тканевого активатора плазминогена, суживает просвет артерии. При этом мы показали, что ключевую роль в этих эффектах урокиназы играет ее протеолитическая активность, что свидетельствует о том, что другие механизмы, которые не активируются под влиянием tPA, но запускаются специфичной для урокиназы протеолитической активностью являются критически важными для ремоделирования артерий. Во-вторых, тканевой активатор плазминогена не только не уменьшал, но на ранних этапах достоверно увеличивал просвет поврежденной артерии, при этом подавляя рост неоинтимы. Поскольку просвет артерии зависит и от развития неоинтимы, и от изменения диаметра сосуда, который отражает площадь, описываемая наружной эластической мембраной, то, вероятно, активаторы плазминогена обладают разным влиянием на эти процессы. Негативное ремоделирование артерии под действием урокиназы происходит благодаря усиленному росту неоинтимы вследствие стимуляции деления клеток и их аккумуляции в неоинтимае, а также сужению диаметра артерии. В то же время под действием тканевого активатора плазминогена происходит положительное ремоделирование артерии, благодаря подавлению развития неоинтимы вследствие уменьшения аккумуляции клеток в формирующейся неоинтимае, а также увеличению диаметра сосуда. Таким образом, активаторы плазминогена оказывают противоположное влияние на ремоделирование поврежденной артерии на ранних стадиях после повреждения. В более поздние сроки (через 14 и 28 суток) эффекты урокиназы остаются прежними, тогда как увеличение диаметра артерии под действием тканевого активатора плазминогена исчезает, при сохранении сниженной пролиферации клеток в неоинтимае до 4 недель. Схожие эффекты у активаторов плазминогена наблюдались только в отношении стимуляции пролиферации клеток меди и

адвентиции, однако, тканевой активатор плазминогена стимулировал рост этих слоев сосудистой стенки в меньшей степени. Данные об уменьшении числа ГМК в неоинтимае на ранних сроках после баллонирования под влиянием тканевого активатора плазминогена хорошо согласуются с результатами, полученными ранее [390]. При этом, тканевой активатор плазминогена является митогеном, и, может быть, именно этот механизм препятствует положительному ремоделированию стенки артерии в отдаленные сроки после повреждения.

Таким образом, урокиназа и тканевой активатор плазминогена влияют на разные механизмы ремоделирования артерий (урокиназа способствует росту и утолщению интимы и меди, а тканевой активатор плазминогена способствует положительному компенсаторному ремоделированию). Полученные данные указывают на наличие существенных различий в механизмах воздействия урокиназы и тканевого активатора плазминогена на регуляцию ремоделирования сосудов, которые ранее не были до конца ясны.

Исследования показали, что развитие рестенозов после ангиопластики обусловлено не только ростом неоинтимы, но и отрицательным ремоделированием сосудистой стенки, выражающемся в уменьшении диаметра сосуда, описываемого наружной эластической мембраной [274, 448], в значительной степени благодаря изменениям в адвентиции. Оказалось, что изменения в адвентиции участвуют также в ремоделировании интимы и меди [274]. Было выявлено, что активированные фибробласты могут мигрировать в неоинтиму [97]. Фибробласты принимают участие в заживлении и развитии фиброза сосудистой стенки и играют важную роль в констриктивном ремоделировании артерии [9, 97]. Развитие ригидной неоадвентиции, состоящей из белков матрикса и клеток, имеющих сократительный фенотип, сдавливает просвет сосуда.

Мы показали, что один из механизмов, определяющих влияние урокиназы на констриктивное ремоделирование, которым не обладает тканевой активатор плазминогена является ее влияние на адвентицию и трансформацию фибробластов в миофибробласты. Согласно полученным результатам сужение

просвета повреждённой артерии под действием урокиназы связано не только с усилением роста неоинтимы, но и со стимуляцией развития неоадвентиции и аккумуляции в ней клеток, имеющих сократительный фенотип. После изолированного повреждения адвентиции в ней возрастает экспрессия урокиназы, увеличивается площадь адвентиции, происходит стимуляция пролиферации адвентициальных клеток, возрастает доля  $\alpha$  - актин позитивных клеток. Подавление активности урокиназы с помощью ингибирующих антител значительно уменьшает все эти эффекты, вызванные адвентициальным повреждением. Результаты, полученные нами на культуре фибробластов, свидетельствуют о дозозависимом увеличении числа клеток сократительного фенотипа после стимуляции урокиназой в физиологических концентрациях. Это является прямым указанием на активацию фибробластов и их трансформацию в миофибробласты под действием урокиназы.

Наши данные нашли свое подтверждение в работе, которая показала новый путь сигнализации урокиназы с вовлечением ее крингл-домена и транслокацией урокиназы в ядро с участием нуклеолина, что указывает на возможность урокиназы принимать участие в регуляции транскрипции генов [10, 259]. Было доказано существование ядерной транслокации урокиназы, которая при этом не зависела от присутствия ростового домена урокиназы. В то же время наличие в молекуле урокиназы крингл-домена оказалось обязательным для ее ядерной транслокации. Было доказано, что урокиназа, проникнув в ядро, вызывает экспрессию гладкомышечного альфа-актина. При повреждении происходит зависящая от урокиназы трансдифференцировка фибробластов в миофибробласты, клетки мигрируют, пролиферируют, активно секретируют матрикс, что важно для развития констриктивного ремоделирования сосудов. В этой же работе были получены данные о взаимодействии урокиназы с факторами транскрипции. Дальнейшие исследования в этом направлении будут способствовать более глубокому пониманию молекулярных механизмов регуляции экспрессии генов под действием урокиназы.

В настоящей работе мы также выявили новый механизм влияния урокиназы на фибробласты – это стимуляция экспрессии ММП-9 в фибробластах, для реализации которой необходимо образование активных форм кислорода и наличие сохранного митохондриального аппарата. В поврежденной артерии стимуляция экспрессии ММП-9 [123], может способствовать констриктивному ремоделированию, принимая участие в утолщении адвентиции пораженной артерии.

Полученные данные позволяют предполагать, что экспрессия урокиназы является важным механизмом формирования неоадвентиции, а, следовательно, может способствовать констриктивному ремоделированию артерии после ангиопластики. Это участие *in vivo* осуществляется преимущественно за счет протеолитической активности урокиназы. Полученные данные показывают, что урокиназа может способствовать сужению просвета артерии, стимулируя не только формирование неоинтимы, но и констриктивное ремоделирование артерии – два основных процесса, лежащих в основе развития рестеноза.

Таким образом, влияние урокиназы на констриктивное ремоделирование очевидно обусловлено как ее непосредственным стимулирующим влиянием на миграцию и пролиферацию гладкомышечных клеток и фибробластов сосудистой стенки, привлечением моноцитов, так и ее опосредованным действием, благодаря активации факторов роста и матриксных металлопротеиназ. В то же время механизмы действия тканевого активатора плазминогена, подавляющие развитие неоинтимы и увеличивающие просвет сосуда оставались неясными. Обнаруживалось также противоречие с полученными нами и другими исследователями данными об участии плазмина в формировании неоинтимы. Вероятно, тканевой активатор плазминогена индуцирует другие процессы помимо образования плазмина, которые оказываются превалирующими при ремоделировании сосудов *in vivo*. Мы предполагаем наличие нескольких возможных механизмов, которые могут обуславливать различия, наблюдаемые в сосудистой стенке.

Тканевой активатор плазминогена обладает большей афинностью при связывании с фибрином, чем урокиназный активатор плазминогена [222], и является основным для обеспечения фибринолиза. Возможно, фибринолитический эффект тканевого активатора плазминогена вносит ключевой вклад, предотвращая тромбообразование и, таким образом, подавляет развитие неоинтимы [197].

Кроме того, после баллонирования регенерирующий эндотелий активно экспрессирует тканевой активатор плазминогена [308]. Быстрая реэндотелизация ограничивает развитие неоинтимы, а неполную реэндотелизацию нередко отмечают в сосудах с неоинтимой большого объема [62, 394]. tPA способствует пролиферации и миграции эндотелиальных клеток [387], тогда как урокиназа не является митогеном для эндотелиальных клеток человека [187]. Ускорение реэндотелизации после экзогенного нанесения tPA может быть одним из возможных механизмов, ограничивающих рост неоинтимы и определяющих различия в эффектах активаторов плазминогена при ремоделировании артерий. Было выявлено, что при отсутствии гена тканевого активатора плазминогена, фибринолитическая активность урокиназы возрастала в 2–3 раза по сравнению с животными дикого генотипа [154]. Это может указывать на существование взаимосвязи между экспрессией урокиназы и тканевого активатора плазминогена, компенсирующей недостаток tPA. Исходя из этого, можно предположить, что избыток тканевого активатора плазминогена в стенке артерии мог вызывать временное снижение экспрессии урокиназы и, таким образом, уменьшать эффекты урокиназы, стимулирующие пролиферацию, миграцию клеток и рост неоинтимы.

Другим механизмом, объясняющим различное влияние активаторов плазминогена на ремоделирование поврежденной сосудистой стенки, может быть миграция гладкомышечных клеток, которая представляет собой один из основных механизмов развития неоинтимы [10]. В исследованиях на животных, лишенных генов активаторов плазминогена, было показано, что именно урокиназа, а не тканевой активатор плазминогена играет ключевую роль в регуляции миграции

клеток в поврежденном сосуде [113]. Исследования, показали, что при стимуляции урокиназой возрастает желатиназная активность клеток промоноцитарных линий U-937 и THP-1, преимущественно за счет активности матриксной металлопротеиназы 9, в то же время тканевой активатор плазминогена таким влиянием не обладает [402]. Меньшая способность к активации матриксных металлопротеиназ у тканевого активатора плазминогена по сравнению с урокиназой, а, следовательно, отсутствие активации протеолитического каскада, необходимого для миграции клеток, может быть одним из возможных механизмов, обуславливающих отсутствие стимуляции миграции клеток сосудистой стенки под действием tPA.

Поскольку механизмы, определяющие различия в эффектах двух активаторов плазминогена при ремоделировании артерий были не вполне ясны, для их более детального изучения, мы оценили экспрессию активаторов плазминогена и матриксных металлопротеиназ, ответственных за расщепление матрикса и также участвующих в процессах ремоделирования сосудов, у животных с разным генетически предопределенным ответом сосудов на изменение кровотока.

Снижение тока крови в частично перевязанной артерии по-разному стимулирует рост интимы и меди у мышей линий FVB и C57Bl. У животных FVB перевязка и уменьшение тока крови стимулирует значительный рост интимы и меди до 28-го дня. Утолщение интимы и меди сопровождается компенсаторным позитивным ремоделированием сосудистой стенки; наблюдалось расширение артерии, с максимальным расширением диаметра просвета к 14 дню. У животных C57Bl уменьшение кровотока не вызывало роста интимы, тогда как диаметр и просвет артерии значительно уменьшались к 28 дню. При этом FVB характеризовались большим компенсаторным расширением сосуда в результате позитивного ремоделирования и расширением просвета, несмотря на рост интимы и меди. Эти особенности указывают на ключевую роль процессов ремоделирования сосудистой стенки в ответ на снижение кровотока, определяющую результирующий размер просвета артерии.

Мы обнаружили, что у инбредных животных с разными типами ремоделирования артерий, изменения размеров интимы, меди и объема внутри наружной эластической мембраны соотносятся с экспрессией тканевого и урокиназного активаторов плазминогена. Мы показали, что динамика утолщения интимы и меди, пролиферации клеток сосудистой стенки и аккумуляции клеток воспалительного типа совпадала с динамикой экспрессии урокиназы, тогда как динамика увеличения диаметра артерии совпадала во времени с динамикой экспрессии тканевого активатора плазминогена. Можно предположить, что генетический тип ремоделирования артерий может определяться разной динамикой экспрессии урокиназного и тканевого активаторов плазминогена при снижении тока крови у инбредных мышей. Совпадение динамики пролиферации клеток сосудистой стенки и аккумуляции воспалительных клеток с экспрессией урокиназы может отражать влияние урокиназы, которая способна стимулировать как пролиферацию ГМК, так и воспаление в сосудистой стенке. Эти данные хорошо соотносятся с полученными нами данными на модели баллонирования сонной артерии, где урокиназа стимулировала пролиферацию ГМК и накопление воспалительных клеток. Полученные результаты хорошо соотносятся с результатами ранее опубликованной работы, показавшей на модели атеросклероза, что увеличение экспрессии урокиназы стимулировало негативное ремоделирование [183]. Кроме того, эти данные подкрепляются тем, что урокиназа является митогеном для ГМК и хемоаттрактантом для лейкоцитов [69].

Поскольку максимальное расширение диаметра артерий совпадало во времени с максимальной экспрессией тканевого активатора плазминогена, можно предположить, что экспрессия tPA играет важную роль в развитии положительного ремоделирования артерии в ответ на снижение тока крови, что наблюдается в случае роста атеросклеротической бляшки (в соответствии с феноменом Глагова) [100]. Расширение диаметра артерии при снижении кровотока обладает сходством с позитивным ремоделированием сосудов человека при атеросклерозе [378].



На использованной модели разного генетически предопределенного типа ремоделирования артерий на фоне снижения кровотока у животных инбредных линий отличий в экспрессии ММП 2 и 9 типов, а также их ингибитора TIMP-2 между линиями не выявлено: их содержание возрастало в равной степени у животных FVB и C57Bl и не соотносилось с показателями ремоделирования.

Возрастание активности ММП у инбредных животных может быть связано с увеличением содержания урокиназы, так как она способна вызывать активацию ММП в сосудистой стенке как непосредственно, так и опосредовано через образование плазмينا [65, 361]. На модели снижения кровотока было обнаружено участие ММП-2 и ММП-9 в ремоделировании сосудов [123]. В нашем исследовании экспрессия ММП у животных двух линий не различалась. Возможной причиной того, что наши данные отличаются от полученных ранее может быть различие в моделях, так как мы использовали модель снижения кровотока при частичной перевязке сонной артерии [350], тогда как при полной перевязке как правило развивается тромбоз из-за перекрытия кровотока, который определяет включение дополнительных механизмов в развитие ремоделирования сосудистой стенки.

На основании проведенного исследования мы полагаем, что разные типы ремоделирования при снижении тока крови могут быть обусловлены различиями в экспрессии активаторов пламиногена, которые оказывают влияние на ключевые процессы ремоделирования артерий, а именно деление клеток, их миграцию и накопление воспалительных клеток моноцитов/макрофагов. Усиленный рост интимы и меди у мышей FVB сопровождался большим индексом пролиферации клеток сосудистой стенки в течение 7 дней после операции частичной перевязки артерии. Кроме того, пролиферация совпадала с накоплением в сосудистой стенке клеток воспалительного ряда, и также была больше у животных линии FVB. При этом наибольшая экспрессия урокиназы и обеих ММП также совпадала с пиками деления клеток и накопления моноцитов/макрофагов. Компенсаторное расширение диаметра артерии при увеличении интимы и меди было выражено у животных линии FVB, тогда как в

сосудах C57Bl отмечалось уменьшение просвета. При этом наибольшее увеличение диаметра и просвета артерии было обнаружено через 14 дней после частичной перевязки артерии, что совпадало с наибольшим возрастанием содержания тканевого активатора плазминогена в артериях. Выявленные совпадения позволили нам предполагать, что роль тканевого активатора плазминогена и урокиназы в регуляции роста интимы и меди и ремоделирования различна: возрастание содержания урокиназы усиливает рост интимы и меди, тогда как повышение содержания тканевого активатора плазминогена способствует компенсаторному позитивному ремоделированию, предотвращающему сужение просвета артерии. Отсутствие возрастания экспрессии тканевого активатора плазминогена в артериях животных линии C57Bl, вероятно, приводит к недостаточному позитивному ремоделированию, и, в результате, к сужению просвета артерии. Наша гипотеза находит подкрепление в результатах исследования, проведенного на мышях, лишенных генов урокиназного или тканевого активаторов плазминогена, показавшего, что только отсутствие гена урокиназы предотвращает рост неоинтимы при повреждении сосуда, тогда как выключение гена тканевого активатора плазминогена не оказывает влияния на ее развитие [113].

Ранее было показано, что рост интимы-меди определяется генетически [160, 171] и ассоциирован с возрастанием риска ишемических заболеваний сердца и мозга и их осложнений [32, 364]. Полученные результаты приводят нас к заключению, что разные типы ремоделирования артерий в ответ на снижение кровотока ассоциированы с различными изменениями экспрессии урокиназного и тканевого активаторов плазминогена, которые, вероятно, также являются генетически предопределенными.

Наши результаты, полученные на двух моделях ремоделирования артерий – внутрисосудистого повреждения сонной артерии крысы и снижения кровотока в сонной артерии мыши хорошо дополняют друг друга. Так, на модели снижения кровотока повышенный уровень урокиназы также совпадал с ростом интимы и меди, а повышенный тканевой активатор плазминогена совпадал с

положительным ремоделированием сосуда. Полученные данные подтверждают нашу гипотезу о различных механизмах регуляции ремоделирования артерий двумя активаторами плазминогена, что позволяет рассматривать их как инструменты для изучения механизмов ремоделирования артерий, а также потенциальные мишени для терапевтических воздействий.

Для дальнейшего прояснения механизмов, обуславливающих различия эффектов активаторов плазминогена на ремоделирование сосудистой стенки мы исследовали влияние урокиназы на экспрессию генов в поврежденной сосудистой стенке с помощью метода транскрипционных матриц (микрочипов). Для анализа микрочипов был использован геном крысы, состоящий из 8799 известных генов и неаннотированных последовательностей. Мы обнаружили, что урокиназа в отличие от тканевого активатора плазминогена стимулирует экспрессию большой группы про-воспалительных генов, что может быть важным для процессов ремоделирования стенки артерии, в том числе, регуляции миграции и пролиферации клеток. В эту группу вошли гены, кодирующие белки, участвующие в регуляции воспаления. Ранее мы показали, что урокиназа способствует привлечению воспалительных клеток к зоне повреждения артерии, в частности, макрофагов. Увеличение числа этих клеток в сосудистой стенке может объяснять повышение экспрессии про-воспалительных генов в сосудистой стенке. Неожиданной находкой оказалось значительное и достоверное ( $p \leq 0,0005$ ) повышение экспрессии гена урокиназы, что может указывать на наличие положительной обратной связи и определять триггерный механизм действия урокиназы в поврежденной стенке артерии.

Кроме того, урокиназа в отличие от тканевого активатора плазминогена вызывала достоверные изменения в экспрессии группы генов, участвующих в регуляции оксидативного стресса в клетках, что может стимулировать рост неоинтимы и сужение просвета артерии. Оксидативный стресс, возникающий в ответ на повреждение сосудистой стенки, играет важную роль в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний, поскольку способствует неблагоприятному ремоделированию сосудов [10, 167]. Полученные нами данные о том, что

урокиназа может регулировать экспрессию генов, участвующих в развитии оксидативного стресса, в поврежденной артерии после баллонирования указывают на новый механизм действия урокиназы, который может оказаться важнейшим в регуляции пролиферации сосудистых клеток, роста неоинтимы и развитии неблагоприятного ремоделирования артерии.

Важно то, что тканевой активатор плазминогена не вызывал изменений, подобных урокиназе, но оказывал влияние на изменения экспрессии группы генов, вовлечённых в регуляцию сосудистого тонуса, а также группы генов, регулирующих функционирование нервной ткани.

Таким образом, было доказано, что разные эффекты активаторов плазминогена в стенке кровеносных сосудов обусловлены разными каскадами, которые они индуцируют.

Мы подтвердили, что в поврежденном сосуде урокиназа участвует в регуляции воспалительной реакции, повышая экспрессию TNF-alpha и TACE, что может являться дополнительным механизмом констриктивного ремоделирования сосудистой стенки. Реакция воспаления в ответ на повреждение сосудистой стенки является одним из важнейших механизмов ремоделирования сосудов и развития неоинтимы [159, 396]. Так, констриктивное ремоделирование не развивалось при подавлении воспаления в поврежденном сосуде [35]. У пациентов подавление гена фермента, активирующего фактор некроза опухолей, подавляло развитие атеросклероза и констриктивное ремоделирование артерий [159].

В нашем исследовании нанесение урокиназы на поврежденную баллонным катетером артерию увеличивало накопление в адвентициальной оболочке клеток моноцитарно-макрофагального ряда. На поздних сроках после нанесения урокиназы на поврежденную артерию сохранялось уменьшение диаметра и констриктивное ремоделирование, что может быть связано с привлечением клеток воспалительного ряда и последующим фиброзированием адвентиции. Большое значение для регуляции этих процессов может иметь TNF-альфа, который образуется под влиянием урокиназы. Жесткая фиброзированная

адвентиция предотвращает компенсаторное расширение при формировании неоинтимы и утолщении меди, сдавливая сосуд.

