

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. Ломоносова
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Адашева Дарья Алексеевна

Роль протеазы RAPP-A в сердечной ткани в норме и при гипертрофии

1.5.4. – Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
кандидат биологических наук
Серебряная Дарья Владимировна

Москва — 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	10
Актуальность работы	10
Цели и задачи работы.....	13
Основные положения, выносимые на защиту	13
Научная новизна и практическая значимость работы	14
Методология диссертационного исследования.....	15
Степень достоверности полученных результатов.....	15
Апробация результатов работы.....	16
Публикации	16
Личный вклад автора.....	17
Структура и объём работы.....	17
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	18
1. Мышечная ткань сердца: структура, основные типы клеток и функция в организме человека.....	18
1.1 Эндотелиальные клетки	19
1.2. Кардиомиоциты.....	20
1.3. Фибробласты	22
2. Основные ССЗ и патологические изменения в миокарде и сосудах.....	23
2.1. Патологическая гипертрофия сердечной мышцы и механизм её возникновения под действием эндотелина-1 и норадреналина	23
3. Различные подходы к исследованию патологической гипертрофии.....	24
3.1 In vitro модели для индукции патологической гипертрофии в миокарде.....	29
3.2 In vivo моделирование гипертрофического ответа в сердечной ткани... ..	32
4. IGF-система и её роль в сердечной ткани в норме	38

4.1 Инсулиноподобные факторы роста.....	41
4.2 IGF-I и IGF-II в сердечной ткани.....	43
4.3 IGF – связывающие белки.....	44
4.3.1 IGFBP-1.....	46
4.3.2 IGFBP-2.....	47
4.3.3 IGFBP-3.....	49
4.3.4 IGFBP-4.....	51
4.3.5. IGFBP-5.....	52
4.3.6. IGFBP-6.....	54
4.4. Специфические протеазы, расщепляющие IGF-связывающие белки. Регуляция биодоступности IGF за счет активности IGF-связывающих белков и различных протеаз	55
4.4.1 Протеаза PAPP-A.....	57
4.4.2 Рецепторы IGF-системы.....	59
5. Роль IGF-сигнального пути в развитии патологических процессов в миокарде.....	61
5.1 Физиологическая и патологическая гипертрофия	61
5.2 Атеросклероз.....	68
5.3 IGF-система и метаболический синдром	70
5.4 Компоненты IGF-сигнального пути как биомаркёры ССЗ и их диагностическое значение.....	71
5.4.1. IGF-I и IGFBP-3	71
5.4.2. IGF-II.....	72
5.4.3. PAPP-A	72
5.4.3. IGFBP-4.....	72
5.4.4. IGFBP-5.....	73
6. Кардиопротекторная роль IGF в сердечной ткани.....	73
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	77
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	90
1. Роль PAPP-A в сердечной ткани в норме.....	90

1.1. Разработка модельных систем для изучения роли PAPP-A в сердечной ткани.....	90
1.1.1 Характеристика клеточных культур кардиомиоцитов методом фазового контрастирования	90
1.1.2 Характеристика клеточных культур кардиомиоцитов методом иммуноцитохимического окрашивания	95
1.1.3 Характеристика культуры кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК, методом проточной цитофлуориметрии	99
1.1.4 Измерение концентрации PAPP-A в кондиционированной среде полученных культур кардиомиоцитов	101
1.2 Характеристика протекания специфичного протеолиза IGFBP-4 под действием PAPP-A в норме.....	103
1.2.1 Протеолитическое расщепление и накопление фрагментов IGFBP-4 в кондиционированной среде культур кардиомиоцитов.....	103
1.2.2 Влияние IGF-II на протекание PAPP-A-зависимого протеолиза IGFBP-4 в культурах кардиомиоцитов	108
1.2.3 Ингибирование PAPP-A специфичного протеолиза IGFBP-4 с использованием фенантролина-1,10 и ЭДТА.....	110
1.2.4 Исследование локализации протекания PAPP-A специфичного протеолиза IGFBP-4	112
2. Роль PAPP-A в сердечной ткани при гипертрофии	117
2.1. Моделирование гипертрофического ответа в клеточных культурах кардиомиоцитов <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	117
2.1.1 Эндотелин-1-индуцированная гипертрофия кардиомиоцитов	117
2.1.1.1. Первичная культура кардиомиоцитов, полученная из неонатальных крыс.....	118
2.1.1.2. Культура кардиомиоцитов человека, дифференцированная из ИПСК.....	120
2.1.2 Норадреналин-индуцированная гипертрофия кардиомиоцитов	122
2.1.2.1 Культура кардиомиоцитов человека, дифференцированная из ИПСК.....	122

2.1.3 Исследование жизнеспособности культур кардиомиоцитов с помощью AlamarBlue после индукции гипертрофии <i>in vitro</i> под действием эндотелина-1 и норадреналина.....	124
2.1.4 Монокроталин-индуцированная модель гипертрофии миокарда в первичной культуре кардиомиоцитов, полученной из взрослых крыс	126
2.2 Измерение концентрации натрийуретического пептида В (BNP) в полученных культурах.....	131
2.3 Измерение концентрации PAPP-A в кондиционированной среде культуры кардиомиоцитов	134
2.4 Изучение специфического протеолиза IGFBP-4 под действием PAPP-A при гипертрофии	135
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	138
1. Моделирование функционирования сердечной ткани, основные возможности и ограничения используемых моделей	138
2. Особенности протекания протеолиза IGFBP-4, ассоциированного со специфической активностью PAPP-A в культурах кардиомиоцитов в норме	143
3. Особенности моделирования гипертрофии в модельных системах <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	147
4. При гипертрофии кардиомиоцитов происходит повышение уровня протеолиза IGFBP-4, ассоциированного со специфической активностью PAPP-A	151
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	156
ВЫВОДЫ	159
БЛАГОДАРНОСТИ	160
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	161

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

4EBP1 (eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1) – белок-1, связывающий эукариотический фактор инициации трансляции 4E

БДМ – 2,3-бутандионмоноксим

ИБС – ишемическая болезнь сердца

ИЗО – изопротеренол

ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

ЛЖ – левый желудочек сердца

МР – метод Рокмана

ОКС – острый коронарный синдром

ПА – пирролизидиновый алкалоид

ПЖ – правый желудочек сердца

ПСА – поперечное сужение аорты

РНК – рибонуклеиновая кислота

СН – сердечная недостаточность

ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания

ФИА – флуороиммунный анализ

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

ФСБТ – фосфатно-солевой буфер, содержащий Tween-20

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭПО – эритропоэтин

ЭТС/ FBS (fetal bovine serum) – эмбриональная телячья сыворотка

ADAMTS1 (A Disintegrin And Metalloproteinase with ThromboSpondin motifs 1) – дезинтегрин и металлопротеиназа с тромбоспондиновыми мотивами 1

Akt1/2 (RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, protein kinase B alpha) – серин-треониновая протеинкиназа B alpha/beta

ALS (acid-labile subunit) – кислотнo-лабильная субъединица

АМФ/ AMP (adenosine monophosphate) – аденозинмонофосфат

АМРК (AMP-activated protein kinase) – АМР-зависимая протеинкиназа

Ang II (angiotensin II) – ангиотензин II

ANOVA (analysis of variance) – дисперсионный анализ

ANP и BNP (natriuretic peptide A and B) – натрийуретические пептиды А и В

APJ – рецептор апелина

BAD (BCL2 associated Death Promoter) – связанный с BCL2 агонист белка клеточной гибели

BCL2 (B-cell lymphoma-2 apoptosis regulator) – регулятор апоптоза В-клеточной лимфомы-2

BMP4 (bone morphogenetic protein 4) – костный морфогенетический белок 4

cAMP – циклическая форма АМФ

c-Myc (cellular myelocytomatosis proto-oncogene) – клеточный протоонкогенный белок Мус

ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания

cGMP (cyclic guanosine monophosphate) – циклический гуанозинмонофосфат

cTnI/T (cardiac troponin I/T) – сердечные изоформы тропонина I и тропонина T

DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол

DLC (double-loop-clip) – петля двойного зажима

DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) – модифицированная по способу Дульбекко среда Игла

DOCA (desoxycorticosterone acetate) – дезоксикортикостерона ацетат

ECE (endothelin converting enzyme) – эндотелин-конвертирующий фермент

ECM (extracellular matrix) – внеклеточный матрикс

EDN1 – ген, кодирующий ET-1

eNOS (endothelial nitric oxide synthase) – эндотелиальная синтаза оксида азота

ErbB2 – рецептор эпидермального фактора роста 2

ERK (extracellular-signal regulated kinase) – внеклеточная сигнал-регулируемая киназа

ET-1, ET_A, ET_{B1}, ET_{B2} и ET_C (endothelin-1) – эндотелин-1/A/B1/B2/C

FOXO 1/3 (Forkhead box O factors) – транскрипционные факторы 1/3 FoxO семейства Forkhead box

GAG (glycosaminoglycan) – глюкозаминогликан

GFAP (glial fibrillary acidic protein) – глиальный фибриллярный кислый белок

GPCR (G-protein coupled receptors) – рецепторы, ассоциированные с G-белками

Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2) – белок 2 связанный с рецептором фактора роста

GSK-3 β (glycogen synthase kinase - 3 beta) – киназа гликогенсинтазы 3 β

HBD (heparin binding domain) – гепарин-связывающий домен

IGF I и II (insulin-like growth factor) – инсулиноподобный фактор роста

IGF-1R / IGF-2R – рецептор IGF-I / рецептор IGF-II

IGFBP 1-6 (insulin-like growth factor binding protein 1-6) – белок, связывающий IGF 1-6

InsP3R – инозитолтрифосфатный рецептор

IP₃ – инозитол-3-фосфат,

IR– рецептор инсулина,

IR/IGF-1R – гибридный рецептор инсулина/IGF-I

IRS – субстрат инсулинового рецептора

KHB (Krebs-Henseleit buffer) – буфер Кребса-Гензелейта

KLF4 (Kruppel Like Factor 4) – факторы типа Круппеля

LANFIA (lanthanide fluorescence immunoassay) – иммунофлуоресцентная детекция на основе лантаноидов

M6P/IGF-2R – рецептор маннозо-6-фосфата/IGF-II

MKT/MCT (monocrotaline) – монокроталин

MAPKs (mitogen-activated protein kinases) – митоген-активируемые протеинкиназы

MMP-3/7/9/12 (matrix metalloproteinase – 3/7/9/12) - матриксная металлопротеаза 3/7/9/12

mTOR (mechanistic target of rapamycin) – серин-треониновая протеинкиназа

NLS (nuclear localization signal) – последовательность ядерной локализации

NO – оксида азота I

NRG-1 – нейрегулин-1

NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 – N- и C- концевые фрагменты IGFBP-4

Oct4 (Octamer-4) – октамер-4, транскрипционный фактор

PAPP-A (pregnancy-associated plasma protein A) – ассоциированный с беременностью белок плазмы А

PAPP-A2 (pregnancy-associated plasma protein A2) – ассоциированный с беременностью белок плазмы А2

PDK (pyruvate dehydrogenase kinase) – киназа пируватдегидрогеназы 1,

PI3K (phosphoinositide-3 kinase) – фосфоинозитид-3 киназа,

PIP₂ (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) – фосфотидилиназитол-2-фосфат,

PIP₃ (phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate) – фосфотидилиназитол-3-фосфат,

PKA (protein kinase A) – протеинкиназа А

PKC (protein kinase C) – протеинкиназа С

PKD (protein kinase D) – протеинкиназа D

PLC (phospholipase C) – фосфолипаза C,

pro-ET-1 – предшественник ET-1

PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) – фосфатаза с двойной субстратной специфичностью,

RGD (Arg-Gly-Asp – integrin recognition motif) – интегрин-связывающий домен

S6K (ribosomal protein S6 kinase beta-1) – рибосомальная протеинкиназа S6 бета-1,

SCR 1-5 (short consensus repeats 1-5s) – короткие консенсусные повторы 1-5

SOX2 (Sex determining region-Y Transcription factor 2) – транскрипционный фактор 2, определяющий пол в области Y хромосомы

STC-2 (stanniocalcin 2) – станниокальцин-2

TGF- β 1 (transforming growth factor-beta) – трансформирующий ростовой фактор бета

Tm (tropomyosin) – тропомиозин

vCM1-vCM5 (ventricular cardiomyocytes 1-5) – группы желудочковых популяций кардиомиоцитов 1-5

VEGF (vascular endothelial growth factor) – фактор роста эндотелия сосудов

α -МНС (myosin heavy chain, alpha isoform) – α -изоформа тяжелой цепи миозина

β -МНС (myosin heavy chain, beta isoform) – β -изоформа тяжелой цепи миозина

β 1-AR (beta1 - adrenoceptor) – β 1- адренорецептор

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Неотъемлемыми условиями существования многоклеточных организмов является правильное функционирование и координация работы всех органов и систем между собой. Взаимодействие между различными клетками, тканями и органами внутри организма осуществляется, в частности, благодаря клеточной сигнализации, обеспечивающей передачу сигналов, в результате чего происходит формирование различных клеточных реакций в ответ на внешние стимулы. Зачастую передача сигнала между клетками и тканями опосредована молекулами-лигандами, которые транспортируются по внутренней среде организма (кровь, лимфа, тканевые жидкости). Лиганды связываются с белками-рецепторами на мембранах клеток, что запускает цепь дальнейших внутриклеточных перестроек. В каждой ткани функционируют как тканеспецифичные пути клеточной сигнализации, так и присутствующие у всех органов и систем. Одной из важнейших систем организма человека, находящейся под контролем различных путей клеточного сигналинга, является сердечно-сосудистая система. На сегодняшний день сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) остаются главной причиной смертности и инвалидизации населения в промышленно развитых странах. Одним из наиболее распространенных ССЗ является сердечная недостаточность (СН) – заболевание, характеризующееся нарушениями в работе сердца, приводящими к нарушению кровоснабжения всего организма. Зачастую хроническая СН сопровождается патологическим утолщением стенок миокарда или патологической гипертрофией миокарда.

