

*На правах рукописи*

**ПЛЕХАНОВА ОЛЬГА СЕРГЕЕВНА**

**РОЛЬ УРОКИНАЗНОГО АКТИВАТОРА ПЛАЗМИНОГЕНА В  
РЕМОДЕЛИРОВАНИИ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ**

**03.01.04 – Биохимия**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук**

**Москва – 2017**

Работа выполнена на факультете фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

**Научный консультант:**

Парфенова Елена Викторовна  
доктор медицинских наук, профессор

**Официальные оппоненты:**

Морозов Сергей Георгиевич, член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», зав. лабораторией общей и перинатальной нейроиммунопатологии, врио директора

Соодаева Светлана Келдибековна, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «НИИ пульмонологии» ФМБА России, зав. лабораторией клинической и экспериментальной биофизики

Покровский Вадим Сергеевич, доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский онкологический научный центр имени Н.Н.Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, и/о зав. лабораторией комбинированной терапии опухолей

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение Сибирский федеральный биомедицинский исследовательский центр имени академика Е. Н. Мешалкина Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится « » \_\_\_\_\_ 2017 года в 12.00 на заседании совета Д 208.084.05 при ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России по адресу: 390026, г.Рязань, ул. Высоковольтная, д. 9.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (390026, г. Рязань, ул. Шевченко, 34) и на сайте [www.rzgtmu.ru](http://www.rzgtmu.ru)

Автореферат разослан « » \_\_\_\_\_ 2017 года

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат медицинских наук, доцент

Фомина М.А.

**Актуальность темы** Ремоделирование сосудов представляет собой распространенную или локальную перестройку их структуры или размеров (Плеханова, О.С., Парфенова, Е.В., Ткачук, В.А., 2015), которая 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. Стенозирующий атеросклероз сосудов, определяющий развитие таких заболеваний как ишемическая болезнь сердца (ИБС) и ее последствия и ишемия нижних конечностей, продолжает оставаться основной причиной смертности населения в развитых странах (Mackenbach, J.P. et al., 2016; Moran, A.E. et al., 2012). Современные подходы к лечению вызванной стенозирующим атеросклерозом ишемии тканей направлены на реваскуляризацию с помощью хирургических и малоинвазивных эндоваскулярных методов. Несмотря на существенный прогресс в технике вмешательств, позволивший снизить число осложнений, у части пациентов (до 11%) через несколько месяцев развивается повторный стеноз или рестеноз (Cui, K. et al., 2017; Micari, A. et al., 2017; Stoner, M.C. et al., 2016; Ko, J.K. et al., 2015; Baumann, F, Diehm, N., 2013). По некоторым данным частота рестенозов, например, бедренной артерии остается высокой и достигает 38% (Araújo, P.V. et al., 2015).

В основе развития рестеноза лежат два процесса – интенсивный рост неоинтимы и констриктивное геометрическое ремоделирование поврежденной артерии (Paneni, F. et al., 2017). Задачей современной медицины является воздействие на эти процессы. Важным в отношении подходов к регуляции ремоделирования артерий является выбор специфической терапевтической мишени. Активатор плазминогена урокиназного типа (урокиназа) вызывает особый интерес, так как представляет собой многофункциональную мультидоменную протеазу, имеющую собственный рецептор, которая регулирует фибринолиз и клеточную миграцию и пролиферацию, а также ассоциирована с серьезными патологическими состояниями (канцерогенезом,

рестенозом) (Парфенова, Е.В. и др., 2009). Выяснение механизмов влияния урокиназы на процессы перестройки сосудистой стенки и изучение роли отдельных доменов урокиназы в функциях этого белка могут позволить разработать лекарственные препараты, влияющие на эти процессы.

Ранее были получены данные о повышенной экспрессии урокиназы при атеросклерозе (Finn, A.V. et al., 2010), но не была уточнена ее колокализация с рецептором и ингибитором. В единственном в мире исследовании было установлено, что уровень урокиназы коррелировал с рестенозом (Strauss, B.H. et al., 1999), однако, данных о корреляции уровня урокиназы с возобновлением стенокардии после транслюминальной баллонной ангиопластики не было.

Была известна роль урокиназы в процессах пролиферации и миграции клеток (Blasi, F., Sidenius, N., 2010; Roztocil, E., Nicholl, S.M., Davies, M.G., 2007), а тканевого активатора плазминогена – в обеспечении фибринолиза (Medcalf, R.L., 2015). Механизмы влияния активаторов плазминогена на процессы ремоделирования артерий были неясны, также оставалась неизвестной роль различных доменов урокиназы в осуществлении ее эффектов в сосудистой стенке *in vivo*. Не было изучено влияние активаторов плазминогена на экспрессию генов в стенке артерии после баллонирования. Отсутствовали данные о влиянии урокиназы на фибробласты адвентиции и их фенотипическую трансформацию в миофибробласты, которая играет важную роль в механизмах ремоделирования сосудов (Chaabane, C. et al., 2013). Кроме того, в литературе не было сведений о влиянии урокиназы на образование активных форм кислорода в гладкомышечных клетках сосудов, а также о значении этого процесса для стимуляции деления клеток под действием урокиназы.

Представленные в диссертации данные раскрывают многие ранее неизвестные аспекты и выводят на новый уровень представления о роли урокиназы в ремоделировании кровеносных сосудов. По использованным методическим подходам полученные результаты соответствуют мировому уровню, а по глубине исследования роли активаторов плазминогена в процессах перестройки сосудистой стенки превосходят таковой.

**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.** 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 провоспалительных 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.** 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 повторного возникновения 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 состояла в оценке экспрессии компонентов системы фибринолиза при атеросклерозе в сопоставлении с типом поражения; определении динамики содержания урокиназы в крови пациентов с ишемической болезнью сердца после 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.

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 плуронического 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*. 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 стимуляцию пролиферации клеток. Выявлены сигнальные механизмы, опосредующие эффекты урокиназы на развитие негативного ремоделирования поврежденной артерии. Часть исследований проводилась в культуре гладкомышечных клеток и фибробластов. При выполнении работы были

использованы 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.

**Апробация результатов работы и степень достоверности.** 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).

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

**По теме диссертации опубликовано** 17 статей в российских журналах перечня ВАК Минобрнауки России, 13 статей в зарубежных журналах, 1 глава в сборнике, 1 патент на изобретение, тезисы докладов на научно-практических конференциях и конгрессах. Публикации достаточно полно отражают

результаты научного исследования. Достоверность полученных данных подтверждается публикациями в рецензируемых научных журналах, показателями их цитируемости в системах РИНЦ (445), Web of Science и Scopus (317), индекс Хирша – 11.

Личный вклад О.С. Плехановой заключался 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.

В результате выполнения диссертационной работы были сформулированы следующие **положения, выносимые на защиту:**

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.

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.

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

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

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

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

### **Материалы и методы исследования**

Исследование проводили на материале 19 аутопсий, который был предоставлен лабораторией Молекулярной и клеточной кардиологии РКНПК Минздрава РФ. Часть работы представляла собой исследование с включением 60 пациентов с ИБС. Экспериментальная часть исследования проведена на животном материале и клетках различного происхождения.

Нейтрализующие моноклональные антитела к урокиназе были получены и охарактеризованы, как описано ранее (Кратасюк с соавт., 1989), и предоставлены группой Инженерной иммунологии ИЭК РКНПК Минздрава РФ.

Рекомбинантные формы проурокиназы: 1) форма урокиназы "дикого" типа, uPA 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, SNEHQVPSNCDCLNGGTCVSNKY, случайной последовательностью из 13 аминокислот ITPSLHACRSTLD, неспособная связываться с рецептором урокиназы (uPA/GFD) с Mr 43 kDa и активностью 100000–120000 МЕ/мг. Бактериальные культуры клеток *Escherichia coli*, трансформированные плазмидами были предоставлены лабораторией Генной инженерии ИЭК РКНПК Минздрава РФ. Выделение, очистка и характеристика рекомбинантных белков были проведены по методике, описанной ранее (Степанова, В.В. и др., 1997). В экспериментах использовали коммерческие препараты урокиназы Ukidan

(Industria Farmaceutica) и Saruplasa (Grunental), а также альфа<sub>2</sub>-антиплазмин (Sigma), тканевой активатор плазминогена (Boehringer Ingelheim Pharma KG).

**Характеристика пациентов.** В исследование были включены 60 пациентов (средний возраст 50,5±9,9 лет). Критериями включения было наличие ИБС со стабильной стенокардией, стенозом коронарных артерий более 70%. Не включали пациентов с сахарным диабетом, нестабильной стенокардией, инфарктом миокарда сроком до 1 месяца, с антикоагулянтной терапией, терапией стероидными гормонами, сопутствующими системными заболеваниями, после операций 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 проводилась по методу A.Gruentzig (1978) и считалась успешной, если резидуальный стеноз просвета дилатируемого сегмента составлял менее 50%, и при этом не развивались осложнения. 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 пациенту проводилась повторная коронароангиография. Образцы периферической крови брали за сутки до проведения коронарной ангиопластики, а также на 2 сутки и через 3 и 6 месяцев после процедуры. Активность тканевого активатора плазминогена определяли по методу Ranby с соавторами (1989). Калибровку проводили по стандарту однопочечного тканевого активатора плазминогена (Chromogenix). Содержание антигена урокиназы в плазме крови определяли с помощью иммуноферментного метода, использовали наборы IMUBIND uPA ELISA Kit (American Diagnostica) для выявления как свободных низкомолекулярных и высокомолекулярных формы урокиназы, так и связанной с урокиназным рецептором или с ПАИ-1 и ПАИ-2 урокиназы. Функциональную

активность ПАИ-1 оценивали фотометрически 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).

**Экспериментальные модели.** В исследование вошло около 500 крыс-самцов линии Вистар-Киото и около 250 мышей линий FVB и C57B1 с разными ответами ремоделирования артерий на снижение кровотока в сонной артерии. Все процедуры с животными были одобрены локальным Этическим комитетом.

Баллонирование общей сонной артерии крысы проводили эмболэктомическим баллонным катетером Fogarty 2F (Baxter) (Clowes, A.W. et al., 1983). Изолированное повреждение адвентиции левой общей сонной артерии проводили с помощью лапчатого пинцета (Fine Science Tools Inc., Heidelberg, Germany) как описано ранее (Plekhanova, O. et al., 2006), при этом по данным гистологии наружная эластическая мембрана и медия оставались неповрежденными. Локальное нанесение препаратов проводили в 40% плуроническом геле, 0,5 мл, (Pluronic F-127, BASF) для постепенного высвобождения препаратов (Villa, A.E. et al., 1995). Ремоделирование, вызванное снижением кровотока, изучали на модели, описанной ранее (Korshunov, V., Berk, V.C., 2003). Кровоток измеряли ультразвуковым флоуметром (Transonic System) и показатели анализировали с использованием программы Power Lab System.

**Окраску срезов на коллагеновую ткань** проводили по методу Ван-Гизона, срезы заключали в Канадский бальзам (Sigma). Проводили морфометрию, адвентицию определяли, как ткань, содержащую большое количество коллагена.

**Для морфометрии** срезы сонных артерий (10 мкм) окрашивали 0,1% толуидиновым синим 3–4 мин и помещали в Канадский бальзам (Sigma) (Wong, J. et al., 1997). Морфометрические измерения площадей структур сосудистой стенки на срезах артерий осуществляли с помощью программного обеспечения KS-100 2.0, Kontron Elektronik, и Optimas 6.1., Optimas Corporation.

**Иммуногистохимическую визуализацию** белков проводили стандартно на замороженных и заключенных в парафин срезах артерий крысы, мышцы и человека. 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), моноклональные антитела мыши к тяжелой цепи гладкомышечного миозина (SM-myosin heavy chain (G-4), Santa Cruz Biotechnology), моноклональные антитела мыши к ED-1 (антиген моноцитарных/макрофагальных клеток) (Serotec), моноклональные антитела мыши к смузелину (Chemicon), моноклональные антитела мыши к гладкомышечному h-кальдесмону (Sigma-Aldrich), поликлональные антитела кролика к ПАИ-1 человека (Dionova), козью сыворотку (ICN), контрольные неиммунные моноклональные антитела (IgG) мыши и кролика Vector Laboratories, преадсорбированные к крысиной ткани биотинилированные лошадиные антитела к IgG мыши и биотинилированные козы антитела к IgG кролика (Vector Laboratories). Использовали также антитела к матричной металлопротеиназе (ММП) 2 антитела козы (Research Diagnostics), к ММП 2 антитела мыши (Oncogen Research), к ММП 9 антитела кролика (Research Diagnostics и Santa Cruz Biotechnology), к ингибитору ММП (TIMP 2) антитела мыши (Santa Cruz Biotechnology), к Ki-67 антитела крысы (Dako), к uPA антитела кролика (American Diagnostica), к tPA антитела козы (American Diagnostica), к CD45 антитела мыши (BD PharMingen). Использовали вторичные лошадиные антитела к мышинным антителам, козы антитела к кроличьим антителам и кроличьи антитела к козым антителам (Vector Lab Inc). Антитела на мишенях визуализировали взаимодействием авидин-биотин-пероксидазы хрена (Vector Laboratories) с диаминобензидином тетрагидрохлоридом (Sigma).