Привлечение и аккумуляция моноцитов/макрофагов под действием урокиназы в поврежденной адвентиции, дают основание считать, что урокиназа является фактором, стимулирующим воспаление в поврежденной сосудистой стенке, что может являться одним из механизмов действия урокиназы, ответственным за констриктивное ремоделирование сосудов. Можно предположить, что сбалансированная локальная регуляция экспрессии урокиназы и генов, ответственных за воспаление, на поврежденном участке артерии может оказаться эффективной для контроля констриктивного ремоделирования.

Мы подтвердили полученные с использованием микрочипов данные о том, что локальное повышение концентрации урокиназы на поврежденном участке стимулирует экспрессию ММП-2. Так, под действием урокиназы возрастала экспрессия и активация матриксных металлопротеиназ (ММП-2 и ММП-9) на ранних сроках после повреждения, тогда как тканевой активатор плазминогена подобного эффекта не вызывал. Более того, в настоящем исследовании тканевой активатор плазминогена на ранних сроках после повреждения подавлял экспрессию матриксной металлопротеиназы 2, что может иметь значение для обеспечения миграции клеток в неоинтиму и ее формирования [74]. Наши данные хорошо соотносятся с ранее полученными данными о том, что урокиназа участвует в активации ММП [65, 361]. Полученные нами данные на модели ремоделирования сонной артерии крысы после повреждения согласуются с нашими данными, полученными на модели ремоделирования сонной артерии мыши после ее частичной перевязки, так как на обеих моделях мы наблюдали возрастание экспрессии матриксных металлопротеиназ после вмешательства. Ранее было показано значение ММП для миграции клеток, формирования неоинтимы и перестройки ВКМ [123, 154, 201]. Возросшая активация матриксных металлопротеиназ 2 и 9 типов может также усиливать миграцию клеток и рост неоинтимы. Кроме того, активированная ММП-2 участвует в протеазной

инактивации отдельных белков, обладающих вазодилатирующим эффектом, и таким образом может способствовать также вазоконстрикции артерии [429].

Таким образом, экспрессия урокиназы запускает протеолитический каскад, который регулирует процессы взаимодействия сосудистых клеток с матриксом. Было обнаружено, что перестройка внеклеточного матрикса играет важную роль в процессах ремоделирования [198]. Так, в работах на животных, лишенных генов различных протеаз, было выявлено ключевое участие урокиназы и матриксных металлопротеиназ 2 и 9 типов, но не тканевого активатора плазминогена, в процессах миграции клеток и формировании неоинтимы после внутрисосудистого повреждения [154, 401].

Урокиназа благодаря собственной протеолитической активности, а также активируя плазмин и матриксные металлопротеиназы, может высвобождать и активировать факторы роста, связанные с матриксом, которые дополнительно усиливают миграционный и пролиферативный ответы клеток сосудистой стенки, в частности, bFGF и TGF-beta, которые способствуют росту неоинтимы [375]. Кроме того, про-миграционные эффекты некоторых факторов роста (bFGF и PDGF-BB) опосредованы урокиназой [11, 13].

Механизмы, отвечающие за эффекты тканевого активатора плазминогена – предотвращение формирования неоинтимы и раннее расширение диаметра артерии, позитивное ремоделирование, остаются не до конца ясными. Тем не менее, в нашем исследовании мы выявили, что тканевой активатор плазминогена при нанесении на поврежденную артерию вызывал подавление экспрессии матриксной металлопротеиназы 2 типа, тогда как урокиназа стимулировала экспрессию этой металлопротеиназы. Кроме того, значение изменений экспрессии генов, участвующих в регуляции тонуса сосудов, которые мы обнаружили методом транскрипционных матриц может определять расширение диаметра артерии под влиянием tPA. Так, мы смогли приблизиться к пониманию механизмов, обуславливающих различное влияние активаторов плазминогена на ремоделирование сосудистой стенки, которое, вероятно, осуществляется через

разное влияние на экспрессию других белков-участников процессов ремоделирования.

Урокиназа также вызывала достоверные изменения в экспрессии генов, участвующих в развитии оксидативного стресса, что может способствовать росту неоинтимы и сужению просвета артерии. Оксидативный стресс, возникающий в ответ на повреждение сосудистой стенки, играет важную роль в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний, поскольку способствует неблагоприятному ремоделированию сосудов [10, 167, 228, 264]. Известно, что образование супероксид-радикала является одним из ключевых процессов, регулирующих сосудистый тонус и пролиферацию ГМК в стенке сосуда [10, 299,324]. В поврежденной артерии после экспериментального баллонирования резко возрастает образование супероксид-радикала и одновременно пролиферация ГМК [10, 265]. Полученные результаты свидетельствуют о способности урокиназы стимулировать генерацию активных форм кислорода клетками сосудистой стенки как ГМК, так и фибробластами. Наши данные согласуются с предыдущим исследованием показавшим, что урокиназа стимулирует высвобождение свободных радикалов кислорода из нейтрофилов [177]. Повышенная экспрессия НАД(Ф)Н-оксидаз в баллонированной артерии представляет собой важный механизм сигнализации, регулирующей рост неоинтимы и ремоделирование артерии [10, 258]. Получены также данные о том, что урокиназа может регулировать экспрессию генов, в частности, ММП-9, через образование АФК, что может играть важнейшую роль в реализации эффектов урокиназы.

Влияние на образование АФК в стенке артерии – новый механизм действия урокиназного активатора плазминогена, который представляется основным в регуляции деления ГМК под действием урокиназы. Можно полагать, что этот новый механизм действия урокиназы может оказаться ключевым для регуляции роста неоинтимы, сужения просвета и развития констриктивного ремоделирования кровеносных сосудов.

Представленные результаты демонстрируют важную роль урокиназы в регуляции миграции, пролиферации, фенотипической трансформации сосудистых

клеток, воспаления, образования активных форм кислорода и активации протеолитических каскадов в формировании неоинтимы и негативного ремоделировании сосудистой стенки после ангиопластики. Мы подтвердили ключевое значение протеолитического домена урокиназы в реализации ее эффектов и показали кардинальные отличия в механизмах влияния активаторов плазминогена на процессы перестройки сосудистой стенки. Эти данные могут способствовать разработке подходов к сбалансированному контролю локальной активности урокиназы в участке повреждения стенки сосуда после ангиопластики, который может оказаться эффективным в предотвращении рестенозов. Полученные нами данные позволяют обозначить новую функциональную мишень для такого контроля, которой является протеолитическая активность урокиназы. Разработка рекомбинантных мутантных форм урокиназы или генно-инженерных конструкций, которые при локальном введении в сосудистую стенку позволяют избирательно блокировать активность урокиназы, представляется в свете полученных данных перспективной для фармакологической и генно-терапевтической профилактики рестеноза и коррекции неблагоприятной структурной перестройки артерий при патологиях. Поскольку урокиназа является одним из ключевых участников реакции сосудов на повреждение, характеризующейся гиперплазией интимы и медиа и ремоделированием сосудистой стенки, это делает контроль ее эффектов перспективным подходом к терапии васкулопролиферативных процессов. Может быть также эффективно блокирование связывания урокиназы с ее рецепторами или внутриклеточных путей сигнализации, активируемых урокиназой, наравне с нейтрализацией ее протеазной активности. Перспективным направлением в области создания новых препаратов для лечения сосудистых (рестеноза, атеросклероза и др.) и онкологических заболеваний является использование рекомбинантных форм урокиназы и ее отдельных доменов, блокирующих эффекты эндогенной урокиназы. Сочетание локальной противовоспалительной, антиоксидантной терапии с контролем экспрессии урокиназы на участке баллонирования может также оказаться эффективным подходом к



предотвращению негативного ремоделирования артерии и неблагоприятных исходов баллонной ангиопластики. Данные о вкладе воспаления и оксидативного стресса в развитие стенозирования артерии, стимулированного урокиназой, могут служить основой для разработки комплексных подходов к предотвращению негативного ремоделирования артерии и неблагоприятных исходов баллонной ангиопластики.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Констриктивное неблагоприятное ремоделирование кровеносных сосудов сопровождает большинство заболеваний сердца и сосудов и ассоциировано с высокой сердечно-сосудистой смертностью. Несмотря на существенный прогресс в технике эндоваскулярных вмешательств, улучшающих кровоснабжение органов-мишеней, у значимой части больных через несколько месяцев после процедур происходит возврат стенокардии. Исследование механизмов ремоделирования сосудов, поиск мишеней для воздействий и регуляции неблагоприятного ремоделирования остается актуальной задачей современной медицины.

Установлено, что экспрессия компонентов системы урокиназы в сосудистой стенке повышается при прогрессировании атеросклеротического поражения преимущественно на клетках моноцитарно-макрофагального ряда. Рестеноз или повторное сужение просвета артерии в участке повреждения можно рассматривать как одну из форм “ускоренного” атеросклероза, сопровождающегося неблагоприятным ремоделированием сосуда, суживающим его просвет.

Уровень урокиназы в крови пациентов перед проведением баллонной ангиопластики коррелирует с возобновлением стенокардии и является ее независимым предиктором, что имеет большое значение для пациентов, которым показано проведение эндоваскулярной реваскуляризации.

Для выяснения механизмов, определяющих влияние активаторов плазминогена на ремоделирование кровеносных сосудов, рост неоинтимы и рестеноз артерий были использованы экспериментальные модели, которые позволили прояснить роль активаторов плазминогена в процессах перестройки сосудистой стенки. Обнаружено повышение экспрессии урокиназы на трех моделях ремоделирования, а именно внутрисосудистого баллонного повреждения, изолированного периадвентициального повреждения и на модели снижения кровотока в сонных артериях, что указывает на то, что система

урокиназы – обязательный участник ремоделирования сосудистой стенки. Урокиназа и ее рецептор экспрессируются в стенке сосуда уже в первые часы после баллонирования. Эта экспрессия в значительной степени обусловлена повышением синтеза этих белков клетками сосудистой стенки, о чем свидетельствует увеличение уровня их мРНК. При этом наблюдается корреляция между выраженностью экспрессии урокиназы, урокиназного рецептора и миграцией и пролиферацией гладкомышечных клеток сонной артерии крысы после экспериментального баллонирования.

Под действием экзогенной урокиназы площади неоинтимы и меди, соотношения меди к просвету и интимы к меди увеличивались, просвет сосуда уменьшался, доля делящихся клеток, а также общее число ГМК неоинтимы возрастали, что свидетельствует о потенциальной способности урокиназы стимулировать миграцию и пролиферацию ГМК на ранних этапах после повреждения стенки сосуда. Уменьшение площади, формирующейся неоинтимы, после введения ингибирующих урокиназу антител и соотношения интимы к просвету сосуда, а также уменьшение аккумуляции гладкомышечных клеток в неоинтимае может свидетельствовать о подавлении миграции клеток из меди в интиму и указывает на значение эндогенной урокиназы в регуляции этих процессов

Для изучения роли отдельных доменов урокиназы в различных функциях этого белка были созданы рекомбинантные конструкции, позволяющие синтезировать разные формы урокиназы и ее отдельные домены. Протеолитически неактивная рекомбинантная урокиназа, которая *in vitro* связывается с урокиназным рецептором и стимулирует миграцию ГМК в культуре, в поврежденном сосуде не стимулирует миграцию ГМК, их пролиферацию и рост неоинтимы в противоположность протеолитически активным формам урокиназы. Существенно, что рекомбинантная урокиназа, имеющая множественные мутации в рецептор-связывающей области молекулы и поэтому не связывающаяся с урокиназным рецептором и не стимулирующая миграцию ГМК в культуре, при нанесении на баллонированную артерию

усиливает рост неоинтимы, миграцию гладкомышечных клеток и их пролиферацию, аналогично полной форме урокиназы. Полученные данные указывают на то, что протеолитическая активность урокиназы в поврежденном сосуде *in vivo*, по-видимому, определяет основной механизм ее стимулирующего влияния на образование неоинтимы.

Для оценки вклада эндогенного плазмина на поврежденный сосуд наносили  $\alpha_2$ -антиплазмин. Было выявлено уменьшение площади неоинтимы, подавление аккумуляции ГМК в неоинтимае после введения  $\alpha_2$ -антиплазмина, а также увеличение площади просвета сосуда по сравнению с контрольным нанесением геля, что свидетельствует о подавлении миграции клеток из меди и интимы на фоне ингибирования плазмина. Это указывает на участие эндогенного плазмина, образующегося под действием активаторов плазминогена, в стимуляции пролиферации клеток и их миграции на ранних этапах после повреждения сосуда.

Поскольку было установлено значение протеолитической активности урокиназы для ее эффектов на ремоделирование стенки поврежденной артерии, было важно оценить влияние второго активатора плазминогена на процессы перестройки поврежденной стенки артерии. Нанесение на артерию тканевого активатора плазминогена вызывало иной эффект: размер неоинтимы был меньшим, чем в контрольных артериях, площадь меди и адвентиции достоверно не изменялась, а отношение площади интимы к площади меди было меньше в сопоставлении с контролем, что свидетельствовало о подавлении формирования неоинтимы. Соотношение площадь меди к площади просвета артерии было меньше, а площадь наружной эластической мембраны увеличивалась, что отражало развитие положительного ремоделирования сосуда под влиянием тканевого активатора плазминогена. На отдаленных сроках после баллонирования (через 14 и 28 суток) стимуляция роста неоинтимы и констриктивного ремоделирования при нанесении на сосуд урокиназы сохраняется длительное время, что, вероятно, обусловлено запуском механизмов, поддерживающих эти процессы. Положительное ремоделирование, вызванное нанесением тканевого активатора плазминогена, исчезает на этих сроках.

Для выяснения наличия связи эффектов урокиназы с ее влиянием на трансдифференцировку адвентициальных фибробластов в миофибробласты проведены исследования влияния урокиназы на поврежденную адвентицию небаллонированной артерии. Оказалось, что после повреждения в адвентиции возрастает экспрессия урокиназы, происходит стимуляция пролиферации адвентициальных клеток, возрастает доля  $\alpha$ -актин позитивных клеток, которые не являлись гладкомышечными, что может указывать на трансформацию фибробластов в миофибробласты, и увеличивается площадь адвентиции параллельно с сужением просвета сосуда. Это влияние урокиназы *in vivo* осуществляется преимущественно за счет специфической протеолитической активности урокиназы. Исследования, проведенные на культуре фибробластов, доказывают способность урокиназы трансформировать фибробласты в миофибробласты.

Был также выявлен механизм влияния урокиназы на фибробласты – это стимуляция экспрессии ММП-9 в фибробластах, для реализации которой необходимо образование активных форм кислорода и наличие сохранного митохондриального аппарата. В поврежденной артерии стимуляция экспрессии ММП-9 фибробластами может способствовать констриктивному ремоделированию.

Для определения механизмов действия активаторов плазминогена на ремоделирование артерий после экспериментального баллонирования были оценены изменения в экспрессии генов в стенке артерии после локального нанесения урокиназного и тканевого активаторов плазминогена на разных этапах после баллонирования с помощью метода микрочипов (транскрипционных матриц). Урокиназа в отличие от тканевого активатора плазминогена стимулирует экспрессию большой группы про-воспалительных генов, что может быть важным для процессов ремоделирования стенки артерии, в том числе регуляции миграции и пролиферации клеток. Также было обнаружено значительное повышение экспрессии гена урокиназы, что позволяет предполагать наличие триггерного механизма действия урокиназы в поврежденной стенке артерии. Урокиназа

вызывала достоверные изменения в экспрессии группы генов, участвующих в регуляции оксидативного стресса в клетках артериальной стенки, возникающего в ответ на повреждение.

Под влиянием тканевого активатора плазминогена менялась экспрессия других групп генов, в частности, генов, регулирующих функционирование нервной ткани и группы генов, участвующих в регуляции тонуса сосудов, эти изменения могут иметь значение для обнаруженного нами положительного ремоделирования под действием тканевого активатора плазминогена на ранних сроках после баллонного повреждения.

Полученные результаты доказывают, что урокиназа и тканевой активатор плазминогена воздействуют на экспрессию разных генов и активируют разные сигнальные пути, что и определяет различия в их эффектах на ремоделирование сосудистой стенки.

В связи с тем, что экспрессия матриксных металлопротеиназ ассоциирована с ремоделированием сосудов было важно определить связаны ли наблюдаемые различия в эффектах тканевого и урокиназного активаторов плазминогена на ремоделирование сосудистой стенки с их влиянием на экспрессию и активацию ММП-2 и ММП-9 в баллонированных сонных артериях. Установлено, что урокиназный и тканевой активаторы плазминогена оказывают разное влияние на активацию и экспрессию матриксных металлопротеиназ – ММП-2 и ММП-9, после повреждения сосуда. Так, увеличение концентрации урокиназы в участке баллонирования артерии увеличивает содержание ММП-2 и ее активной формы, а также активной формы ММП-9 на ранних этапах после повреждения. Противоположно урокиназе возрастание концентрации активатора плазминогена тканевого типа подавляет экспрессию ММП-2 и не оказывает влияния на образование активных форм ММП-2 и ММП-9.

У мышей с разными генетически predetermined типами ремоделирования артерий изменения размеров интимы, меди и объема внутри наружной эластической мембраны соотносятся с экспрессией тканевого и урокиназного активаторов плазминогена. Было показано, что динамика

утолщения интимы и меди, пролиферации клеток сосудистой стенки и аккумуляции клеток воспалительного типа совпадала с динамикой экспрессии урокиназы, тогда как динамика увеличения диаметра артерии совпадала с динамикой экспрессии тканевого активатора плазминогена. При этом динамика экспрессии ММП у животных обеих линий не менялась. Можно предположить, что генетический тип ремоделирования артерий определяется разной динамикой экспрессии урокиназного и тканевого активаторов плазминогена при снижении тока крови у инбредных мышей.

Привлечение в сосуд воспалительных клеток является одним из механизмов влияния урокиназы на ремоделирование сосудов. Установлено, что одновременно урокиназа увеличивает экспрессию в стенке сосуда одного из основных провоспалительных факторов, секретирующихся моноцитами/макрофагами – фактора некроза опухолей альфа и фермента, осуществляющего его превращение в активную форму, в то время как нанесение тканевого активатора плазминогена подобного влияния не оказывало.

На предыдущем этапе были получены данные об изменении экспрессии генов оксидативного стресса под действием урокиназы при ее локальном нанесении на сосуд. В связи с этим, нашей задачей стало исследование роли подобных изменений для ремоделирования сосудистой стенки после экспериментального баллонного повреждения артерии.

Системное введение антиоксиданта существенно подавляло развитие эффектов урокиназы на ремоделирование сосудистой стенки и рост неоинтимы *in vivo*. В культуре ГМК эбселен как антиоксидант достоверно подавлял мощную индукцию пролиферации ГМК, возникающую под влиянием урокиназы, что свидетельствует о существовании редокс-зависимого механизма регуляции урокиназой деления клеток. Существенно, что урокиназа стимулировала образование активных форм кислорода в культивируемых ГМК. При этом урокиназа достоверно стимулировала экспрессию НАД(Ф)Н-оксидаз в ГМК. В поврежденных артериях экспрессия НАД(Ф)Н-оксидаз значительно повышена, что является одним из важных механизмов сигнализации, регулирующей рост

неоинтимы и ремоделирование артерий. Данные о том, что урокиназа способна регулировать уровень НАД(Ф)Н-оксидаз в сосудистых ГМК, выявляют новый механизм действия урокиназы, который может оказаться ключевым в регуляции пролиферации клеток сосудистой стенки, роста неоинтимы и ремоделирования артерии. На рисунке 56 представлено схематичное изображение механизмов, способствующих пролиферации клеток под действием урокиназы.