Одним из перспективных молекулярных маркёров ССЗ считается ассоциированный с беременностью белок А плазмы крови, PAPP-A (pregnancy associated plasma protein-A). PAPP-A является матриксной металлопротеазой, локализованной на поверхности клеток [1]. Показано, что данный белок

располагается на внешней мембране или секретируется различными клетками организма человека: фибробластами [2], сердечными адипоцитами [3], гранулёзными клетками [4], гладкомышечными клетками сосудов [5] и многими другими. При этом PAPP-A является ферментом, регулирующим биодоступность таких важнейших факторов для организма, как инсулиноподобные факторы роста I и II (IGF). IGF-система является многокомпонентной и строго регулируемой системой, работа которой направлена на рост, пролиферацию и поддержание жизнеспособности различных клеток и тканей организмов. В ее состав входят три основных лиганда (IGF-I, IGF-II, инсулин), несколько типов рецепторов, расположенных на поверхности клеток-мишеней, с которыми лиганды специфически взаимодействуют: рецептор IGF-I (IGF-1R), рецептор IGF-II (IGF-2R), рецептор маннозо-6-фосфата/IGF-II (M6P/IGF-2R), рецептор инсулина (IR) и гибридный рецептор IR/IGF-1R; а также шесть типов IGF-связывающих белков IGFBP (IGFBP 1-6), которые взаимодействуют с лигандами IGF-I и IGF-2 и таким образом регулируют их биодоступность [6]. Высвобождение лигандов из комплексов с IGFBP происходит благодаря протеазам, которые специфически расщепляют белки IGFBP в комплексе IGF-IGFBP и делают возможным взаимодействие молекул IGF с их рецепторами. PAPP-A в физиологических условиях является единственной протеазой, способной расщеплять IGFBP-4, что приводит к высвобождению IGF [1].

Известно, что PAPP-A присутствует в атеросклеротических бляшках, а её концентрация в сыворотке крови увеличивается при остром коронарном синдроме (ОКС). Также известно, что повышение в крови уровня PAPP-A говорит о нарушении стабильности атеросклеротических бляшек, что в свою очередь позволило предположить, что протеаза PAPP-A может являться диагностическим маркером ОКС и возможным биомаркером острого инфаркта миокарда и нестабильной стенокардии [1]. Как упоминалось ранее, протеаза PAPP-A обладает специфической активностью по отношению к белку IGFBP-4. При этом продуктами специфической активности PAPP-A по отношению к IGFBP-4 являются два протеолитических фрагмента: N-концевой (NT-IGFBP-4) и C-

концевой (СТ-IGFBP-4) [8]. Протеолитические фрагменты белка IGFBP-4 рассматриваются как прогностические биомаркеры различных ССЗ. В ряде работ показано, что повышение уровня фрагментов IGFBP-4 в крови ассоциировано с возрастанием риска развития ОКС у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) и повышением риска летального исхода от ССЗ у больных диабетом 1 типа [5, 9, 10]. Недавно было показано, что повышение в крови больных СН уровня фрагментов NT- и СТ-IGFBP-4 ассоциировано с возрастанием риска летального исхода. Также было показано, что у больных острой сердечной недостаточностью СТ-IGFBP-4 является прогностическим маркером риска летального исхода [11].

Как было сказано выше, биодоступность IGF регулируется путем протеолиза белков IGFBP, в частности, регуляция биодоступности IGF осуществляется протеазой PAPP-A за счет её специфической протеолитической активности по отношению к IGFBP-4. Результатом этого процесса является высвобождение IGF из комплекса с IGFBP-4 и взаимодействие IGF с рецептором. Повышение уровня фрагментов IGFBP-4 может свидетельствовать об увеличении концентрации IGF в примембранном пуле клеток. В зависимости от действующей концентрации IGF может обладать как кардиопротекторными свойствами, так и действовать, как индуктор патологических состояний миокарда, в частности гипертрофии.

В этой связи тонкая регуляция концентрации IGF в примембранном пуле клетки чрезвычайно важна для нормального функционирования сердца и также может опосредовать развитие адаптивных реакций при патологических изменениях миокарда. Как упоминалось ранее, патологическая гипертрофия миокарда зачастую сопровождает многие ССЗ. Также несмотря на то, что на сегодняшний день было проведено множество исследований, демонстрирующих повышение концентрации фрагментов IGFBP-4 в крови пациентов до развития осложнений ССЗ, до сих пор не было показано, что протеолиз IGFBP-4 под действием PAPP-A происходит в сердечной ткани в норме. Таким образом исследование роли PAPP-A как регулятора биодоступности IGF в сердечной ткани в норме и при гипертрофии является актуальной задачей как с прикладной биомедицинской, так и с фундаментальной научной точек зрения.

Цели и задачи работы

Целью настоящей работы являлось исследование роли протеазы PAPP-A в сердечной ткани в норме и при гипертрофии.

Для достижения данной цели нами были поставлены следующие **задачи**:

1. Разработать и охарактеризовать модельные системы для исследования протеолиза IGFBP-4 под действием PAPP-A в кардиомиоцитах в норме;
2. Изучить особенности протекания протеолитического расщепления IGFBP-4 под действием PAPP-A, используя разработанные модельные системы;
3. Разработать и охарактеризовать модельные системы для исследования протеолиза IGFBP-4 под действием PAPP-A в кардиомиоцитах при гипертрофии;
4. Исследовать особенности протекания протеолиза IGFBP-4 под действием PAPP-A в культурах кардиомиоцитов, переведённых в гипертрофированное состояние.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Разработанная комбинация трёх независимых подходов к моделированию миокарда на клеточном уровне позволяет получить более полное представление о процессах, протекающих в сердце в физиологических условиях;
2. Протеолитическое расщепление IGFBP-4 под действием PAPP-A в норме протекает как на поверхности клеток, так и в кондиционированной среде, способствуя взаимодействию IGF с его рецепторами на поверхности клеток.
3. Наблюдаемое усиление протеолиза IGFBP-4 под действием PAPP-A, приводящее к высвобождению IGF, может служить как компенсаторным механизмом негативных последствий гипертрофии, так и механизмом, усиливающим эти изменения.

Научная новизна и практическая значимость работы

Данная работа посвящена изучению протекания RAPP-A-опосредованного протеолиза IGFBP-4 в сердечной ткани в норме и при гипертрофии. Модуляция данного процесса напрямую связана с изменением либо уровня экспрессии RAPP-A, либо активности данной протеазы. Для исследования данного процесса были получены и охарактеризованы первичные культуры кардиомиоцитов из неонатальных и взрослых крыс, а также разработаны две модели гипертрофии *in vitro* с использованием эндотелина-1 и норадреналина, основанные на первичной культуре кардиомиоцитов крысы и на кардиомиоцитах, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека, а также модель развития гипертрофии *in vivo*, основанная на индукции лёгочной гипертензии у взрослых крыс под действием монокроталина. Полученные в ходе работы данные впервые свидетельствуют о том, что RAPP-A опосредованный протеолиз IGFBP-4 происходит в кондиционированной среде кардиомиоцитов в трёх различных модельных системах, специфичность RAPP-A ассоциированного протеолиза IGFBP-4 была показана с использованием пар антител, специфичных к неозепитопу, образующемуся на концах фрагментов IGFBP-4 после специфического протеолиза под действием RAPP-A. Дополнительным доказательством протеолитического расщепления IGFBP-4 под действием RAPP-A в кондиционированной среде кардиомиоцитов является преимущественное протекание протеолиза IGFBP-4 в присутствии IGF-II, так как известно, что RAPP-A ассоциированный протеолиз IGFBP-4 происходит эффективнее, когда IGFBP-4 находится в комплексе с IGF. Также было показано заметное снижение уровня протеолиза в присутствии специфических ингибиторов металлопротеаз – фенантролина, связывающего Zn^{2+} , и ЭДТА, хелатирующего Ca^{2+} , являющийся регулятором активного центра RAPP-A. В результате проведения экспериментов в присутствии гепарина, конкурентно взаимодействующего с SCR-остатками на конце RAPP-A, отвечающих за взаимодействие RAPP-A с глюкозаминогликаном на мембране клетки, была определена локализация протекания данной протеолитической реакции как на поверхности клеток, так и во внеклеточном пространстве. Также было впервые

продемонстрировано, что после индукции гипертрофических изменений во всех исследуемых модельных системах как *in vitro*, так и *in vivo* наблюдается повышение уровня RAPP-A-специфичного протеолиза IGFBP-4.

Результаты данной работы носят, с одной стороны, фундаментальный научный характер и расширяют понимание роли матриксной металлопротеазы RAPP-A как регулятора биодоступности IGF в сердечной ткани в норме и при гипертрофии, а, с другой стороны, открывают новые возможности для создания терапевтических подходов для лечения ССЗ, связанных с гипертрофическими изменениями миокарда, и основанных на поддержании постоянной концентрации IGF. Кроме того, полученные данные предоставляют возможность исследовать ранее не изученные механизмы развития сердечно-сосудистых патологий.

Методология диссертационного исследования

Данное исследование выполнено с использованием современных биохимических, культурально-биологических, иммунохимических и физиологических методов.

Степень достоверности полученных результатов

Постановка цели и задач данного исследования, а также выбор методик и протоколов, необходимых для решения поставленных задач, основаны на анализе актуальных публикаций по теме исследования. Достоверность представленных результатов обусловлена воспроизводимостью измерений, проведенных в необходимом количестве биологических повторностей. Постановка всех проведенных экспериментов проводилась в соответствии с современными правилами проведения научных исследований: постановка контрольных экспериментов с учётом специфики выполняемой работы, статистическая обработка результатов с использованием подходящих критериев для каждого типа полученных экспериментальных данных.

Апробация результатов работы

Результаты, полученные в данной работе, были доложены на заседаниях кафедры биохимии биологического факультета МГУ, представлены на 46-м Международном Конгрессе FEBS в 2022 г. (Лиссабон, Португалия), на итоговой научно-практической конференции ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. академика Ю.М. Лопухина ФМБА, на 12-й международной конференции «Рецепторы и внутриклеточной сигнализации» (Пушино, Россия), на международном конгрессе ISCOMS в 2023 г. (Гронинген, Нидерланды), представлены на 24-м съезде физиологического общества им. И.П. Павлова (Санкт-Петербург, Россия) и на всероссийской научной конференции «Биохимия человека – 2024» (Москва, Россия).

Публикации

По теме диссертационной работы было опубликовано 3 статьи в международных реферируемых журналах, соответствующих перечню ВАК, и 5 тезисов сообщений, представленных на российских и международных конференциях:

1. Серебряная Д.В., Адашева Д.А., Конев А.А., Артемьева М.М., Катруха И.А., Постников А.Б., Медведева Н.А., Катруха А.Г. Протеолиз IGFBP-4 под действием PAPP-A в первичной культуре неонатальных кардиомиоцитов крысы в норме и при гипертрофии // *Биохимия*. – 2021. – Т. 86. – №. 11. – С. 1620–1634

Serebryanaya D.V., Adasheva D.A., Konev A.A., Artemieva M.M., Katrukha I.A., Postnikov A.B., Medvedeva N.A., Katrukha A.G. IGFBP-4 Proteolysis by PAPP-A in a Primary Culture of Rat Neonatal Cardiomyocytes under Normal and Hypertrophic Conditions // *Biochemistry (Moscow)*. – 2021. – Vol. 86. – No. 11. – P. 1395–1406

2. Adasheva D.A., Lebedeva O.S., Goliusova D.V., Postnikov A.B., Teriakova M.V., Kopylova I.V., Lagarkova M.A., Katrukha A.G., Serebryanaya D.V. PAPP-A-Specific IGFBP-4 Proteolysis in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – No. 9. – P. 8420.

3. Адашева Д.А., Серебряная Д.В. IGF-сигнальный путь в сердце в норме и при патологических состояниях // *Биохимия*. – 2024. – Т. 89. – №8. – С. 1402–1428.
Adasheva D.A., Serebryanaya D.V. IGF Signaling in the Heart in Health and Disease // *Biochemistry (Moscow)* – 2024. – Vol. 89. – No. 8. – P. 1402–1428

Личный вклад автора

Личный вклад соискателя присутствует на всех этапах работы, начиная от отработки используемых методик и завершая получением экспериментальных данных, их обработки, обсуждения результатов, подготовки статей и тезисов конференций.

Структура и объём работы

Диссертационная работа изложена по стандартному плану и состоит из введения, обзора литературы, раздела «Материалы и методы», полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, в который входит 305 библиографических ссылок. Работа изложена на 200 страницах печатного текста, содержит 31 рисунок и 1 таблицу.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мышечная ткань сердца: структура, основные типы клеток и функция в организме человека

Сердце человека – это сложноустроенный орган, состоящий из четырёх морфологически и функционально различающихся камер: двух предсердий и двух желудочков. Камеры сердца разделены между собой межпредсердной и межжелудочковой перегородками, а однонаправленность тока крови обеспечивается атриовентрикулярным и желудочковоартериальным клапанами. За счёт низкого давления венозная кровь из сердца продвигается в лёгкие, где насыщается кислородом. Насыщенная кислородом артериальная кровь сначала поступает в левое предсердие и желудочек, после чего кровь транспортируется по всему организму. Управление ритмом мышечных сокращений осуществляет электрофизиологическая система, которая передает электрические импульсы от синоатриального узла к атриовентрикулярному узлу и вдоль волокон Пуркинье к верхушке сердца, где и начинается сокращение. Анатомическая и функциональная сложность сердца требует чёткой и слаженной работы гетерогенных популяций клеток для обеспечения непрерывного сокращения и расслабления при действии различных факторов, одновременно влияющих на каждую из камер сердца. Сердечная мышечная ткань гетерогенна по своему клеточному составу и представлена различными типами клеток: кардиомиоцитами, фибробластами, клетками сосудистого эндотелия, адипоцитами и гладкомышечными клетками сосудов (рис.1).