Экспрессию антигенов после иммуногистохимии оценивали полуколичественным способом в условных единицах, как описано ранее (Plekhanova, O. et al., 2001). Для оценки пролиферации клеток поврежденных и

неповрежденных сосудов использовали ядерный маркер пролиферирующих клеток (PCNA). Индексы пролиферации рассчитывали по формуле: Индекс = число окрашенных клеток x 100 / общее число клеток. Аналогично рассчитывали долю альфа-актин позитивных клеток. Анализировали солокализацию антигенов на клетках разных типов.

**Экспрессию белков** оценивали с помощью **полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией**. Суммарную РНК выделяли по стандартному методу (в каждой пробе по 3 общие сонные артерии) (Chomczynski, P. et al., 1987). Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически (длина волны 260 нм). Качество РНК исследовали с помощью электрофореза в агарозном геле в денатурирующих условиях, затем РНК детектировали в ультрафиолетовом свете с длиной волны 302 нм. Реакцию обратной транскрипции РНК проводили с помощью набора RT-PCR (Perkin Elmer). Полученные фрагменты кДНК амплифицировали методом полимеразной цепной реакции в Omnigene TM термоциклере по стандартной методике (Ward, M. et al., 1997), используя специфичные олигонуклеотидные праймеры, в том числе к рибосомальному белку L7. Продукты реакции анализировали электрофоретически в агарозном геле. Амплифицированные фрагменты кДНК фотографировали в ультрафиолетовом свете (302 нм) на пленку Polaroid 667. Олигонуклеотидные праймеры конструировали с помощью "Primer Detective" (TMJ Lowe, Clontech Labs) и "Синтол" (Россия).

**Ферментативную активность матричных металлопротеиназ** определяли **методом зимографии** как описано ранее (Menshikov, M.Yu., et al., 2006). Концентрацию белка определяли методом Брэдфорда (Asryants, R.A. et al., 1985). Белки разделяли электрофорезом в полиакриламидном геле по методике Laemli (1970). Гель окрашивали Кумасси. Денситометрию зимограмм проводили с помощью программы Science Image.

**Для оценки изменений в экспрессии генов методом транскрипционных матриц** (микрочипов) экстракцию РНК, мечение проб и гибридизацию проводили по стандартному протоколу (Brooks, M. et al., 2002). Для анализа микрочипов был использован геном крысы Affymetrix U34A,

состоящий из 8799 известных генов и неаннотированных последовательностей (Santa Clara ([www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com))). Окрашивание и сканирование проводили в соответствии с протоколом производителя. Для оценки вариабельности данных между микрочипами использовали программное обеспечение Affymetrix (Microarray Analysis Suite (MAS 5.0)) (Brooks, M. et al., 2002).

Для уменьшения числа ложных обнаружений и количества мишеней для статистического анализа данных микрочипов были рассчитаны индексы для идеального обнаружения экспрессии с использованием программного обеспечения DNA-Chip Analyzer. В результате проведенной фильтрации 4458 генов-мишеней вошли в анализ. Для оценки достоверности различий в экспрессии генов между группами были использованы программа SAM (significance analysis of microarrays) (Welle, S. et al., 2002), параметрический тест ANOVA и Т-тест в модификации Вельша в программе GeneSpring (GeneSpring Software (Silicon Genetics, Redwood City)). Значимыми признавали изменения экспрессии генов, подтвержденные двумя тестами (SAM и Т-тест в модификации Вельша) (Hoffmann, R. et al., 2002). Были использованы статистические алгоритмы Microarray Suite 5.0 и пакет DNA-Chip Analyzer ([www.dchip.org](http://www.dchip.org)). Данные, полученные в Microarray Suite и DNA-Chip Analyzer, анализировали в программе SAM (<http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/>).

Количественную полимеразную цепную реакцию проводили с помощью системы детекции последовательности ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems) (Korshunov, V. et al., 2006). Подготовку и очистку двухцепочечной кДНК проводили с помощью набора Ambion MessageAmp aRNA kit (Applied Biosystems). Праймеры и Master Mix из RT2 Real-Time Gene Expression Assay kits (SuperArray) были получены для 6 генов крысы: бета-актина, супероксид-дисмутазы-2, содержащей марганец (manganese-containing SOD-2), фактора некроза опухолей-альфа (TNF-alpha), TNF-альфа превращающего фермента (TACE), ММП-2, цАМФ фосфодиэстеразы 4В (PDE4B).

**Клеточно-биологическое исследование.** Фибробласты кожи человека культивировали в среде роста DMEM (Gibco), содержащей (100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 10 % фетальной бычьей сыворотки

(ФБС), в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при +37<sup>0</sup>С. В экспериментах использовали клетки 8–9 пассажей. Для изучения **трансформации фибробластов в миофибробласты** клетки культивировали до достижения 70% монослоя, инкубировали 24 ч в среде с заменой 10% ФБС на 0,1% ФБС, затем инкубировали 48 ч с рекомбинантной урокиназой (1 нМ, 5 нМ, 10 нМ, 20 нМ, 50 нМ и 100 нМ). Для экстракции гладкомышечного альфа-актина после стимуляции клетки лизировали, образцы, содержащие равное количество белка (80–100 мкг), разделяли с помощью ДСН-электрофореза в полиакриламидном геле и переносили на нитроцеллюлозную мембрану стандартным методом электроэлюции (Towbin, H. et al., 1979). Содержание альфа-актина оценивали с помощью иммуноблоттинга с антителами к α-актину человека (Sigma). После окраски мембрану сканировали с помощью цифровой видеокамеры (Kodak), интенсивность окрашивания определяли в программе PCBAS 2.08. Культивируемые клетки депривировали в среде, содержащей 0,1% ФБС, 12ч, затем инкубировали 60 мин с uPA, 100 нМ, или 50 нг/мл фактора некроза опухолей-альфа. **Оценку образования активных форм кислорода (АФК)** проводили по флюоресценции гидроэтидина и по хемилюминесценции с люцигенином как описано ранее (Menshikov, M.Yu. et al., 2006). Клетки фотографировали с помощью флюоресцентного микроскопа Olympus BX51 при увеличении 40х (длина волны возбуждения 488 нм и эмиссии 610 нм). Пролиферацию гладкомышечных клеток (ГМК) в культуре оценивали методом иммунофлюоресценции с антителами к ядерному антигену пролиферирующих клеток (PCNA) через 24 часа после стимуляции клеток урокиназой (100 нМ). Пролиферацию клеток в контроле (ФСБ равного объема) принимали за единицу. Содержание НАД(Ф)Н-оксидаз в культивируемых ГМК определяли через 4 часа после стимуляции клеток урокиназой (5–100 нМ) с помощью иммуноблоттинга.

**Статистическая обработка.** Данные исследования представлены как M±m. Достоверными считались различия при p<0,05. Для обработки данных использовали программу Jandel SigmaStat; достоверность отличий оценивали с помощью t-теста и для множественных сравнений One Way ANOVA. Данные пациентов с ИБС обрабатывали с помощью программы SAS PROC PHREG

(Statistical Analysis System Institute Inc.) с использованием стандартных алгоритмов вариационной статистики; для многомерного анализа использовали регрессионный анализ. Использовали также стандартные тесты: результаты обрабатывались с помощью одномерного дисперсионного анализа и критерия F-Фишера (для двухфакторного – с помощью t-критерия Стьюдента). Была использована макропроцедура, позволяющая тестировать множество как клинических, так и биохимических показателей с учетом влияния заведомо значимых (например, возраста), насильственно включаемых в модель. Значимость переменных определяли с помощью критерия хи-квадрат.

### **Результаты исследования и обсуждение**

Ранее было установлено, что урокиназа стимулирует миграцию и пролиферацию сосудистых клеток *in vitro* (Ткачук, В.А. и др., 2013). На трансгенных животных было обнаружено, что отсутствие гена урокиназы ведет к подавлению роста неоинтимы (Carmeliet, P. et al., 1997). Мы исследовали экспрессию урокиназы и ее рецептора при разных патологических состояниях, чтобы подтвердить актуальность исследования ее эффектов в сосудистой стенке и вовлеченность урокиназы в развитие заболеваний у человека.

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

При развитии атеросклеротического поражения происходит увеличение содержания урокиназы и ее рецептора в интиме (**рис. 1**). При двойном иммуногистохимическом окрашивании была выявлена солокализация урокиназы и ее рецептора в основном на макрофагах интимы. Большинство этих клеток экспрессировали урокиназу ( $\approx 60\%$ ). Рецептор урокиназы (uPAR) активно экспрессировали как ГМК ( $\approx 80\%$  от общего числа ГМК), так и макрофаги ( $\approx 65\%$  от общего числа макрофагов) интимы (**рис. 1**). Наблюдалось также увеличение экспрессии ингибитора активаторов плазминогена 1-го типа.

Исследования показали, что баллонная ангиопластика пораженного

атеросклерозом сосуда вызывает активацию системы коагуляции и фибринолиза (Katsaros, K.M. et al., 2008). Рестеноз или повторное сужение просвета артерии в участке повреждения нередко рассматривают форму «ускоренного» атеросклероза, сопровождающегося неблагоприятным ремоделированием сосуда, суживающим его просвет.

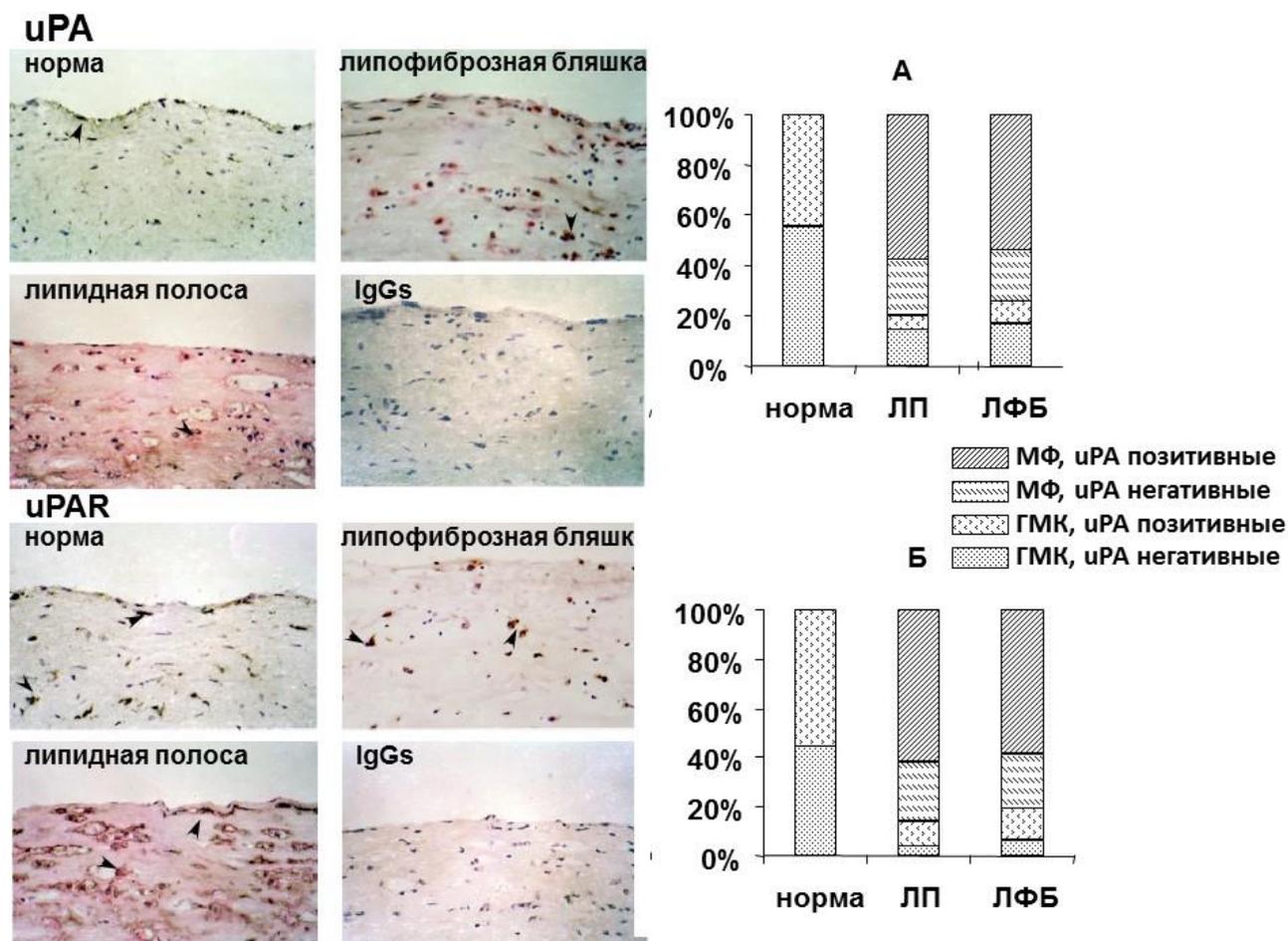


Рисунок 1 – Иммуногистохимическая окраска на антиген урокиназы (uPA) и рецептора урокиназы (uPAR) в непораженной аорте, липидной полосе и липофиброзной бляшке аорты человека. Специфическое окрашивание на урокиназу – темно-коричневый цвет, маркер макрофагов (CD68) – красный. Отрицательный контроль – неиммунные иммуноглобулины G мыши (IgGs). Стрелки указывают на клетки, экспрессирующие uPA и uPAR. Ядра клеток окрашены гематоксилиновым синим, ув. x540. Изменение соотношения клеток, экспрессирующих урокиназу (uPA) (А) и ее рецептор (uPAR) (Б), в нормальной интиме аорты и в разных типах атеросклеротических поражений (% от общего числа клеток). ГМК – гладкомышечные клетки; МФ – макрофаги

В связи с этим мы исследовали частоту рецидива стенокардии и рестеноза в сопоставлении с уровнями компонентов системы фибринолиза

## исходно и в динамике у пациентов с ИБС после транслюминальной коронарной ангиопластики.

Было обнаружено, что содержание урокиназы в крови повышено именно у тех пациентов с подтвержденной ИБС, у которых после баллонной ангиопластики происходит возобновление стенокардии. Активность ПАИ-1 была значительно выше у пациентов с рецидивом стенокардии в сопоставлении с пациентами без такового как исходно, так и через 3 и 6 месяцев после коронарной ангиопластики,  $p < 0,05$ .