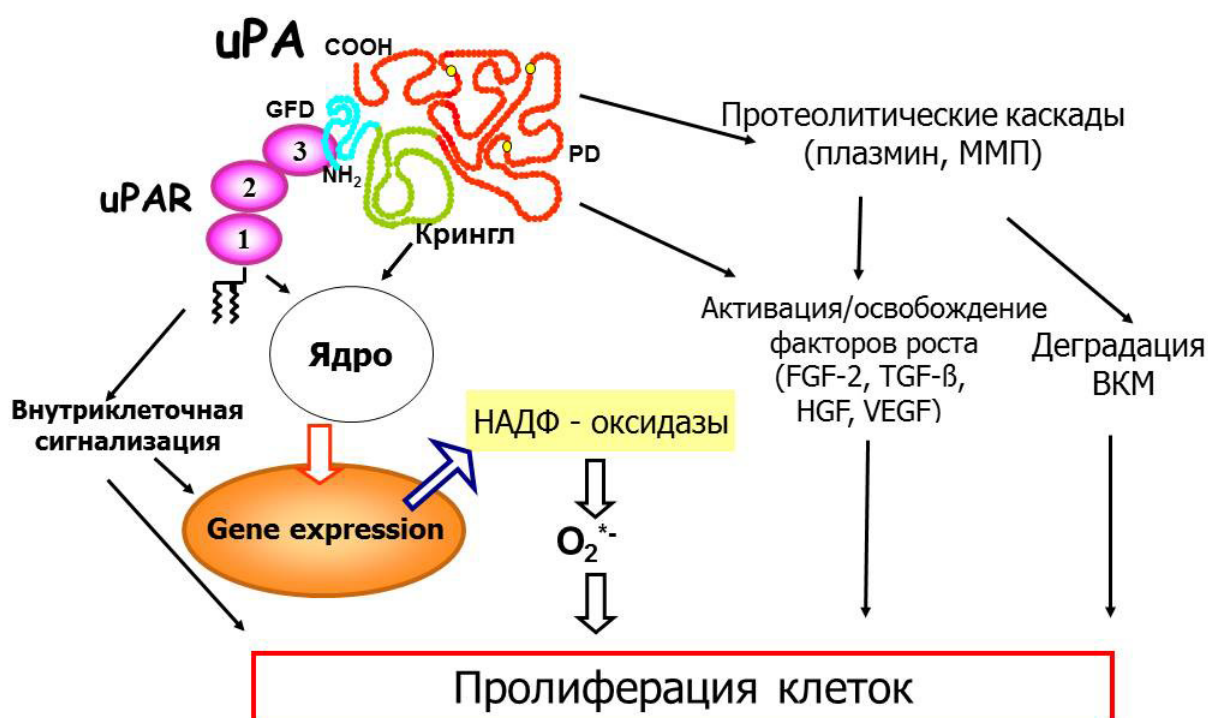


Рисунок 56 – Схема механизмов, способствующих пролиферации клеток под действием урокиназы (Обозначения: uPA – урокиназа; uPAR – рецептор урокиназы uPAR/CD87; GFD – домен, подобный фактору роста; PD – протеолитический домен; ММП – матриксные металлопротеиназы; FGF – фактор роста фибробластов; PDGF – тромбоцитарный фактор роста; HGF – фактор роста гепатоцитов; VEGF – сосудисто-эндотелиальный фактор роста; НАДФ – никотиамид аденин динуклеотид фосфат; ВКМ – внеклеточный матрикс)

Таким образом, урокиназа играет важнейшую роль в регуляции большинства процессов, вовлеченных в ремоделирование сосудов при их



повреждении (рисунок 57). Основные механизмы регуляции процессов ремоделирования артерий под действием урокиназы схематично представлены на рисунке 58.

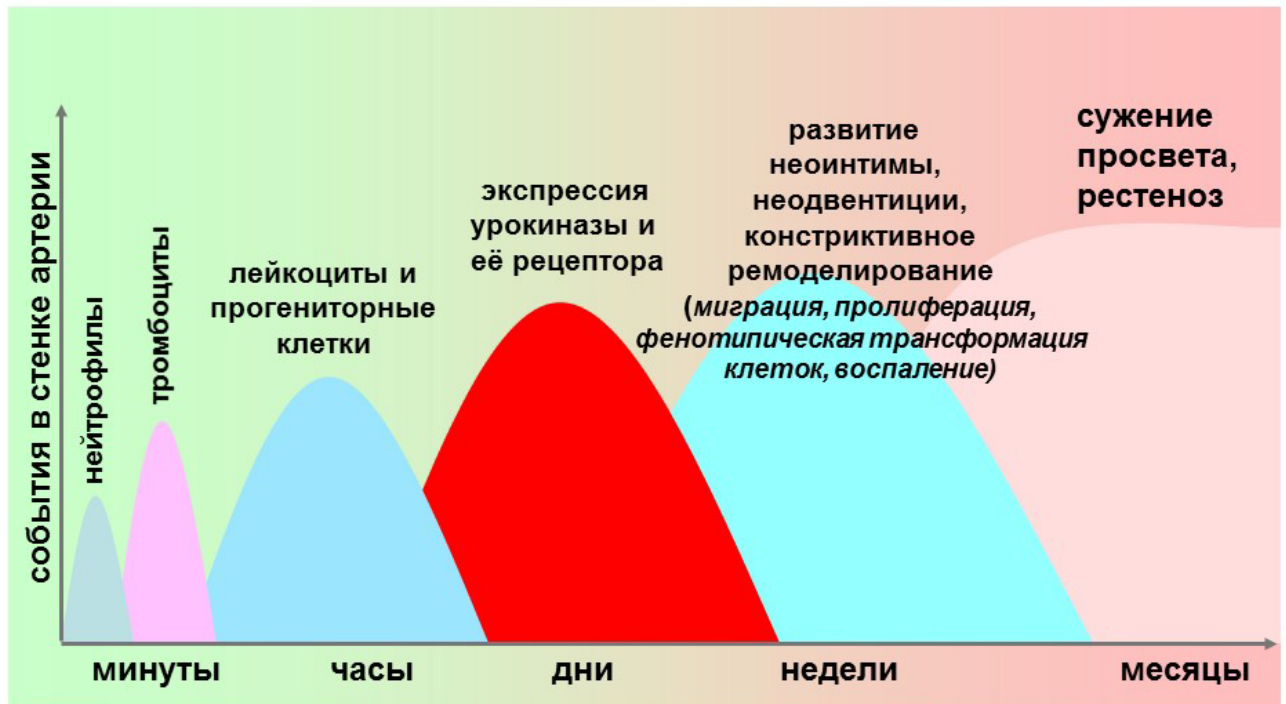


Рисунок 57 – Последовательность ответов сосудистой стенки на повреждение, приводящих к сужению просвета артерии

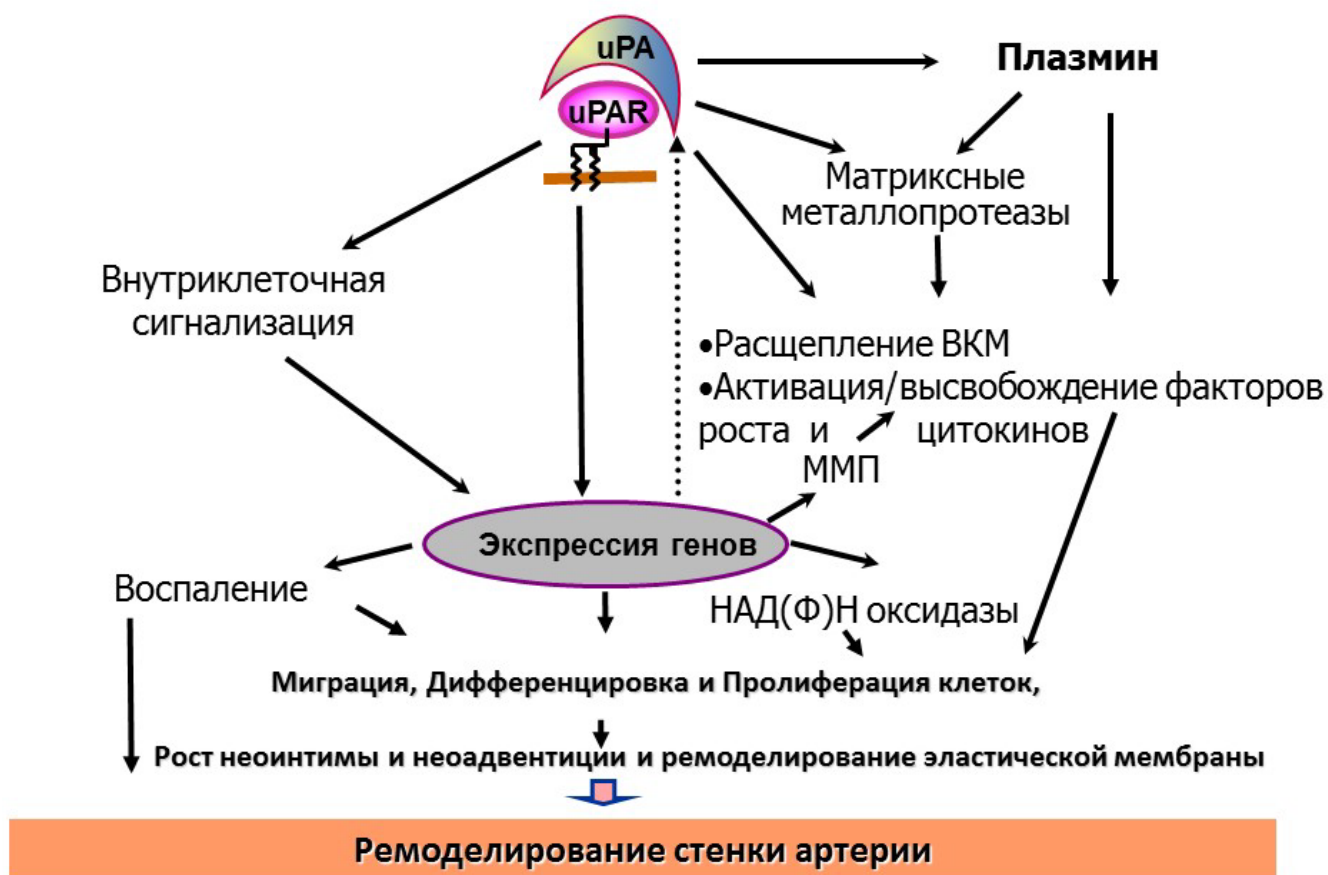


Рисунок 58 – Механизмы регуляции роста и ремоделирования артерий под действием урокиназы (Обозначения: uPA – урокиназа; uPAR – рецептор урокиназы uPAR/CD87; ВКМ – внеклеточный матрикс; ММП – матриксные металлопротеиназы)

### Перспективы исследований и дальнейшая разработка темы

В настоящем исследовании мы убедительно показали, что урокиназа является уникальным регулятором ремоделирования стенки артерии, способствующим констриктивному ремоделированию сосудов вследствие стимуляции ключевых процессов ремоделирования сосудов - миграции, пролиферации клеток, трансформации фибробластов в миофибробласты, воспаления, оксидативного стресса, а также усилении протеолитического каскада ММП. Требуют дальнейшего исследования механизмы сигнализации и определение транскрипционных факторов, вовлеченных в регуляцию урокиназой экспрессии генов в сосудистой стенке.

Мы обнаружили, что тканевой активатор плазминогена на ранних этапах после повреждения, напротив, способствует увеличению диаметра артерии. Независимое исследование, посвященное механизмам действия тканевого активатора плазминогена, приводящим к расширению просвета артерии, является перспективным с точки зрения изучения механизмов положительного ремоделирования сосудистой стенки.

Поскольку урокиназа является одним из ключевых регуляторов ремоделирования сосудистой стенки, это делает контроль ее эффектов перспективным подходом к терапии заболеваний, сопровождающихся констриктивным ремоделированием, в частности, рестенозов и окклюзий шунтов после процедур реваскуляризации. Для этого может быть эффективно блокирование внутриклеточных путей сигнализации, активируемых урокиназой, и нейтрализация ее протеазной активности. Использование рекомбинантных форм урокиназы и ее отдельных доменов, блокирующих эффекты эндогенной урокиназы, может оказаться перспективным направлением в области создания новых препаратов для лечения сосудистых (рестеноза, атеросклероза и других) и онкологических заболеваний.

### **Благодарности**

Выражаю большую признательность всем коллегам, принимавшим участие в исследованиях. Благодарю академика Ткачука Всеволода Арсеньевича за неизменное интеллектуальное участие и наставничество, научного консультанта доктора медицинских наук, профессора Парфенову Елену Викторовну за сотрудничество и поддержку. Благодарю профессора Э.М. Тарарака и к.б.н. Н.И. Калинину (лаборатория Молекулярной и клеточной кардиологии ИЭК РКНПК Минздрава РФ) за любезное предоставление аутопсийного материала и консультации по методу иммуногистохимии; руководителя группы Инженерной иммунологии ИЭК РКНПК Минздрава РФ к.б.н. С.П. Домогатского за предоставление нейтрализующих моноклональных антител к урокиназе; руководителя лаборатории генной инженерии ИЭК РКНПК Минздрава РФ к.б.н.

Р.Ш. Бибилашвили, предоставившего бактериальные культуры клеток *E.coli*, трансформированные плазмидами, содержащими различные формы урокиназы. Благодарю семью и друзей за любовь и понимание.

Исследования были проведены при поддержке гранта РФФИ проект №14-24-00086.

## ВЫВОДЫ

1. Содержание компонентов системы урокиназы в сосудистой стенке повышается при прогрессировании атеросклеротического поражения, при этом экспрессия урокиназы и ее рецептора локализована преимущественно на клетках моноцитарно-макрофагального ряда.

2. Повышенное содержание урокиназы в крови больных ишемической болезнью сердца является независимым предиктором возобновления стенокардии после транслюминальной баллонной ангиопластики, так, при уровне урокиназы 1–1,2 нг/мл и выше частота возобновления стенокардии возрастает до 60–80%.

3. Экзогенная урокиназа при нанесении на сосуд после баллонирования стимулирует ранние процессы образования неоинтимы и неoadвентиции, причем эти эффекты обусловлены в основном протеолитическими свойствами урокиназы. Подавление эндогенной урокиназы с помощью нейтрализующих антител препятствует образованию неоинтимы и сужению просвета артерии после баллонирования *in vivo*.

4. Урокиназа стимулирует фенотипическую трансформацию фибробластов в миофибробласты, которая в поврежденной адвентиции *in vivo* сопровождается усиленным делением клеток, аккумуляцией клеток сократительного фенотипа, накоплением коллагена и утолщением адвентиции, что способствует констриктивному ремоделированию артерии.

5. Активаторы плазминогена оказывают противоположное влияние на ремоделирование артерии: урокиназа усиливает рост неоинтимы и негативное ремоделирование артерии, тогда как тканевой активатор плазминогена подавляет рост неоинтимы и способствует положительному ремоделированию на ранних сроках после экспериментального баллонирования.

6. Урокиназа усиливает экспрессию и активацию матриксных металлопротеиназ 2 и 9 типов в поврежденной сосудистой стенке, тогда как тканевой активатор плазминогена подавляет экспрессию матриксной металлопротеиназы 2 типа.

7. Урокиназный активатор плазминогена является фактором, стимулирующим воспаление в сосудистой стенке, поскольку увеличивает экспрессию про-воспалительных белков и способствует инфильтрации поврежденной стенки артерии моноцитами/макрофагами.

8. Урокиназа стимулирует пролиферацию гладкомышечных клеток сосудов, индуцируя образование активных форм кислорода благодаря экспрессии НАД(Ф)Н оксидаз Nox1 и Nox4. Образование активных форм кислорода под действием урокиназы является новым механизмом реализации пролиферативного эффекта урокиназы на клетки сосудистой стенки.

9. Урокиназа является обязательным участником перестройки сосудистой стенки и одним из ключевых регуляторов констриктивного ремоделирования артерий благодаря влиянию на экспрессию генов, вовлеченных в регуляцию воспаления и оксидативного стресса, стимуляции миграции и пролиферации клеток, аккумуляции воспалительных клеток, фенотипической трансформации фибробластов в миофибробласты. Для осуществления большинства этих эффектов урокиназы необходима ее протеолитическая активность.

10. Протеолитическая активность урокиназы представляет собой новую функциональную мишень для воздействий, направленных на предотвращение констриктивного ремоделирования при заболеваниях кровеносных сосудов.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Пациентам с ишемической болезнью сердца до проведения процедур эндоваскулярной реваскуляризации рекомендуется определение уровня урокиназы крови для оценки риска возобновления стенокардии.
2. На основании данных о предикторной значимости урокиназы возможно создание диагностической системы для выявления пациентов с увеличенным риском возврата стенокардии после процедур эндоваскулярной реваскуляризации.
3. Результаты работы являются основой для разработки методов предотвращения неблагоприятного ремоделирования и рестенозирования сосудов с помощью локальной нейтрализации протеолитической активности урокиназы в сосудистой стенке.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

а.о.	–	аминокислотные остатки
АФК	–	активные формы кислорода
ВКМ	–	внеклеточный матрикс
ГМК	–	гладкомышечные клетки
ГТФ	–	гуанин-нуклеотид
ГФИ якорь	–	гликозилфосфатидилинозитольный якорь
ДНК	–	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИБС	–	ишемическая болезнь сердца
ММП	–	матриксные металлопротеиназы
		модифицированным ростовым доменом, не связывающаяся с урокиназным рецептором
мРНК	–	матричная рибонуклеиновая кислота
		на глутамин в активном центре, каталитически неактивная
НАД(Ф)Н	–	никотинамидадениндинуклеотидфосфат
НЭМ	–	наружная эластическая мембрана
ПААГ	–	полиакриламидном геле
ПАИ	–	ингибитор активатора плазминогена
ПЦР	–	полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
РНК	–	рибонуклеиновая кислота
ТБКА	–	транслюминальная баллонная коронарная ангиопластика
ТИМ	–	толщина интимы-медии
ФБС	–	фетальной бычьей сыворотки
ФСБ	–	фосфатно-солевой буфер
ЭДТА	–	этилендиаминтетраацетат
bFGF	–	основной фактор роста фибробластов
C57Bl	–	мыши линии C57 Black 6 J
CD-45	–	лейкоцитарный маркер



ED-1	–	маркер моноцитов/макрофагов
EGF	–	эпидермальный фактор роста
FAK	–	киназа фокальных контактов;
FAK	–	киназа фокальных контактов
FVB/NJ	–	линейные мыши FVB/NJ
GFD	–	домен, подобный эпидермальному фактору роста
GPI	–	гликозилфосфатидилинозитольный якорь
HGF	–	фактор роста гепатоцитов
h-кальдесмон	–	высокомолекулярный гладкомышечный кальдесмон
ICE	–	интерлейкин 1 бета конвертирующий фермент (каспаза-1)
IgGs	–	неиммунные иммуноглобулины G
JAK	–	тирозиновые протеинкиназы;
Ki-67	–	маркер пролиферации клеток
LRP	–	рецептор липопротеидов низкой плотности
LRP/ $\alpha$ 2-MR	–	белок, связанный с рецептором липопротеидов низкой плотности/рецептор $\alpha$ 2-макроглобулина
MAPK	–	митогенактивируемые протеинкиназы
NADH	–	никотинамидадениндинуклеотид
NO	–	оксида азота
NR-TK	–	нерецепторная тирозинкиназа;
PCNA	–	маркер пролиферации клеток
PDGF	–	тромбоцитарный фактор роста
PI3K	–	фосфоинозитид-3-киназа
PKA	–	протеинкиназа A
PKC $\epsilon$	–	протеинкиназа C $\epsilon$
Ser	–	серин
SM-МНС	–	тяжелая цепь гладкомышечного миозина

STAT	–	ДНК-связывающие активаторы транскрипции
TACE	–	конвертирующий фермент фактора некроза опухолей
TGF $\beta$	–	трансформирующий фактор роста $\beta$
TIMP 2	–	тканевой ингибитор металлопротеиназы-2
TNF-alpha	–	фактор некроза опухолей альфа
tPA	–	тканевой активатор плазминогена
uPA (wt)	–	нативная рекомбинантная форма урокиназы дикого типа
uPA H/Q	–	рекомбинантная форма урокиназы с заменой гистидина на глутамин в активном центре
uPA	–	активатор плазминогена урокиназного типа (урокиназа)
uPA/GFD	–	рекомбинантная форма урокиназы с модифицированным ростовым доменом
uPAR (uPAR/CD87)	–	рецептор урокиназы
uPARAP	–	белок, ассоциированный с урокиназным рецептором
VEGF	–	фактор роста эндотелия сосудов
VLDLR	–	рецептор липопротеидов очень низкой плотности

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Айсина, Р.Б. Структура и функции системы плазминоген/плазмин [Текст] / Р.Б. Айсина, Л.И. Мухаметова // Биоорганическая химия. – 2014. – Т.40, № 6. – С.642-657.
2. Активаторы плазминогена и матриксные металлопротеиназы в экспериментальном ремоделировании артерий [Текст] / О.С. Плеханова [и др.] // Кардиология. - 2006. – Т.46, № 9. - С. 47-56.
3. Взаимодействия между крингл и ростовым доменами в молекуле урокиназы: возможная роль в стимуляции хемотаксиса клеток [Текст] / В.В. Степанова [и др.] // Биохимия. – 2008. – Т.73. – С.311 – 321.
4. Клеточные механизмы, клинические и морфологические факторы риска развития рестеноза [Текст] / А.М. Герасимов [и др.] // Вестник рентгенологии и радиологии. – 2011. – №4. – С.58-65.
5. Моноклональные антитела для одностадийного получения высокоочищенной урокиназы [Текст] / Г.А. Кратасюк [и др.] // Биополимеры и клетка. – 1989. – Т.5, №3. – С.95-101.
6. Образование активных форм кислорода в гладкомышечных клетках сосудов под действием урокиназы [Текст] / О.С. Плеханова [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2006. – Т.142, № 3. - С. 304-307.
7. Панченко, Е.П. Тромбозы в кардиологии. Механизмы развития и возможности терапии [Текст] / Е.П. Панченко, А.Б. Добровольский. – М.: Спорт и культура, 1999.
8. Парфенова, Е.В. Роль активаторов плазминогена в ремоделировании кровеносных сосудов и ангиогенезе [Текст] / Е.В. Парфенова, О.С. Плеханова, В.А. Ткачук // Биохимия. – 2002. – Т.67, № 1. – С.119-134.
9. Плеханова, О.С. Механизмы ремоделирования сосудов после повреждения артерий [Текст] / О.С. Плеханова, Е.В. Парфенова, В.А. Ткачук // Кардиология. – 2015. – №7. – С.63-77.