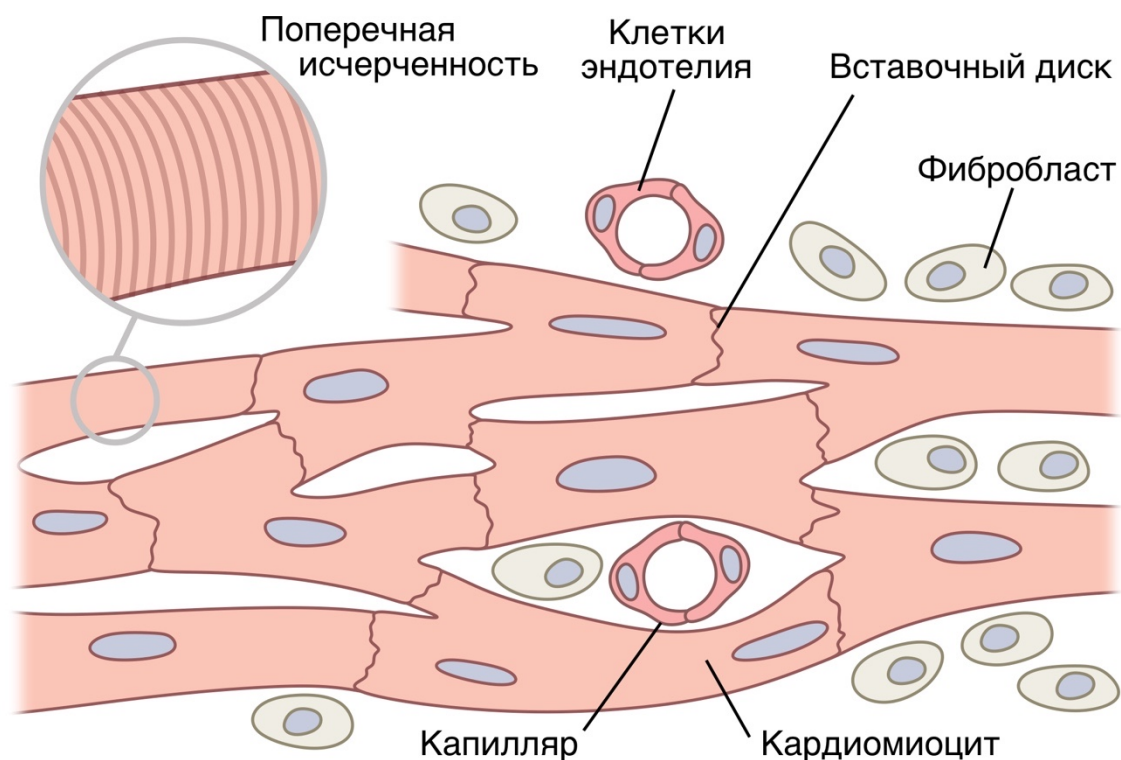


Рисунок 1. Строение сердечной ткани. Описание в тексте.

При этом в состав сердечной мышцы в основном входят два типа клеток: кардиомиоциты и фибробласты [12]. Отдельные типы клеток различаются внутри своей популяции и формируют субпопуляции. Например, кардиомиоциты желудочков и предсердий отличаются друг от друга, что было показано при исследовании библиотек РНК, полученных из этих двух субпопуляций. А желудочковая субпопуляция, в свою очередь, включает в себя 5 групп (vCM1-vCM5, групп желудочковой популяции кардиомиоцитов) [13].

Так или иначе, все типы клеток, перечисленные выше, связаны между собой клеточными контактами, и обеспечивают нормальное функционирование сердца. Для обеспечения проводимости электрических импульсов, кардиомиоциты и фибробласты соединены посредством белков коннексинов [12].

1.1 Эндотелиальные клетки

Клетки сосудистого эндотелия осуществляют вазомоторный контроль коронарных артерий, поддерживая оптимальный уровень кислорода в миокарде.

Также клетки эндотелия выполняют секреторную роль, экспрессируя различные белковые факторы, которые, например, могут помогать кардиомиоцитам отвечать на гемодинамический стресс [14]. Одним из таких факторов является представитель семейства эпидермальных факторов роста нейрегулин-1 (NRG-1). NRG-1, связываясь со своим рецептором ErbB2, запускает клеточные процессы, необходимые для регуляции и поддержания нормального развития сердца и нервной системы [15]. Ещё одним нейрогуморальным регулятором, который экспрессируется клетками эндотелия, является апелин. Апелин связывается со своим рецептором APJ и играет одну из ключевых ролей в сердечно-сосудистой системе. Являясь вазодилататором, данный белок регулирует сократимость миокарда и влияет на водный гомеостаз [16].

1.2. Кардиомиоциты

Кардиомиоциты составляют от 20 до 35% всех клеток сердца и именно они обеспечивают сокращение, благодаря которому кровь осуществляет транспорт кислорода и питательных веществ ко всем клеткам тела [17]. Как правило, среди кардиомиоцитов выделяют клетки-водители ритма, а также клетки, отвечающие непосредственно за сокращение. В миокарде кардиомиоциты соединены между собой с помощью вставочных дисков (рис.1). Во вставочном диске выделяют поперечные и продольные участки. Поперечные участки содержат много межклеточных контактов – десмосом и обеспечивают прочность соединения кардиомиоцитов. В продольных участках присутствует много межклеточных контактов типа «нексусов», которые образуют узкие каналы между соседними клетками. Через эти каналы способна проходить вода и ионы, что создаёт условия для свободного прохождения электрического тока с одного кардиомиоцита на другой. Таким образом, наличие нексусов обеспечивает электрическое сопряжение кардиомиоцитов, необходимое для быстрого распространения возбуждения по всему миокарду, что необходимо для его синхронного сокращения. Также кардиомиоциты способны к регенерации своей популяции после повреждения, что было показано на таких модельных объектах, как *Danio rerio* [18]. Для обеспечения

работы всех типов клеток сердца как единого целого, кардиомиоциты секретируют кардиокины - белки и пептиды для осуществления паракринной регуляции между различными популяциями клеток. Анализируя концентрацию кардиокинов в плазме крови, можно судить о различных патологических состояниях сердца. Кардиокины включают факторы роста, эндокринные гормоны, цитокины, белки внеклеточного матрикса и пептиды, которые важны для поддержания нормального роста и функционирования сердца, а также в качестве сигнальных медиаторов в ответ на различные стрессы. Хорошо известные кардиокины, индуцируемые стрессом, включают натрийуретические пептиды А (ANP) и В (BNP), которые действуют как кардиопротекторы для клеток сердечной ткани [19].

Способность кардиомиоцитов к сокращению обусловлена наличием упорядоченных структур цитоскелета – саркомеров. Саркомер кардиомиоцитов представлен несколькими белками, расположенными между двумя Z-дисками: тонкими филаментами актина, образующими двуспиральную протяжённую структуру, толстыми филаментами миозина, а также тропомиозином, гетеротримерным тропониновым комплексом и некоторыми другими белками. Внутри саркомер разделён на так называемые дисковые зоны. В середине саркомера выделяют Н-зону, которая состоит только из толстых филаментов, в центре Н-зоны выделяют М-диск. М-диск расположен в центре саркомера и состоит из рядов, образованных сцепленными между собой концами толстых филаментов миозина. По бокам от М-диска расположены А-диски (анизотропные диски) саркомера, образующиеся перекрытием толстых и тонких филаментов. Далее выделяют I-диски (изотропные диски) саркомера, представляющие собой светлые участки справа и слева от А-дисков, соответствующие участку, где располагаются только тонкие филаменты актина. Тропониновый комплекс сердца человека включает в себя три основных белка: тропонин С (сTnC), способный связываться с ионами Ca^{2+} и запускать сокращение; тропонин I (сTnI), препятствующий сокращению в отсутствии ионов Ca^{2+} , связанного с сTnC, и тропонин Т (сTnT), который отвечает за взаимодействие между тропониновым

комплексом и тропомиозином (Tm) [20]. Совместно эти белки реализуют и регулируют функцию сокращения кардиомиоцитов в частности, и сердца в целом.

1.3. Фибробласты

Одной из основных функций фибробластов мышечной ткани сердца, составляющих до 2/3 от всей ткани сердца, является формирование внеклеточного матрикса (extracellular matrix – ECM). Основными компонентами такого внеклеточного матрикса являются белки фибронектин, ламинин, а также коллаген I и III типов. Данная белковая внеклеточная сеть является очень динамичной структурой и может претерпевать реорганизацию в ответ на действие различных сигнальных молекул. Так, активаторами создания ECM являются такие сигнальные молекулы, как ангиотензин II (Ang II), инсулиноподобный фактор роста I (IGF-I), трансформирующий ростовой фактор бета (TGF-beta) и другие [21]. Фибробласты продуцируют коллаген, эластин, глюкозаминогликаны и другие компоненты внеклеточного матрикса, и обеспечивают структурную поддержку и эластичность сердечной ткани. Фибробласты играют важную роль в заживлении сердечной ткани, формируя фиброзную ткань после повреждения. Развитие фибротических изменений поврежденных тканей миокарда является важным компенсаторным механизмом, помогающим сердцу справиться с нарушениями в своей работе.

Клетки миокарда, как и любые другие клетки сердечно-сосудистой системы, реагируют на изменения в окружающей среде, благодаря системам клеточной сигнализации. Активация механизмов передачи сигналов внутрь клетки в ответ на тот или иной стимул приводит к развитию адаптивного клеточного ответа, а нарушения в их функционировании могут вызывать развитие различных патологических состояний.

2. Основные ССЗ и патологические изменения в миокарде и сосудах

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются главной причиной преждевременной смерти и инвалидности населения в промышленно-развитых странах. Поскольку диагностика и лечение сердечно-сосудистых заболеваний требуют существенных финансовых расходов, они также оказывают значительное социально-экономическое влияние на население в целом. Существует большое количество типов ССЗ – как наследственных, так и приобретённых – среди которых можно выделить ИБС, кардиомиопатии, синдром Марфана, аритмия, тромбоз глубоких вен, болезни перикарда и другие. За долгие годы исследований ССЗ был выявлен ряд факторов риска их развития, значительная доля которых связана с образом жизни пациентов: ожирение, курение, гиподинамия, гипертония и т.д. Возникновение многих ССЗ зачастую связано с атеросклеротическими изменениями сосудов, которые приводят к развитию таких заболеваний, как ишемическая болезнь сердца (ИБС) и тромбоэмболия, что в итоге может приводить к инфаркту или инсульту. В некоторых случаях развитие ССЗ связано с патологическими изменениями сердечной мышцы, как, например, в случае хронической сердечной недостаточности, различных видов аритмий, кардиомиопатий и приобретённых пороков сердца. Большинство заболеваний сердечной мышцы сопровождаются развитием такого патологического состояния, как гипертрофия.

2.1. Патологическая гипертрофия сердечной мышцы и механизм её возникновения под действием эндотелина-1 и норадреналина

Гипертрофия кардиомиоцитов (увеличение клеток в размерах) является адаптивным ответом клеток на усиление биомеханического стресса. При гипертрофии клетки сердца претерпевают существенное изменение транскрипционной программы. Выделяют два основных типа гипертрофии: физиологическая и патологическая. Патологическая гипертрофия сопровождается повышенной экспрессией натрийуретических пептидов ANP и BNP, а также

снижением уровня экспрессии α -изоформы тяжёлой цепи миозина (α -МНС) с одновременным увеличением экспрессии β -изоформы тяжёлой цепи миозина (β -МНС). Длительная патологическая гипертрофия миокарда приводит к возникновению сердечной недостаточности и в большинстве случаев ведёт к смерти [22]. При физиологической гипертрофии подобных изменений не наблюдается [23]. Кроме этого, при патологической гипертрофии наблюдается снижение количества кардиомиоцитов, тогда как при физиологической гипертрофии их количество остаётся неизменным [24]. Патологическую гипертрофию можно инициировать добавлением специальных индукторов, например, эндотелина-1 и норадреналина [23, 25], используя для этого изолированные культуры кардиомиоцитов или вызвать её физиологическое развитие у модельных животных.

3. Различные подходы к исследованию патологической гипертрофии

Существующие на сегодняшний день модельные системы для исследования патологической гипертрофии можно условно разделить на *in vitro* модели, в которых используются клеточные культуры, и *in vivo* клеточные модели, основанные на естественном физиологическом развитии гипертрофических изменений в результате действия прогипертрофических агентов или операционного вмешательства. Рассмотрим *in vitro* клеточные модели для индукции сердечной гипертрофии. Как упоминалось выше, ткань сердечной мышцы гетерогенна и представлена различными типами клеток, что сильно затрудняет изучение роли отдельных клеточных популяций в функционировании сердечной мышцы в норме и при патологических состояниях. Широко используемым подходом для исследования молекулярных механизмов функционирования сердечной ткани является получение изолированной культуры кардиомиоцитов. Использование первичной культуры кардиомиоцитов, полученной непосредственно из сердца, имеет ряд ограничений, главным из которых является гетерогенность финальной культуры (содержание кардиомиоцитов в ней составляет 70-90%, остальная часть клеток представлена

фибробластами, гладкомышечными клетками и клетками эндотелия). Контаминация другими типами клеток сердечной ткани может вносить свой вклад в изучаемые молекулярные механизмы, влияя на исход эксперимента. Также результаты, полученные с использованием данной модельной системы, слабо отражают реальные физиологические процессы, происходящие в миокарде при гипертрофии. Тем не менее, данная *in vitro* модельная система по физиологическим свойствам кардиомиоцитов является наиболее приближенной к кардиомиоцитам сердечной мышцы.

Также для подобного рода исследований можно использовать immortalized линии кардиомиоцитов, использование которых широко описано в литературе [26–29]. Существуют линии H9C2 и HL-1 - это immortalized линии кардиомиоцитов, полученные из левого желудочка эмбриона крысы и предсердия взрослой мыши. Эти клетки имеют простые протоколы культивирования и довольно дешевы в использовании [26]. Сравнительный морфологический анализ с первичными клеточными культурами показал, что как H9C2, так и HL-1 характеризуются кардиальным фенотипом, что также подтверждается исследованиями экспрессии мРНК. Транскриптомный анализ выявил биохимическое и биоэнергетическое сходство с первичными кардиомиоцитами [26, 27]. Учитывая все ограничения, связанные с использованием immortalized клеточных линий (прежде всего, изменения клеточного цикла, которые могут привести к генетическим и фенотипическим изменениям) [28], кардиомиоциты, дифференцированные из ИПСК привлекают большее внимание благодаря их человеческому происхождению и более высокой степени сходства с клетками сердца человека. ИПСК – это клетки, которые получают из соматических клеток взрослого организма. Основным преимуществом таких клеток является их способность дифференцироваться в клетку любого типа под влиянием ряда факторов, среди которых основную роль играют транскрипционные факторы. Получение ИПСК было впервые проведено Яманака и соавторами в 2006 году. Авторами было выявлено более 20 факторов, которые

отвечают как за приобретение, так и за поддержание статуса плюрипотентности. Основными транскрипционными факторами, с использованием комбинации которых авторам удалось перевести в плюрипотентное состояние мышинные эмбриональные фибробласты, являлись Oct4 (Octamer-4, участвует в самообновлении недифференцированных эмбриональных клеток), SOX2 (Sex determining region-Y Transcription factor 2, необходим для поддержания и самообновления эмбриональных стволовых клеток), c-Myc (myelocytomatosis proto-oncogene, протоонкогенный белок, клеточный гомолог миелоцитоматозного вирусного онкогена, который регулирует клеточный метаболизм и пролиферацию) и KLF4 (Kruppel Like Factor 4, регулирует пролиферацию, дифференцировку и апоптоз соматических клеток) [30]. Таким образом, различные типы клеток из ИПСК можно получать, обрабатывая их разнообразными агентами. Например, культуру кардиомиоцитов из ИПСК можно получить, воздействуя на ИПСК активинем А (представитель надсемейства лигандов TGF-beta) и фактором BMP4. Несомненным плюсом такого методологического подхода по сравнению с подходом, основанным на получении первичной культуры, является степень чистоты финальной культуры кардиомиоцитов, которая при успешной дифференцировке достигает 95-100%. Таким образом, если необходимо оценить вклад конкретного типа клеток, входящего в состав той или иной ткани, модель, построенная на клеточной культуре, полученной из ИПСК, является наиболее подходящей.