Антиген урокиназы был достоверно выше не только исходно, но и после ангиопластики на 2-е сутки, через 3 и 6 месяцев после процедуры ( $p < 0,05$ ) в крови у пациентов с рецидивом стенокардии по сравнению с пациентами без такового,  $p < 0,05$  (рис. 2). Частота рецидива стенокардии после ангиопластики возрастала с увеличением концентрации урокиназы плазмы в квинтилях исходно до процедуры с 4,6 % при концентрации урокиназы менее 0,8 нг/мл до 80% при концентрации урокиназы более 1,2 нг/мл.

В однофакторный и многофакторный анализ с использованием пошаговой пропорциональной модели регрессии Кокса были включены 36 клинических, биохимических и ангиографических показателей.

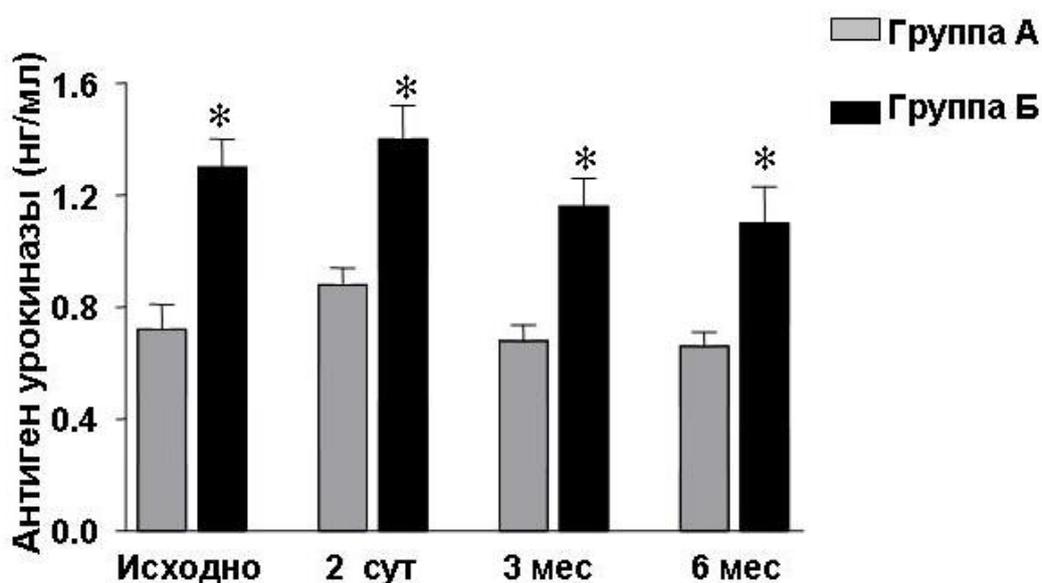


Рисунок 2 – Динамика содержания урокиназы в плазме крови у пациентов с рецидивом стенокардии после коронарной ангиопластики по сравнению с пациентами без рецидива стенокардии, \*  $p < 0,05$

Значимыми предикторами возобновления стенокардии из клинико-биохимических параметров при однофакторном анализе 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 ( $\chi^2 = 9,37$ ;  $p=0,002$ ). При разделении пациентов на группы с рецидивом стенокардии после ангиопластики и без такового 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). При уровне урокиназы крови исходно до ангиопластики более 1,2 нг/мл риск возобновления стенокардии после процедуры возрастает в 6,2 раза (риск возврата стенокардии 80%), а при уровне 1–1,2 нг/мл – 60%.

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 успешной процедуры эндоваскулярного вмешательства.

В литературы представлены данные единственного исследования, где уровень урокиназы в крови у пациентов коррелировал с развитием ангиографического рестеноза после баллонной ангиопластики (Strauss, V.H. et al., 1999). Однако механизмы, определяющие значение урокиназы для роста неоинтимы, негативного ремоделирования и рестеноза артерий оставались неясными.

Для изучения роли урокиназы в этих процессах мы отработали модель баллонирования сонной артерии крысы *in vivo* человеческим баллонным катетером Forgarty2F. На этой модели мы изучили **временную и пространственную динамику экспрессии эндогенной урокиназы и ее рецептора** в сонной артерии животных после повреждения сосуда. Мы обнаружили, что урокиназа и ее рецептор экспрессируются в стенке артерии уже в первые часы после баллонирования. Эта экспрессия обусловлена повышением синтеза белков клетками сосудистой стенки, о чем свидетельствует увеличение мРНК по данным ПЦР (рис. 3).

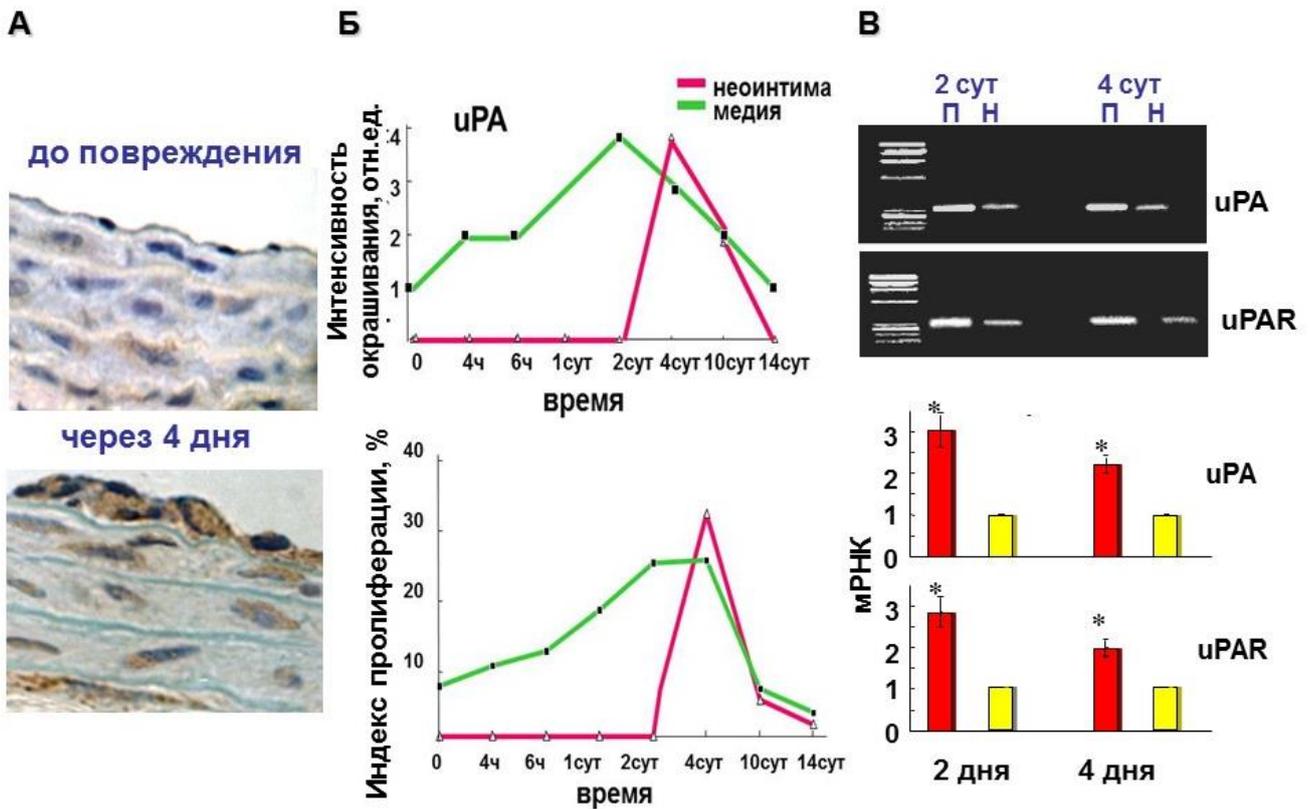


Рисунок 3 – (А) Иммуногистохимическая окраска на антиген урокиназы срезов общей сонной артерии крысы до баллонирования и на 4-е сутки после повреждения. Ядра клеток окрашены гематоксилиновым синим, ув. х450. (Б) Наглядное представление динамики содержания урокиназы в сопоставлении с индексом пролиферации в интима и медиа общей сонной артерии после баллонирования. 0 – неповрежденный сосуд. Оценку выраженности иммуногистохимического окрашивания проводили в условных единицах. В каждой группе было не менее 7 животных. (В) Экспрессия мРНК урокиназы и урокиназного рецептора после баллонирования в неповрежденной (н) и поврежденной (п) сонной артерии на 2 и 4 сутки после баллонирования по данным ПЦР. Суммированы данные 8 экспериментов (нижняя панель) \* $p < 0,05$

При этом наблюдается корреляция между выраженностью экспрессии урокиназы, урокиназного рецептора и миграцией и пролиферацией ГМК сонной артерии крысы после экспериментального баллонирования.

Для оценки значения эндогенной урокиназы и ее уровня мы исследовали влияние локального нанесения рекомбинантной урокиназы и ингибирующих антител к урокиназе на ремоделирование поврежденной артерии. Периадвентициальное нанесение на поврежденный сосуд рекомбинантной урокиназы в плуроническом геле достоверно увеличивало площадь неоинтимы, меди и адвентиции и вызывало уменьшение просвета артерии при сопоставлении с контролем (рис. 4).

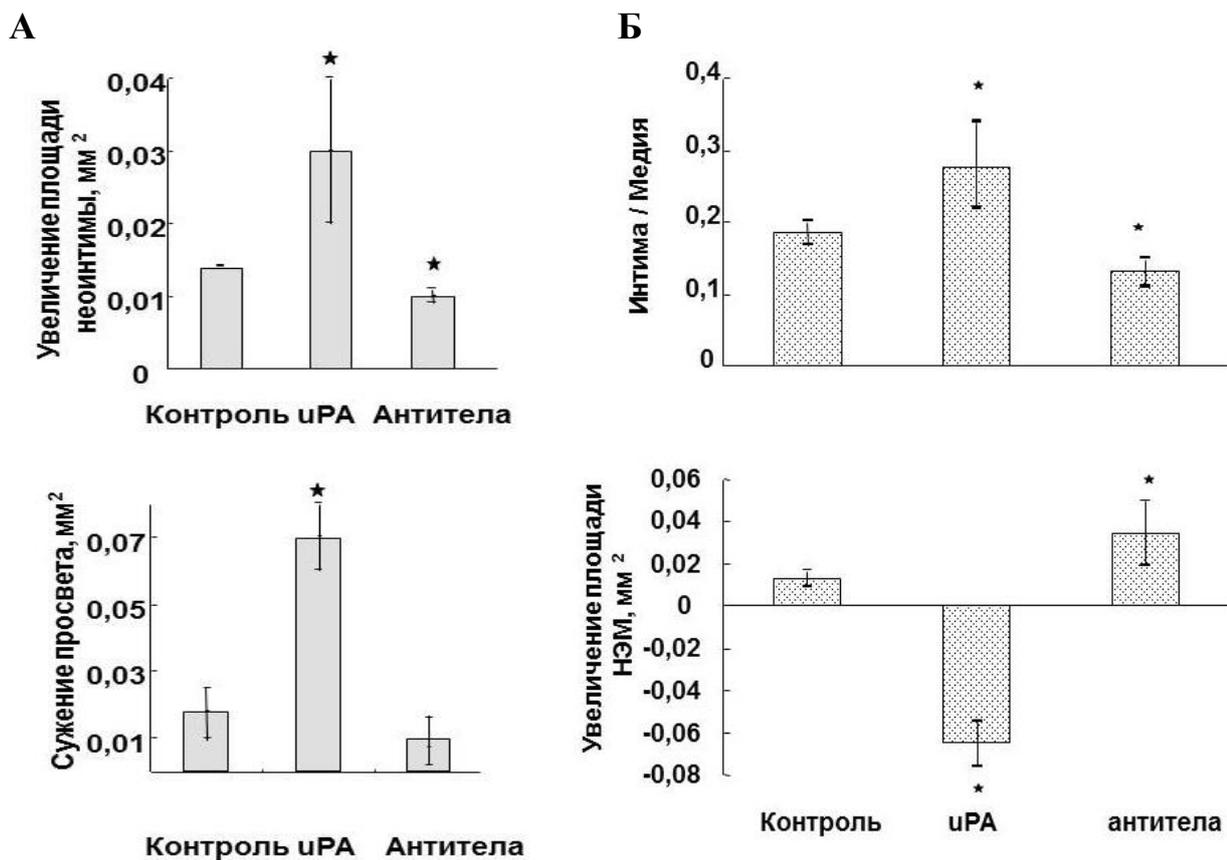


Рисунок 4 – (А) Изменения площади неоинтимы, просвета и (Б) показателей ремоделирования сонной артерии на 4-е сутки после баллонирования и нанесения урокиназы или ингибирующих антител к урокиназе. НЭМ – наружная эластическая мембрана. В каждой группе не менее 6 животных. Контроль – нанесение чистого геля. \* $p < 0,05$  (отличие от контроля)