10. Регуляция роста и ремоделирования кровеносных сосудов: уникальная роль урокиназы [Текст] / Е.В. Парфенова [и др.] // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2009. – Т. 95, № 5. – С.442-464.
11. Роль мультидоменной структуры урокиназы в регуляции роста и ремоделирования сосудов [Текст] / В.А. Ткачук [и др.] // Український біохімічний журнал. – 2013. – Т.85, №6. – С.18-45.
12. Роль показателей доклинического поражения артериальной стенки в оценке риска развития сердечно-сосудистых осложнений [Текст] / С.Ж. Уразалина [и др.] // Кардиология. – 2012. – Т.52, № 4. – С.53-59.
13. Роль ростового домена урокиназы в миграции гладкомышечных клеток / В.В. Степанова [и др.] // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 1997. – Т.83, № 11-12. – С.158-167.
14. Рубина, К.А. Навигационные рецепторы в нервной и сердечно сосудистой системах [Текст] / К.А. Рубина, В.А. Ткачук // Биохимия. – 2015. – Т.80, № 10. – С. 1503-1521.
15. Савченко, А.П. Клиническая эффективность эндоваскулярных технологий при лечении ишемической болезни сердца [Текст] / А.П. Савченко, Б.А. Руденко // Кардиологический вестник. – 2008. – Т.1, № 3. – С. 5-11.
16. Структурные исследования рекомбинантного ростового домена урокиназы [Текст] / И.Б. Белоглазова [и др.] // Биохимия. – 2013. – Т.78, № 5. – С.575 – 591.
17. Сумароков, А.Б. Проблема предотвращения рестенозирования сосуда после имплантации коронарного стента [Текст] / А.Б. Сумароков, А.Н. Самко, В.Г. Наумов // Терапевтический архив. – 2004. – Т.76, № 8. – С.82-85.
18. Урокиназа стимулирует воспалительную реакцию в поврежденной сосудистой стенке при ремоделировании артерий *in vivo* [Текст] / О.С. Плеханова [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2008 - Т.145, № 1. - С. 15-20.
19. Урокиназа стимулирует экспрессию матриксной металлопротеазы 9 в фибробластах через образование активных форм кислорода [Текст] / Е.С. Зубкова

[и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2014. - Т.157, № 1. - С. 23-27.

20. Урокиназа стимулирует, а тканевой активатор плазминогена подавляет развитие стеноза кровеносных сосудов [Текст] / О.С. Плеханова [и др.] // Российский физиологический журнал. - 2001. - Т.87, №5. - С. 584-593.

21. Урокиназа увеличивает содержание и активность матричной металлопротеиназы 2 после баллонной ангиопластики *in vivo* [Текст] / М.А. Соломатина [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2005. - Т.139, № 3. - С. 283-286.

22. Урокиназный активатор плазминогена стимулирует развитие экспериментального рестеноза [Текст] / Е.В. Парфенова [и др.] // Кардиология. - 2000. - № 9. - С. 69-77.

23. Экспрессия урокиназы и ее рецептора коррелирует с пролиферацией гладкомышечных клеток в поврежденных артериях [Текст] / О.С. Плеханова [и др.] // Российский физиологический журнал. - 2000. - Т.86, №1. - С. 18-27.

24. Экспрессия урокиназы, ее рецептора и ингибитора активаторов плазминогена 1-го типа в стенке аорты человека при разных типах атеросклеротического поражения [Текст] / М.А. Соломатина [и др.] // Цитология. - 2004. - Т.46, № 4. - С. 352-360.

25. 2-Year results of paclitaxel-coated balloons for long femoropopliteal artery disease: evidence from the sfa-long study [Text] / A. Micari [et al.] // JACC Cardiovasc Interv. - 2017. - Vol.10, № 7. - P.728-734.

26. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis: a report from the committee on vascular lesions of the Council on Atherosclerosis, American Heart Association. Arterioscler [Text] / H.C. Stary [et al.] // Thromb Vasc Biol. - 1995. - Vol.15. - P.1512-1531.

27. A focus on inflammation as a major risk factor for atherosclerotic cardiovascular diseases [Text] / I. Gregersen [et al.] // Expert Rev Cardiovasc Ther. - 2016. - Vol.14, № 3. - P.391-403.

28. A model of primary atherosclerosis and post-angioplasty restenosis in mice [Text] / J.E. Leidenfrost [et al.] // *Am J Pathol.* – 2003. – Vol.163, № 2. – P.773-778.
29. A novel PDGF receptor inhibitor-eluting stent attenuates in-stent neointima formation in a rabbit carotid model [Text] / C. Huang [et al.] // *Mol Med Rep.* – 2017. – Vol.15, № 1. – P.21-28.
30. A randomized animal study evaluating the efficacies of locally delivered heparin and urokinase for reducing in-stent restenosis [Text] / R. Kornowski [et al.] // *Coron Artery Dis.* – 1997. – Vol.8, № 5. – P.293-298.
31. A randomized phase II study of Xilonix, a targeted therapy against interleukin 1 $\alpha$ , for the prevention of superficial femoral artery restenosis after percutaneous revascularization [Text] / H. El Sayed [et al.] // *J Vasc Surg.* – 2016. – Vol.63, № 1. – P.133-141.
32. A review on atherosclerotic biology, wall stiffness, physics of elasticity, and its ultrasound-based measurement [Text] / A.K. Patel [et al.] // *Curr Atheroscler Rep.* – 2016. – Vol.18, № 12. – P.83.
33. A urokinase-sensitive region of the human urokinase receptor is responsible for its chemotactic activity [Text] / F. Fazioli [et al.] // *EMBO J.* – 1997. – Vol.16, № 24. – P.7279-7286.
34. Abd El-Aziz, T.A. Relation of PAI-1 and TPA genes polymorphisms to acute myocardial infarction and its outcomes in Egyptian patients [Text] / T.A. Abd El-Aziz, N.A. Rezk // *Cell Biochem Biophys.* – 2015. – Vol. 71, № 1. – P. 227-234.
35. Activation of nuclear factor-kappa B significantly contributes to lumen loss in a rabbit iliac artery balloon angioplasty model [Text] / J.M. Breuss [et al.] // *Circulation.* – 2002. – Vol.105, № 5. – P.633-638.
36. Activation of p38 MAP-kinase and caldesmon phosphorylation are essential for urokinase-induced human smooth muscle cell migration [Text] / E.A. Goncharova [et al.] // *Biol Chem.* – 2002. – Vol.383, № 1. – P.115-126.
37. Activation of pro-urokinase and plasminogen on human sarcoma cells: a proteolytic system with surface-bound reactants [Text] / R.W. Stephens [et al.] // *J Cell Biol.* – 1989. – Vol.108, № 5. – P.1987-1995.

38. Adventitial myofibroblasts contribute to neointimal formation in injured porcine coronary arteries [Text] / Y. Shi [et al.] // *Circulation*. – 1996. – Vol.94, № 7. – P.1655-1664.
39. Alexander, M.R. Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease [Text] / M.R. Alexander, G.K. Owens // *Annual review of physiology*. – 2012. – Vol. 74. – P. 13-40.
40. Alfano, D. Urokinase signaling through its receptor protects against anoikis by increasing BCL-xL expression levels [Text] / D. Alfano, I. Iaccarino, M.P. Stoppelli // *J Biol Chem*. – 2006. – Vol.281, № 26. – P.17758-17767.
41. Alkaloid rich fraction from *Nelumbo nucifera* targets VSMC proliferation and migration to suppress restenosis in balloon-injured rat carotid artery [Text] / M.Y. Jun [et al.] // *Atherosclerosis*. – 2016. – Vol.248. – P.179-189.
42. Alpha(2)-antiplasmin gene deficiency in mice does not affect neointima formation after vascular injury [Text] / H.R. Lijnen [et al.] // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. – 2000. – Vol.20, № 6. – P.1488-1492.
43. An amino-terminal fragment of urokinase isolated from a prostate cancer cell line (PC-3) is mitogenic for osteoblast-like cells [Text] / S.A. Rabbani [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun*. – 1990. – Vol.173, № 3. – P.1058-1064.
44. Angelovich, T.A. Inflammation-induced foam cell formation in chronic inflammatory disease [Text] / T.A. Angelovich, A.C. Hearps, A. Jaworowski // *Immunol Cell Biol*. – 2015. – Vol.93, № 8. – P.683-693.
45. Angiographic and clinical characteristics of patients with acetylcholine-induced coronary vasospasm on follow-up coronary angiography following drug-eluting stent implantation [Text] / S. Ito [et al.] // *J Invasive Cardiol*. – 2011. – Vol.23, № 2. – P.57-64.
46. Angiotensin-converting enzyme inhibition abolishes medial smooth muscle PDGF-AB biosynthesis and attenuates proliferation in injured carotid arteries: relationships to neointima formation [Text] / J. Wong [et al.] // *Circulation*. – 1997. – Vol.96. – P.1631-1640.

47. Anti-inflammatory drugs as promising cardiovascular treatments [Text] / F. Huet [et al.] // *Expert Rev Cardiovasc Ther.* – 2017. – Vol.15, № 2. – P.109-125.
48. Antimonocyte chemoattractant protein-1 gene therapy reduces experimental in-stent restenosis in hypercholesterolemic rabbits and monkeys [Text] / K. Ohtani [et al.] // *Gene Ther.* – 2004. – Vol.11, № 16. – P.1273-1282.
49. Aortic stiffness and calcification in men in a population-based international study [Text] / A. Sekikawa [et al.] // *Atherosclerosis.* – 2012. – Vol. 222. – P. 473-477.
50. Aortic stiffness as a tissue biomarker for predicting future cardiovascular events in asymptomatic hypertensive subjects [Text] / S. Laurent [et al.] // *Annals of medicine.* – 2012. – Vol. 44 (Suppl. 1). – P. S93-97.
51. Aortic-brachial arterial stiffness gradient and cardiovascular risk in the community: the framingham heart study [Text] / T.J. Niiranen [et al.] // *Hypertension.* – 2017. – Apr 10. pii: HYPERTENSIONAHA.116.08917. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08917.
52. Arterial remodeling. Mechanisms and clinical implications [Text] / M.R. Ward [et al.] // *Circulation.* – 2000. – Vol. 102. – P.1186-1191.
53. Arterial ultrasound screening as a tool for coronary risk assessment in asymptomatic men and women [Text] / M. Cournot [et al.] // *Angiology.* – 2012. – Vol. 63. – P.282-288.
54. Asryants, R.A. Determination of Sepharose-bound protein with Coomassie brilliant blue G-250 [Text] / R.A. Asryants, I.V. Duszenkova, N.K. Nagradova // *Anal Biochem.* – 1985. – Vol.151, № 2. – P.571-574.
55. Assessing the global burden of ischemic heart disease: part 1: methods for a systematic review of the global epidemiology of ischemic heart disease in 1990 and 2010 [Text] / A.E. Moran [et al.] // *Global heart.* – 2012. – Vol. 7. – P. 315-329.
56. Association of fibrinolytic parameters with early atherosclerosis. The ARIC Study. Atherosclerosis Risk in Communities Study [Text] / V. Salomaa [et al.] // *Circulation.* – 1995. – Vol.91, № 2. – P.284-290.



57. Association of smooth muscle cell phenotypic modulation with extracellular matrix alterations during neointima formation in rabbit vein grafts [Text] / W.D. Zhang [et al.] // *J Vasc Surg.* – 1999. – Vol.30, № 1. – P.169-183.
58. Associations of cardiovascular risk factors with carotid intima-media thickness in middle-age adults and elders [Text] / T.W. Wu [et al.] // *J Atheroscler Thromb.* – 2016. – Vol.23. – P.1-10.
59. Astrup, T. An activator of plasminogen in normal urine [Text] / T. Astrup, I. Sterndorff // *Proc Soc Exp Biol Med.* – 1952. – Vol.81, № 3. – P.675-678.
60. Avolio, A. Quantification of alterations in structure and function of elastin in the arterial media [Text] / A. Avolio, D. Jones, M. Tafazzoli-Shadpour // *Hypertension.* – 1998. – Vol. 32. – P.170-175.
61. Baumann, F. Restenosis after infrapopliteal angioplasty - clinical importance, study update and further directions [Text] / F. Baumann, N. Diehm // *Vasa.* – 2013. – Vol.42, № 6. – P.413-420.
62. Beclin 1 knockdown retards re-endothelialization and exacerbates neointimal formation via a crosstalk between autophagy and apoptosis [Text] / L.X. Ye [et al.] // *Atherosclerosis.* – 2014. – Vol.237, № 1. – P.146-154.
63. Behrendt, N. The urokinase receptor (uPAR) and the uPAR-associated protein (uPARAP/Endo180): membrane proteins engaged in matrix turnover during tissue remodeling [Text] / N. Behrendt // *Biol Chem.* – 2004. – Vol.385, № 2. – P.103-136.
64. Beyond the early stages: insights from the ASSURE registry on bioresorbable vascular scaffolds [Text] / J. Wöhrle [et al.] // *EuroIntervention.* - 2015. - Vol.11, № 2. - P.149-156.
65. Bhoday, J. The molecular mechanisms of vascular restenosis: Which genes are crucial? [Text] /J. Bhoday, S. de Silva, Q. Xu // *CurrVascPharmacol.* – 2006. – Vol.4. – P.269-275.
66. Binder, B.R. uPAR-uPA-PAI-1 interactions and signaling: a vascular biologist's view [Text] / B.R. Binder, J. Mihaly, G.W. Prager // *Thromb Haemost.* – 2007. – Vol.97, № 3. – P.336-342.

67. Binding of urokinase-type plasminogen activator-plasminogen activator inhibitor-1 complex to the endocytosis receptors alpha2-macroglobulin receptor/low-density lipoprotein receptor-related protein and very-low-density lipoprotein receptor involves basic residues in the inhibitor [Text] / K.W. Rodenburg [et al.] // *Biochem J.* – 1998. – Vol.329 (Pt 1). – P.55-63.
68. Biological responses in stented arteries [Text] / C. Chaabane [et al.] // *Cardiovasc Res.* – 2013. – Vol.99, № 2. – P.353-363.
69. Blasi, F. Proteolysis, cell adhesion, chemotaxis, and invasiveness are regulated by the u-PA-u-PAR-PAI-1 system [Text] / F. Blasi // *Thromb Haemost.* – 1999. – Vol.82, № 2. – P.298-304.
70. Blasi, F. The urokinase receptor: focused cell surface proteolysis, cell adhesion and signaling [Text] / F. Blasi, N. Sidenius // *FEBS Lett.* – 2010. – Vol.584, № 9. – P.1923-1930.
71. Blockade of vascular endothelial growth factor suppresses experimental restenosis after intraluminal injury by inhibiting recruitment of monocyte lineage cells [Text] / K. Ohtani [et al.] // *Circulation.* – 2004. – Vol.110, № 16. – P.2444-2452.
72. Bobik, A. Metalloproteinases and plasminogen activators in vessel remodeling [Text] / A. Bobik, V. Tkachuk // *Curr Hypertens Rep.* – 2003. – Vol.5, № 6. – P.466-472.
73. Burnstock, G. Purinergic signaling and blood vessels in health and disease [Text] / G. Burnstock, V. Ralevic // *Pharmacol Rev.* – 2013. – Vol.66, № 1. – P.102-192.
74. Carbon monoxide releasing molecule accelerates reendothelialization after carotid artery balloon injury in rat [Text] / Q.S. Hu [et al.] // *Biomed Environ Sci.* – 2015. – Vol.28, № 4. – P.253-262.
75. Carmeliet, P.F. Physiological consequences of over- or under-expression of fibrinolytic system components in transgenic mice [Text] / P.F. Carmeliet // *Baillieres Clin Haematol.* – 1995. – Vol.8, № 2. – P.391-401.
76. Carretero, O.A. Vascular remodeling and the kallikrein-kinin system [Text] / O.A. Carretero // *The Journal of clinical investigation.* – 2005. – Vol. 115. – P. 588-591.

77. Carriero, M.V. The urokinase-type plasminogen activator and the generation of inhibitors of urokinase activity and signaling [Text] / M.V. Carriero, M.P. Stoppelli // *Curr Pharm Des.* – 2011. – Vol.17, № 19. – P.1944-1961.
78. Castellino, F.J. Structure and function of the plasminogen/plasmin system [Text] / F.J. Castellino, V.A. Ploplis // *Thromb Haemost.* - 2005. - Vol.93, № 4. - P.647-54.
79. Catalano, R.A. Elimination of precipitates in oil red O fat stain by adding dextrin [Text] / R.A. Catalano, R.D. Lillie // *Stain Technol.* – 1975. – Vol.50, № 5. – P.297-299.
80. Caveolin-1-dependent and -independent uPAR signaling pathways contribute to ganglioside GT1b induced early apoptosis in A549 lung cancer cells [Text] / J.H. Hwang [et al.] // *Am J Cancer Res.* – 2014. – Vol.4, № 6. – P.801-810.
81. CD95 ligand induces motility and invasiveness of apoptosis-resistant tumor cells [Text] / B.C. Barnhart [et al.] // *EMBO J.* – 2004. – Vol.23, № 15. – P.3175-3185.
82. cDNA sequence of human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen [Text] / J.W. McLean [et al.] // *Nature.* – 1987. – Vol.330(6144). – P.132-137.
83. Changes in mortality inequalities over two decades: register based study of European countries [Text] / J.P. Mackenbach [et al.] // *BMJ.* – 2016. – Vol.353. – P.i1732.
84. Changes in the fibrinolytic system in patients with peripheral arterial occlusive disease undergoing percutaneous transluminal angioplasty [Text] / R.E. Roller [et al.] // *Thromb Res.* – 1999. – Vol.94, № 4. – P.241-247.
85. Changes in vessel wall plasminogen activator activity and smooth muscle cell proliferation and activation after arterial injury [Text] / R.S. More [et al.] // *Cardiovasc Res.* – 1995. – Vol.29, № 1. – P.22-26.
86. Chapman, H.A. Plasminogen activators, integrins, and the coordinated regulation of cell adhesion and migration [Text] / H.A. Chapman // *Curr Opin Cell Biol.* – 1997. – Vol.9, № 5. – P.714-724.
87. Characterization of the functional epitope on the urokinase receptor. Complete alanine scanning mutagenesis supplemented by chemical cross-linking [Text] / H. Gårdsvoll [et al.] // *J Biol Chem.* – 2006. – Vol.281, № 28. – P.19260-19272.

88. Chemotactic effect of urokinase plasminogen activator: a major role for mechanisms independent of its proteolytic or growth factor domains [Text] / A.A. Poliakov [et al.] // *Recept Signal Transduct Res.* – 1999. – Vol.19, № 6. – P.939-951.
89. Chien, S. Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell [Text] / S. Chien // *American journal of physiology Heart and circulatory physiology.* – 2007. – Vol. 292. – P. H1209-1224.
90. Chomczynski, P. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [Text] / P. Chomczynski, N. Sacchi // *Anal Biochem.* – 1987. – Vol. 162. – P.152-159.
91. Clathrin and LRP-1-independent constitutive endocytosis and recycling of uPAR [Text] / K. Cortese [et al.] // *PLoS One.* – 2008. – Vol.3, № 11. – P.e3730.
92. Clinical outcomes of second- versus first-generation drug-eluting stents in patients with acute myocardial infarction: a meta-analysis of randomized controlled trials [Text] / G. Wu [et al.] // *Arch Med Sci.* – 2014. – Vol.10, № 4. – P.643-650.
93. Clowes, A.W. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I: Smooth muscle growth in the absence of endothelium [Text] / A.W. Clowes, M.A. Reidy, M.M. Clowes // *Lab Invest.* – 1983. – Vol.49. – P.327-333.
94. Clowes, A.W. Mechanisms of stenosis after arterial injury [Text] / A.W. Clowes, M.A. Reidy, M.M. Clowes // *Lab Invest.* – 1983. – Vol.49, № 2. – P.208-215.
95. Clustering of urokinase receptors (uPAR; CD87) induces proinflammatory signaling in human polymorphonuclear neutrophils [Text] / R.G. Sitrin [et al.] // *J Immunol.* – 2000. – Vol.165, № 6. – P.3341-3349.
96. Coagulation activation in patients undergoing directional coronary atherectomy [Text] / M. Lins [et al.] // *Thromb Res.* – 1997. – Vol.86, № 6. – P.433-441.
97. Coen, M. Myofibroblast-mediated adventitial remodeling: an underestimated player in arterial pathology [Text] / M. Coen, G. Gabbiani, M.L. Bochaton-Piallat // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* – 2011. – Vol. 31. – P. 2391-2396.
98. Collagen and elastin cross-linking: a mechanism of constrictive remodeling after arterial injury [Text] / C. Brasselet [et al.] // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2005. – Vol.289, № 5. – P.H2228-2233.