В случае, когда изначально ИПСК были получены от донора с определённым генетическим заболеванием, их можно дифференцировать в различные типы клеток, и используя такие клетки с патологическим генотипом исследовать молекулярные механизмы, сопровождающие то или иное заболевание, а также разрабатывать различные стратегии лечения. В случае, если донор является здоровым, можно получать трансгенные линии различных типов клеток для моделирования развития различных патологических состояний [31]. Помимо этого, ИПСК и дифференцированные из них клетки используются в таких отраслях, как

регенеративная медицина и трансплантология. Существенным недостатком данной модели является неполная зрелость полученных дифференцированных клеток, которую зачастую наблюдают в случае культур кардиомиоцитов. Среди морфологических параметров отличающихся в кардиомиоцитах полученных из ИПСК по сравнению с нативными зрелыми кардиомиоцитами выделяют разницу как в размерах клеток в целом – кардиомиоциты из ИПСК имели меньшие размеры, чем взрослые кардиомиоциты, так и значительные различия в соотношении длины и ширины клеток – взрослые кардиомиоциты имеют большую длину относительно ширины и четкую цилиндрическую форму, а кардиомиоциты из ИПСК не имеют четко выраженной цилиндрической формы, и, наоборот, представлены клетками самой различной формы. Помимо этого, наблюдались различия в количестве митохондрий – зрелые кардиомиоциты имели большее число митохондрий, а у кардиомиоцитов, полученных из ИПСК, отсутствовали Т-трубочки в отличие от взрослых кардиомиоцитов. Также был проведен сравнительный анализ ультраструктур саркомеров зрелых кардиомиоцитов по сравнению с кардиомиоцитами, дифференцированными из ИПСК. Мониторинг уровней экспрессии саркомерных белков, таких, как сердечный тропонин Т, сердечный тропонин I, α -актинин и β -миозин с тяжелой цепью (β -МНС), обеспечивает базовую оценку успешной дифференцировки и созревания кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК. Полимеразная цепная реакция, совмещенная с реакцией обратной транскрипции и иммуноцитохимический анализ, проведенные различными научными группами, подтвердили экспрессию саркомерных генов в кардиомиоцитах, дифференцированных из ИПСК. [32–34] Поскольку относительно незрелые кардиомиоциты также экспрессируют эти белки, обнаружение саркомерных генов не следует использовать в качестве единственной оценки созревания. Электронная микроскопия показала, что кардиомиоциты, дифференцированные из ИПСК, обладают незрелыми ультраструктурными характеристиками с различной степенью саркомерной организации [35, 36]. Зачастую данные проблемы решаются с помощью длительного культивирования кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК – более 120 дней [37],

позволяющего улучшить такие параметры, как высвобождение кальция и скорости его обратного захвата, амплитуду потенциала действия, а также увеличение силы сокращения кардиомиоцитов. Несмотря на то, что длительное культивирование улучшает многие показатели созревания кардиомиоцитов, этот подход существенно снижает производительность культур кардиомиоцитов. Поэтому многие лаборатории в настоящее время пытаются ускорить и усовершенствовать дифференцировку кардиомиоцитов другими способами, такими как культивирование на более жёстких субстратах, так как в процессе эмбрионального и раннего постнатального развития происходит накопление коллагена во внеклеточном матриксе [38, 39].

В естественных условиях кардиомиоциты подвергаются воздействию физических факторов, которые влияют на их морфологические признаки, и позволяют приобретать удлинённую форму и форму стержня. Было убедительно продемонстрировано, что форма кардиомиоцитов регулирует выравнивание саркомеров [40]. Таким образом, потенциальным способом созревания кардиомиоцитов является разработка усовершенствованных систем культивирования клеток, которые имитируют топографические характеристики микроокружения *in vivo*. Другим способом является электрическая стимуляция. В естественных условиях, кардиомиоциты постоянно подвергаются воздействию электрических сигналов, которые способствуют их синхронному сокращению. Было высказано предположение, что электрическая стимуляция кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК, может способствовать их созреванию [41, 42]. Ещё одним подходом решения проблемы «незрелости» кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК, является использование так называемых биохимических сигналов: агонистов адренергических рецепторов [43], IGF-I [44] и микроРНК [45]. Было показано, что воздействие IGF-I на неонатальные кардиомиоциты крысы приводило к усилению регуляции экспрессии легкой цепи миозина-2 и тропонина-I, что приводит к удвоению размеров клеток и повышению синтеза белка [44].

Все перечисленные выше типы клеточных культур кардиомиоцитов подробно описаны в литературе и широко используются для моделирования различных патологических состояний и заболеваний сердечной мышцы [31, 46]. Далее будут подробно рассмотрены некоторые *in vitro* и *in vivo* модели, используемые в настоящее время для индукции гипертрофии.

3.1 In vitro модели для индукции патологической гипертрофии в миокарде

In vitro модельные системы развития гипертрофии кардиомиоцитов основаны на действии таких прогипертрофических агентов, как эндотелин-1 и норадреналин. Главной отличительной чертой в механизмах развития патологической гипертрофии по сравнению с нормальной гипертрофией является вовлечение в процесс рецепторов, ассоциированных с G-белками – GPCR (G-protein coupled receptors). Агонистами таких рецепторов являются гормоны эндотелин-1 (ET-1) и ангиотензин II (Ang II). ET-1 является гормоном белковой природы, регулирующим ряд процессов, вовлеченных в развитие заболеваний сердечно-сосудистой системы [47]. Недавние исследования показывают, что наблюдается повышение уровня эндотелина-1 в плазме крови женщин с ишемической болезнью сердца [48]. На сегодняшний день обнаружены три типа эндотелинов (эндотелин-1, эндотелин-2 и эндотелин-3), гены которых расположены в хромосомах 6, 1 и 20, соответственно. Эндотелины различных типов экспрессируются преимущественно в печени, однако также показана их экспрессия в сердце. Они взаимодействуют с разными типами GPCR – ET_A, ET_{B1}, ET_{B2} и ET_C. Эндотелин-1 экспрессируется преимущественно в сердечной ткани, где он способен связываться с двумя типами рецепторами ET_B и ET_A. ET_A является преобладающим в кардиомиоцитах по сравнению с ET_B (доля рецепторов ET_A в сердце – 90%) [24]. Эндотелин-1 кодируется геном *EDN1*. В результате трансляции образуется предшественник pro-ET-1 длиной 203 аминокислотных остатка, который впоследствии процессируется эндопептидазой до pro-ET-1, включающего в себя 39 аминокислотных остатков. Окончательный процессинг осуществляется

эндотелин-конвертирующим ферментом (ECE). Показано, что ECE участвует в финальном процессинге всех трёх типов эндотелина. Индукция экспрессии эндотелина-1 осуществляется благодаря действию таких факторов, как тромбин, инсулин, ангиотензин II, а ингибирование экспрессии - за счёт повышения уровня оксида азота II (NO) или уровня cGMP [49].

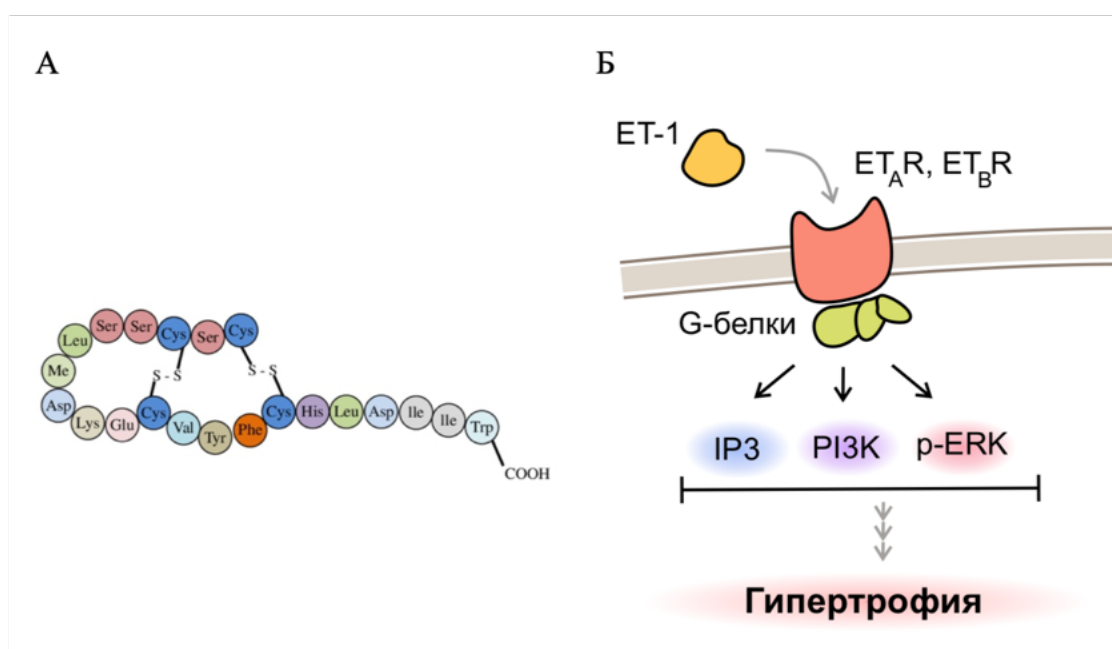


Рисунок 2. Эндотелин-1. А – строение молекулы эндотелина-1; Б – механизм индукции гипертрофии под действием эндотелина-1. Описание в тексте.

Кроме GPCR в развитии патологической гипертрофии участвуют такие сигнальные молекулы, как митоген-активируемые протеинкиназы (MAPKs), протеинкиназа С (PKC), протеинкиназа D (PKD) и кальцинейрин. Как было сказано выше, с рецепторами эндотелина-1 ассоциированы гетеротримеры G-белков, которые участвуют в дальнейшей передаче сигнала. При взаимодействии лиганда с рецептором происходит диссоциация тримера G-белков на мономер G α , остающийся ассоциированным с рецептором, и на димер G $\beta\gamma$, который диссоциирует от рецептора. Дальнейшая передача сигнала через G α и G $\beta\gamma$ приводит к ряду событий, ведущих к гипертрофии: реорганизации саркомеров, изменению транскрипционной программы клеток, а также изменению процесса трансляции [24] (рис. 2Б). Механический стресс, испытываемый клетками при

таком механизме возникновения гипертрофии, аналогичен гипертрофии в ответ на биомеханический стресс клеток сердечной мышцы. В обоих случаях клетки сердечной мышцы экспрессируют натрийуретические пептиды А и В, что позволяет определять развитие гипертрофии по возрастанию концентраций ANP и BNP.

Другим индуктором гипертрофии миокарда является норадреналин, который представляет собой нейромедиатор, отвечающий за передачу нервного импульса как в центральной, так и в периферической нервной системе (рис. 3А). Показано, что усиление активности адренергической нервной системы играет одну из ключевых ролей в возникновении гипертрофии. В норме норадреналин связывается с адренергическими рецепторами, при этом доминирующей изоформой таких рецепторов в сердечной ткани является $\beta 1$ -адренорецептор ($\beta 1$ -AR). Этот факт был установлен Симпсон и соавторами, которые, используя культуру неонатальных кардиомиоцитов, показали, что норадреналин-опосредованная индукция гипертрофии происходит именно через $\beta 1$ -AR с применением специфических ингибиторов этого класса рецепторов – празозина и теразозина [25]. Рецепторы $\beta 1$ -AR индуцируют синтез циклической формы АМР – сАМР, которая, в свою очередь, активирует протеинкиназу А (РКА) и белок, активируемый сАМР. РКА фосфорилирует ряд последующих участников данного каскада, которые играют ключевую роль в клеточном метаболизме ионов Ca^{2+} (рис. 3Б), что приводит к развитию гипертрофии.

Среди эффектов норадреналин-опосредованной гипертрофии выделяют нарушение метаболизма Ca^{2+} , повышенную экспрессию фосфоламбана, повышение уровня сАМР, а также гиперфосфорилирование РКА. В нескольких работах отмечено увеличение размера ядра, повышение активности каспаз и индуцирование митохондриально-опосредованных стрессовых реакций [50]. Развитие гипертрофии под действием норадреналина ингибируется алкалоидом стахидрином [51]. Ещё одним ингибитором действия норадреналина в развитии

гипертрофии является резвератрол, который активирует сигнальный путь NO/AMPK (NO – оксид азота, AMP-зависимая протеинкиназа) [52].

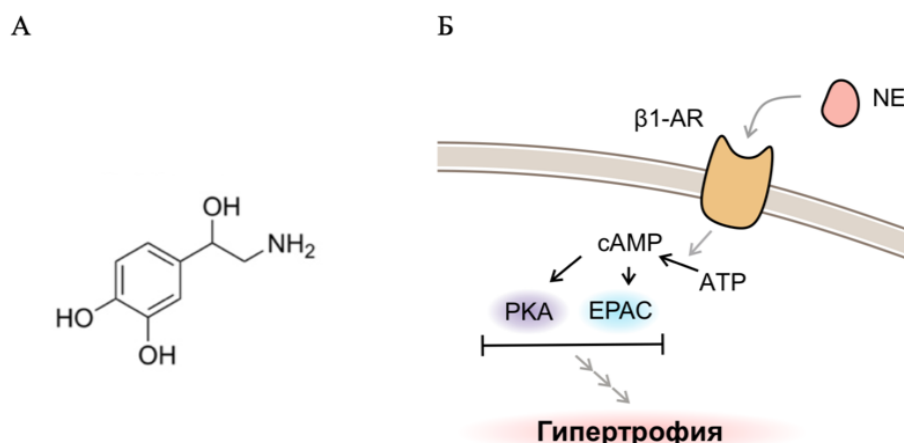


Рисунок 3. Норадреналин. А – строение молекулы норадреналина; Б – механизм индукции гипертрофии под действием норадреналина.

Участие норадреналина в развитии гипертрофии доказали Рапасиуоло и соавторы. Они создали линию крыс *Dbb*^{-/-}, у которых был нокаутирован ген дофаминовой бета-гидролазы, которая участвует в синтезе норадреналина из дофамина. При индукции гипертрофии у таких крыс под действием избыточного давления в отсутствии норадреналина не наблюдалось увеличения размеров кардиомиоцитов и сердца в целом [53]. Помимо этого, возникновение гипертрофии под действием норадреналина может быть связано с ремоделированием коллагенового матрикса кардиомиоцитов. Увеличение кардиомиоцитов в размере напрямую связано с повышенным синтезом коллагена. По всей видимости, норадреналин может нарушать баланс между формированием и деградацией внеклеточного и клеточного матрикса. Важную роль в регуляции динамики матрикса также играет TGF- β 1, экспрессия которого возрастает при длительном воздействии норадреналина на кардиомиоциты [50, 54].