Уменьшение просвета артерии сопровождалось сокращением площади наружной эластической мембраны (НЭМ), что указывает на ремоделирование стенки сосуда и сужение его просвета не только вследствие роста неоинтимы, но и благодаря уменьшению диаметра артерии. Нанесение экзогенной урокиназы стимулировало также деление клеток в неоинтимае (данные не представлены,  $p < 0,05$ ).

Локальное нанесение ингибирующих антител к урокиназе, напротив, достоверно уменьшало площадь неоинтимы, не влияя существенно на площадь меди и адвентиции (рис. 4). При этом также отмечалось увеличение площади НЭМ (рис. 4), что указывает на положительное ремоделирование стенки сосуда и увеличение его диаметра. 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.

Уменьшение площади формирующейся неоинтимы после введения ингибирующих урокиназу антител свидетельствует о подавлении миграции клеток из меди в интиму и указывает на значение эндогенной урокиназы в регуляции этих процессов.

Так как урокиназа *in vitro* способна стимулировать миграцию и пролиферацию ГМК через механизмы, как связанные, так и не связанные с ее протеолитической активностью (Gorrasi, A. et al., 2014; Blasi, F. et al., 2010), то для оценки относительного значения рецептор-связывающих и протеолитических свойств урокиназы для реализации ее эффектов *in vivo*, мы оценили значение **структурных доменов урокиназы для ранних процессов ремоделирования артерий**. Периадвентициальное нанесение на поврежденный сосуд рекомбинантной урокиназы, имеющей мутацию в рецептор-связывающей области молекулы, вызывало эффекты сходные с теми, которые наблюдались при нанесении полной формы урокиназы (**рис. 5**).

В противоположность двум протеолитически активным формам неактивная протеолитически урокиназа не усиливала рост неоинтимы (**рис. 5**). Эта форма урокиназы не увеличивала также и площадь меди и адвентиции, не оказывала влияния на соотношение интима/медия и площадь НЭМ и, что особенно важно, не вызывала уменьшения просвета артерии (**рис. 5**) в отличие от контроля, где после баллонирования и нанесения чистого геля просвет артерии достоверно суживался уже на 4-е сутки после баллонирования.

В противоположность эффектам активных протеолитически форм урокиназы нанесение на поврежденную артерию формы урокиназы без протеолитической активности, не меняло число клеток в неоинтимае, меди и адвентиции по сравнению с контролем.

Полученные данные указывают на то, что протеолитическая активность урокиназы в поврежденном сосуде *in vivo* определяет основной механизм ее стимулирующего влияния на образование неоинтимы и констриктивное ремоделирование.

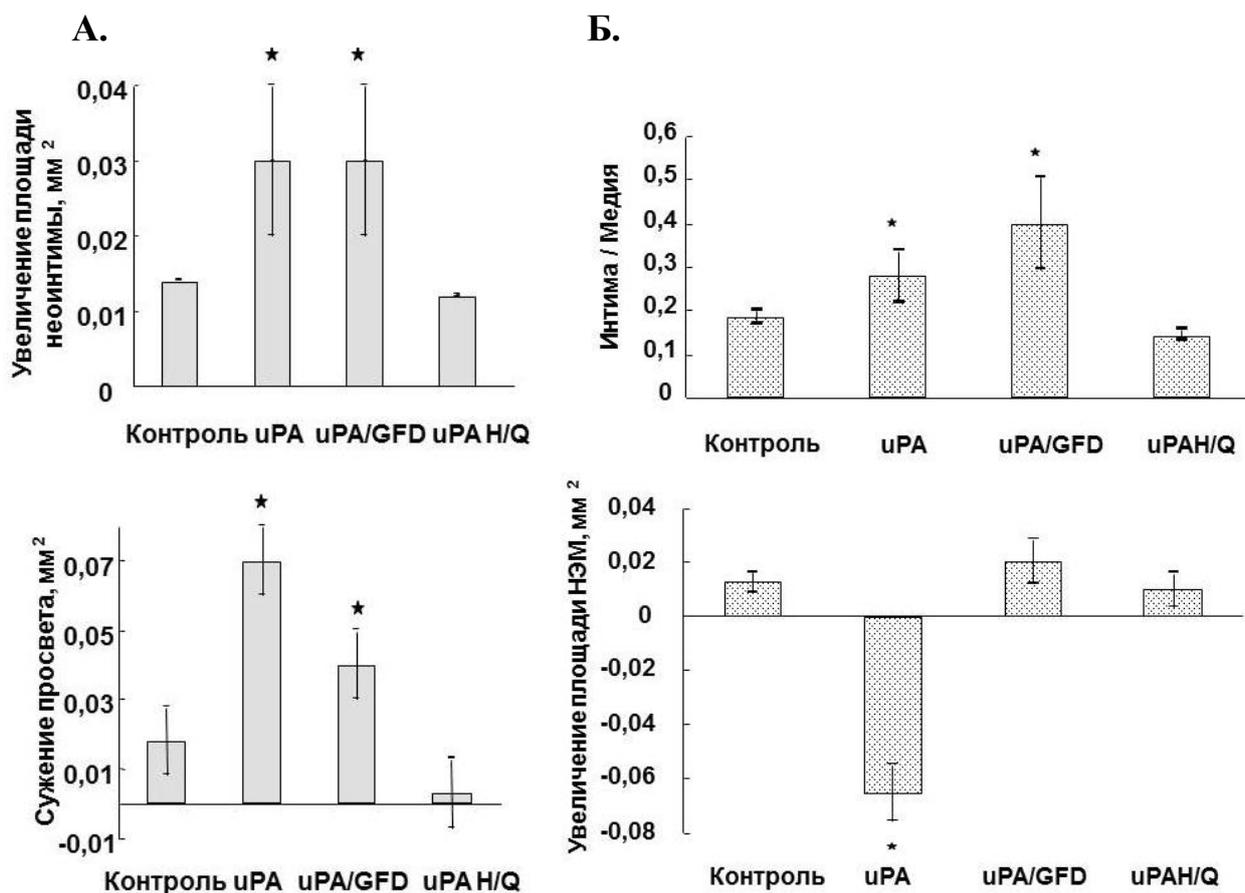


Рисунок 5 – (А) Изменения площади неоинтимы, просвета и (Б) показателей ремоделирования сонной артерии на 4-е сутки после баллонирования и нанесения рекомбинантных форм урокиназы (uPA – нативной урокиназы; uPA/GFD – формы урокиназы с измененным ростовым доменом; uPA H/Q – протеолитически неактивной формы урокиназы). НЭМ – наружная эластическая мембрана. Контроль – нанесение чистого геля. В каждой группе не менее 6 животных. \* $p < 0,05$  (отличие от контроля)

В связи с выявленным значением протеолитической активности для процессов перестройки стенки артерии после повреждения мы сопоставили **эффекты урокиназы и тканевого активатора плазминогена** в поврежденном сосуде и обнаружили их противоположное влияние не только на образование неоинтимы, но и на ремоделирование артерии (**рис. 6**).

Нанесение урокиназы на 4-е сутки после повреждения стимулировало рост неоинтимы и меди. Возрастание толщины интимы и меди сопровождалось уменьшением площади просвета артерии и площади внутри НЭМ – основного показателя ремоделирования. Все это свидетельствовало о развитии констриктивного ремоделирования артерии.

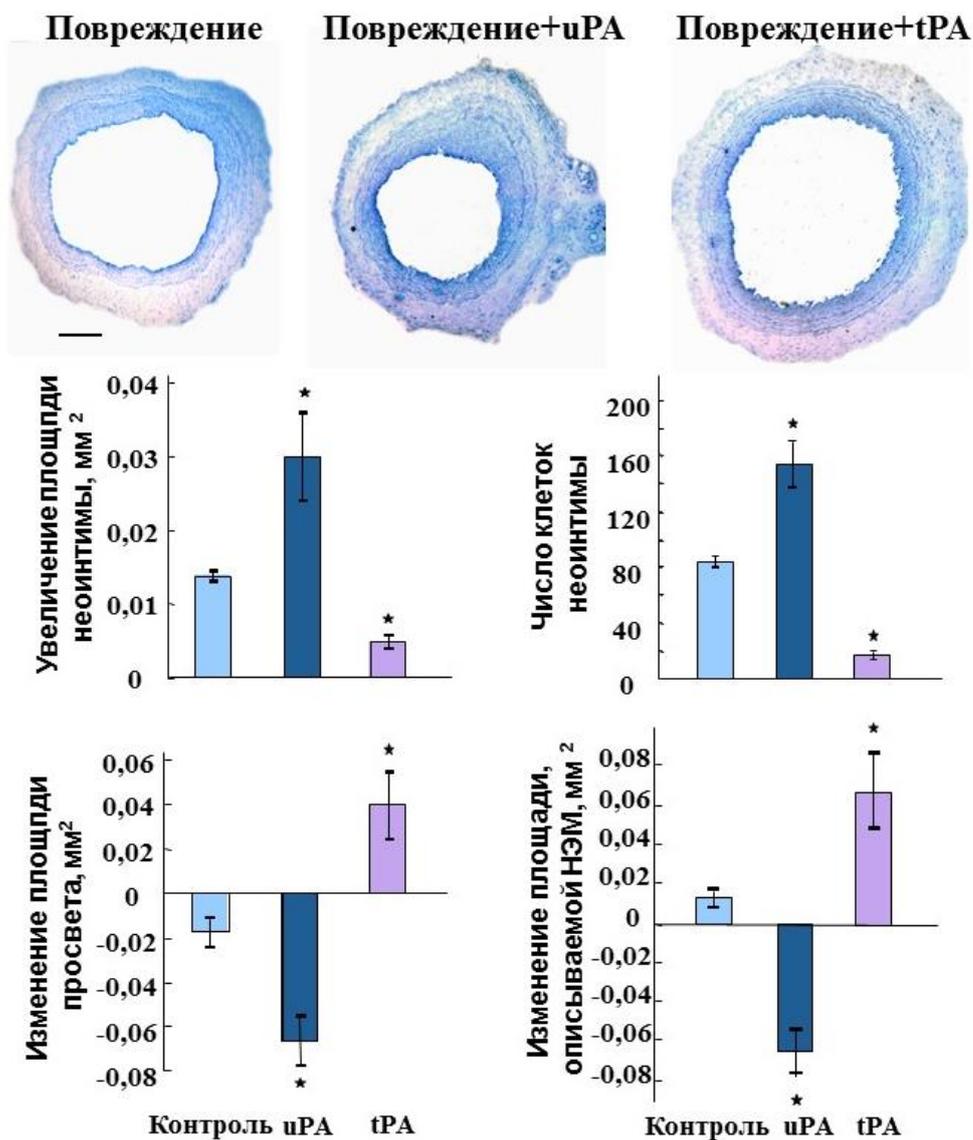


Рисунок 6 – Влияние урокиназного (uPA) и тканевого (tPA) активаторов плазминогена на перестройку стенки сонной артерии на 4-е сутки после баллонирования. Срезы сонной артерии после нанесения uPA или tPA; окраска толуидиновым синим, ув. х 75 Масштабная линейка 100  $\mu$ m. (НЭМ – наружная эластическая мембрана. Контроль – нанесение чистого геля. \* $p < 0,05$  (отличие от контроля); суммированы данные минимум 6 экспериментов)

Нанесение на артерию тканевого активатора плазминогена вызывало другой эффект: размер неоинтимы и отношение площади интимы к площади медики были меньше в сопоставлении с контролем, что свидетельствовало о подавлении формирования неоинтимы (рис. 6). Площадь внутри НЭМ увеличивалась, отражая развитие положительного ремоделирования под влиянием тканевого активатора плазминогена.