99. Comparison of long-term clinical and 1-year angiographic outcomes after primary stenting (-12 hours) and late reperfusion (12 hours-) using sirolimus-eluting stents for ST-segment elevated myocardial infarctions: a propensity score matching analysis [Text] / T. Ishikawa [et al.] // Intern Med. – 2013. – Vol.52, № 12. – P.1303-1310.
100. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries [Text] / S. Glagov [et al.] // The New England journal of medicine. – 1987. – Vol. 316. – P. 1371-1375.
101. Compound K, an intestinal metabolite of ginsenosides, inhibits PDGF-BB-induced VSMC proliferation and migration through G1 arrest and attenuates neointimal hyperplasia after arterial injury [Text] / E.S. Park [et al.] // Atherosclerosis. – 2013. – Vol.228, № 1. – P.53-60.
102. Concept of vulnerable/unstable plaque [Text] / A.V. Finn [et al.] // Arterioscler Thromb Vasc Biol. – 2010. – Vol.30, № 7. – P.1282-1292.
103. Conde, I.D. Arterial thrombosis for the interventional cardiologist: from adhesion molecules and coagulation factors to clinical therapeutics [Text] / I.D. Conde, N.S. Kleiman // Catheter Cardiovasc Interv. – 2003. – Vol.60, № 2. – P.236-246.
104. Contrasting effects of urokinase and tissue-type plasminogen activators on neointima formation and vessel remodeling early after arterial injury [Text] / Ye. Parfyonova [et al.] // Journal of Vascular Research. - 2004. - Vol. 41, № 3. - P. 268-276.
105. Coronary injury score correlates with proliferating cells and alpha-smooth muscle actin expression in stented porcine coronary arteries [Text] / V.J. Swier [et al.] // PLoS One. – 2015. – Vol.10, № 9. – P.e0138539.
106. Crystal structure of the urokinase receptor in a ligand-free form [Text] / X. Xu [et al.] // J Mol Biol. – 2012. – Vol.416, № 5. – P.629-641.
107. Cui, N. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases [Text] / N. Cui, M. Hu, R.A. Khalil // Prog Mol Biol Transl Sci. – 2017. – Vol.147. – P.71-73.

108. Cybulsky, M.I. Macrophages and dendritic cells: partners in atherogenesis [Text] / M.I. Cybulsky, C. Cheong, C.S. Robbins // *Circ Res.* – 2016. – Vol.118, № 4. – P.637-652.
109. D'Alessio, S. The urokinase receptor as an entertainer of signal transduction [Text] / S. D'Alessio, F. Blasi // *Front Biosci (Landmark Ed).* – 2009. – Vol.14. – P.4575-4587.
110. Deng, W. Endothelin signalling regulates volume-sensitive Cl<sup>-</sup> current via NADPH oxidase and mitochondrial reactive oxygen species [Text] / W. Deng, L. Baki, C.M. Baumgarten // *Cardiovasc Res.* – 2010. – Vol.88, № 1. – P.93-100.
111. Dexamethasone-eluting vascular stents / M. Hämäläinen [et al.] // *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* – 2013. – Vol. 112, № 5. – P.296-301.
112. Differences in inflammatory and thrombotic markers between unstable angina and acute myocardial infarction [Text] / D. Tousoulis [et al.] // *Int J Cardiol.* – 2007. – Vol.115, № 2. – P.203-207.
113. Different mechanisms of increased luminal stenosis after arterial injury in mice deficient for urokinase- or tissue-type plasminogen activator [Text] / K. Schäfer [et al.] // *Circulation.* – 2002. – Vol.106, № 14. – P.1847-1852.
114. Differential effects of phosphodiesterase PDE-3/PDE-4-specific inhibitors on vasoconstriction and cAMP-dependent vasorelaxation following balloon angioplasty [Text] / H. Zhao [et al.] // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2007. – Vol.292, № 6. – P.H2973-2981.
115. Direct interaction of the kringle domain of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and integrin alpha v beta 3 induces signal transduction and enhances plasminogen activation [Text] / T. Tarui [et al.] // *Thromb Haemost.* – 2006. – Vol. 95, № 3. – P.524-534.
116. Disruption of platelet-derived growth factor-dependent phosphatidylinositol 3-kinase and phospholipase C $\gamma$  1 activity abolishes vascular smooth muscle cell proliferation and migration and attenuates neointima formation in vivo [Text] / E. Caglayan [et al.] // *J Am Coll Cardiol.* – 2011. – Vol.57, № 25. – P.2527-2538.

117. Distinct ligand binding sites in integrin  $\alpha 3\beta 1$  regulate matrix adhesion and cell-cell contact [Text] / F. Zhang [et al.] // *J Cell Biol.* – 2003. – Vol.163, № 1. – P.177-188.
118. Distribution of inflammatory cells in atherosclerotic plaques relates to the direction of flow [Text] / M.T. Dirksen [et al.] // *Circulation.* – 1998. – Vol.98. – P.2000–2003.
119. Divergent effects of 17- $\beta$ -estradiol on human vascular smooth muscle and endothelial cell function diminishes TNF- $\alpha$ -induced neointima formation [Text] / R. Nintasen [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2012. – Vol.420, № 4. – P.828-833.
120. Dotter, C.T. Transluminal treatment of arteriosclerotic obstruction. Description of a new technic and a preliminary report of its application [Text] / C.T. Dotter, M.P. Judkins // *Circulation.* – 1964. – Vol.30. – P. 654-670.
121. Drug-eluting balloon versus bare-metal stent and drug-eluting stent for de novo coronary artery disease: A systematic review and meta-analysis of 14 randomized controlled trials [Text] / K. Cui [et al.] // *PLoS One.* – 2017. – Vol.12, № 4. – P.e0176365.
122. Duru, E.A. Protease-mediated human smooth muscle cell proliferation by urokinase requires epidermal growth factor receptor transactivation by triple membrane signaling [Text] / E.A. Duru, Y. Fu, M.G. Davies // *J Surg Res.* – 2014. – Vol.192, № 2. – P.254-262.
123. Early differential MMP-2 and -9 dynamics during flow-induced arterial and vein graft adaptations [Text] / S.A. Berceli [et al.] // *J Surg Res.* – 2006. – Vol.134, № 2. – P.327-334. Epub 2006 Feb 20.
124. Eble, J.A. The extracellular matrix of blood vessels [Text] / J.A. Eble, S. Niland // *Curr Pharm Des.* – 2009. – Vol.15, № 12. – P.1385-1400.
125. Effect of Bcl-xL gene expression silenced by RNA interference on invasion of human colorectal cancer cells [Text] / W.D. Liu [et al.] // *J BUON.* – 2014. – Vol.19, № 4. – P.925-929.

126. Effect of shear stress, statins and TNF- $\alpha$  on hemostatic genes in human endothelial cells [Text] / N. Bergh [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2012. – Vol.420, № 1. – P.166-171.
127. Effects of antisense c-myc oligonucleotides on vascular smooth muscle cell proliferation and response to vessel wall injury [Text] / A.E. Villa [et al.] // *Circ Res.* – 1995. – Vol.76, № 4. – P.505-513.
128. Effects of vitamin C treatment on collar-induced intimal thickening [Text] / M.Z. Arun [et al.] // *Drug Des Devel Ther.* – 2015, №9. – P.6461-6473.
129. Elastin organization in pig and cardiovascular disease patients pericardial resistance arteries [Text] / M. Bloksgaard [et al.] // *J Vasc Res.* – 2015. – Vol.52, № 1. – P.1-11.
130. Elsilbucol inhibits atherosclerosis following arterial injury: multifunctional effects on cholesterol levels, oxidative stress and inflammation [Text] / S. Dussault [et al.] // *Atherosclerosis.* – 2014. – Vol.237, № 1. – P.194-199.
131. Endogenously produced urokinase-type plasminogen activator is a major determinant of the basal level of activated ERK/MAP kinase and prevents apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells [Text] / Z. Ma [et al.] // *J Cell Sci.* – 2001. – Vol.114(Pt 18). – P.3387-3396.
132. Endothelial fluid shear stress sensing in vascular health and disease [Text] / N. Baeyens [et al.] // *J Clin Invest.* – 2016. – Vol.126, № 3. – P.821-828.
133. Enhancement of neointima formation with tissue-type plasminogen activator [Text] / P.R. Hilfiker [et al.] // *J Vasc Surg.* – 2001. – Vol.33, № 4. – P.821-828.
134. Epigallocatechin gallate inhibits TNF- $\alpha$ -induced PAI-1 production in vascular endothelial cells [Text] / Y. Cao [et al.] // *J Cardiovasc Pharmacol.* – 2013. – Vol.62, № 5. – P.452-456.
135. Evaluation of early healing profile and neointimal transformation over 24 months using longitudinal sequential optical coherence tomography assessments and 3-year clinical results of the new dual-therapy endothelial progenitor cell capturing sirolimus-eluting combo stent: the EGO-Combo Study [Text] / S.W. Lee [et al.] // *Circ Cardiovasc Interv.* – 2016. – Vol.9, № 7. – P. pii: e003469.



136. Evaluation of vascular endothelial growth factor and its receptors in human neointima [Text] / M. Bruczko [et al.] // *Pathobiology*. – 2016. – Vol.83, № 1. – P.47-52.
137. Expression of matrix metalloproteinase 9 and its regulators in the unstable coronary atherosclerotic plaque [Text] / F. Chen [et al.] // *Int J Mol Med*. – 2005. – Vol.15, № 1. – P.57-65.
138. Extracellular cleavage of the vascular endothelial growth factor 189-amino acid form by urokinase is required for its mitogenic effect [Text] / J. Plouët [et al.] // *J Biol Chem*. – 1997. – Vol.272, № 20. – P.13390-13396.
139. Extracellular collagen promotes interleukin-1 $\beta$ -induced urokinase-type plasminogen activator production by human corneal fibroblasts [Text] / K. Sugioka [et al.] // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. – 2017. – Vol.58, № 3. – P.1487-1498.
140. Extracellular matrix changes in stented human coronary arteries [Text] / A. Farb [et al.] // *Circulation*. – 2004. – Vol.110, № 8. – P.940-947.
141. Extracellular matrix of the human aortic media: an ultrastructural histochemical and immunohistochemical study of the adult aortic media [Text] / K.P. Dingemans [et al.] // *The Anatomical record*. – 2000. – Vol. 258. – P. 1-14.
142. Extracellular matrix proteases contribute to progression of pelvic organ prolapse in mice and humans [Text] / M. Budatha [et al.] // *J Clin Invest*. – 2011. – Vol.121, № 5. – P.2048-2059.
143. Falcone, D.J. Acetyl-LDL stimulates macrophage-dependent plasminogen activation and degradation of extracellular matrix [Text] / D.J. Falcone, M.J. Ferenc // *J Cell Physiol*. – 1988. – Vol.135, № 3. – P.387-396.
144. Farnesyltransferase inhibitors interact synergistically with the Chk1 inhibitor UCN-01 to induce apoptosis in human leukemia cells through interruption of both Akt and MEK/ERK pathways and activation of SEK1/JNK [Text] / Y. Dai [et al.] // *Blood*. – 2005. – Vol.105, № 4. – P.1706-1716.
145. Fenyó, I.M. The involvement of the monocytes/macrophages in chronic inflammation associated with atherosclerosis [Text] / I.M. Fenyó, A.V. Gafencu // *Immunobiology*. – 2013. – Vol.218, № 11. – P.1376-1384.

146. Ferraris, G.M. Urokinase plasminogen activator receptor: a functional integrator of extracellular proteolysis, cell adhesion, and signal transduction [Text] / G.M. Ferraris, N. Sidenius // *Semin Thromb Hemost.* – 2013. – Vol.39, № 4. – P.347-355.
147. Fibroblast growth factor (FGF) signaling regulates transforming growth factor beta (TGF $\beta$ )-dependent smooth muscle cell phenotype modulation [Text] / P.Y. Chen [et al.] // *Sci Rep.* – 2016. – Vol.6. – P.33407. doi: 10.1038/srep33407.
148. Fibronectin is an important regulator of flow-induced vascular remodeling [Text] / H.Y. Chiang [et al.] // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2009. – Vol. 29, № 7. – P.1074-1079.
149. Fibulin-5 binds urokinase-type plasminogen activator and mediates urokinase-stimulated  $\beta$ 1-integrin-dependent cell migration [Text] / A. Kapustin [et al.] // *Biochem J.* – 2012. – Vol.443, № 2. – P.491-503.
150. First report of a novel polymer-free dual-drug eluting stent in de novo coronary artery disease: results of the first in human BICARE trial [Text] / M. Yu [et al.] // *Catheter Cardiovasc Interv.* – 2014. – Vol.83, № 3. – P.405-411.
151. Five-year follow-up after sirolimus-eluting stent implantation results of the SIRIUS (Sirolimus-Eluting Stent in De-Novo Native Coronary Lesions) Trial [Text] / G. Weisz [et al.] // *J Am Coll Cardiol.* – 2009. – Vol.53, № 17. – P.1488-1497.
152. Fox, K.M. Heart rate: a forgotten link in coronary artery disease? [Text] / K.M. Fox, R. Ferrari // *Nat Rev Cardiol.* – 2011. – Vol.8, № 7. – P.369-379.
153. Fuhrman, B. The urokinase system in the pathogenesis of atherosclerosis [Text] / B. Fuhrman // *Atherosclerosis.* – 2012. – Vol.222, № 1. – P.8-14.
154. Function of the plasminogen/plasmin and matrix metalloproteinase systems after vascular injury in mice with targeted inactivation of fibrinolytic system genes [Text] / H.R. Lijnen [et al.] // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 1998. – Vol.18, № 7. – P.1035-1045.
155. Functional correction of established central nervous system deficits in an animal model of lysosomal storage disease with feline immunodeficiency virus-based vectors [Text] / A.I. Brooks [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2002. – Vol.99, № 9. – P.6216-6221.

156. Functional relevance of urinary-type plasminogen activator receptor-alpha3beta1 integrin association in proteinase regulatory pathways [Text] / S. Ghosh [et al.] // *J Biol Chem.* – 2006. – Vol.281, № 19. – P.13021-13029.
157. Gareri, C. MicroRNAs for restenosis and thrombosis after vascular injury [Text] / C. Gareri, S. De Rosa, C. Indolfi // *Circ Res.* – 2016. – Vol.118, № 7. – P.1170-1184.
158. Gene response of human skin fibroblasts to urokinase- and tissue-type plasminogen activators [Text] / A. Copeta [et al.] // *Growth Factors.* - 2000. - Vol.17, № 4. - P.249-268.
159. Gene silencing of TACE enhances plaque stability and improves vascular remodeling in a rabbit model of atherosclerosis [Text] / X. Zhao [et al.] // *Sci Rep.* – 2015. – Vol.5. – P.17939.
160. Genetic and environmental contributions to atherosclerosis phenotypes in men and women: heritability of carotid intima-media thickness in the Framingham Heart Study [Text] / C.S. Fox [et al.] // *Stroke.* – 2003. – Vol.34, № 2. – P.397-401.
161. Gimbrone, M.A. Jr. Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis [Text] / M.A. Gimbrone Jr., G. Garcia-Cardena // *Cardiovascular pathology: the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology.* – 2013. – Vol. 22. – P. 9-15.
162. Greenwald, S.E. Ageing of the conduit arteries [Text] / S.E. Greenwald // *The Journal of pathology.* – 2007. – Vol. 211. – P.157-172.
163. Grüntzig, A. Transluminal dilatation of coronary artery stenosis [Text] / A. Grüntzig // *Lancet.* –1978. – Vol.1. – P.263.
164. Haemostatic and rheological factors as predictors of restenosis following percutaneous transluminal angioplasty [Text] / J.F. Price [et al.] // *Eur J Vasc Endovasc Surg.* – 1997. – Vol.14, № 5. – P.392-398.
165. Harmon, K.J. Strain-dependent vascular remodeling phenotypes in inbred mice [Text] / K.J. Harmon, L.L. Couper, V. Lindner // *Am J Pathol.* – 2000. – Vol.156, № 5. – P.1741-1748.

166. Head, S.J. Drug-eluting stent implantation for coronary artery disease: current stents and a comparison with bypass surgery [Text] / S.J. Head, A.J. Bogers, A.P. Kappetein // *Curr Opin Pharmacol.* – 2012. – Vol.12, № 2. – P.147-154.
167. Hemodynamic regulation of reactive oxygen species: implications for vascular diseases [Text] / U. Raaz [et al.] // *Antioxid Redox Signal.* – 2014. – Vol.20, № 6. – P.914-928.
168. Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group [Text] / S.G. Thompson [et al.] // *N Engl J Med.* – 1995. – Vol.332, № 10. – P.635-641.
169. Heparin binding to the urokinase kringle domain [Text] / R.W. Stephens [et al.] // *Biochemistry.* – 1992. – Vol.31, № 33. – P.7572-7579.
170. Herbert, J.M. Urokinase and tissue-type plasminogen activator are required for the mitogenic and chemotactic effects of bovine fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor-BB for vascular smooth muscle cells [Text] / J.M. Herbert, I. Lamarche, P. Carmeliet // *J Biol Chem.* – 1997. – Vol.272, № 38. – P.23585-23591.
171. Heritability of carotid artery intima-medial thickness in type 2 diabetes [Text] / L.A. Lange [et al.] // *Stroke.* – 2002. – Vol.33, № 7. – P.1876-1881.
172. High pulsatility flow induces acute endothelial inflammation through overpolarizing cells to activate NF- $\kappa$ B [Text] / M. Li [et al.] // *Cardiovasc Eng Technol.* – 2013. – Vol.4, № 1. – P.26-38.
173. Histopathology of postpercutaneous transluminal coronary angioplasty remodeling in human coronary arteries [Text] / G. Sangiorgi [et al.] // *Am Heart J.* – 1999. – Vol.138, № 4 (Pt 1). – P.681-687.
174. Hoffmann, R. Profound effect of normalization on detection of differentially expressed genes in oligonucleotide microarray data analysis [Text] / R. Hoffmann, T. Seidl, M. Dugas // *Genome Biol.* – 2002. – Vol.3, № 7. – P.RESEARCH0033.
175. Human autopsy study of drug-eluting stents restenosis: histomorphological predictors and neointimal characteristics [Text] / M. Nakano [et al.] // *Eur Heart J.* – 2013. – Jul 3.

176. Human recombinant activated protein C-coated stent for the prevention of restenosis in porcine coronary arteries [Text] / D. Lukovic [et al.] // *J Mater Sci Mater Med.* – 2015. – Vol. 26, № 10. – P.241.

177. Human urokinase-type plasminogen activator primes neutrophils for superoxide anion release. Possible roles of complement receptor type 3 and calcium [Text] / D. Cao [et al.] // *J Immunol.* – 1995. – Vol.154, № 4. – P.1817-1829.

178. Identification of a urokinase receptor-integrin interaction site. Promiscuous regulator of integrin function [Text] / D.I. Simon [et al.] // *J Biol Chem.* – 2000. – Vol.275, № 14. – P.10228-10234.

179. Immunoreactivity of tissue plasminogen activator and of its inhibitor complexes. Biochemical and multicenter validation of a two site immunosorbent assay [Text] / M. Rånby [et al.] // *Thromb Haemost.* – 1989. – Vol.61, № 3. – P.409-414.

180. Impaired fibrinolysis early after percutaneous transluminal coronary angioplasty is associated with restenosis [Text] / K. Sakata [et al.] // *Am Heart J.* – 1996. – Vol.131, № 1. – P.1-6.

181. Impaired fibrinolytic capacity and tissue plasminogen activator release in patients with restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA) [Text] / W. Kirschstein [et al.] // *Thromb Haemost.* – 1989. – Vol.62, № 2. – P.772-775.

182. In vitro suppression of urokinase plasminogen activator in breast cancer cells-a comparison of two antisense strategies [Text] / N. Arens [et al.] // *Int J Oncol.* – 2005. – Vol.26, № 1. – P.113-119.