3.2 *In vivo* моделирование гипертрофического ответа в сердечной ткани

На сегодняшний день существует множество подходов к моделированию СН и, в частности, гипертрофии миокарда *in vivo* (рис. 4).

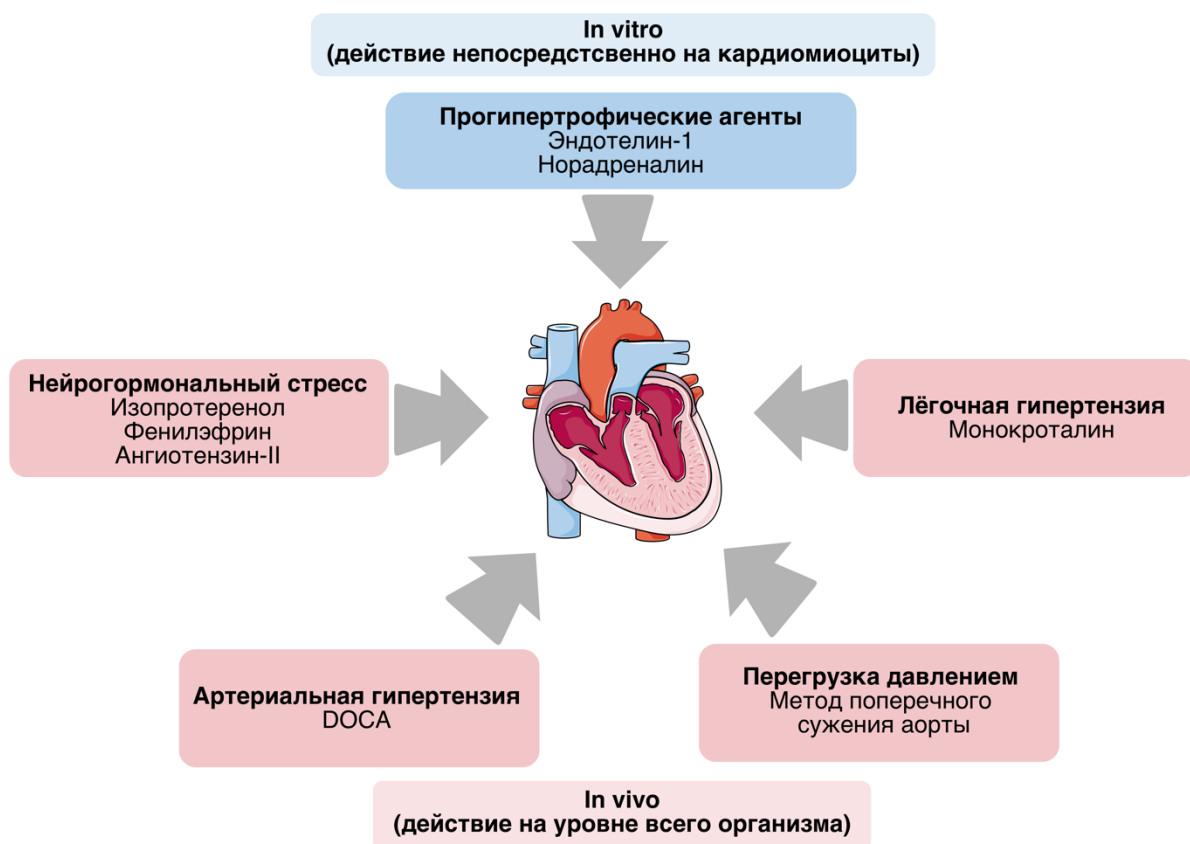


Рисунок 4. *In vitro* и *in vivo* подходы к моделированию патологической гипертрофии миокарда.

Артериальная гипертензия является одним из основных состояний, приводящих к сердечной недостаточности (СН). При артериальной гипертензии происходит интенсификация воспалительных процессов в сердечной мышце и существенно меняется метаболизм. Дополнительно картина может усугубляться при повышении давления в левом желудочке, что в свою очередь будет приводить к разрастанию фибробластов и гипертрофии клеток гладкой мускулатуры сосудов. При таких изменениях повышается нагрузка на стенки миокарда, что вызывает гипертрофию левого желудочка (ЛЖ) как компенсаторный механизм на повышение давления [55]. Наиболее распространенной моделью для изучения сердечной недостаточности, вызванной артериальной гипертензией, является введение дезоксикортикостерона ацетата (DOCA) мышам при одновременном их обеспечении питьевой водой с высоким содержанием соли (1% NaCl). В таких

условиях возникает повышенная реабсорбция натрия и воды в почках, что приводит к высокому кровяному давлению из-за снижения соотношения ренин/альдостерон. Данная модель имеет некоторые ограничения. Было показано, что результаты, полученные с ее использованием, зависят от линии мышей, так, например, мыши одних линий менее восприимчивы к повреждению почек и гипертензии, чем другие [56]. Кроме того, было показано, что нарушение функций почек у самцов протекает тяжелее, чем у самок, следовательно, эффекты артериальной гипертензии у них более выражены. Модель DOCA приводит к гипертрофии сердца, фиброзу желудочков, усилению синтеза маркеров гипертрофии ANP и BNP, а также к инфильтрации воспалительных клеток в сердечную ткань [57]. Также используется введение ангиотензина II (AngII) для индуцирования гипертензии и хронической болезни почек у мышей. Устойчивое повышение уровня AngII в кровотоке приводит к вазоконстрикции, опосредованной AngII, артериальной гипертензии, секреции альдостерона, фиброзу, опосредованному трансформирующими факторами роста, и воспалению – весь этот спектр факторов способствует развитию гипертрофии сердца [58].

Гипертрофия левого желудочка при перегрузке давлением является известным предвестником СН и имеет самые неблагоприятные прогнозы. Разработка экспериментальных моделей, воспроизводящих это явление, играет важную роль в развитии понимания его патофизиологии. Для изучения данной патологии были разработаны различные хирургические подходы, имитирующие адаптационные изменения, происходящие в сердце при развитии артериальной гипертензии. Золотым стандартом среди этих модельных систем является контролируемое сужение средней дуги аорты у мышей по методике Рокмана. Рокман и соавторы впервые описали метод поперечного сужения аорты (ПСА) и в настоящее время это наиболее распространенный метод изучения СН, вызванной перегрузкой давлением в ЛЖ [59]. ПСА вызывает увеличение постнагрузки на ЛЖ, что приводит к концентрической гипертрофии, интерстициальному фиброзу и увеличению жесткости ЛЖ, что в конечном итоге стимулирует развитие систолической недостаточности [60, 61]. Однако процедура ПСА не лишена

недостатков, поскольку она сильно зависит от исследователя, который проводит операцию, и обладает слабой воспроизводимостью из-за своей технической сложности, приводящей к различной степени сужения аорты. Гипертрофический ответ на ПСА и прогрессирование до СН зависят от пола, веса, возраста и индивидуальных генетических особенностей мышей [61]. Кроме того, диапазон смертности от ПСА варьирует в разных исследованиях от 6% до 45% [61–63]. Недавно Мерино и соавторы [64] разработали модифицированную методику, которая позволяет проводить индивидуальное и полностью контролируемое сужение аорты, повышает эффективность и создает воспроизводимый стеноз, который технически легко выполнить и устранить. Алгоритм вычисляет, основываясь на диаметре эхокардиографической дуги, предполагаемый периметр в месте сужения, и подготавливается шов с соответствующим разделением двух узлов. Аорту дважды обвивают швом, и петля закрывается микроклипсой под обоими узлами. Было проведено контролируемое сужение аорты с помощью метода Рокмана (MP) и двойной петли зажима (double-loop-clip (DLC)) у мышей. DLC доказала превосходство по эффективности и большую однородность результатов, чем MP. Методика DLC более оптимизирована для использования на животных и создает последовательное и индивидуальное сужение аорты с однородными морфофункциональными, структурными и молекулярными особенностями перегрузки давлением в ЛЖ.

Модели развития СН, индуцированные введением токсинов, или модели создания нейрогормонального стресса, как правило, основаны на индукции патологических состояний, приводящих к СН, таких как гипертония, повреждение почек и печени [65–67]. При использовании данных моделей индуцируется системное повреждение организма модельных животных вместо того, чтобы прицельно воздействовать на сердечно-сосудистую систему. Хроническая адренергическая стимуляция является отличительной чертой хронической СН [68]. Чтобы прицельно исследовать этот процесс, мышам вводят изопротеренол (ИЗО), неселективный агонист β -адренорецепторов, с помощью имплантированного осмотического насоса или непрерывных инъекций. Эхокардиография показывает,

что гипертрофия сердца, дилатация и желудочковая дисфункция развиваются после 3 недель непрерывного введения ИЗО [65]. ИЗО дополнительно вызывает апоптоз кардиомиоцитов, приводящий к снижению способности желудочка сокращаться [65]. У мышей с различными генетическими предрасположенностями к сердечно-сосудистым заболеваниям наблюдается различное увеличение массы ЛЖ, гипертрофия и дилатация, а также различное уменьшение фракции выброса, что позволяет предположить, что дозировка ИЗО должна соответствовать генетическим особенностям используемых мышей [69]. Фенилэфрин является агонистом α -адренорецепторов, который вызывает сужение сосудов, что приводит к увеличению постнагрузки, то есть перенапряжению желудочка, которое требуется для выброса крови, и снижению функции желудочков. При введении мышам фенилэфрин вызывает гипертрофию миокарда ЛЖ, увеличение массы ЛЖ, систолическую дисфункцию и повышенную экспрессию маркеров СН – ANP и BNP (натрийуретического пептида А и натрийуретического пептида В) [70]. При внутривенном введении Ang II, другого мощного сосудосуживающего гормона, у мышей развивается гипертензия, сосудистое воспаление и фиброз [71]. Фенилэфрин и Ang II также вводили совместно для увеличения общей вазоконстрикции в сердечно-сосудистой системе и усиления гипертрофии.

Модель монокроталин-индуцированной легочной гипертензии является одной из широко используемых моделей для изучения этого патологического состояния. Эта модель используется в исследованиях как базовый инструмент для понимания механизмов, лежащих в основе развития легочной гипертензии и для оценки потенциальных терапевтических подходов. Индукция лёгочной гипертензии с помощью монокроталина (МКТ) позволяет исследователям изучать процессы воспаления, гипертрофии миокарда, фиброза и ремоделирования сосудов, которые характерны для этого заболевания. Данная модель хорошо репрезентативна для некоторых аспектов лёгочной гипертензии у людей. Исследования с применением модели МКТ-индуцированной лёгочной гипертензии обычно осуществляются на животных, таких как крысы или мыши. Результаты этих исследований позволяют выявить потенциальные новые молекулярные

мишени для лечения лёгочной гипертензии и разработать инновационные подходы к терапии.

МКТ является 11-членным макроциклическим пирролизидиновым алкалоидом, вызывающим синдром лёгочного сосудистого поражения у крыс, характеризующийся пролиферативным лёгочным васкулитом, лёгочной гипертензией и кор-пульмонале - состоянием, при котором увеличивается и ослабляется правый желудочек сердца из-за длительного давления и перегрузки в лёгочной артерии или лёгочном круге кровообращения.

Существующие на сегодняшний день гипотезы о патогенезе монокроталин-индуцированной пневмотоксичности предполагают, что МКТ превращается в реактивное метаболически активное вещество в печени, а затем транспортируется эритроцитами в легкие, где вызывает необратимое эндотелиальное повреждение (рис. 5).

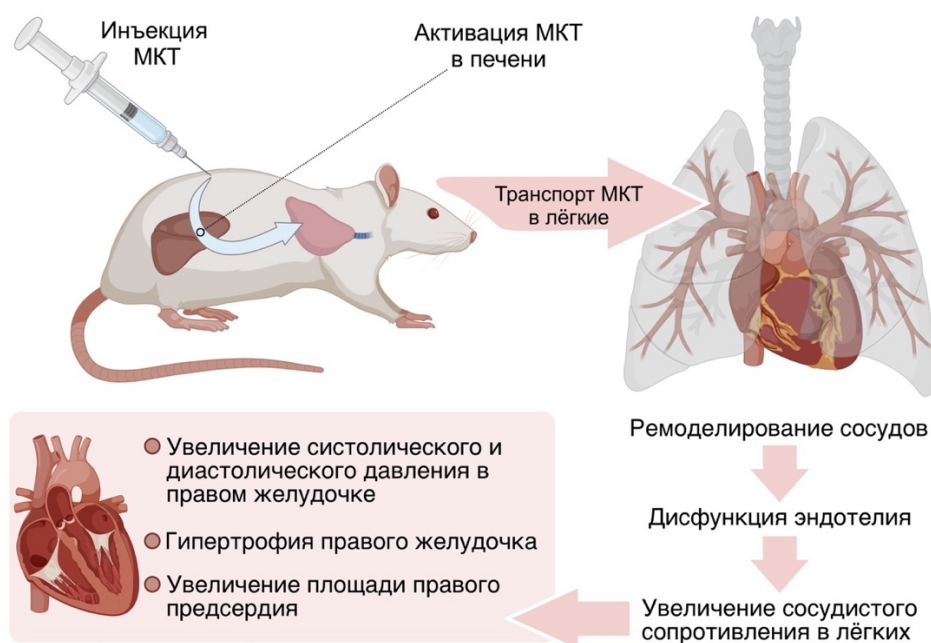


Рисунок 5. Экспериментальная модель МКТ-индуцированной лёгочной артериальной гипертензии. После введения МКТ у крысы происходит ремоделирование сосудов, в следствие чего развивается дисфункции эндотелия, что приводит к постепенному увеличению сосудистого сопротивления в легких и, в конечном итоге, к увеличению систолического и диастолического давления в правом желудочке (ПЖ), гипертрофии ПЖ, а также увеличению площади правого предсердия.

Понимание механизмов, лежащих в основе гипертрофических патологий сердечной ткани, тесно связано с изучением IGF-системы. Как упоминалось ранее, гипертрофия миокарда является адаптивным компенсаторным механизмом, развивающимся в ответ на повышение нагрузки на сердце, а IGF-система является важнейшим регулятором роста и развития всего организма и, в частности, сердечно-сосудистой системы как на эмбриональном, так и на постнатальном этапах развития. Многие компоненты IGF-системы являются диагностическими и прогностическими маркерами различных ССЗ, таких как ИБС, СН или ОКС. Поэтому далее мы подробнее рассмотрим IGF- систему в контексте её роли в сердечной ткани как в норме, так и при различных патологических состояниях.