Оказалось, что стимуляция роста неоинтимы и констриктивного ремоделирования при нанесении на сосуд урокиназы сохраняется длительное время (до 28 суток), что, вероятно, обусловлено запуском механизмов, поддерживающих эти процессы. Эффекты тканевого активатора плазминогена на расширение просвета и диаметра артерии нивелировались к 14 суткам.

Таким образом, способность стимулировать констриктивное ремоделирование оказалась уникальным свойством урокиназы.

Ранее было показано, что структурная перестройка сосудистой стенки может быть обусловлена генетически (Fox, C.S. et al., 2003; Lange, L.A. et al., 2002). Для уточнения **взаимосвязи ремоделирования артерий с экспрессией урокиназы и тканевого активатора плазминогена**, а также ММП на другой модели *in vivo* мы оценили экспрессию этих белков в сосудах мышечных инбредных линий, характеризующихся генетически предопределенными разными типами ремоделирования при снижении кровотока (Korshunov, V. et al., 2003).

На этой модели после неполной перевязки ветвей левой сонной артерии и снижении кровотока у мышечной линии FVB возрастал объем интимы левой сонной артерии, и в ответ на увеличение слоев сосудистой стенки просвет сосуда компенсаторно увеличивался, а у животных линии C57Bl объем интимы оставался неизменным, а просвет артерии значительно уменьшался (Korshunov, V. et al., 2003). Один из основных показателей ремоделирования – объем области, описываемой НЭМ, у животных FVB достоверно увеличивался, тогда, как в группе C57 он увеличивался значительно меньше по сравнению с контролем.

При этом максимум расширения диаметра артерии совпадал во времени с максимальной экспрессией тканевого активатора плазминогена, что свидетельствует о его возможном участии в регуляции положительного ремоделирования артерий. В то же время максимум экспрессии урокиназы в стенке артерии после снижения кровотока совпадал с пиком пролиферации клеток интимы и меди и максимальным накоплением клеток воспалительного типа в стенке артерии, что указывает на возможное участие урокиназы в стимуляции этих процессов. Развитие ремоделирования обоих типов

сопровождалось схожим повышением экспрессии матриксных металлопротеиназ и их ингибитора.

В связи с доказанной важной ролью миофибробластов адвентиции в процессах констриктивного ремоделирования сосудов (Coen M., Gabbiani G., Vochaton-Piallat M.L., 2011), мы исследовали влияние урокиназы на **трансдифференцировку фибробластов в миофибробласты**.

На модели изолированного повреждения адвентиции мы показали, что в ней значительно возрастала экспрессия эндогенной урокиназы: количество клеток, экспрессирующих урокиназу, возрастало до  $47,4 \pm 3,2\%$  после повреждения ( $p < 0,05$ ) по сравнению с неповрежденной артерией ( $1,4 \pm 0,5\%$ ) (**рис. 7**). 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 реализации пролиферативного ответа фибробластов необходима их трансдифференцировка в миофибробласты (Wang, Y.L. et al., 2012). Мы выявили, что после повреждения в адвентиции одновременно возрастает доля  $\alpha$ -актин позитивных клеток, что может указывать на трансформацию фибробластов в миофибробласты. Для определения фенотипа клеток адвентиции мы использовали антитела к гладкомышечному  $\alpha$ -актину, к тяжелой цепи гладкомышечного миозина (SM-MHC), к высокомолекулярному h-кальдесмону, смузелину и к моноцитарно-макрофагальному маркеру ED-1.

Экспрессия гладкомышечного  $\alpha$ -актина в адвентиции значительно возрастала через 4 суток после повреждения по сравнению с неповрежденной адвентицией ( $p < 0,05$ , **рис. 7**).

Адвентициальные клетки не экспрессировали ни h-кальдесмон, ни смузелин до и после повреждения. Доля ED-1 позитивных клеток достоверно возрастала на 4-е сутки после повреждения по сравнению с неповрежденной артерией. Около  $10 \pm 3,7\%$   $\alpha$ -актин позитивных клеток были также ED-1 позитивными (**рис. 7**, отмечены стрелками).

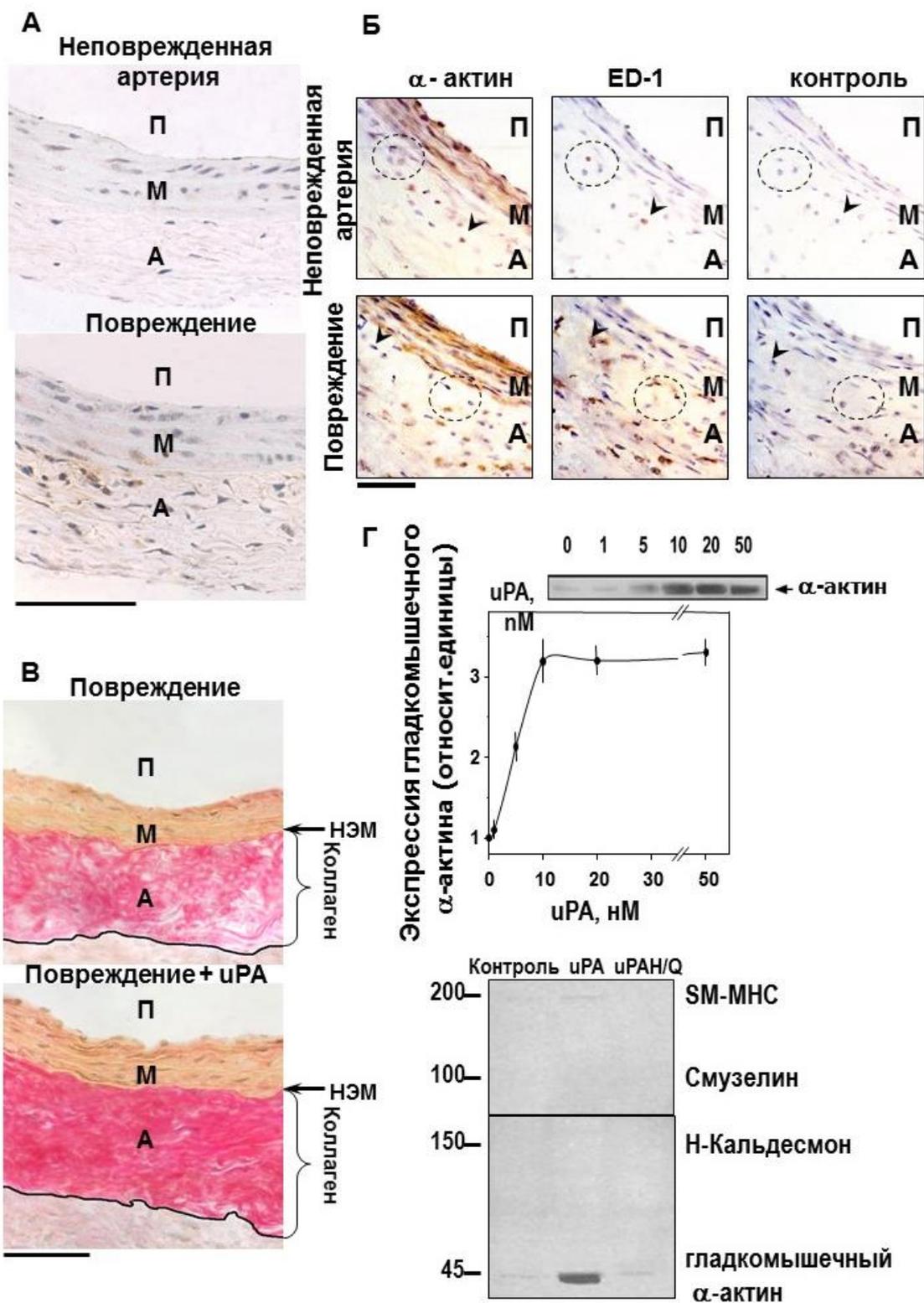


Рисунок 7 – (А) Иммунолокализация урокиназы (uPA): в неповрежденной сонной артерии окрашивание на uPA отсутствует; на 4-е сутки после повреждения – выраженное окрашивание. Ядра клеток окрашены гематоксилином. П – просвет, М – медиа, А – адвентиция. Масштабная линейка 30  $\mu$ m. (В) Микрофотографии срезов артерий после нанесения uPA (нижняя панель) на адвентицию сонной артерии на 4-е сутки после повреждения. Верхняя панель - контроль. Срезы окрашены по Ван-Гизону. НЭМ – наружная эластическая мембрана. Масштабная линейка 30  $\mu$ m). (Б) Экспрессия

гладкомышечного альфа-актина и макрофагального антигена ED-1 на серийных срезах (Неповрежденная артерия – верхняя панель; 4 сутки после повреждения – нижняя панель. Контроль – неиммунные IgG мыши. Стрелки и кружки указывают на разное окрашивание миофибробластов и лейкоцитов. Масштабная линейка 50  $\mu$ m). (Г) Концентрационно-зависимое влияние урокиназы (uPA) (1–50 nM) на содержание гладкомышечного альфа-актина в культивируемых фибробластах кожи человека (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). Нижняя панель – 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))

При исследовании **роли протеолитической активности урокиназы на модели изолированного повреждения адвентиции** мы обнаружили, что нанесение нативной формы урокиназы приводило к достоверному увеличению доли  $\alpha$ -актин позитивных клеток и доли воспалительных клеток ( $p < 0,05$ ), тогда как неактивная урокиназа подобного эффекта не оказывала ( $p > 0,05$ ), а антитела, нейтрализующие урокиназу, их уменьшали ( $p < 0,05$ ). Нативная урокиназа увеличивала общее число клеток адвентиции почти вдвое по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ), тогда как неактивная uPA H/Q подобного эффекта не оказывала ( $p > 0,05$ ). Нейтрализующие урокиназу антитела достоверно уменьшали число клеток адвентиции ( $p < 0,05$ ). Нанесение на адвентицию нативной урокиназы приводило к увеличению индекса пролиферации адвентиции до  $51,3 \pm 6,1\%$  ( $p < 0,01$  по сравнению с  $16,6 \pm 3,2\%$  в контрольной группе).

Таким образом, результаты демонстрируют участие урокиназы в трансдифференцировке фибробластов в миофибробласты и в усилении пролиферативного ответа адвентиции на повреждение. Это участие *in vivo* осуществляется преимущественно благодаря специфической протеолитической активности урокиназы.

Для того чтобы подтвердить способность урокиназы стимулировать трансдифференцировку фибробластов в миофибробласты мы исследовали

влияние рекомбинантной урокиназы с нативной структурой на **фенотипическую модуляцию фибробластов в миофибробласты *in vitro***. На **рисунке 7** видно, что после стимуляции урокиназой содержание маркера клеток сократительного фенотипа  $\alpha$ -актина в клетках возрастало с увеличением концентрации урокиназы от 1 нМ до 50 нМ, что свидетельствует об увеличении доли клеток сократительного фенотипа в культуре. Напротив, протеолитически неактивная урокиназа uPA(H/Q) таких изменений не вызывала.

Полученные данные свидетельствуют о способности урокиназы стимулировать трансформацию фибробластов в миофибробласты *in vitro* и *in vivo*, а также увеличивать пролиферацию клеток в поврежденной адвентиции и ее площадь, что может вести к констриктивному ремоделированию артерии.

Наблюдаемый эффект мог быть связан регуляцией экспрессии генов в клетках сосудистой стенки под действием урокиназы, в связи с чем мы исследовали **влияние урокиназы на экспрессию генов в поврежденной сосудистой стенке с помощью метода транскрипционных матриц (микрочипов)**. Для анализа был использован геном крысы Affymetrix U34A, 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 воспалительной реакции, том числе интерлейкин 18 (интерферон гамма, индуцирующий фактор), фермент, конвертирующий фактор некроза опухолей (TACE), фермент, конвертирующий интерлейкин-1, белок естественной резистентности макрофагов (Nramp 2), ММП-2. Экспрессия этих генов была достоверно повышена по сравнению с контролем.

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.

Урокиназа в отличие от тканевого активатора плазминогена вызывала также достоверные изменения экспрессии группы генов, участвующих в развитии оксидативного стресса. Оксидативный стресс, возникающий в ответ на повреждение сосудистой стенки, играет важную роль в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний и способствует неблагоприятному ремоделированию сосудов (Raaz, U. et al., 2014; Парфенова, Е.В. и др., 2009). 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 ключевым в регуляции ремоделирования артерий.

Важно, что тканевой активатор плазминогена оказывал влияние на экспрессию группы генов, вовлеченных в регуляцию сосудистого тонуса, а также группы генов, регулирующих функционирование нервной ткани.