183. Increased expression of urokinase during atherosclerotic lesion development causes arterial constriction and lumen loss, and accelerates lesion growth [Text] / M. Falkenberg [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2002. – Vol.99, № 16. – P.10665-10670.

184. Increased plasminogen activator inhibitor-1 and apolipoprotein (a) in coronary atherectomy specimens in acute coronary syndromes [Text] / J. Shindo [et al.] // *Coron Artery Dis.* – 2001. – Vol.12, № 7. – P.573-579.

185. Increased type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in atherosclerotic human arteries [Text] / J. Schneiderman [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA. – 1992. – Vol.89, № 15. – P.6998-7002.

186. Induction in human osteoblastic cells (SaOS2) of the early response genes fos, jun, and myc by the amino terminal fragment (ATF) of urokinase [Text] / S.A. Rabbani [et al.] // J Cell Physiol. – 1997. – Vol.172, № 2. – P.137-145.

187. Induction of vascular SMC proliferation by urokinase indicates a novel mechanism of action in vasoproliferative disorders [Text] / S.M. Kanse [et al.] // Arterioscler Thromb Vasc Biol. – 1997. – Vol.17, № 11. – P.2848-2854.

188. Inhibition of 14q32 microRNA miR-495 reduces lesion formation, intimal hyperplasia and plasma cholesterol levels in experimental restenosis [Text] / S.M.J. Welten [et al.] // Atherosclerosis. – 2017. – Vol.261. – P.26-36.

189. Inhibition of apoptotic signaling and neointimal hyperplasia by tempol and nitric oxide synthase following vascular injury [Text] / D.K. Jagadeesha [et al.] // J Vasc Res. – 2009. – Vol.46, № 2. – P.109-118.

190. Inhibition of protein tyrosine kinases attenuates increases in expression of transforming growth factor-beta isoforms and their receptors following arterial injury [Text] / M.R. Ward [et al.] // Arterioscler Thromb Vasc Biol. – 1997. – Vol.17, № 11. – P.2461-2470.

191. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by a novel fibroblast growth factor receptor antagonist [Text] / A. Segev [et al.] // Cardiovasc Res. – 2002. – Vol.53, № 1. – P.232-241.

192. Inhibitors of fibrinolysis are elevated in atherosclerotic plaque [Text] / L.A. Robbie [et al.] // Arterioscler Thromb Vasc Biol. – 1996. – Vol.16, № 4. – P.539-545.

193. Inhibitory role of plasminogen activator inhibitor-1 in arterial wound healing and neointima formation: a gene targeting and gene transfer study in mice [Text] / P. Carmeliet [et al.] // Circulation. – 1997. – Vol. 96, № 9. – P.3180-3191.

194. Insights in vessel development and vascular disorders using targeted inactivation and transfer of vascular endothelial growth factor, the tissue factor receptor, and the

plasminogen system [Text] / P. Carmeliet [et al.] // *Ann N Y Acad Sci.* – 1997. – Vol. 811. – P.191-206.

195. Integrin  $\alpha$ M $\beta$ 2 orchestrates and accelerates plasminogen activation and fibrinolysis by neutrophils [Text] / E. Pluskota [et al.] // *Biol Chem.* – 2004. – Vol.279, № 17. – P.18063-18072.

196. Interleukins and inflammatory markers in in-stent restenosis after femoral percutaneous transluminal angioplasty [Text] / P.V. Araújo [et al.] // *Ann Vasc Surg.* – 2015. – Vol.29, № 4. – P.731-737.

197. Intravascular ultrasound predictors of subacute vessel closure after balloon angioplasty or atherectomy [Text] / E. Cheneau [et al.] // *J Invasive Cardiol.* – 2004. – Vol.16, № 10. – P.572-574.

198. Inward remodeling of the rabbit aorta is blocked by the matrix metalloproteinase inhibitor doxycycline [Text] / D.W. Courtman [et al.] // *J Vasc Res.* – 2004. – Vol.41, № 2. – P.157-165.

199. Is thrombin a key player in the 'coagulation-atherogenesis' maze? [Text] / J.I. Borissoff [et al.] // *Cardiovasc Res.* – 2009. – Vol.82, № 3. – P.392-403.

200. Ishikawa, K. Management of drug-eluting stent restenosis [Text] / K. Ishikawa, Y. Aoyama, H. Hirayama // *J Invasive Cardiol.* – 2012. – Vol.24, № 4. – P.178-182.

201. Janssens, S. What has been learned about the cardiovascular effects of matrix metalloproteinases from mouse models? [Text] / S. Janssens, H.R. Lijnen // *Cardiovasc Res.* – 2006. – Vol.69, № 3. – P.585-594.

202. Jo, H. Role of NADPH oxidases in disturbed flow- and BMP4- induced inflammation and atherosclerosis [Text] / H. Jo, H. Song, A. Mowbray // *Antioxidants & redox signaling.* – 2006. – Vol. 8. – P. 1609-1619.

203. Kjølner, L. Rac mediates cytoskeletal rearrangements and increased cell motility induced by urokinase-type plasminogen activator receptor binding to vitronectin [Text] / L. Kjølner, A. Hall // *J Cell Biol.* – 2001. – Vol.152, № 6. – P.1145-1157.

204. Kjølner, L. The urokinase plasminogen activator receptor in the regulation of the actin cytoskeleton and cell motility [Text] / L. Kjølner // *Biol Chem.* – 2002. – Vol.383, № 1. – P.5-19.

205. Kokkinidis, D.G. Treatment of coronary artery in-stent restenosis [Text] / D.G. Kokkinidis, S.W. Waldo, E.J. Armstrong // *Expert Rev Cardiovasc Ther.* – 2017. – Vol.15, № 3. – P.191-202.
206. Korshunov, V.A. Flow-induced vascular remodeling in the mouse: a model for carotid intima-media thickening [Text] / V.A. Korshunov, B.C. Berk // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2003. – Vol.23, № 12. – P.2185-2191.
207. Kwaan, H.C. The apparent uPA/PAI-1 paradox in cancer: more than meets the eye [Text] / H.C. Kwaan, A.P. Mazar, B.J. McMahon // *Semin Thromb Hemost.* – 2013. – Vol.39, № 4. – P.382-391.
208. Lack of alpha 2-antiplasmin promotes re-endothelialization via over-release of VEGF after vascular injury in mice [Text] / H. Matsuno [et al.] // *Blood.* – 2003. – Vol.102, № 10. – P.3621-3628.
209. Laemli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4 [Text] / U.K. Laemli // *Nature.* – 1970. – Vol.227. – P.680-685.
210. Lehoux, S. Redox signalling in vascular responses to shear and stretch [Text] / S. Lehoux // *Cardiovascular research.* – 2006. – Vol. 71. – P.269-279.
211. Leukocyte recruitment and expression of chemokines following different forms of vascular injury [Text] / F.G. Welt [et al.] // *Vasc Med.* – 2003. – Vol.8, № 1. – P.1-7.
212. Li, C. Model-based analysis of oligonucleotide arrays: model validation, design issues and standard error application [Text] / C. Li, W. Hung Wong // *Genome Biol.* – 2001. – Vol.2, № 8. – P.RESEARCH0032.
213. Lijnen, H.R. Gene targeting in hemostasis. Alpha2-antiplasmin [Text] / H.R. Lijnen // *Front Biosci.* – 2001. – Vol.6. – P.D239-247.
214. Lin, J. Impact of matrix metalloproteinases on atherosclerosis [Text] / J. Lin, V. Kakkar, X. Lu // *Curr Drug Targets.* – 2014. – Vol.15, № 4. – P.442-453.
215. Lipid lowering by diet reduces matrix metalloproteinase activity and increases collagen content of rabbit atheroma: a potential mechanism of lesion stabilization [Text] / M. Aikawa [et al.] // *Circulation.* – 1998. – Vol.97. – P.2433–2444.



216. Lipid raft compartmentalization of urokinase receptor signaling in human neutrophils [Text] / R.G. Sitrin [et al.] // *Am J Respir Cell Mol Biol.* – 2004. – Vol.30, № 2. – P.233-241.

217. Lipoprotein(a) level does not predict restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty [Text] / P. Alaigh [et al.] // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 1998. – Vol.18, № 8. – P.1281-1286.

218. Localization of fibrinolytic activators and inhibitors in normal and atherosclerotic vessels [Text] / M. Falkenberg [et al.] // *Thromb Haemost.* – 1996. – Vol.75, № 6. – P.933-938.

219. Localization of uPAR and MMP-9 in lipid rafts is critical for migration, invasion and angiogenesis in human breast cancer cells [Text] / H. Raghu [et al.] // *BMC Cancer.* – 2010. – Vol.10. – P.647.

220. Localized inflammation and aneurysm formation 10 years after sirolimus-eluting stent implantation [Text] / T. Nabeta [et al.] // *Circ J.* – 2017. – Jan 27. doi: 10.1253/circj.CJ-16-1064.

221. London, G.M. Atherosclerosis and arteriosclerosis in chronic renal failure [Text] / G.M. London, T.B. Drueke // *Kidney Int.* – 1997. – Vol.51. – P.1678-1695.

222. Longstaff, C. Fibrin binding and the regulation of plasminogen activators during thrombolytic therapy [Text] / C. Longstaff, S. Williams, C. Thelwell // *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* - 2008. - Vol.6, № 3. - P.212-23.

223. Long-term follow-up of the platinum chromium TAXUS Element (ION) stent: The PERSEUS workhorse and small vessel trial five-year results [Text] / D.J. Kereiakes [et al.] // *Catheter Cardiovasc Interv.* – 2015. – Vol.86, № 6. – P.994-1001.

224. LRP-1 promotes cancer cell invasion by supporting ERK and inhibiting JNK signaling pathways [Text] / B. Langlois [et al.] // *PLoS One.* – 2010. – Vol.5, № 7. – P.e11584.

225. Maintenance of long-term clinical benefit with sirolimus-eluting coronary stents: three-year results of the RAVEL trial [Text] / J. Fajadet [et al.] // *Circulation.* – 2005. – Vol.111, № 8. – P.1040-1044.

226. Marchina, E. Degradation of human plasma and extracellular matrix fibronectin by tissue type plasminogen activator and urokinase [Text] / E. Marchina, S. Barlati // *Int J Biochem Cell Biol.* – 1996. – Vol.28, № 10. – P.1141-1150.
227. Markers of early vascular ageing [Text] / V. Kotsis [et al.] // *Curr Pharm Des.* – 2017. – Mar. doi: 10.2174/1381612823666170328142433.
228. Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species [Text] / K. Grote [et al.] // *Circulation research.* – 2003. – Vol. 92. – P.e80-86.
229. Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation [Text] / G. Murphy [et al.] // *APMIS.* – 1999. – Vol.107, № 1. – P.38-44.
230. Mechanisms of arterial remodeling: lessons from genetic diseases [Text] / B.J. van Varik [et al.] // *Frontiers in genetics.* – 2012. – Vol. 3. – P. 290. DOI: 10.3389/fgene.2012.00290
231. Mechanisms of late lumen loss after antiproliferative percutaneous coronary intervention using beta-irradiation in a porcine model of restenosis [Text] / C. Deiner [et al.] // *Cardiovasc Revasc Med.* – 2007. – Vol.8, № 2. – P.94-98.
232. Mechanisms of post-intervention arterial remodelling [Text] / S.A. Goel [et al.] // *Cardiovasc Res.* – 2012. – Vol.96, № 3. – P.363-371.
233. Mechanosignaling in the vasculature: emerging concepts in sensing, transduction and physiological responses [Text] / S. Chatterjee [et al.] // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2015. – Vol.308, № 12. – P.H1451-1462.
234. Medcalf, R.L. What drives "fibrinolysis"? [Text] / R.L. Medcalf // *Hamostaseologie.* – 2015. – Vol.35, № 4. – P.303-310.
235. MEKK1 is required for inducible urokinase-type plasminogen activator expression [Text] / J. Witowsky [et al.] // *J Biol Chem.* – 2003. – Vol.278, № 8. – P.5941-5946.
236. Mekkawy, A.H. Involvement of urokinase-type plasminogen activator system in cancer: an overview [Text] / A.H. Mekkawy, M.H. Pourgholami, D.L. Morris // *Med Res Rev.* – 2014. – Vol.34, № 5. – P.918-956.

237. Metalloproteinase inhibitor attenuates neointima formation and constrictive remodeling after angioplasty in rats: augmentative effect of alpha(v)beta(3) receptor blockade [Text] / L. Margolin [et al.] // *Atherosclerosis*. – 2002. – Vol.163, № 2. – P.269-277.

238. Michels, H.R. Pharmacokinetics and hemostatic effects of saruplase in patients with acute myocardial infarction: comparison of infusion, single-bolus, and split-bolus administration [Text] / H.R. Michels, J.J. Hoffman, F.W. Bär // *J Thromb Thrombolysis*. – 1999. – Vol.8, № 3. – P.213-221.

239. MicroRNA-206 regulates vascular smooth muscle cell phenotypic switch and vascular neointimal formation [Text] / H. Sun [et al.] // *Cell Biol Int*. – 2017. – Mar 22. doi: 10.1002/cbin.10768.

240. Midterm angiographic outcomes with sirolimus- and everolimus-eluting stents for small vessels in diabetic patients: propensity-score-matched comparisons in three different vessel diameters [Text] / K. Suzuki [et al.] // *Cardiovasc Interv Ther*. – 2017. – Mar 27. doi: 10.1007/s12928-017-0466-9

241. Mitogenic effects of urokinase on melanoma cells are independent of high affinity binding to the urokinase receptor [Text] / J.L. Koopman [et al.] // *J Biol Chem*. – 1998. – Vol.273, № 50. – P.33267-33272.

242. Mojsilović, S.S. Transforming growth factor-beta differently regulates urokinase type plasminogen activator and matrix metalloproteinase-9 expression in mouse macrophages; analysis of intracellular signal transduction [Text] / S.S. Mojsilović, J.F. Santibanez // *Cell Biol Int*. – 2015. – Vol.39, № 5. – P.619-628.

243. Morphologic characteristics of lesion formation and time course of smooth muscle cell proliferation in a porcine proliferative restenosis model [Text] / A.J. Carter [et al.] // *J Am Coll Cardiol*. – 1994. – Vol.24, № 5. – P.1398-1405.

244. Morphological effects of coronary balloon angioplasty in vivo assessed by intravascular ultrasound imaging [Text] / J. Honye [et al.] // *Circulation*. – 1992. – Vol.85, № 3. – P.1012-1025.

245. Mosesson, M.W. Fibrinogen and fibrin structure and functions [Text] / M.W. Mosesson // *J Thromb Haemost*. – 2005. – Vol.3, № 8. – P.1894-1904.

246. Moss, J.W. Cytokines: roles in atherosclerosis disease progression and potential therapeutic targets [Text] / J.W. Moss, D.P. Ramji // *Future Med Chem.* – 2016. – Vol.8, № 11. – P.1317-1330.
247. Mulvany, M.J. Small artery remodelling in hypertension: causes, consequences and therapeutic implications [Text] / M.J. Mulvany // *Medical&biological engineering& computing.* – 2008. – Vol.46. – P. 461-467.
248. Myosin light chain kinase functions downstream of Ras/ERK to promote migration of urokinase-type plasminogen activator-stimulated cells in an integrin-selective manner [Text] / D.H. Nguyen [et al.] // *J Cell Biol.* – 1999. – Vol.146, № 1. – P.149-164.
249. NADPH oxidase 2-derived reactive oxygen species signal contributes to bradykinin-induced matrix metalloproteinase-9 expression and cell migration in brain astrocytes [Text] / C.C. Lin [et al.] // *Cell Commun Signal.* – 2012. – Vol. 23, №10. – P.35.
250. Natural heterogeneity of  $\alpha$ 2-antiplasmin: functional and clinical consequences [Text] / S. Abdul [et al.] // *Blood.* – 2016. – Vol.127, № 5. – P.538-545.
251. Neutralization of interleukin-18 inhibits neointimal formation in a rat model of vascular injury [Text] / P. Maffia [et al.] // *Circulation.* – 2006. – Vol.114, № 5. – P.430-437.
252. Neutrophil, not macrophage, infiltration precedes neointimal thickening in balloon-injured arteries [Text] / F.G. Welt [et al.] // *ArteriosclerThrombVasc Biol.* – 2000. – Vol.20, № 12. – P.2553-2558.
253. New-generation coronary stents: current data and future directions [Text] / A. Kalra [et al.] // *Curr Atheroscler Rep.* – 2017. – Vol.19, № 3. – P.14.
254. Nicholl, S.M. Plasminogen activator system and vascular disease [Text] / S.M. Nicholl, E. Roztocil, M.G. Davies // *Curr.Vasc.Pharmacol.* – 2006. – Vol.4. – P.101-116.
255. Nicholl, S.M. Urokinase-induced smooth muscle cell responses require distinct signaling pathways: a role for the epidermal growth factor receptor [Text] / S.M. Nicholl, E. Roztocil, M.G. Davies // *J Vasc Surg.* – 2005. – Vol.41, № 4. – P.672-681.

256. Nobiletin Inhibits PDGF-BB-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration and attenuates neointimal hyperplasia in a rat carotid artery injury model [Text] / S. Guan [et al.] // *Drug Dev Res.* – 2014. – Vol. 75, № 8. – P.489-496.
257. Nox activator 1: a potential target for modulation of vascular reactive oxygen species in atherosclerotic arteries [Text] / X.L. Niu [et al.] // *Circulation.* – 2010. – Vol.121, № 4. – P.549-559.
258. NOX isoforms and reactive oxygen species in vascular health [Text] / R.M. Touyz [et al.] // *Mol Interv.* – 2011. – Vol.11, № 1. – P.27-35.
259. Nuclear translocation of urokinase-type plasminogen activator [Text] / V. Stepanova [et al.] // *Blood.* – 2008. – Vol.112, № 1. – P.100-110.
260. Oligonucleotide microarrays reveal regulated genes related to inward arterial remodeling induced by urokinase plasminogen activator [Text] / O. Plekhanova [et al.] // *J Vasc Res.* - 2009. - Vol. 46, № 3. - P. 177-187.
261. O'Rourke, M.F. Arterial aging: pathophysiological principles [Text] / M.F. O'Rourke // *Vascular medicine.* – 2007. – Vol. 12. – P. 329-341.
262. Overexpression of tissue-type plasminogen activator in atherosclerotic human coronary arteries [Text] / M.B. Steins [et al.] // *Atherosclerosis.* – 1999. – Vol.145, № 1. – P.173-180.
263. Oxidative stress and pathological changes after coronary artery interventions [Text] / R.P. Juni [et al.] // *J Am CollCardiol.* – 2013. – Vol.61, № 14. – P.1471-1481.
264. Oxidative stress as a signaling mechanism of the vascular response to injury: the redox hypothesis of restenosis [Text] / L.C. Azevedo [et al.] // *Cardiovasc Res.* – 2000. – Vol.47, № 3. – P.436-445.
265. Oxidative stress induces early-onset apoptosis of vascular smooth muscle cells and neointima formation in response to injury [Text] / C. Gomez [et al.] // *Biosci Rep.* – 2015. – Vol.35, № 4. – P. pii: e00227. doi: 10.1042/BSR20140122.
266. Oxygen consumption rates and oxygen concentration in molt-4 cells and their mtDNA depleted (rho0) mutants [Text] / J. Shen [et al.] // *Biophys J.* – 2003. – Vol.84, № 2 (Pt 1) . – P.1291-1298.

267. Pant, R. Pathophysiology of coronary vascular remodeling: relationship with traditional risk factors for coronary artery disease [Text] / R. Pant, R. Marok, L.W. Klein // *Cardiol Rev.* – 2014. – Vol.22, № 1. – P.13-16.
268. Parenchymal cell proliferation in coronary arteries after percutaneous transluminal coronary angioplasty: a human tissue bank study [Text] / J.P. Ciezki [et al.] // *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* – 1999. – Vol.45, № 4. – P.963-968.
269. Pathology of drug-eluting stents in humans: delayed healing and late thrombotic risk [Text] / M. Joner [et al.] // *J Am Coll Cardiol.* – 2006. – Vol.48. – P.193–202.
270. Percutaneous transluminal angioplasty and stenting for severe stenosis of the intracranial extradural internal carotid artery causing transient ischemic attack or minor stroke [Text] / J.K. Ko [et al.] // *Interv Neuroradiol.* – 2015. – Vol.21, № 4. – P.511-519.
271. Perivascular gene transfer of dominant-negative N19RhoA attenuates neointimal formation via inhibition of TGF-beta1-Smad2 signaling in rats after carotid artery balloon injury [Text] / W. Chen [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2009. – Vol.389, № 2. – P.217-23. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.08.104.
272. Pharmacological targeting of plasminogen activator inhibitor-1 decreases vascular smooth muscle cell migration and neointima formation [Text] / Y. Ji [et al.] // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2016. – Vol.36, № 11. – P.2167-2175.
273. Phase II randomised proof-of-concept study of the urokinase inhibitor upamostat (WX-671) in combination with gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with non-resectable, locally advanced pancreatic cancer [Text] / V. Heinemann [et al.] // *Br J Cancer.* – 2013. – Vol.108, № 4. – P.766-770.
274. Phenotypic transformation and migration of adventitial cells following angioplasty [Text] / Y.L. Wang [et al.] // *Exp Ther Med.* – 2012. – Vol.4, № 1. – P.26-32.
275. Plasma urokinase antigen and C-reactive protein predict angina recurrence after coronary angioplasty [Text] / Ye. Parfyonova [et al.] // *Heart and Vessels.* - 2014. - Vol. 29, № 5. - P. 611-618.