4. IGF-система и её роль в сердечной ткани в норме

Система инсулиноподобных факторов роста (IGF), или IGF-сигнальная система, является ключевым участником в регуляции таких клеточных процессов, как рост, пролиферация и поддержание жизнеспособности [1]. В состав IGF-системы входит большое количество белков, экспрессия которых показана во всех тканях и органах организма. При этом экспрессия этих белков значительно выше в эмбриональном периоде развития по сравнению с постнатальным периодом развития [73].

IGF-сигнальная система включает в себя большое количество молекул, выполняющих разные функции: лиганды, клеточные рецепторы, лиганд-связывающие белки, протеазы (рис. 6). В роли лигандов выступают два инсулиноподобных фактора роста I и II (IGF- I и IGF- II) и инсулин. К клеточным рецепторам IGF-сигнальной системы, которые расположены на поверхности клеток-мишеней и с которыми специфически взаимодействуют лиганды, относят рецептор IGF-I (IGF-IR), рецептор маннозо-6-фосфата/IGF-II (M6P/IGF-IIR), рецептор инсулина (IR) и гибридный рецептор IR/IGF-IR. Существует шесть высокоаффинных лиганд-связывающих белков (IGFBP 1-6), которые способны

связывать молекулы IGF с высоким сродством. Протеазы IGF-системы осуществляют расщепление лиганд-связывающих белков, что позволяет регулировать биодоступность IGF для их специфических рецепторов [72, 74, 75]. Описанные выше белки-участники IGF-сигнальной системы осуществляют внеклеточную передачу сигналов. Во внутриклеточной передаче сигналов участвует, например, семейство белков IRS. Эти белки активируют такие сигнальные каскады, как, например, RAF-MAPK или (PI3K)-AKT-TOR. Активация этих сигнальных каскадов, в свою очередь, стимулирует клеточную пролиферацию и повышает жизнеспособность клеток.

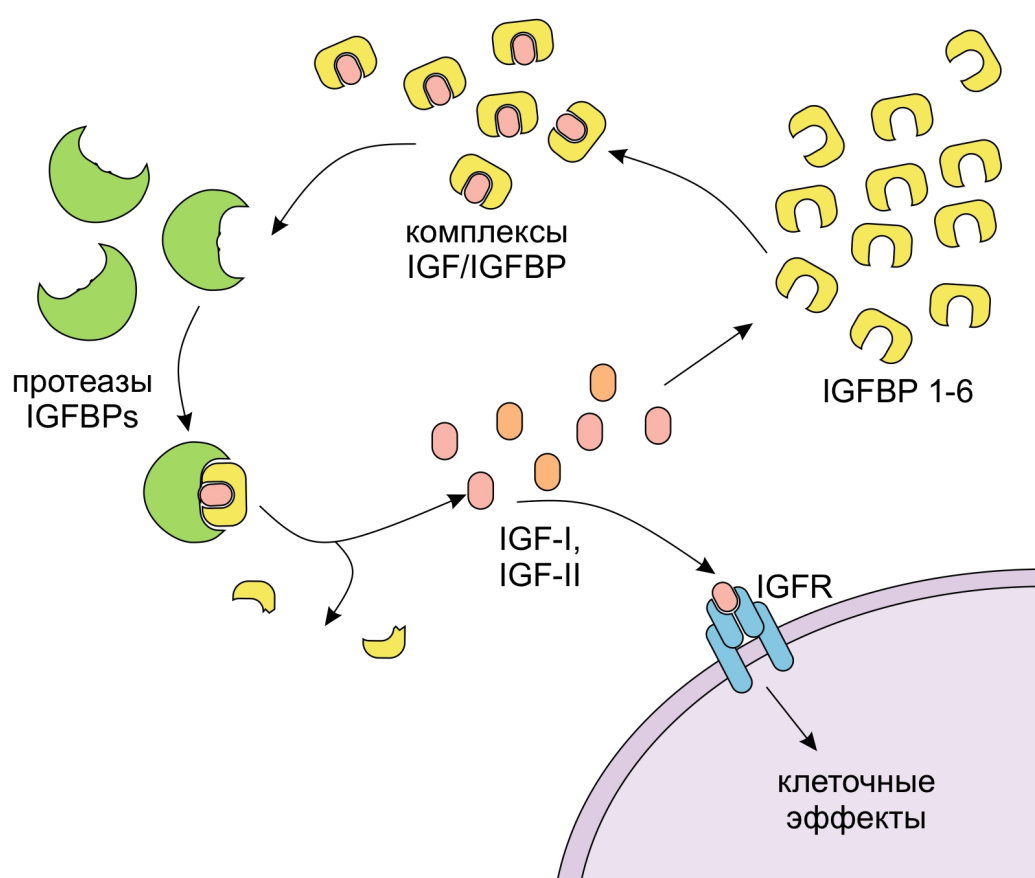


Рисунок 6. IGF-система [76].

Главной функцией IGF-сигнального пути в сердечной ткани является регуляция гиперплазии и роста сердца в период эмбрионального развития. Инсулиноподобные факторы роста IGF-I и IGF-II были идентифицированы как наиболее важные факторы, которые стимулируют пролиферацию кардиомиоцитов в этот период развития организма.

Помимо этого, в сердечной ткани IGF обладают кардиопротекторными свойствами и выполняют защитные функции в сердце. Кардиопротекторные свойства осуществляются через их антиапоптотическое действие. Проведенные *in vitro* и *in vivo* исследования показали, что IGF-I обладает выраженным кардиопротекторным эффектом [77–80]. Помимо этого, IGF-I является фактором, который способен запускать митотическое деление клеток. Свою антиапоптотическую функцию он осуществляет не только в сердечной ткани, но и в клетках сосудов, включая гладкомышечные и эндотелиальные клетки [81], также он выполняет регуляторные функции в иммунной системе. Так, антитела к IGF-IR были обнаружены у пациентов с болезнью Грейвса (аутоиммунное заболевание). У пациентов с таким заболеванием наблюдается существенное увеличение частоты IGF-IR-положительных клеток иммунной системы: В- и Т-лимфоцитов. Потенциальное участие факторов IGF-сигнального пути - IGF-I и IGF-IR - в патогенезе аутоиммунных заболеваний делает этот сигнальный путь одной из перспективных терапевтических мишеней для их лечения [82]. Проведённые исследования также позволяют предположить, что IGF-I, по всей видимости, помимо описанных выше эффектов, может обладает атеропротекторным действием. Это, в свою очередь, делает его перспективным терапевтическим агентом для возможной терапии ССЗ, которые вызваны атеросклеротическими изменениями сосудов [83].

Однако, активация и/или ингибирование работы IGF-системы в сердце могут быть связаны с возникновением различных патологических состояний в сердечно-сосудистой системе. Ранее было показано, что сниженные уровни IGF-I в сыворотке крови коррелируют с повышенным риском ишемической болезни сердца и инсульта [84, 85]. Также в ряде работ было продемонстрировано, что повышенный уровень протеолитических фрагментов одного из участников IGF-системы, IGFBP-связывающего белка IGFBP-4, ассоциирован с повышением риска возникновения ОКС у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС), острой сердечной недостаточностью [10], а также с увеличением риска наступления смерти в связи с осложнениями ССЗ у больных диабетом 1-го типа [9, 86]. Недавно

в нашей лаборатории было показано, что концентрация протеолитических фрагментов IGFBP-4 повышается при таких патологических состояниях сердечной мышцы, как гипертрофические изменения в кардиомиоцитах [87]. В 2023 году Ванг и соавторы показали, что уровни IGF-I и IGFBP-2 в плазме крови пациентов могут являться мощными прогностическими факторами риска развития ОКС [88]. Также было показано, что IGFBP-2 является важным биомаркером дисфункции левого желудочка при дилатационной кардиомиопатии [89].

Таким образом, несмотря на то что в ряде работ показано усиление кардиопротекторных и атеропротекторных эффектов в сердечной ткани после активации IGF-сигнального пути, некоторые исследования, напротив, демонстрируют активацию IGF-сигнального пути при различных патологических изменениях, развивающихся в сердечной ткани, таких как атеросклеротическое поражение сосудов и гипертрофия.

4.1 Инсулиноподобные факторы роста

В геноме человека ген *IGF-I* располагается на длинном плече 12 хромосомы [90, 91]. В состав этого гена входит шесть экзонов, при этом четыре из них подвергаются альтернативному сплайсингу, в результате чего образуются различные предшественники IGF-I [23,24]. Экспрессия IGF регулируется на различных стадиях, таких как транскрипция, процессинг РНК и трансляция. Синтезированный белковый предшественник IGF-I затем превращается в функционально активную форму IGF-I благодаря специфическому протеолизу [92, 93]. Функционально активная форма IGF-I представляет собой полипептид с молекулярной массой 7,5 кДа, который состоит из 70 аминокислотных остатков и содержит три дисульфидных связи [92]. Показано, что значительная часть содержащихся в крови молекул IGF-I вырабатывается клетками печени, при этом также показано, что IGF-I синтезируется и в других органах, осуществляя аутокринное или паракринное действие на клетки различных тканей. Регуляция синтеза IGF-I в печени является многофакторной, при этом основную роль в усилении экспрессии IGF-I играет гормон роста (GH), который вырабатывается

гипофизом. Многочисленные эксперименты по изучению эффектов от нарушенной экспрессии IGF-I в различных тканях демонстрируют противоречивые результаты. Так, например, при нарушенной экспрессии IGF-I в тканях печени у мышей не было показано значимых отклонений в развитии. Это может быть связано с компенсацией уровня экспрессии посредством IGF-I, который секретируется клетками мышечной ткани [94]. При проведении экспериментов по тканеспецифичному генетическому нокауту *IGF-I* в клетках скелетной мускулатуры у мышей наблюдалась значительная потеря мышечной массы, что указывает на то, что IGF-I является значимым участником в процессе поддержания нормального состояния скелетной мускулатуры [95]. При нарушенной экспрессии IGF-I в головном мозге у мышей и крыс наблюдаются нарушения соматического и дендритного роста нейронов, когнитивных функций, памяти и терморегуляции [96, 97]. Помимо этого, IGF-I играет важную роль в тканях почек, лёгких и поджелудочной железы [98].

Ген IGF-II кодирует секретируемый одноцепочечный белок, состоящий из 67 аминокислот, который структурно и функционально схож с IGF-I. [99, 100]. У мышей с нарушенной экспрессией IGF-II (генетический нокаут) наблюдается задержка роста во время развития, однако в постнатальном периоде рост происходит без изменений [101]. Фактически уровни циркулирующего в плазме крови IGF-II резко и значительно снижаются у мышей с наступлением постнатального периода развития. Экспрессия IGF-II происходит как в печени, так и в других тканях [102]. Несмотря на то, что IGF-II важен на эмбриональных стадиях развития и не обнаруживается в плазме крови взрослых мышей, недавние исследования показывают, что локальная экспрессия IGF-II в постнатальном периоде развития необходима в различных тканях для процессов, происходящих в них. Так, например, экспрессия IGF-II необходима для развития костей [103], а также для нейрогенеза в гиппокампе, что играет важную роль в консолидации памяти [104]. IGF-II, по-видимому, играет важную роль в процессе поддержания стволовых клеток кишечника и стволовоподобных нервных клеток [105, 106].

Помимо этого, тканеспецифичное подавление экспрессии IGF-II в поджелудочной железе приводит к подавлению секреции инсулина [107].

4.2 IGF-I и IGF-II в сердечной ткани

К ключевым функциям IGF-I можно отнести регуляцию постнатального роста сердца и участие в антиапоптотических механизмах, осуществляемых через активацию различных сигнальных путей в сердце взрослого человека (PI3K/Akt и ERK-сигнальные пути, передача сигнала, опосредованная G-белками) [108]. Эксперименты по оверэкспрессии IGF-I, которые были проведены в сердечной ткани мыши при липополисахаридиндуцированной сократительной дисфункции кардиомиоцитов, позволили показать положительный эффект IGF-I на их выживаемость. Такие эффекты IGF-1, по всей видимости, связаны с его антиоксидантными свойствами в миокарде, так как избыточная экспрессия IGF-I приводит к снижению накопления активных форм кислорода (АФК) и, как следствие, к уменьшению количества поврежденных белковых молекул, а также к подавлению апоптотических процессов в кардиомиоцитах [109]. Антиапоптотическое действие IGF-I было также показано в кардиомиоцитах эмбрионов рыб рода *Danio* с нарушенной экспрессией *tbx5* – гена, кодирующего фактор транскрипции, участвующий в регуляции процессов развития [110].

В основе роста тканей плода во время эмбрионального развития лежит митотическое деление клеток. IGF-II при этом является основным фактором, инициирующим такое деление у кардиомиоцитов в данный период развития [111–113]. Было продемонстрировано, что количество мРНК IGF-II в эмбриональной ткани желудочков намного выше, чем уровни IGF-I, также было показано, что экспрессия IGF-II в сердечной ткани снижается после рождения [113]. Процесс инициирования пролиферации кардиомиоцитов в эмбриональном периоде развития IGF-II запускает через взаимодействие с рецепторами IGF-системы: IGF-IR и INSR. Последующая передача сигнала от IGF приводит к активации сигнальных внутриклеточных путей ERK/MAPK и PI3K/Akt. Активированный участник пути

PI3K/Akt – Akt - способствует регуляции локализации в цитоплазме и инактивации FOXO-факторов, которые являются негативными регуляторами пролиферации миокарда [114]. По сути, это и является IGF-II опосредованным фактором, который инициирует пролиферацию кардиомиоцитов.

Стоит отметить, что несмотря на установленный в ряде работ факт экспрессии IGF-I и IGF-II в кардиомиоцитах [115], основным источником этих молекул в процессе развития сердца является наружная оболочка сердца - эпикард. IGF-I и IGF-II экспрессируются в эпикарде между 11.5 и 17.5 неделями развития эмбриона мыши. Секреция IGF-II эпикардом и дальнейшая передача сигнала через сигнальный путь ERK необходима для запуска процессов пролиферации кардиомиоцитов до момента установления коронарного кровообращения [111]. Изначально эпикардальная секреция IGF-II индуцируется циркулирующим в крови эритропоэтином (ЭПО). Показано, что при обработке культивируемых клеток ЭПО, экспрессия IGF-II повышается [116]. При этом Браде и соавторы предполагают, что источником ЭПО, необходимым для индукции IGF-II в эпикарде, служит печень. Также показано, что с 10 недели эмбрионального развития экспрессия эпикардального IGF-II перестает зависеть от ЭПО и начинает регулироваться под действием поступающих глюкозы и кислорода, связанным с транспортной функцией плаценты [117, 118].