**Урокиназа и воспаление в поврежденной сосудистой стенке.** В связи с полученными данными об аккумуляции воспалительных клеток в поврежденной сосудистой стенке под действием урокиназы и обнаруженным изменением экспрессии генов, участвующих в развитии воспаления, мы исследовали влияние урокиназы на содержание фактора некроза опухоли альфа (TNF-alpha), одного из основных про-воспалительных факторов, секретирующихся моноцитами/макрофагами и фермента, осуществляющего его превращение в активную форму (TACE – TNF-alpha converting enzyme).

Мы показали, что урокиназа увеличивает экспрессию в стенке сосуда и TNF-alpha, и TACE по сравнению с контролем, в то время как нанесение тканевого активатора плазминогена подобного влияния не оказывало (**рис. 8**).

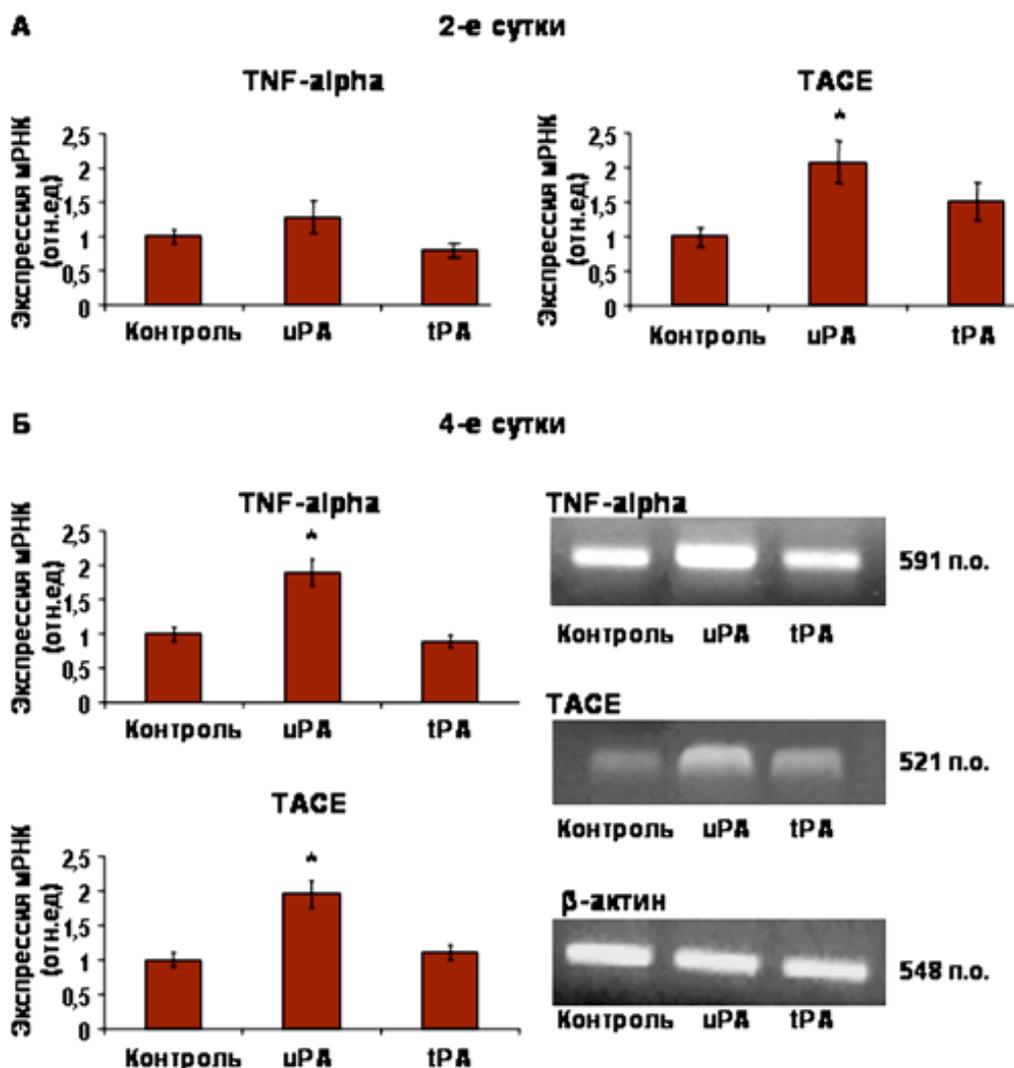


Рисунок 8 – Экспрессия фактора некроза опухолей альфа (TNF-alpha) и фермента, осуществляющего его превращение в активную форму (TACE – TNF-alpha converting enzyme) по данным ПЦР с обратной транскрипцией в стенке сонной артерии крысы на 2-е (А) и 4-е сутки (Б) после баллонирования и нанесения в плуроническом геле рекомбинантных урокиназного (uPA) и тканевого (tPA) активаторов плазминогена (Контроль – нанесение чистого геля. \* $p < 0,05$  по сравнению с контролем. В каждой группе 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.

**Урокиназа и экспрессия матриксных металлопротеиназ в поврежденной сосудистой стенке.** Во многих работах показано участие

матриксных металлопротеиназ в процессах перестройки сосудистой стенки (Cui, N., 2017; Margolin, L. et al., 2002). Для понимания механизмов различного влияния активаторов плазминогена на сосудистое ремоделирование, мы исследовали их влияние на экспрессию и активацию ММП-2 и ММП-9.

Периадвентициальное нанесение рекомбинантной урокиназы в плуроническом геле на поврежденную артерию достоверно увеличивало содержание и активность ММП-2 и ММП-9 на 2-е и 4-е сутки после баллонирования по данным иммуногистохимии и зимографии. Нанесение тканевого активатора плазминогена не вызывало возрастания содержания и активности ММП (рис. 9).

Было обнаружено, что и на 2-е и 4-е сутки количество мРНК ММП-2 в сосудах, на которые наносили урокиназу, было увеличено, а в сосудах, на которые наносили tPA, отмечалось уменьшение мРНК ММП-2 по сравнению с контрольными сосудами (рис. 9). Было обнаружено также увеличение мРНК ММП-9 в сосудах при нанесении урокиназы.

Таким образом, мы показали, что урокиназный и тканевой активаторы плазминогена оказывают разное влияние на активацию и экспрессию ММП-2 и ММП-9 после повреждения сосуда. Эти данные позволяют предполагать, что оба активатора плазминогена либо прямо, либо опосредовано влияют на экспрессию ММП-2. Причем это влияние разнонаправленное.

**Новый АФК-зависимый механизм стимуляции урокиназой деления клеток сосудистой стенки.** В связи с тем, что мы получили данные об изменении экспрессии генов-возможных участников оксидативного стресса под действием урокиназы при ее локальном нанесении на сосуд, нашей задачей стало исследование роли образования активных форм кислорода для эффектов урокиназы на ремоделирование сосудистой стенки после баллонирования.

Мы оценили эффекты урокиназы на развитие неоинтимы на фоне системного введения антиоксиданта пирролидин-дитиокарбомата (PTDC), который вводился интраперитонеально по 200 мг/кг 1 раз в сутки за 24 часа до операции и в течение 7 дней после операции.

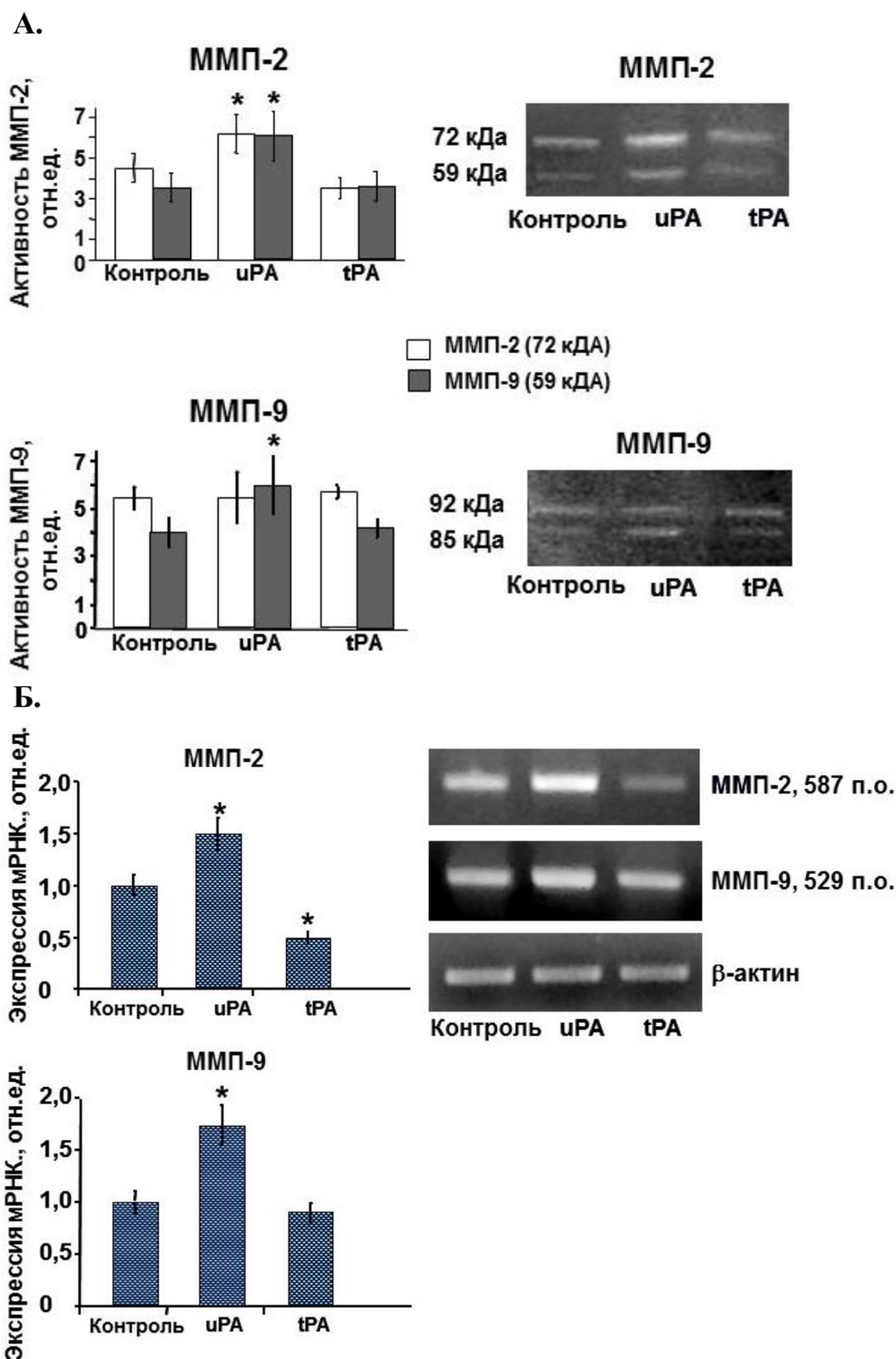


Рисунок 9 – Влияние активаторов плазминогена на активность и экспрессию ММП-2 и ММП-9 в поврежденных сонных артериях на четвертые сутки после экспериментального баллонирования. Справа даны примеры зимограмм. Видно, что урокиназа значительно увеличивала активность ММП-2 и в меньшей степени ММП-9. \* $p < 0,05$  по сравнению с контролем, в каждой группе минимум 6 животных

После локального нанесения урокиназы и системного введения антиоксиданта площадь неоинтимы была достоверно меньше, чем после локального введения урокиназы. При этом число клеток неоинтимы и общая толщина интимы и меди были достоверно меньше при введении антиоксиданта (данные не представлены). Таким образом, системное введение антиоксиданта существенно подавляло эффекты урокиназы на процессы ремоделирования и рост неоинтимы в поврежденной стенке артерии.