276. Plasma urokinase antigen and plasminogen activator inhibitor-1 antigen levels predict angiographic coronary restenosis [Text] / B.H. Strauss [et al.] // *Circulation*. – 1999. – Vol.100, № 15. – P.1616-1622.
277. Plasmin activation system in restenosis: role in pathogenesis and clinical prediction? [Text] / G. Christ [et al.] // *J Thromb Thrombolysis*. – 1999. – Vol.7, № 3. – P.277-285.
278. Plasmin-dependent elimination of the growth-factor-like domain in urokinase causes its rapid cellular uptake and degradation [Text] / A. Poliakov [et al.] // *Biochem J*. – 2001. – Vol.355(Pt 3). – P.639-645.
279. Plasminogen activation with single-chain urokinase-type plasminogen activator (scu-PA). Studies with active site mutagenized plasminogen (Ser740----Ala) and plasmin-resistant scu-PA (Lys158----Glu) [Text] / H.R. Lijnen [et al.] // *J Biol Chem*. – 1990. – Vol.265, № 9. – P.5232-5236.
280. Plasminogen activator expression in human atherosclerotic lesions [Text] / F. Lupu [et al.] // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. – 1995. – Vol.15, № 9. – P.1444-1455.
281. Plasminogen activator inhibitor and the risk of cardiovascular disease: The Framingham Heart Study [Text] / G.H. Tofler [et al.] // *Thromb Res*. – 2016. – Vol.140. – P.30-35.
282. Plasminogen activator inhibitor-1 predicts coronary in-stent restenosis of drug-eluting stents [Text] / K.M. Katsaros [et al.] // *J Thromb Haemost*. – 2008. – Vol.6, № 3. – P.508-513.
283. Plasminogen activator inhibitor-1 associates with cardiovascular risk factors in healthy young adults in the Cardiovascular Risk in Young Finns Study [Text] / J.R. Raiko [et al.] // *Atherosclerosis*. – 2012. – Vol.224, № 1. – P.208-212.
284. Plasminogen activator system in human coronary atherosclerosis [Text] / P.N. Raghunath [et al.] // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. – 1995. – Vol.15, № 9. – P.1432-1443.
285. Platelet binding to monocytes increases the adhesive properties of monocytes by up-regulating the expression and functionality of beta1 and beta2 integrins [Text] / P.A. da Costa Martins [et al.] // *J Leukoc Biol*. – 2006. – Vol.79, № 3. – P.499-507.

286. Ploplis, V.A. Effects of altered plasminogen activator inhibitor-1 expression on cardiovascular disease [Text] / V.A. Ploplis // *Curr Drug Targets*. – 2011. – Vol.12, № 12. – P.1782-1789.
287. Ploug, J. Isolation of a plasminogen activator (urokinase) from urine [Text] / J. Ploug, N. Kjeldgaard // *Arch Biochem Biophys*. – 1956. – Vol.62, № 2. – P.500-501.
288. Porstmann, W. EinneuerKorsett-Ballonkatheter zurtransluminalen Rekanalisation nach Dotter unterbesondererBerucksichtigung von Obliterationenan den Beckenarterien [Text] / W. Porstmann // *RadiolDiagn*. – 1973. – Bd.14. – S.239-243.
289. Post, M.J. The relative importance of arterial remodeling compared with intimal hyperplasia in lumen renarrowing after balloon angioplasty [Text] / M.J. Post, C. Borst, R.E. Kuntz // *Circulation*. – 1994. – Vol. 89. – P.2816- 2821.
290. Potent inhibition of arterial intimal hyperplasia by TIMP1 gene transfer using AAV vectors [Text] / G.A. Ramirez Correa [et al.] // *Mol Ther*. – 2004. – Vol. 9, № 6. – P.876-884.
291. Potential applications of small interfering RNA in the cardiovascular field [Text] / F. Agostini [et al.] // *Drug of the future*. – 2006. – Vol. 31, № 6. – P. 513-525.
292. Predictive value of PAI-1 plasma activity and thallium perfusion imaging for restenosis after percutaneous transluminal angioplasty in clinically asymptomatic patients [Text] / M. Gottsauner-Wolf [et al.] // *Thromb Haemost*. – 1999. – Vol.81, № 4. – P.522-526.
293. Pro-atherogenic role of smooth muscle Nox4-based NADPH oxidase [Text] / X. Tong [et al.] // *J Mol Cell Cardiol*. – 2016. – Vol.92. – P.30-40.
294. Probucol inhibits in-stent thrombosis and neointimal hyperplasia by promoting re-endothelialization [Text] / D. Tanous [et al.] // *Atherosclerosis*. – 2006. – Vol.189, № 2. – P.342-349.
295. Rachev, A. Theoretical study of the effects of vascular smooth muscle contraction on strain and stress distributions in arteries [Text] / A. Rachev, K. Hayashi // *Annals of biomedical engineering*. – 1999. – Vol. 27. – P. 459-468.
296. Ragno, P. The urokinase receptor: a ligand or a receptor? Story of a sociable molecule [Text] / P. Ragno // *Cell Mol Life Sci*. – 2006. – Vol.63, № 9. – P.1028-1037.



297. Rajagopal, V. Coronary restenosis: a review of mechanisms and management [Text] / V. Rajagopal, S.G. Rockson // *Am J Med.* – 2003. – Vol.115, № 7. – P.547-553.
298. Reactive oxygen generated by Nox1 triggers the angiogenic switch [Text] / J.L. Arbiser [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2002. – Vol.99, № 2. – P.715-720.
299. Reactive oxygen species: key regulators in vascular health and diseases [Text] / Q. Chen [et al.] // *Br J Pharmacol.* – 2017. – Apr. doi: 10.1111/bph.13828.
300. Receptor-independent role of urokinase-type plasminogen activator in pericellular plasmin and matrix metalloproteinase proteolysis during vascular wound healing in mice [Text] / P. Carmeliet [et al.] // *J Cell Biol.* – 1998. – Vol.140, № 1. – P.233-245.
301. Recycling of the urokinase receptor upon internalization of the uPA:serpin complexes [Text] / A. Nykjaer [et al.] // *EMBO J.* – 1997. – Vol.16, № 10. – P.2610-2620.
302. Reduced metastasis of transgenic mammary cancer in urokinase-deficient mice [Text] / K. Almholt [et al.] // *Int J Cancer.* – 2005. – Vol.113, № 4. – P.525-532.
303. Reduction of mouse atherosclerosis by urokinase inhibition or with a limited-spectrum matrix metalloproteinase inhibitor [Text] / J.H. Hu [et al.] // *Cardiovasc Res.* – 2015. – Vol.105, № 3. – P.372-382.
304. Regulation and involvement of matrix metalloproteinases in vascular diseases [Text] / M. Amin [et al.] // *Front Biosci (Landmark Ed).* – 2016. – Vol.21. – P.89-118.
305. Regulation and role of urokinase plasminogen activator in vascular remodelling [Text] / V. Tkachuk [et al.] // *Clin Exp Pharmacol Physiol.* – 1996. – Vol.23, № 9. – P.759-765.
306. Regulation of cell migration and invasion by specific modules of uPA: mechanistic insights and specific inhibitors [Text] / M.V. Carriero [et al.] // *Curr Drug Targets.* – 2011. – Vol.12, № 12. – P.1761-1771.
307. Regulation of integrin function by the urokinase receptor [Text] / Y. Wei [et al.] // *Science.* – 1996. – Vol.273(5281). – P.1551-1555.

308. Reidy, M.A. Migration of arterial wall cells. Expression of plasminogen activators and inhibitors in injured rat arteries [Text] / M.A. Reidy, I. Colleen, V. Lindner // *Circ Res.* – 1996. – Vol.78. – P.405-414.

309. Relation of arterial geometry to luminal narrowing and histologic markers for plaque vulnerability: the remodeling paradox [Text] / G. Pasterkamp [et al.] // *Journal of the American College of Cardiology.* – 1998. – Vol. 32. – P. 655-662.

310. Relationship of plasmin generation to cardiovascular disease risk factors in elderly men and women [Text] / P.A. Sakkinen [et al.] // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 1999. – Vol.19, № 3. – P.499-504.

311. Relationships of thrombosis and fibrinolysis to atherosclerosis [Text] / A. Hamsten [et al.] // *Curr Opin Lipidol.* – 1994. – Vol.5, № 5. – P.382-389.

312. Reporting standards of the Society for Vascular Surgery for endovascular treatment of chronic lower extremity peripheral artery disease [Text] / M.C. Stoner [et al.] // *J Vasc Surg.* – 2016. – Vol.64, № 1. – P.e1-e21.

313. Rescuing impaired re-endothelialization of drug-eluting stents using the hepatocyte growth factor [Text] / C. Huang [et al.] // *Ann Vasc Surg.* – 2016. – Vol.36. – P.273-282.

314. Resistant in-stent restenosis in the drug eluting stent era [Text] / K. Theodoropoulos [et al.] // *Catheter Cardiovasc Interv.* - 2016. - Vol.88, № 5. - P.777-785.

315. RESOLUTE all-comers investigators. 4-year clinical outcomes and predictors of repeat revascularization in patients treated with new-generation drug-eluting stents: a report from the RESOLUTE all-comers trial (a randomized comparison of a zotarolimus-eluting stent with an everolimus-eluting stent for percutaneous coronary intervention) [Text] / M. Taniwaki [et al.] // *J Am Coll Cardiol.* 2014. – Vol. 63, № 16. – P.1617-1625.

316. Restenosis after experimental angioplasty. Intimal, medial, and adventitial changes associated with constrictive remodelling [Text] / A. Lafont [et al.] // *Circ Res.* – 1995. – Vol.76. – P.996-1002.

317. Restenosis after PCI. Part 1: pathophysiology and risk factors [Text] / J.W. Jukema [et al.] // *Nat Rev Cardiol.* – 2011. – Vol.9, № 1. – P.53-62.
318. Reversible interactions between plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 [Text] / J. Mimuro [et al.] // *Biochim Biophys Acta.* – 1992. – Vol.1160, № 3. – P.325-334.
319. RhoB regulates uPAR signalling [Text] / D. Alfano [et al.] // *J Cell Sci.* – 2012. – Vol.125(Pt 10). – P.2369-2380.
320. Robertson, L. Antiplatelet and anticoagulant drugs for prevention of restenosis/reocclusion following peripheral endovascular treatment [Text] / L. Robertson, M.A. Ghouri, F. Kovacs // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2012. – Vol.8. – P.CD002071.
321. Rogers, C. A mAb to the beta2-leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) reduces intimal thickening after angioplasty or stent implantation in rabbits [Text] / C. Rogers, E.R. Edelman, D.I. Simon // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1998. – Vol.95, № 17. – P.10134-10139.
322. Role of endogenous platelet-derived growth factor in arterial smooth muscle cell migration after balloon catheter injury [Text] / C.L. Jackson [et al.] // *Arterioscler Thromb.* – 1993. – Vol.13, № 8. – P.1218-1226.
323. Role of hemostatic risk factors for restenosis in peripheral arterial occlusive disease after transluminal angioplasty [Text] / M. Tschopl [et al.] // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 1997. – Vol.17, № 11. – P.3208-3214.
324. Role of smooth muscle Nox4-based NADPH oxidase in neointimal hyperplasia [Text] / X. Tong [et al.] // *J Mol Cell Cardiol.* – 2015. – Vol.89 (Pt B). – P.185-194.
325. Role of the JAK/STAT pathway in rat carotid artery remodeling after vascular injury [Text] / Y. Seki [et al.] // *Circ Res.* – 2000. – Vol.87, № 1. – P.12-18.
326. Roles and regulation of membrane-associated serine proteases [Text] / D. Qiu [et al.] // *Biochem Soc Trans.* – 2007. – Vol.35(Pt 3). – P.583-587.
327. Roles of P-selectin in inflammation, neointimal formation, and vascular remodeling in balloon-injured rat carotid arteries [Text] / S. Hayashi [et al.] // *Circulation.* – 2000. – Vol. 102, № 14. – P.1710-1717.

328. Rosetti, F. The many faces of Mac-1 in autoimmune disease [Text] / F. Rosetti, T.N. Mayadas // *Immunol Rev.* – 2016. – Vol.269, № 1. – P.175-193.
329. Roztocil, E. Mechanisms of kringle fragment of urokinase-induced vascular smooth muscle cell migration [Text] / E. Roztocil, S.M. Nicholl, M.G. Davies // *J Surg Res.* – 2007. – Vol.141, № 1. – P.83-90.
330. Sager, H.B. Inflammation: a trigger for acute coronary syndrome [Text] / H.B. Sager, M. Nahrendorf // *Q J Nucl Med Mol Imaging.* – 2016. – Vol.60, № 3. – P.185-193.
331. Schaller, J. The plasmin-antiplasmin system: structural and functional aspects [Text] / J. Schaller, S.S. Gerber // *Cell Mol Life Sci.* - 2011. - Vol.68, № 5. - P.785-801.
332. Schober, A. Chemokines in vascular dysfunction and remodeling [Text] / A. Schober // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2008. – Vol.28, № 11. – P.1950-1959.
333. Schultz, R. The effect of urokinase and fibrinolytic euglobulins on synthetic amino acid esters [Text] / R. Schultz, K. von Kaulla // *Biochem J.* – 1958. – Vol.68, № 2. – P.218-221.
334. Schwartz, R.S. Pathophysiology of coronary artery restenosis [Text] / R.S. Schwartz, T.D. Henry // *Rev Cardiovasc Med.* – 2002. – Vol. 3 (Suppl.5). – P.S4-9.
335. Schwartz, R.S. The vessel wall reaction in restenosis [Text] / R.S. Schwartz // *Semin Interv Cardiol.* – 1997. – Vol. 2. – P.83-88.
336. Selective endothelin A receptor antagonism with sitaxentan reduces neointimal lesion size in a mouse model of intraluminal injury [Text] / K.M. Duthie [et al.] // *Br J Pharmacol.* – 2015. – Vol.172, № 11. – P.2827-2837.
337. Sensing the mechano-chemical properties of the extracellular matrix [Text] / P. Ringer [et al.] // *Matrix Biol.* – 2017. – Apr 4. pii: S0945-053X(17)30018-5. doi: 10.1016/j.matbio.2017.03.004.
338. Serum levels of thrombotic markers in patients with acute myocardial infarction [Text] / S. Islam [et al.] // *Int J Clin Exp Med.* – 2014. – Vol.7, № 4. – P.1059-1063.

339. Shear stress patterns affect the secreted chemokine profile in endothelial cells [Text] / K. Urschel [et al.] // *Clinical hemorheology and microcirculation*. – 2012. – Vol. 50. – P.143-152.
340. Simone, T.M. Low molecular weight antagonists of plasminogen activator inhibitor-1: therapeutic potential in cardiovascular disease [Text] / T.M. Simone, P.J. Higgins // *Mol Med Ther*. – 2012. – Vol.1, № 1. – P.101.
341. Sirolimus coating on heparinized stents prevents restenosis and thrombosis [Text] / I.H. Bae [et al.] // *J Biomater Appl*. – 2017. – Jan 1:885328217706222.
342. Smooth muscle cells express urokinase during mitogenesis and tissue-type plasminogen activator during migration in injured rat carotid artery [Text] / A.W. Clowes [et al.] // *Circ Res*. – 1990. – Vol.67. – P.61-67.
343. Smooth muscle cell-specific Tgfb1 deficiency attenuates neointimal hyperplasia but promotes an undesired vascular phenotype for injured arteries [Text] / M. Liao [et al.] // *Physiol Rep*. – 2016. – Vol.4, № 23. – P. e13056.
344. Smooth muscle-selective inhibition of nuclear factor- $\kappa$ b attenuates smooth muscle phenotypic switching and neointima formation following vascular injury [Text] / T. Yoshida [et al.] // *J Am Heart Assoc*. – 2013. – Vol.2, № 3. – P.e000230.
345. SOCS1 prevents graft arteriosclerosis by preserving endothelial cell function [Text] / L. Qin [et al.] // *J Am Coll Cardiol*. – 2014. – Vol.63, № 1. – P.21-29.
346. Soluble transforming growth factor-beta type II receptor inhibits negative remodeling, fibroblast transdifferentiation, and intimal lesion formation but not endothelial growth [Text] / J.D. Smith [et al.] // *Circ Res*. – 1999. – Vol.84, № 10. – P.1212-1222.
347. Solution structures of human transforming growth factor alpha derived from 1H NMR data [Text] / T.P. Kline [et al.] // *Biochemistry*. – 1990. – Vol.29, № 34. – P.7805-7813.
348. SORT OUT II Investigators. 10-year clinical outcome after randomization to treatment by sirolimus- or paclitaxel-eluting coronary stents [Text] / A.M. Galløe [et al.] // *J Am Coll Cardiol*. – 2017. – Vol.69, № 6. – P.616-624.

349. Stary, H.C. Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults [Text] / H.C. Stary // *Arteriosclerosis*. – 1989. – Vol.9, № 1 (Suppl.). – P.119-132.
350. Strain-dependent expression of proteolytic molecules during vascular remodeling in the mice [Text] / V. Korshunov [et al.] // *Journal of Vascular Research*. - 2004. – T. 41, № 6. - P. 481-489.
351. Structural basis of interaction between urokinase-type plasminogen activator and its receptor [Text] / C. Barinka [et al.] // *J Mol Biol*. – 2006. – Vol.363, № 2. – P.482-495.
352. Structural requirements for the growth factor activity of the amino-terminal domain of urokinase [Text] / S.A. Rabbani [et al.] // *J Biol Chem*. – 1992. – Vol. 267, № 20. – P.14151-14156.
353. Structure and ligand interactions of the urokinase receptor (uPAR) [Text] / M. Kjaergaard [et al.] // *Front Biosci*. – 2008. – Vol.13. – P.5441-5461.
354. Succinobucol-eluting stents increase neointimal thickening and peri-strut inflammation in a porcine coronary model [Text] / J. Watt [et al.] // *Catheter Cardiovasc Interv*. – 2013. – Vol.81, № 4. – P.698-708.
355. Systematic mutational analysis of the receptor-binding region of the human urokinase-type plasminogen activator [Text] / V. Magdolen [et al.] // *Eur J Biochem*. – 1996. – Vol.237, № 3. – P.743-751.
356. Takada, Y. Potential role of kringle-integrin interaction in plasmin and uPA actions (a hypothesis) [Text] / Y. Takada // *J Biomed Biotechnol*. – 2012;2012:136302.
357. Takasaki, Y. A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformation [Text] / Y. Takasaki, J.S. Deng, E.M. Tan // *J Exp Med*. – 1981. – Vol.154, № 6. – P.1899-1909.
358. Tanaka, L.Y. Vascular remodeling: A redox-modulated mechanism of vessel caliber regulation [Text] / L.Y. Tanaka, F.R. Laurindo // *Free Radic Biol Med*. – 2017. – Jan 18. pii: S0891-5849(17)30034-5.
359. Task Force Members. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the

European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC) [Text] / G. Mancia [et al.] // *J Hypertens.* – 2013. – Vol.31, № 7. – P.1281-1357.

360. Tedgui, A. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways [Text] / A. Tedgui, Z. Mallat // *Physiol Rev.* – 2006. – Vol.86, № 2. – P.515-581.

361. Temporal and topographic matrix metalloproteinase expression after vascular injury in mice [Text] / H.R. Lijnen [et al.] // *Thromb Haemost.* – 1999. – Vol.81, № 5. – P.799-807.

362. Tesfamariam, B. Endothelial repair and regeneration following intimal injury [Text] / B. Tesfamariam // *J Cardiovasc Transl Res.* – 2016. – Vol.9, № 2. – P.91-101.

363. Textor, S.C. Renal artery stenosis: if and when to intervene [Text] / S.C. Textor, M.M. McKusick // *Curr Opin Nephrol Hypertens.* – 2016. – Vol.25, № 2. – P.144-151.

364. The aging cardiovascular system: understanding it at the cellular and clinical levels [Text] / F. Paneni [et al.] // *J Am Coll Cardiol.* – 2017. – Vol.69, № 15. – P.1952-1967.