4.3 IGF – связывающие белки

Инсулиноподобные факторы роста взаимодействуют с шестью представителями семейства IGF-связывающих белков IGFBP. В организме человека каждый из шести IGFBP (IGFBP-1 – IGFBP-6) кодируется определённым геном, однако у других позвоночных экспрессия определённого белка IGFBP может происходить с нескольких генов, или транскрипция некоторых генов IGFBP не осуществляется вовсе. Представители семейства IGFBP отличаются по своей структуре и выполняемым функциям несмотря на тот факт, что для них характерна высокая гомология аминокислотного состава. Такое различие в выполняемых

функциях внутри семейства связано с наличием определённых мотивов в их белковой структуре. В состав молекулы всех IGFBP входят консервативные N- и С- домены, которые содержат 12 и 6 аминокислотных остатков цистеина соответственно, соединённых дисульфидными связями, а также вариабельный линкерный домен. N-домен включает в себя IGF-связывающий мотив и, соответственно, участвует в связывании IGFBP с IGF. В линкерном домене обнаруживаются участки, необходимые для связывания с молекулами гепарина, также он содержит аминокислотные остатки, которые могут подвергаться посттрансляционным модификациям. Помимо этого, в линкерном домене могут находиться аминокислотные мотивы, являющиеся сайтами для протеолитического расщепления. С-домен имеет тиреоглобулиновый аминокислотный мотив и отвечает за связывание гепарина, а также может включать в себя сигнальную последовательность, необходимую для транспорта молекулы IGFBP в нуклеоплазму ядра (такая последовательность обнаруживается у IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-5 и IGFBP-6) (рис. 7) [85, 86].

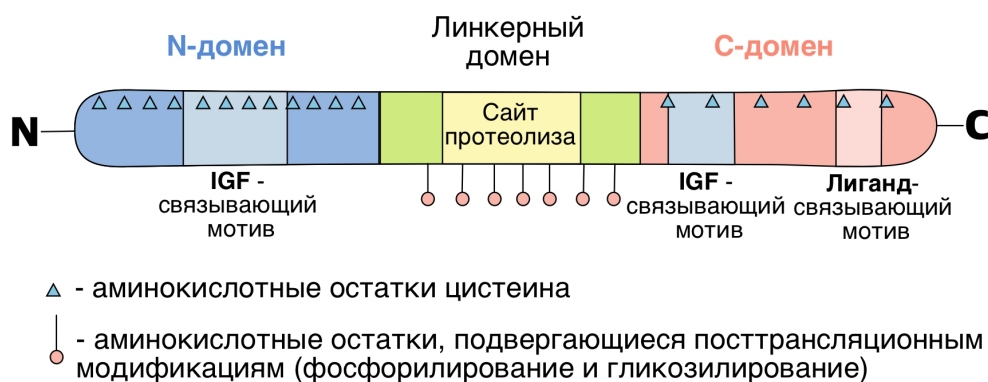


Рисунок 7. Доменная структура IGFBPs [76].

В сердечной мышце молекулы IGFBP преимущественно связаны с молекулами IGF [120]. Таким образом, молекулы IGFBP (в основном, IGFBP-3 и -5) участвуют в создании пула IGF в примембранном внеклеточном пространстве, доступного для рецепторов. Помимо этого, молекулы IGFBP (в основном IGFBP-1, -2 и -4) контролируют тканеспецифичный отток IGF и его распределение между рецепторами различных клеток. Далее будет рассмотрена роль каждого из представителей IGF-связывающих белков непосредственно в сердечной ткани.

4.3.1 IGFBP-1

IGFBP-1 кодируется геном, расположенным в геноме человека на 7 хромосоме, и экспрессируется в основном в клетках печени и почек. Белковая молекула IGFBP-1 имеет молекулярный вес 28 кДа. N- и C- концевые домены белка IGFBP-1 являются высоко консервативными и гомологичны таковым у других представителей семейства IGFBP. В центральном линкерном домене у IGFBP-1 обнаруживаются аминокислотные остатки, которые подвергаются пост-трансляционным модификациям, таким как частичный протеолиз и фосфорилирование. При этом активность IGFBP-1 регулируется как его фосфорилированием, так и его дефосфорилированием [121, 122].

К многочисленным функциям IGFBP-1 относится регуляция клеточной пролиферации, миграции и регуляция метаболизма глюкозы через активацию сигнальных путей интегрин-ILK/FAK/PTEN [123–125]. Так, например, было продемонстрировано, что IGFBP-1 способен улучшать чувствительность клеток к инсулину и его секрецию, а также поглощение глюкозы из кровяного русла посредством своего интегрин-связывающего домена RGD (Arg-Gly-Asp) [123]. Помимо этого, одним из эффектов передачи сигнала через интегриновый сигнальный путь является стимуляция процесса ангиогенеза через активацию киназы фокальной адгезии [126].

Регуляция экспрессии IGFBP-1, по всей видимости, происходит на транскрипционном уровне и является гормональной. Было показано, что высокий уровень инсулина в крови ассоциирован с, напротив, низкими концентрациями IGFBP-1 и наоборот. Критической концентрацией инсулина в крови, при которой происходит снижение количества IGFBP-1 является 90 пмоль/л [127]. В работах по обработке различными концентрациями инсулина изолированного сокращающегося сердца крысы было показано, что под воздействием инсулина IGFBP-1, как и IGFBP-2, способен переходить из кровяного русла в ткани сердца [128]. Помимо этого, в ряде работ показана независимость регуляции экспрессии

IGFBP-1 от метаболических и антропометрических факторов, равно как от диеты, а также была показана мультифакторность этой регуляции[129].

Несмотря на то, что на момент написания данной работы данные об экспрессии IGFBP-1 в сердце отсутствуют, ряд работ по изучению недостаточной экспрессии и оверэкспрессии IGFBP-1 в сердечной ткани позволяют заключить, что он важен в нормальном функционировании сердечно-сосудистой системы. Так, низкий уровень IGFBP-1 в плазме крови, как правило, ассоциирован с рисками заболеваний сердечно-сосудистой системы. Понижение уровня IGFBP-1 в крови рассматривают как потенциальный прогностический маркёр развития таких заболеваний человека, как диабет и острый коронарный синдром [130, 131]. Повышенная экспрессия IGFBP-1 приводит к увеличению синтеза оксида азота NO, являющегося вазодилататором, что, в свою очередь, приводит к улучшению функционирования эндотелия сосудов, включая и сосуды сердца. IGFBP-1-опосредованное увеличение синтеза NO связано с тем, что IGFBP-1 индуцирует фосфорилирование эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS) через PI3K/АКТ сигнальный путь [132, 133]. Также высокая концентрация IGFBP-1 в крови ассоциирована с антиатеросклеротическим действием [134]. При этом данные, полученные в работах на животных, дефицитных по IGFBP-1, указывают на то, что IGFBP-1 необходим для восстановления эндотелия сосудов в результате повреждений, но не является критически важным для метаболизма эндотелиальных клеток и физиологии сосудов [135].

4.3.2 IGFBP-2

IGFBP-2 кодируется геном, расположенным в геноме человека на второй хромосоме, имеет молекулярную массу 34 кДа и обнаруживается преимущественно в сыворотке крови плода. IGFBP-2, как и IGFBP-1, содержит в С-концевой части RGD-интегрин-связывающий домен, и, помимо этого, в его состав входят гепарин-связывающий домен (HBD) и последовательность ядерной локализации (NLS). Благодаря HBD IGFBP-2 взаимодействует с белками

внеклеточного матрикса, а NLS обеспечивает ядерную локализацию IGFBP-2 [136–138].

Показано, что IGFBP-2 экспрессируется во время эмбрионального развития в большом количестве и играет ключевые эндокринные, аутокринные и паракринные функции в процессах роста и развития. Однако, эксперименты по изучению эффектов от нарушенной экспрессии IGFBP-2 не показали его значимость для реализации вышеупомянутых процессов [139]. При этом при нарушении экспрессии IGFBP-2 наблюдается усиление экспрессии других представителей семейства IGFBP: IGFBP-1, IGFBP-3 и IGFBP-4. По всей видимости, это является компенсаторным механизмом в ответ на отсутствие и, соответственно, недостаток в организме IGFBP-2 [140, 141].

Среди эффектов в экспериментах по гиперэкспрессии IGFBP-2 у мышей наблюдалась сниженная масса тела, при этом масса внутренних органов оставалась неизменной. Этот результат позволяет заключить, что IGFBP-2 может выступать в качестве негативного регулятора постнатального роста. В экспериментах с мышами, дефицитными по IGFBP-2, было показано, что изменения массы тела не происходило, размер и морфология мозга были нормальными, в то время как были отмечены изменения размеров селезёнки и печени.

Количество IGFBP-2 в плазме крови, как и в случае с IGFBP-1, регулируется гормонально посредством инсулина. Концентрация IGFBP-2 в плазме крови обратно пропорциональна степени выраженности резистентности к инсулину, а результаты экспериментов по гиперэкспрессии IGFBP-2 указывают на его защитную роль в развитии ожирения и инсулиновой резистентности [142]. Помимо инсулина в регуляции концентрации IGFBP-2 могут участвовать такие факторы как онкосупрессоры PTEN (phosphatase and tensin) и p53, негативный регулятор сигнального пути Hh (hedgehog) – Ptch1 (Patched1), а также другие факторы [139].

Интересно, что IGFBP-2 был выделен в качестве достоверного диагностического маркера СН в ходе масштабного протеомного анализа [143]. Полученные данные подтверждаются рядом других работ, в которых было показано, что низкая концентрация IGFBP-2 ассоциировано с повышенным

уровнем маркёров риска ССЗ [105], а также было показано повышение экспрессии IGFBP-2 в лёгких у пациентов с лёгочной артериальной гипертензией [111].

4.3.3 IGFBP-3

IGFBP-3 кодируется геном, располагающимся в геноме человека на 7 хромосоме и имеет молекулярную массу 28,7 кДа. IGFBP-3 является самым распространённым представителем семейства IGFBP среди всех представителей позвоночных: подавляющая часть молекул IGF-I и IGF-II, которые обнаруживаются в плазме крови, связаны с IGFBP-3 [144]. IGFBP-3 взаимодействует с IGF-I и кислотно-лабильной субъединицей (ALS) с образованием тройного стабильного комплекса с массой 150 кДа и предотвращает дальнейший транспорт IGF-I в ткани [144]. N- и C- концевые домены IGFBP-3 консервативны, однако соединяющий их линкерный домен является наиболее переменным среди всех представителей семейства IGFBP. В нём содержатся аминокислотные остатки, подвергающиеся посттрансляционным модификациям, таким как гликозилирование, и фосфорилирование. Помимо этого, в линкерном домене находятся аминокислотные мотивы, которые являются сайтами для протеолитического расщепления молекулы. Также в этом домене обнаруживаются сайты для связывания с гепарином или глюкозаминогликаном (GAG). IGF-связывающие домены при этом обнаруживаются как в N-, так и в C-концевой областях молекулы IGFBP-3 [137, 145].

IGFBP-3 может осуществлять функции как зависимо, так и независимо от молекул IGF. К IGF-зависимым функциям IGFBP-3 относится транспорт IGF к мембранным рецепторам, при этом данная функция не является уникальной лишь для этого представителя семейства IGFBP. К IGF-независимым функциям IGFBP-3 относят его активность в качестве транскрипционного фактора в тандеме с ядерными рецепторами или РНК-полимеразой II, участие в репарации двуцепочечных разрывов ДНК, регуляцию апоптоза и многие другие. Данные функции IGFBP-3 реализуются благодаря его способности связываться с белками

внеклеточного матрикса и плазматической мембраны клеток и транслоцироваться в цитоплазму и в ядро. [145]. Эксперименты на мышах по изучению эффектов от повышенной экспрессии IGFBP-3 показали, что обнаруживается снижение веса, в то время как эксперименты с пониженной экспрессии IGFBP-3 сходных результатов не показали [146, 147].

IGFBP-3 экспрессируется в сердечной мышце как в норме, так и при патологических состояниях на уровне мРНК и белкового продукта. Показано, что как количество мРНК, так и количество белка IGFBP-3 в сердце выше, чем в печени в период внутриутробного развития по сравнению с постнатальным периодом. Интересно, что количество детектируемого IGFBP-3 у больных ишемической болезнью сердца выше, чем в случае сердечной гипертрофии или дилатационной кардиомиопатии [148]. Также показано, что уровень экспрессии IGFBP-3 увеличивается после трансплантации сердца [149]. Помимо этого на клеточной линии кардиомиоцитов H9C2 была показана взаимосвязь IGFBP-3 с гипоксическими условиями: уровень экспрессии IGFBP-3 возрастал [150]. В миокарде IGFBP-3 выполняет широкий спектр функций. Так, в клетках-предшественниках кардиомиоцитов он способен проявлять антипролиферативное действие [151]. Отдельного внимания заслуживает одновременно индукторная и супрессорная функция IGFBP-3 в процессах ангиогенеза [137]. Тот факт, что IGFBP-3 обладает супрессорным эффектом на процессы ангиогенеза, делает его перспективным терапевтическим агентом для терапии ряда онкологических заболеваний. При некоторых онкологических заболеваниях экспрессия IGFBP-3 способствует снижению ангиогенеза в очагах опухолевых образований. Это осуществляется благодаря тому, что IGFBP-3 при его высокой концентрации подавляет экспрессию фактора ангиогенеза VEGF [152]. Помимо этого, IGFBP-3 способен подавлять адгезию клеток эндотелия сосудов к внеклеточному матриксу, что является важным фактором для развития ангиогенеза и репарации эндотелия [153]. Проангиогенный эффект IGFBP-3 является IGF-зависимым и заключается в его способности запускать экспрессию определённых генов, которые ответственны за ангиогенез [154].

4.3.4 IGFBP-4

IGFBP-4 кодируется геном, располагающимся в геноме человека на 17 хромосоме, однако этот ген кодирует белок-предшественник IGFBP-4. Созревание IGFBP-4 заключается в ограниченном протеолизе и отщеплении сигнального пептида. Зрелый IGFBP-4 состоит из 237 аминокислотных остатков, что делает его самым маленьким среди всех представителей семейства IGFBP.