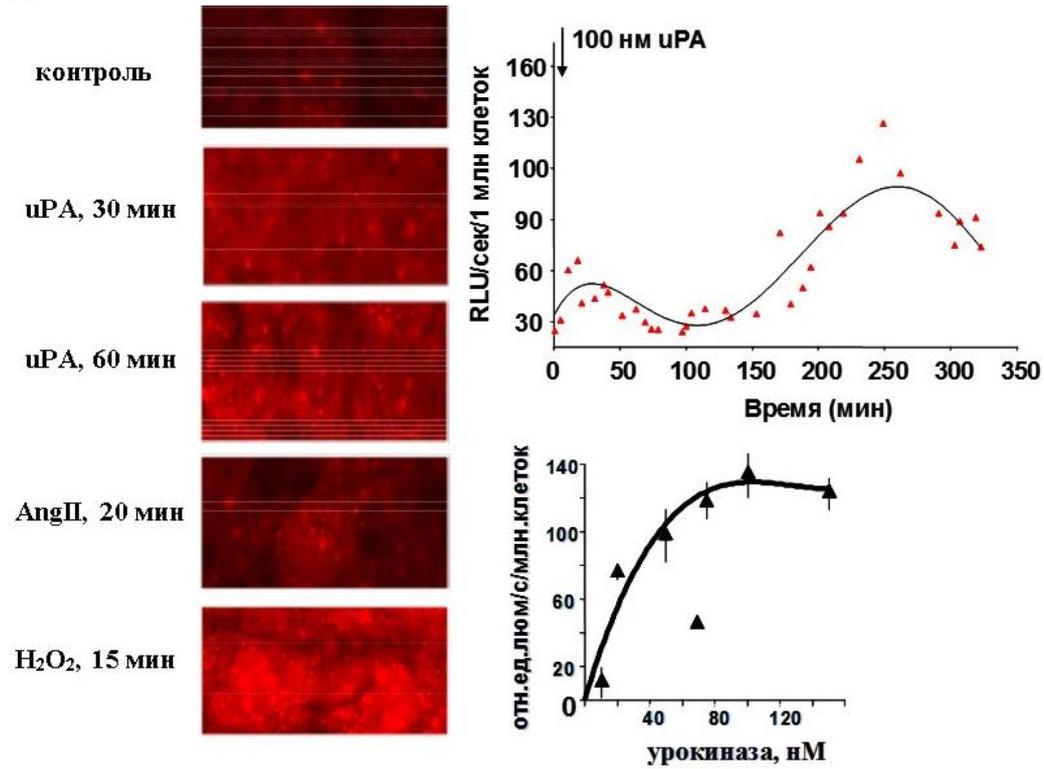
Было изучено влияние урокиназы на образование АФК в культивируемых ГМК. Урокиназа (5–200 нМ) стимулировала образование супероксидного радикала в ГМК, причем максимальная стимуляция по флуоресценции гидроэтидина и хемилюминесценции люцигенина отмечалась после инкубации с урокиназой (75–100 нМ) в течение первых 4-х часов. Этот эффект урокиназы был концентрационно-зависимым (**рис. 10**).

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 АФК стимулирует деление клеток. Мы исследовали влияние урокиназы на деление ГМК в культуре, в том числе при добавлении антиоксиданта (эбселена). Стимуляция урокиназой приводила к увеличению индекса пролиферации ГМК более чем вдвое (**рис. 10**).

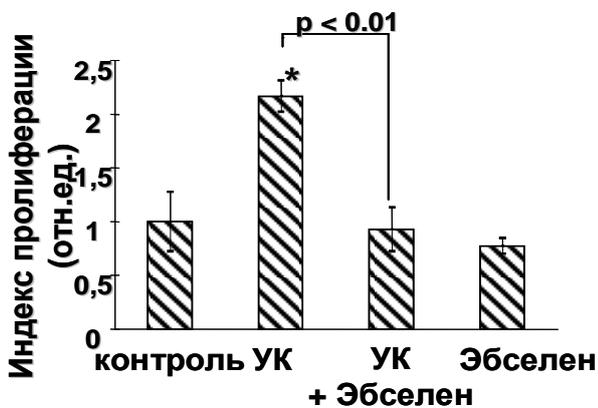
Мы обнаружили, что антиоксидант эбселен достоверно подавлял мощную индукцию пролиферации ГМК, возникающую под влиянием урокиназы (**рис.10**), что свидетельствует о существовании редокс-зависимого механизма регуляции урокиназой деления клеток.

Образование супероксид-радикала в пораженных атеросклерозом и поврежденных артериях происходит преимущественно за счет НАД(Ф)Н-оксидаз *nox1* и *nox4* (Niu, X.L. et al., 2010; Szöcs, K. et al., 2002). Мы оценили влияние урокиназы на экспрессию НАД(Ф)Н-оксидаз в культивируемых ГМК. Урокиназа достоверно стимулировала экспрессию *nox1* и *nox4* (**рис. 10**), причем их содержание возрастало с увеличением концентрации урокиназы.

А.



Б.



В.

Экспрессия Nox1 и Nox4

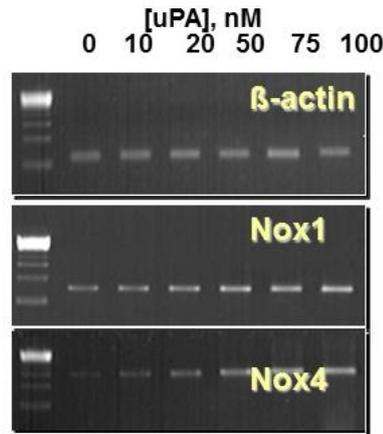


Рисунок 10 – (А) Урокиназа (5–200 нМ) стимулировала образование активных форм кислорода в культивируемых ГМК аорты, причем максимальная стимуляция образования супероксидного радикала по флуоресценции гидроэтидина отмечалась после инкубации с урокиназой 100 нМ. Типичные микрофотографии для 4 экспериментов. Контроль – фосфатно-солевой буфер равного объема. После добавления урокиназы (100 нМ) к ГМК аорты максимальное образование супероксид-радикала по хемилюминесценции люцигенина детектировалось через 4 часа. Усредненные данные 4 экспериментов. (Б) Подавление стимулированной урокиназой (100нМ, 24 часа) пролиферации ГМК антиоксидантом эбселеном (40 μМ) по данным метода иммунофлуоресценции с антителами к PCNA (В) Содержание НАДФ-оксидаз pox1, pox4 в ГМК аорты возрастало после инкубации с урокиназой в течение 4-х часов (20–100 нМ). Содержание оксидаз оценивали относительно содержания β-актина в тех же гомогенатах.

Максимальное увеличение экспрессии оксидаз наблюдалось при концентрации урокиназы 75 нМ и выше.

Полученные данные свидетельствуют о том, что урокиназа усиливает образование АФК, стимулируя экспрессию НАД(Ф)Н-оксидаз в сосудистых ГМК, и за счет этого способствует их пролиферации.

Таким образом, обнаружен новый механизм действия урокиназы в сосудистой стенке: усиление образования супероксидного радикала благодаря стимуляции экспрессии НАД(Ф)Н-оксидаз, который может усиливать оксидативный стресс, возникающий в ответ на повреждение. Этот новый ред-окс зависимый механизм стимуляции пролиферации клеток может оказаться ключевым для эффектов урокиназы при ремоделировании сосудистой стенки.

### **Заключение**

Повышенное содержание урокиназы в крови пациентов с ИБС коррелирует с высоким риском возобновления стенокардии после транслюминальной баллонной ангиопластики. Экспрессия урокиназы и ее рецептора повышена в сосудах, пораженных атеросклерозом, и в стенке артерий при ремоделировании после механического повреждения и снижения кровотока, что указывает на то, что урокиназа – обязательный участник перестройки сосудистой стенки.

С помощью рекомбинантных конструкций, позволяющих синтезировать разные формы урокиназы, было установлено, что после баллонирования в поврежденной артерии урокиназа стимулирует образование неоинтимы *in vivo* преимущественно благодаря своей протеолитической активности.

Способность стимулировать формирование неоинтимы является специфическим свойством урокиназы. Два активатора плазминогена оказывают противоположное влияние на структуру артерии на ранних сроках после повреждения: урокиназа способствует росту неоинтимы и негативному ремоделированию, а тканевой активатор плазминогена препятствует формированию неоинтимы и индуцирует положительное компенсаторное ремоделирование. У животных с генетически predetermined типом ремоделирования артерий перестройка сосудистой стенки соотносится во

времени с разной экспрессией активаторов плазминогена, которая также, скорее всего, является генетически детерминированной. Экспрессия урокиназы совпадает с пролиферацией кеток и аккумуляцией лейкоцитов, а экспрессия тканевого активатора плазминогена совпадает с максимальным увеличением диаметра артерии.

Урокиназа, но не тканевой активатор плазминогена, индуцирует фенотипическую трансформацию фибробластов в миофибробласты *in vivo* и в культуре клеток.

На ранних сроках после экспериментального баллонного повреждения урокиназа усиливала экспрессию ММП-2 и образование активных форм ММП-2 и ММП-9 в поврежденной сосудистой стенке *in vivo*. Напротив, тканевой активатор плазминогена вызывал подавление экспрессии ММП-2.

Под действием урокиназы происходило изменение экспрессии генов воспалительного каскада, при этом тканевой активатор плазминогена подобных изменений не вызывал. Урокиназа повышала экспрессию в стенке баллонированной артерии одного из основных факторов воспаления – фактора некроза опухоли альфа и фермента, осуществляющего его превращение в активную форму.

Урокиназа способна регулировать экспрессию генов, участвующих в развитии оксидативного стресса в поврежденной артерии.

В гладкомышечных клетках сосудов урокиназа индуцирует образование активных форм кислорода, благодаря повышению экспрессии НАД(Ф)Н оксидаз *nox1* и *nox4* и, таким образом стимулирует деление ГМК. Эти результаты раскрывают новый механизм стимуляции урокиназой деления ГМК, который является важнейшим для роста неоинтимы. Урокиназа также стимулирует экспрессию ММП-9 через образование АФК в культивируемых фибробластах, что может иметь значение для стимуляции миграции фибробластов.

Таким образом, наша работа убедительно показала, что урокиназа является многофункциональным белком, ключевым регулятором процессов перестройки сосудистой стенки. Действие урокиназы обусловлено ее стимулирующим

влиянием на миграцию и деление клеток, фенотипическую модуляцию фибробластов, аккумуляцию моноцитов/макрофагов и образование АФК в стенке сосуда, а также активацию протеолитических каскадов и экспрессию белков, участвующих в развитии воспаления и оксидативного стресса в сосудистой стенке (рис. 11). Все эти процессы ведут к констриктивному ремоделированию артерий, что делает урокиназу перспективной мишенью для воздействий, направленных на профилактику рестенозов и предотвращение неблагоприятной структурной перестройки кровеносных сосудов.

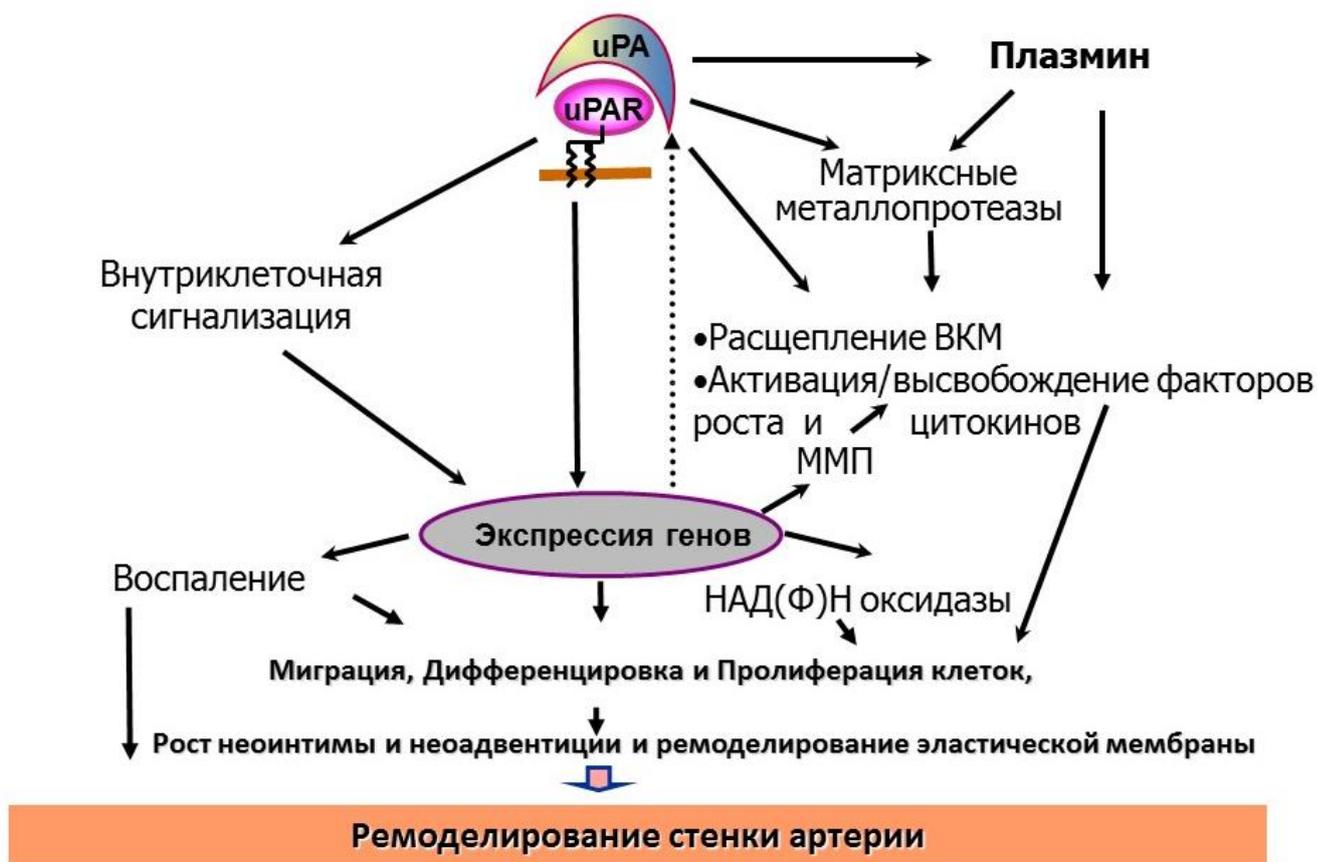


Рисунок 11 – Механизмы регуляции роста и ремоделирования артерий под действием урокиназы (uPA – урокиназа; uPAR – рецептор урокиназы uPAR/CD87; ВКМ – внеклеточный матрикс; ММП – матриксные металлопротеиназы)

### Перспективы исследований и дальнейшая разработка темы

Механизмы сигнализации и транскрипционные факторы, вовлеченные в регуляцию урокиназой экспрессии генов в сосудистой стенке, требуют дальнейшего изучения. Исследование механизмов действия тканевого активатора плазминогена, ведущих к расширению просвета артерии, является

перспективным с точки зрения изучения процессов 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.