365. The chemotactic action of urokinase on smooth muscle cells is dependent on its kringle domain. Characterization of interactions and contribution to chemotaxis [Text] / S. Mukhina [et al.] // *J Biol Chem.* – 2000. – Vol.275, № 22. – P.16450-16458.

366. The cleavage of the urokinase receptor regulates its multiple functions [Text] / N. Montuori [et al.] // *J Biol Chem.* – 2002. – Vol.277, № 49. – P.46932– 46939.

367. The harmonizing outcomes with revascularization and stents in acute myocardial infarction (HORIZONS-AMI) Trial: study design and rationale [Text] / R. Mehran [et al.] // *Am Heart J.* – 2008. – Vol.156, № 1. – P.44-56.

368. The influence of established genetic variation in the haemostatic system on clinical restenosis after percutaneous coronary interventions [Text] / D. Pons [et al.] // *Thromb Haemost.* – 2007. – Vol.98, № 6. – P.1323-1328.

369. The interaction between uPAR and vitronectin triggers ligand-independent adhesion signalling by integrins [Text] / G.M. Ferraris [et al.] // *EMBO J.* – 2014. – Vol.33, № 21. – P.2458-2472.

370. The Jak/Stat pathway and urokinase receptor signaling in human aortic vascular smooth muscle cells [Text] / I. Dumler [et al.] // *J Biol Chem.* – 1998. – Vol.273, № 1. – P.315-321.

371. The kringle domain of urokinase-type plasminogen activator potentiates LPS-induced neutrophil activation through interaction with  $\alpha$ V $\beta$ 3 integrins [Text] / S.H. Kwak [et al.] // *J Leukoc Biol.* – 2005. – Vol.78, № 4. – P.937-945.

372. The kringle stabilizes urokinase binding to the urokinase receptor [Text] / K. Bdeir [et al.] // *Blood.* – 2003. – Vol.102, № 10. – P.3600-3608.

373. The plasminogen activator inhibitor PAI-1 controls in vivo tumor vascularization by interaction with proteases, not vitronectin. Implications for antiangiogenic strategies [Text] / K. Bajou [et al.] // *J Cell Biol.* – 2001. – Vol.152, № 4. – P. 777-784.

374. The receptor-binding sequence of urokinase. A biological function for the growth-factor module of proteases [Text] / E. Appella [et al.] // *J Biol Chem.* – 1987. – Vol.262, № 10. – P.4437-4440.

375. The relationships between polymorphisms in genes encoding the growth factors TGF- $\beta$ 1, PDGFB, EGF, bFGF and VEGF-A and the restenosis process in patients with stable coronary artery disease treated with bare metal stent [Text] / T. Osadnik [et al.] // *PLoS One.* – 2016. – Vol.11, № 3. – P.e0150500.

376. The role of drug-coated balloons in in-stent restenosis [Text] / M. Andrassy [et al.] // *J Cardiovasc Surg (Torino).* – 2017. doi: 10.23736/S0021-9509.17.09963-3

377. The role of plasminogen activator receptor in cancer invasion and dormancy [Text] / L. Ossowski [et al.] // *Medicina (B Aires).* – 1999. – Vol.59, № 5 (Pt 2). – P.547-552.

378. The role of shear stress in the generation of rupture-prone vulnerable plaques [Text] / C.J. Slager [et al.] // *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* – 2005. – Vol.2, № 8. – P.401-407.

379. The urokinase receptor (CD87) represents a central mediator of growth factor-induced endothelial cell migration [Text] / M. Poettler [et al.] // *Thromb Haemost.* – 2012. – Vol.108, № 2. – P.357-366.



380. The urokinase receptor takes control of cell migration by recruiting integrins and FPR1 on the cell surface [Text] / A. Gorrasi [et al.] // PLoS One. – 2014. – Vol.9, № 1. – P.e86352.
381. The urokinase/urokinase receptor system in mast cells: effects of its functional interaction with fmlf receptors [Text] / F.W. Rossi [et al.] // Transl Med UniSa. – 2016. – Vol.15. – P.34-41.
382. The urokinase-system--role of cell proliferation and apoptosis [Text] / R. Hildenbrand [et al.] // Histol Histopathol. – 2008. – Vol.23, № 2. – P.227-236.
383. The urokinase-type plasminogen activator receptor mediates tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and activation of mitogen-activated protein kinase in cultured endothelial cells [Text] / H. Tang [et al.] // J Biol Chem. – 1998. – Vol.273, № 29. – P.18268-18272.
384. Thrombin promotes proinflammatory phenotype in human vascular smooth muscle cell [Text] / S.W. Chung [et al.] // Biochem Biophys Res Commun. – 2010. – Vol.396, № 3. – P.748-754.
385. Tigges, U. Adventitial pericyte progenitor/mesenchymal stem cells participate in the restenotic response to arterial injury [Text] / U. Tigges, M. Komatsu, W.B. Stallcup // J Vasc Res. – 2013. – Vol.50, № 2. – P.134-144.
386. Tissue plasminogen activator and risk of myocardial infarction. The Rotterdam Study [Text] / J.G. van der Bom [et al.] // Circulation. – 1997. – Vol.95, № 12. – P.2623-2627.
387. Tissue plasminogen activator enhances mobilization of endothelial progenitor cells and angiogenesis in murine limb ischemia [Text] / H.K. Yip [et al.] // Int J Cardiol. – 2013. – Vol.168, № 1. – P.226-236.
388. To study the effects of local co-transfection vascular endothelial growth factor165 and tissue-type plasminogen activator genes on inhibiting intimal hyperplasia after operation injury artery in rabbits [Text] / Z.J. Wu [et al.] // Zhonghua Wai Ke Za Zhi. – 2005. – Vol.43, № 13. – P.861-865.

389. Towbin, H. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications [Text] / H. Towbin, T. Staehelin, G. Gordon // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1979. – Vol.76. – P.4350-4354.
390. tPA via infusion catheters followed by continuous IV infusion for 3 days prevents intimal hyperplasia after balloon injury [Text] / K. Kanamasa [et al.] // *Angiology*. – 2001. – Vol.52, № 12. – P.819-825.
391. Transcriptional activation of urokinase by the Krüppel-like factor Zf9/COPEB activates latent TGF-beta1 in vascular endothelial cells [Text] / S. Kojima [et al.] // *Blood*. – 2000. – Vol.95, № 4. – P.1309-1316.
392. Transforming growth factor-beta blockade down-regulates the renin-angiotensin system and modifies cardiac remodeling after myocardial infarction [Text] / L.J. Ellmers [et al.] // *Endocrinology*. – 2008. – Vol.149, № 11. – P.5828-5834.
393. Transluminal angioplasty evaluated by electron microscopy [Text] / C.L. Zollikofer [et al.] // *Radiology*. – 1984. – Vol.153, № 2. – P.369-374.
394. Transplantation of EPCs overexpressing PDGFR- $\beta$  promotes vascular repair in the early phase after vascular injury [Text] / H. Wang [et al.] // *BMC Cardiovasc Disord*. – 2016. – Vol.16, № 1. – P.179.
395. Tumor development is retarded in mice lacking the gene for urokinase-type plasminogen activator or its inhibitor, plasminogen activator inhibitor-1 [Text] / L.S. Gutierrez [et al.] // *Cancer Res*. – 2000. – Vol.60, № 20. – P.5839-5847.
396. Tumor necrosis factor inhibitors as novel therapeutic tools for vascular remodeling diseases [Text] / C.M. Lambert [et al.] // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. – 2010. – Vol.299, № 4. – P.H995-1001.
397. uPA promotes lipid-loaded vascular smooth muscle cell migration through LRP-1 [Text] / R. Lugano [et al.] // *Cardiovasc Res*. – 2013. – Vol.100, № 2. – P.262-271.
398. uPAR regulates pericellular proteolysis through a mechanism involving integrins and fMLF-receptors [Text] / N. Montuori [et al.] // *Thromb Haemost*. – 2013. – Vol.109, № 2. – P.309-318.

399. Upregulation of Nox-based NAD(P)H oxidases in restenosis after carotid injury [Text] / K. Szöcs [et al.] // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2002. – Vol.22, № 1. – P.21-27.
400. Urinary-type plasminogen activator (uPA) expression and uPA receptor localization are regulated by alpha 3beta 1 integrin in oral keratinocytes [Text] / S. Ghosh [et al.] // *J Biol Chem.* – 2000. – Vol.275, № 31. – P.23869-23876.
401. Urokinase but not tissue plasminogen activator mediates arterial neointima formation in mice [Text] / P. Carmeliet [et al.] // *Circ Res.* – 1997. – Vol. 81, № 5. – P.829-839.
402. Urokinase induces matrix metalloproteinase-9/gelatinase B expression in THP-1 monocytes via ERK1/2 and cytosolic phospholipase A2 activation and eicosanoid production [Text] / M. Menshikov [et al.] // *J Vasc Res.* – 2006. – Vol.43, № 5. – P.482-490.
403. Urokinase plasminogen activator augments cell proliferation and neointima formation in injured arteries via proteolytic mechanisms [Text] / O. Plekhanova [et al.] // *Atherosclerosis.* - 2001. - Vol. 159, № 2. - P. 297-306.
404. Urokinase plasminogen activator colocalizes with CD25+ cells in atherosclerotic vessels [Text] / M. Falkenberg [et al.] // *J Vasc Res.* – 1998. – Vol.35, № 5. – P.318-324.
405. Urokinase plasminogen activator enhances intima and media growth and reduces lumen size in carotid arteries [Text] / O. Plekhanova [et al.] // *J of Hypertension.* - 2000. – Vol. 18, № 8. - P. 1065-1069.
406. Urokinase plasminogen activator in injured adventitia increases the number of myofibroblasts and augments early proliferation [Text] / O. Plekhanova [et al.] // *J Vasc Res.* – 2006. – Vol.43, № 5. – P.437-446.
407. Urokinase plasminogen activator induces human smooth muscle cell migration and proliferation via distinct receptor-dependent and proteolysis-dependent mechanisms [Text] / V. Stepanova [et al.] // *Mol Cell Biochem.* – 1999. – Vol.195, № 1-2. – P.199-206.

408. Urokinase plasminogen activator is a central regulator of macrophage three-dimensional invasion, matrix degradation, and adhesion [Text] / A.J. Fleetwood [et al.] // *J Immunol.* – 2014. – Vol.192, № 8. – P.3540-3547.
409. Urokinase plasminogen activator receptor, beta 2-integrins, and Src-kinases within a single receptor complex of human monocytes [Text] / J. Bohuslav [et al.] // *J Exp Med.* – 1995. – Vol.181, № 4. – P.1381-1390.
410. Urokinase plasminogen activator stimulates vascular smooth muscle cell proliferation via redox-dependent pathways [Text] / M. Menshikov [et al.] // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* - 2006. – Vol. 26. - P. 801-807.
411. Urokinase plasminogen activator system in humans with stable coronary artery disease [Text] / T.L. Krasnikova [et al.] // *Clin Exp Pharmacol Physiol.* – 1999. – Vol.26, № 4. – P.354-357.
412. Urokinase receptor and fibronectin regulate the ERK(MAPK) to p38(MAPK) activity ratios that determine carcinoma cell proliferation or dormancy in vivo [Text] / J.A. Aguirre-Ghiso [et al.] // *Mol Biol Cell.* – 2001. – Vol.12, № 4. – P.863-879.
413. Urokinase receptor is associated with the components of the JAK1/STAT1 signaling pathway and leads to activation of this pathway upon receptor clustering in the human kidney epithelial tumor cell line TCL-598 [Text] / Y. Koshelnick [et al.] // *J Biol Chem.* – 1997. – Vol.272, № 45. – P.28563-28567.
414. Urokinase receptor surface expression regulates monocyte migration and is associated with accelerated atherosclerosis [Text] / W. Chen [et al.] // *Int J Cardiol.* – 2012. – Vol.161, № 2. – P.103-110.
415. Urokinase receptors promote beta1 integrin function through interactions with integrin alpha3beta1 [Text] / Y. Wei [et al.] // *Mol Biol Cell.* – 2001. – Vol.12, № 10. – P.2975-2986.
416. Urokinase stimulates human vascular smooth muscle cell migration via a phosphatidylinositol 3-kinase-Tyk2 interaction [Text] / A. Kusch [et al.] // *J Biol Chem.* – 2000. – Vol.275, № 50. – P.39466-39473.

417. Urokinase-dependent human vascular smooth muscle cell adhesion requires selective vitronectin phosphorylation by ectoprotein kinase CK2 [Text] / V. Stepanova [et al.] // *J Biol Chem.* – 2002. – Vol.277, № 12. – P.10265-10272.
418. Urokinase-induced migration of human vascular smooth muscle cells requires coupling of the small GTPases RhoA and Rac1 to the Tyk2/PI3-K signalling pathway [Text] / I. Kiian [et al.] // *Thromb Haemost.* – 2003. – Vol.89, № 5. – P.904-914.
419. Urokinase-induced mitogenesis is mediated by casein kinase 2 and nucleolin [Text] / I. Dumler [et al.] // *Curr Biol.* – 1999. – Vol.9, № 24. – P.1468-1476.
420. Urokinase-induced signaling in human vascular smooth muscle cells is mediated by PDGFR-beta [Text] / J. Kiyon [et al.] // *EMBO J.* – 2005. – Vol. 24, № 10. – P.1787-17897.
421. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) induces pulmonary microvascular endothelial permeability through low density lipoprotein receptor-related protein (LRP)-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase [Text] / A.M. Makarova [et al.] // *J Biol Chem.* – 2011. – Vol.286, № 26. – P.23044-23053.
422. Urokinase-type plasminogen activator binding to its receptor stimulates tumor cell migration by enhancing integrin-mediated signal transduction [Text] / M. Yebra [et al.] // *Exp Cell Res.* – 1999. – Vol.250, № 1. – P.231-240.
423. Urokinase-type plasminogen activator induces proliferation in breast cancer cells [Text] / M. Gandhari [et al.] // *Int J Oncol.* – 2006. – Vol. 28, № 6. – P.1463-1470.
424. Urokinase-type plasminogen activator is required for the generation of a type 1 immune response to pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection [Text] / M.R. Gyetko [et al.] // *J Immunol.* – 2002. – Vol. 168, № 2. – P.801-809.
425. Urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) ligation induces a raft-localized integrin signaling switch that mediates the hypermotile phenotype of fibrotic fibroblasts [Text] / L.M. Grove [et al.] // *J Biol Chem.* – 2014. – Vol.289, № 18. – P.12791-12804.
426. Urokinase-type plasminogen activator receptor interaction with  $\beta$ 1 integrin is required for platelet-derived growth factor-AB-induced human mesenchymal

stem/stromal cell migration [Text] / V. Chabot [et al.] // Stem Cell Res Ther. – 2015. – Vol.6. – P.188.

427. Urokinase-type plasminogen activator receptors associate with beta1 and beta3 integrins of fibrosarcoma cells: dependence on extracellular matrix components [Text] / W. Xue [et al.] // Cancer Res. – 1997. – Vol.57, № 9. – P.1682-1689.

428. Varnava, A.M. Relationship between coronary artery remodeling and plaque vulnerability [Text] / A.M. Varnava, P.G. Mills, M.J. Davies // Circulation. – 2002. – Vol. 105. – P. 939-943.

429. Vascular matrix metalloproteinase-2-dependent cleavage of calcitonin gene-related peptide promotes vasoconstriction [Text] / C. Fernandez-Patron [et al.] // Circ Res. – 2000. – Vol.87, № 8. – P.670-676.

430. Vascular remodeling [Text] / M.J. Mulvany [et al.] // Hypertension. – 1996. – Vol.28, № 3. – P.505-506.

431. Vascular smooth muscle cell migration: current research and clinical implications [Text] / A.I. Willis [et al.] // Vascular and endovascular surgery. – 2004. – Vol. 38. – P. 11-23.

432. Vascular smooth muscle cell phenotypic plasticity and the regulation of vascular calcification [Text] / V.P. Iyemere [et al.] // Journal of internal medicine. – 2006. – Vol. 260. – P. 192-210.

433. Vascular smooth muscle Jak2 deletion prevents angiotensin II-mediated neointima formation following injury in mice [Text] / A. Kirabo [et al.] // J Mol Cell Cardiol. – 2011. – Vol.50, № 6. – P.1026-1034.

434. Vascular wall hypoxia promotes arterial thrombus formation via augmentation of vascular thrombogenicity [Text] / Y. Matsuura [et al.] // Thromb Haemost. – 2015. – Vol.114, № 1. – P.158-172.

435. VEGF-induced endothelial cell migration requires urokinase receptor (uPAR)-dependent integrin redistribution [Text] / R.A. Alexander [et al.] // Cardiovasc Res. – 2012. – Vol.94, № 1. – P.125-135.

436. von Hundelshausen, P. Platelets and their chemokines in atherosclerosis-clinical applications [Text] / P. von Hundelshausen, M.M. Schmitt // *Front Physiol.* – 2014. – Vol.5. – P.294.
437. v-Src's hold over actin and cell adhesions [Text] / M.C. Frame [et al.] // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2002. – Vol.3, № 4. – P.233-245.
438. Wahlgren, C.M. Inhibition of neointimal hyperplasia by a specific thrombin inhibitor [Text] / C.M. Wahlgren, S. Frebelius, J. Swedenborg // *Scand Cardiovasc J.* – 2004. – Vol.38, № 1. – P.16-21.
439. Wan, W. Biomechanical and microstructural properties of common carotid arteries from fibulin-5 null mice [Text] / W. Wan, H. Yanagisawa, R.L. Jr. Gleason // *Ann Biomed Eng.* – 2010. – Vol.38, № 12. – P.3605-3617.
440. Webb, D.J. Extracellular signal-regulated kinase functions in the urokinase receptor-dependent pathway by which neutralization of low density lipoprotein receptor-related protein promotes fibrosarcoma cell migration and matrigel invasion [Text] / D.J. Webb, D.H. Nguyen, S.L. Gonias // *J Cell Sci.* – 2000. – Vol.113 (Pt 1). – P.123-134.
441. Webb, D.J. Plasminogen activator inhibitor 1 functions as a urokinase response modifier at the level of cell signaling and thereby promotes MCF-7 cell growth [Text] / D.J. Webb, K.S. Thomas, S.L. Gonias // *J Cell Biol.* – 2001. – Vol.152, № 4. – P.741-752.
442. Webber, M.M. Urokinase-mediated extracellular matrix degradation by human prostatic carcinoma cells and its inhibition by retinoic acid [Text] / M.M. Webber, A. Waghray // *Clin Cancer Res.* – 1995. – Vol.1, № 7. – P.755-761.
443. Weintraub, W.S. The pathophysiology and burden of restenosis [Text] / W.S. Weintraub // *Am J Cardiol.* – 2007. – Vol.100, № 5A. – P.3K-9K.
444. Welle, S. Computational method for reducing variance with Affymetrix microarrays [Text] / S. Welle, A.I. Brooks, C.A. Thornton // *BMC Bioinformatics.* – 2002. – Vol.3. – P.23.
445. Werner, M. DES and modern stent technologies for in-stent restenosis [Text] / M. Werner // *J Cardiovasc Surg (Torino).* – 2017. doi: 10.23736/S0021-9509.17.09955-4.

446. Wight, T.N. Arterial remodeling in vascular disease: a key role for hyaluronan and versican [Text] / T.N. Wight // *Front Biosci.* – 2008. – Vol.13. – P.4933-4937.
447. Willnow, T.E. Lipoprotein receptors: new roles for ancient proteins [Text] / T.E. Willnow, A. Nykjaer, J. Herz // *Nat Cell Biol.* – 1999. – Vol.1, № 6. – P.E157-162.
448. Wu, X. Expression and significance of  $\alpha$ -SMA and PCNA in the vascular adventitia of balloon-injured rat aorta [Text] / X. Wu, Q. Lu // *Exp Ther Med.* – 2013. – Vol.5, № 6. – P.1671-1676.
449. Xiaoli, M. Effects and mechanism of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor on vascular smooth muscle cell proliferation [Text] / M. Xiaoli, H. Wenying, S. Mingpeng // *Int J Cardiol.* - 1998. - Vol. 66 (Suppl. 1). - P.S57-64.
450. Yanagisawa, H. Fibulin-5, an integrin-binding matricellular protein: its function in development and disease [Text] / H. Yanagisawa, M.K. Schluterman, R.A. Brekken // *J Cell Commun Signal.* – 2009. – Vol.3, № 3-4. – P.337-347.
451. Zhang, L. Wnt co-receptor LRP5/6 overexpression confers protection against hydrogen peroxide-induced neurotoxicity and reduces tau phosphorylation in SH-SY5Y cells [Text] / L. Zhang, P. Bahety, P.L. Ee // *Neurochem Int.* – 2015. – Vol.87. – P.13-21.