### **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 неоадвентиции, 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 подавляет развитие 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 провоспалительных 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 основных работ, опубликованных по теме диссертации:**

1. Урокиназа стимулирует пролиферацию и увеличивает число клеток сократительного фенотипа в поврежденной адвентиции [Текст] / **О.С. Плеханова** [и др.] // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.** - 2000. - Т.129, № 5. - С. 511-514. - (Соавт.: Н.И. Калинина, Е.А. Волынская, Е.В. Парфенова).
2. Урокиназный активатор пламиногена стимулирует развитие экспериментального рестеноза [Текст] / Е.В. Парфенова [и др.] // **Кардиология.** - 2000. - №9. - С. 69-77. - (Соавт.: **О.С. Плеханова**, Н.И. Калинина, Р.Ш. Бибилашвили, А. Бобик, В.А. Ткачук).
3. 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. - (Соавт.: Н.И. Калинина, Е.А. Волынская, Е.В. Парфенова).
4. 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. - (Co-auth.: Ye. Parfyonova, R. Bibilashvily, V. Stepanova, A. Bobik, V. Tkachuk).

5. Урокиназа стимулирует, а тканевой активатор плазминогена подавляет развитие стеноза кровеносных сосудов [Текст] / **О.С. Плеханова** [и др.] // **Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.** - 2001. - Т.87, №5. - С. 584-593. - (Соавт.: М.А. Соломатина, С.П. Домогатский, В.Г. Наумов, В.А. Ткачук, Е.В. Парфенова, Е.И. Чазов).

6. 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.- (Co-auth.: Ye. Parfyonova, R. Bibilashvily, S. Domogatskii, V. Stepanova, D.C. Gulba, A. Agrotis, A. Bobik, V. Tkachuk).

7. 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.

8. Урокиназный активатор плазминогена: механизмы участия в ремоделировании сосудов и ангиогенезе, генно-терапевтические подходы к лечению ишемии [Текст] / Е.В. Парфенова [и др.] // **Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.** - 2004. - Т.90, № 5. - С. 547-568. - (Соавт.: **О.С. Плеханова**, В.В. Степанова, М.Ю. Меньшиков, З.И. Цоколаева, К.А. Талицкий, Т.М. Рахмат-заде, Д.О. Трактуев, Н.А. Торосян, Н.И. Рогунова, Е.И. Ратнер, В.А. Ткачук).

9. 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. - (Соавт.: **О.С. Плеханова**, О.П. Ильинская, Н.И. Калинина, Е.В. Михайлова, З.И. Цоколаева, Э.М. Тарарак, В.Г. Наумов, Е.В. Парфенова).

10. 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. - (Co-auth.: **O. Plekhanova**, M. Solomatina, V. Naumov, A. Bobik, B. Berk, V. Tkachuk).

11. Strain-dependent expression of proteolytic molecules during vascular remodeling in the mice [Text] / V. Korshunov [et al.] // **Journal of Vascular Research**. - 2004. - Vol. 41, №6. - P. 481-489. - (Co-auth.: M. Solomatina, **O. Plekhanova**, Ye. Parfyonova, V. Tkachuk, B. Berk).

12. Урокиназа увеличивает содержание и активность матриксной 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. - (Соавт. **О.С. Плеханова**, М.Ю. Меньшиков, Е.И. Ратнер, В.А. Ткачук, Е.В. Парфенова).

13. Активаторы плазминогена и матриксные металлопротеиназы в экспериментальном ремоделировании артерий [Текст] / **О.С. Плеханова** [и др.] // **Кардиология**. - 2006. – Т.46, №9. - С. 47-56. - (Соавт.: М.А. Соломатина, М.Ю. Меньшиков, П.П. Баштрыков, В.А. Коршунов, Б.С. Берк, В.А. Ткачук, Е.В. Парфенова).

14. 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. - (Соавт.: М.Ю. Меньшиков, П.П. Баштрыков, Б. Берк, В.А. Ткачук, Е.В. Парфенова).

15. Urokinase plasminogen activator in injured adventitia increases the number of myofibroblasts and augments early proliferation [Text] / **O. Plekhanova** [et al.] // **Journal of Vascular Research**. - 2006. - Vol. 43, №5. - P. 437-446. - (Co-auth.: V. Stepanova, E. Ratner, A. Bobik, V. Tkachuk, Ye. Parfyonova).

16. Urokinase plasminogen activator stimulates vascular smooth muscle cell proliferation via redox-dependent pathways [Text] / M. Menshikov [et al.] // **Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology**. - 2006. - Vol. 26. - P. 801-807.-

(Co-auth.: **O. Plekhanova**, H. Cai, K. Chalupsky, Y. Parfyonova, P. Bashtrikov, V. Tkachuk, V.C. Berk).

17. 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. - (Соавт.: М.А. Соломатина, Е.И. Ратнер, В.А. Ткачук, Е.В. Парфенова).

18. 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. - (Соавт.: **О.С. Плеханова**, М.Ю. Меньшиков, В.В. Степанова, В.А. Ткачук).

19. Oligonucleotide microarrays reveal regulated genes related to inward arterial remodeling induced by urokinase plasminogen activator [Text] / **O. Plekhanova** [et al.] // **Journal of Vascular Research**. - 2009. - Vol. 46, № 3. - P. 177-187. - (Co-auth.: V.C. Berk, P. Bashtrykov, A. Brooks, V. Tkachuk, Ye. Parfyonova).

20. Regulation of blood vessel remodeling by urokinase-type plasminogen activator [Text] / V.A. Tkachuk [et al.] // **Canadian journal of physiology and pharmacology**. - 2009. - Vol. 87, № 4. - P. 231-251. - (Co-auth.: **O.S. Plekhanova**, Ye.V. Parfyonova).

21. Перспективы создания противоопухолевых лекарственных средств, направленных на систему активатора плазминогена урокиназного типа [Текст] / И.Б. Белоглазова [и др.] // **Технологии живых систем**. - 2013. - № 1. - С. 3-19. - (Соавт.: Ж.А. Акопян, М.Н. Карагяур, **О.С. Плеханова**, Е.В. Семина, Д.В. Стамбольский).

22. Протеолитически неактивные рекомбинантные формы урокиназы подавляют миграцию эндотелиальных клеток [Текст] / И.Б. Белоглазова [и др.] // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**. - 2013. - Т.156, №12. - С. 715-720. - (Соавт.: Е.С. Зубкова, Д.В. Стамбольский, **О.С.**

**Плеханова, М.Ю.** Меньшиков, Р.Ш. Бибилашвили, Е.В. Парфенова, В.А. Ткачук).

23. Role of multidomain structure of urokinase in regulation of growth and remodeling of vessels [Text] / V.A. Tkachuk [et al.] // **Ukr. Biochem. J.** - 2013. – Vol. 85, №6. - P. 18-45. - (Соавт.: **O.S. Plekhanova**, I.B. Beloglazova, Ye.V. Parfyonova).

24. 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. - (Соавт.: М.Ю. Меньшиков, **О.С. Плеханова**, И.Б. Белоглазова, Е.И. Ратнер, В.А. Ткачук, Е.В. Парфенова).

25. Application of molecular modeling to urokinase inhibitors development [Electronic resource] / V.B. Sulimov [et al.] // **Biomed Res Int.** - 2014. - P. 1-15.- (Co-auth.: E.V. Katkova, I.V. Oferkin, A.V. Sulimov, A.N. Romanov, A.I. Roschin, I.B. Beloglazova, **O.S. Plekhanova**, V.A. Tkachuk, V.A. Sadovnichiy).URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/625176>

26. 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. - (Co-auth.: I. Alekseeva, **O. Plekhanova**, A. Deev, E. Titaeva, A. Dobrovolsky, Z. Gabbasov, A. Lyakishev, V. Tkachuk).

27. Механизмы ремоделирования сосудов после повреждения артерий [Текст] / **О.С. Плеханова** [и др.] // **Кардиология.** - 2015. - № 7. - С. 63-77. - (Соавт.: Е.В. Парфенова, В.А. Ткачук).

28. Молекулярное моделирование – новый подход к разработке ингибиторов урокиназы [Текст] / И.Б. Белоглазова [и др.] // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.** - 2015. – Т.158, №5. - С. 700-704. - (Соавт.: **О.С. Плеханова**, Е.В. Каткова, Д.В. Стамбольский, В.Б. Сулимов, В.А. Ткачук).

29. Non-viral transfer of BDNF and uPA stimulates peripheral nerve regeneration [Text] / M. Karagyaur [et al.] // **Biomed Pharmacother.** - 2015. - Vol. 74. - P. 63-

70.- (Co-auth.: D. Dyikanov, P. Makarevich, E. Semina, D. Stambolsky, **O. Plekhanova**, N. Kalinina, V. Tkachuk).

30. Urokinase and urokinase receptor participate in regulation of neuronal migration, axon growth and branching [Text] / E. Semina [et al.] // **Eur J Cell Biol.** - 2016. - Vol. 95, №9. - P. 295-310.- (Co-auth.: K. Rubina, V. Sysoeva, K. Rysenkova, P. Klimovich, **O. Plekhanova**, V. Tkachuk).

### **Главы в книгах и сборниках**

Перспективы создания новых препаратов на основе генетических конструкций и рекомбинантных форм урокиназы для воздействия на ангиогенез и ремоделирование сосудов [Текст] / В. А. Ткачук [и др.] // Сердечно-сосудистая патология. Современное состояние проблемы: сборник трудов / под ред. Е.И. Чазова. - М.: Медиа-Медика, 2009. – С.357-364. – (Соавт.: Р.Ш. Бибилашвили, **О. С. Плеханова**, Е. В. Парфенова).

### **Патент**

Патент 2528249 Рос. Федерация, МКИ C12N 15/00 (2006.01). Способ подавления ангиогенеза с помощью рекомбинантных форм урокиназы / Ж.А. Акопян [и др.]; патентообладатель: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова" (МГУ) (RU). - № 2012150078/10; заявл. 23.11.2012; опубл. 10.09.2014, Бюл. 25.- 27 с. - (Соавт.: И.Б. Белоглазова , Н.И. Калинина, **О.С. Плеханова**, Д.В. Стамбольский, Е.В. Тарасова, В.А. Ткачук).

## Список сокращений и условных обозначений

АФК	–	активные формы кислорода
ВКМ	–	внеклеточный матрикс
ГМК	–	гладкомышечные клетки
ДНК	–	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИБС	–	ишемическая болезнь сердца
ММП	–	матриксные металлопротеиназы
мРНК	–	матричная РНК
НАД(Ф)Н	–	никотинамидадениндинуклеотидфосфат
НЭМ	–	наружная эластическая мембрана
ПАИ-1	–	ингибитор активатора плазминогена 1 типа
РНК	–	рибонуклеиновая кислота
Урокиназа	–	активатор плазминогена урокиназного типа
C57B1	–	мышь линии C57B1/6J
CD45	–	лейкоцитарный маркер
ED-1	–	клеточный маркер моноцитов / макрофагов
FVB	–	линейные мыши FVB/NJ
GFD	–	домен, подобный эпидермальному фактору роста
Ki-67	–	маркер пролиферации клеток
PCNA	–	маркер пролиферации клеток
TACE	–	конвертирующий фермент фактора некроза опухолей
TNF-alpha	–	фактор некроза опухолей альфа
tPA	–	тканевой активатор плазминогена
uPA H/Q	–	рекомбинантная форма урокиназы с заменой гистидина на глутамин в активном центре, каталитически неактивная
uPA	–	активатор плазминогена урокиназного типа (урокиназа)
uPA/GFD	–	рекомбинантная форма урокиназы с модифицированным ростовым доменом, не связывающаяся с урокиназным рецептором
uPA	–	нативная рекомбинантная форма урокиназы дикого типа
uPAR	–	рецептор урокиназы

Подписано в печать 27.06.2017 г. Формат 60x84/16.  
Бумага писчая. Гарнитура Times. Печать офсетная.  
Усл. печ. л. 2,0. Заказ № 21. Тираж 100 экз.

Отпечатано в отделе оперативной печати Геологического факультета  
Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования  
«Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»  
119234, г. Москва, Ленинские горы, д.1