Как и у других представителей семейства IGFBP, N- и C-концевые домены IGFBP-4 соединены линкерным участком, который содержит аминокислотный мотив, являющийся сайтом для расщепления его молекулы с помощью металлопротеазы PAPPA (Pregnancy Associated Plasma Protein A, белок, ассоциированный с беременностью A). Помимо этого, линкерный участок содержит аминокислотный остаток Asn104, который подвергается гликозилированию, а также два дополнительных аминокислотных остатка цистеина. При этом примерно половина всего пула IGFBP-4 в плазме крови гликозилирована [1, 10]. IGFBP-4 синтезируется преимущественно в печени, однако мРНК гена *IGFBP4*, как и его белковый продукт, детектируются в гладких мышцах, лёгких, яичниках, почках, сердце и других органах [1, 155].

В отличие от других IGFBP, основной функцией IGFBP-4 является регуляция биодоступности IGF для их специфических рецепторов, в особенности IGF-II. В том случае, если IGFBP-4 и IGF связаны, последний не способен взаимодействовать с рецепторами и, соответственно, запускать внутриклеточные этапы передачи сигнала. Протеолитическое расщепление IGFBP-4 является основным условием для высвобождения IGF, его связывания с рецептором и дальнейшей передачи сигнала посредством молекулярных сигнальных путей внутри клетки. Такие молекулярные пути регулируют миграцию, пролиферацию и другие регенеративные клеточные процессы [156]. IGFBP-4 играет важную роль в регуляции роста и деления клеток. В эксперименте по оверэкспрессии IGFBP-4 в различных тканях у мышей была показана гипоплазия этих тканей: замедление

роста тимуса, желудка, мочевого пузыря, а также уменьшение массы гладкомышечной и костной тканей [157]. Однако, ряд исследований позволяет заключить, что IGFBP-4 может играть и обратную роль и выступать в качестве позитивного регулятора роста клеток и тканей [158]. Постоянные инъекции IGFBP-4 мышам в надкостницу правой теменной кости приводило к повышению концентрации щелочной фосфатазы и остеокальцина, экспрессирующихся остеобластами, и являющихся специфичными и необходимыми для формирования костной ткани [159]. Кроме этого, у мышей с нарушенной экспрессией IGFBP-4, наблюдалось отставание в росте на 10-15% по сравнению с контрольной группой [160].

В сердечной ткани IGFBP-4 является важным фактором, необходимым для регенерации ткани независимо от присутствия IGF. Было продемонстрировано, что IGFBP-4 усиливает дифференцировку кардиомиоцитов *in vitro*, в то время как его отсутствие замедляет этот процесс *in vitro* и *in vivo*. Регуляция данного процесса происходит через Wnt-сигнальный путь. Молекулы IGFBP-4 взаимодействуют с Wnt-рецепторами, что приводит к блокировке последних [161]. В 2012 году А.Б. Постников и соавторы показали, что протеолитические фрагменты IGFBP-4, образующиеся в результате протеолитической активности RAPP-A, являются молекулярными прогностическими биомаркерами риска развития ССЗ, таких как острая сердечная недостаточность, при этом количество фрагментов пропорционально степени развития заболевания. Также в ряде работ была исследована диагностическая и прогностическая роль протеолитических фрагментов IGFBP-4 [10, 11, 87, 162], которая будет подробно рассмотрена нами в разделе «Роль IGF-системы в развитии патологических состояний сердечной ткани».

4.3.5. IGFBP-5

IGFBP-5 имеет молекулярную массу 28,6 кДа и, как и IGFBP-3, образует тройной комплекс с молекулами IGF и ALS. Белковая молекула IGFBP-5 состоит

из трёх доменов: высококонсервативный N-домен, неструктурированный петлеобразный линкерный домен и C-концевой структурированный домен, содержащий, в частности, тиреоглобулиновый повтор типа I. Помимо структурных элементов, описанных выше, в структуре молекулы IGFBP-5 присутствует IGF-связывающий домен, сайт протеолитического расщепления, сигнальная последовательность для ядерной локализации (nuclear localization signal - NLS), а также ALS-связывающий мотив для взаимодействия с внеклеточным матриксом [163].

Впервые IGFBP-5 обнаружили и выделили в чистом виде из экстрактов костной ткани, а также из культуры клеток остеосаркомы человека [164, 165]. На данный момент экспрессия IGFBP-5 показана, например, в тканях лёгких, костей, мышц, почек, половых желёз. В некоторых тканях регуляция экспрессии IGFBP-5 происходит посредством гормональной системы. Так, у мышей в этом может участвовать гормон пролактин или паратгормон в остеобласт-подобных клетках. Однако, иногда экспрессия IGFBP-5 происходит конститутивно, то есть постоянно на определённом уровне [163]. Помимо описанного выше механизма гормональной регуляции экспрессии IGFBP-5, контроль экспрессии может происходить посредством РНК-интерференции на пост-транскрипционном уровне посредством с помощью микроРНК [166, 167]. Молекула IGFBP-5 может подвергаться посттрансляционным модификациям, среди которых известно фосфорилирование по некоторым аминокислотным остаткам серина. Такое фосфорилирование приводит к снижению сродства IGFBP-5 к гепарину, но не к молекулам IGF. Помимо фосфорилирования IGFBP-5 может подвергаться протеолитическому расщеплению. Такой тип модификаций в некоторых случаях препятствует связыванию IGFBP-5 с IGF [168]. IGFBP-5 способен связываться с внеклеточным матриксом, что влияет на активность этого представителя семейства IGFBP. Например, связывание IGFBP-5 с поверхностью клеточной мембраны фибробластов стимулирует клеточный рост IGF-зависимым способом, так как таким образом IGFBP-5 привлекает молекулы IGF-I [169]. Также в некоторых случаях элементы внеклеточного матрикса могут активировать экспрессию IGFBP-

5, как это схожим образом происходит в случае фибронектина клеток гладких мышц у свиней [170].

В работах на мышцах по изучению эффектов от гиперэкспрессии IGFBP-5 было показано снижение роста тела и в пренатальном, и в постнатальном периоде развития, высокая неонатальная смертность, снижение фертильности самок и уменьшение массы скелетных мышц приблизительно на 30% [171]. Эти экспериментальные данные хорошо согласуются с представлением о том, что IGFBP-5 ингибирует IGF-сигнальный путь. При недостатке IGFBP-5 у мышей значительных изменений в морфологии не было показано. Этот факт, по всей видимости, связан с наличием компенсаторного механизма, который работает за счёт присутствия других представителей семейства IGFBP [172]. На фоне ССЗ показана положительная корреляция уровня IGFBP-5 в плазме крови [173]. Также показано, что подкожная инъекция IGFBP-5 значительно замедляла рост аденокарциномы и уменьшало количество кровеносных сосудов у мышей по сравнению с контрольной группой. По всей видимости, такая анти-ангиогенная активность опосредована ингибированием PI3K/AKT сигнального пути [174].

4.3.6. IGFBP-6

Молекулярная масса IGFBP-6 составляет 22,8 кДа, однако этот представитель семейства IGFBP подвергается гликозилированию. Данная модификация увеличивает молекулярную массу IGFBP-6 до 34 кДа [175]. Строение белковой молекулы IGFBP-6 - типичное для представителей семейства IGFBP. Однако, стоит отметить, что в составе молекулы IGFBP-6 присутствует 5, а не 6 дисульфидных связей в N-концевом домене. Помимо этого, IGFBP-6 имеет в своем составе последовательность NLS, а также большое количество сайтов гликозилирования в линкерном участке.

IGFBP-6 способен связываться с IGF-II, при этом такое взаимодействие происходит в 50 раз эффективнее, по сравнению с IGF-I [176]. Связывание IGFBP-6 с IGF-II по сути является важной IGF-опосредованной функцией IGFBP-6, так как

при таком связывании IGF-II оказывается не доступен для рецепторов на поверхности клеток. Это, в свою очередь, негативно влияет на регуляцию пролиферации, миграции и дифференцировки клеток [177]. Ввиду того, что IGFBP-6 преимущественно связывается с IGF-II, IGFBP-6 не оказывает эффекта на IGF-I-опосредованные процессы.

Регуляция экспрессии IGFBP-6 может происходить на транскрипционном уровне: промотор гена IGFBP-6 обладает регуляторными элементами, которые могут контролироваться при гипоксии. В пользу этого говорит факт увеличения количества IGFBP-6 после гипоксии в эндотелиальных клетках сосудов [178]. Однако, регуляция экспрессии IGFBP-6 может происходить не только на транскрипционном уровне. Показано, что *in vitro* экспрессия IGFBP-6 может происходить посредством таких молекулярных факторов, как cAMP, IGF, витамин D, p53, ретиноевая кислота и глюкокортикоиды [178]. Стоит отметить, что детектируемое количество IGFBP-6 в плазме крови оказывается выше у мужчин, чем у женщин, и увеличивается с возрастом в независимости от пола, при этом у женщин во время беременности уровень IGFBP-6 заметно снижается [180].

IGFBP-6 имеет большое количество функций: от участия в работе иммунной системы до регуляции фиброза и опухолеобразования [181]. Также известно, что IGFBP-6 принимает участие в регуляции функционирования соединительной ткани и фиброза. Помимо этого, известно участие IGFBP-6 в фиброзе сердца. Показано, что IGFBP-6 участвует в развитии патологических состояний сердечно-сосудистой системы, сопровождающихся развитием фиброза, таких как острый инфаркт миокарда и формирование атеросклеротических бляшек. В атеросклеротической бляшке молекулы IGFBP-6 обнаруживаются в эндотелиальных клетках CD31⁺ и в макрофагах CD68⁺ [182].

4.4. Специфические протеазы, расщепляющие IGF-связывающие белки.

Регуляция биодоступности IGF за счет активности IGF-связывающих белков и различных протеаз

Инсулиноподобные факторы роста (IGF) оказывают широкий спектр эффектов на такие клеточные процессы в тканях организма, как клеточный рост, поддержание жизнеспособности клеток, а также их дифференцировку. Основным регуляторным механизмом активации IGF сигнального пути в тканях организма является обеспечение биодоступности IGF для их клеточных рецепторов. Данный процесс может регулироваться посредством высвобождения лигандов (IGF) и с помощью связывания IGF с белками IGFBP. Процесс высвобождения IGF из комплекса IGF-IGFBP происходит под действием протеаз, которые протеолитически расщепляют IGFBP. При расщеплении IGFBP происходит высвобождение IGF и, соответственно, повышение биодоступности IGF. В следствие этого IGF может связываться со специфичными мембранными рецепторами на поверхности клеток. При этом степень аффинности между IGFBP и IGF, как правило, не отличается или превышает таковую для IGF и их рецепторов. Из-за того, что IGFBP находятся в молярном избытке по отношению к IGF, практически весь пул IGF оказывается в связанной форме с IGFBP и в свободной форме IGF в плазме содержится менее 1% от его общего количества. Также регуляция биодоступности IGF для их рецепторов происходит посредством посттрансляционных модификаций IGFBP (фосфорилирование, гликозилирование и т.д.), которые меняют стабильность IGFBP или его аффинность [144, 183].

Протеолитическое расщепление в линкерном домене качестве посттрансляционной модификации известно для всех 6 представителей семейства IGFBP [184, 185]. Для различных представителей IGFBP показан целый ряд расщепляющих их специфических протеаз [1, 186], однако далеко не все из них идентифицированы на данный момент. В рамках данного раздела будут упомянуты лишь некоторые протеазы, субстратом для которых являются молекулы IGFBP.

Единственной известной на данный момент протеазой, способной расщеплять все типы IGFBP *in vitro* является матриксная металлопротеаза-7 [187]. В результате действия данной протеазы IGFBP-1 расщепляется и образуется два протеолитических фрагмента массой 12 и 19 кДа. Такое протеолитическое расщепление IGFBP-1 показано в амниотической жидкости плода, в результате

чего IGFBP-1 теряет способность связывать IGF-1. [188]. Помимо этого, нефосфорилированная форма IGFBP-1 подвергается протеолизу посредством протеазы клеток децидуальной оболочки [189]. IGFBP-2 подвергается протеолитическому расщеплению, например, под действием протеазы ADAMTS1 (A Disintegrin And Metalloproteinase with ThromboSpondin motifs 1 или дезинтегрин и металлопротеиназа (ADAM-протеаза), содержащая мотив тромбоспондина 1). Детекция такой субстрат-ферментной пары была осуществлена при исследовании IGFBP-2 в качестве маркера глиомы [190]. Показано, что протеолиз IGFBP-3 активно происходит во время беременности и в плазме крови беременных женщин IGFBP-3 детектируется по большей части в виде протеолитических фрагментов [191], при этом такие протеолитические фрагменты не являются непосредственным маркером беременности [192]. Среди протеаз, субстратом которых является IGFBP-3, известны, например, матриксная металлопротеаза 3 (MMP3) [145], сериновая протеаза семенной жидкости [193], катепсин-D-подобная протеаза [194] и многие другие. IGFBP-5 также подвергается протеолизу под действием таких протеаз, как тромбин [170], катепсин-G, эластаза [195] и многих других. *In vitro* исследования в кондиционированной среде фибробластов кожи по изучению протеолитического расщепления IGFBP-5 показывают, что связывание IGFBP-5 с гликозаминогликанами плазматической мембраны клеток защищает его от протеолитической деградации [196]. Среди протеаз, расщепляющих IGFBP-6 в организме, выделяют катепсин-D-подобную кислотоактивируемую протеазу [194], нейтральную сериновую протеазу [197], а также MMP-7, MMP-9 и MMP-12 [198, 199].

4.4.1 Протеаза PAPP-A

Помимо рассмотренных выше протеаз существует ещё большое количество других, способных расщеплять молекулы представителей семейства IGFBP, однако в рамках данной работы особый интерес представляют матриксные металлопротеазы PAPP-A (ассоциированный с беременностью белок плазмы А) и

РАРР-А2 (ассоциированный с беременностью белок плазмы А2). РАРР-А и РАРР-А2 осуществляют протеолитическое расщепление белка IGFBP-5 по одинаковому сайту [200]. Помимо IGFBP-5 протеаза РАРР-А также способна осуществлять расщепление молекул IGFBP-2 и IGFBP-4, в то время как РАРР-А2 протеолитически расщепляет IGFBP-3. Стоит отметить, что РАРР-А-опосредованное расщепление молекул IGFBP-2 и IGFBP-4 происходит активнее в присутствии IGF-I или IGF-II, при этом РАРР-А2-опосредованное расщепление IGFBP-3 и IGFBP-5 происходит эффективно в независимости от IGF, однако присутствие IGF способно ускорять реакцию. *In vivo* молекулы IGFBP-4 расщепляются РАРР-А, при этом данная протеаза является одной из немногих подробно описанных и изученных среди тех протеолитически активных ферментов, субстратом которых является IGFBP-4 [156]. При этом протеолитически активным РАРР-А является в случае образования гомодимера, прикреплённого к глюкозаминогликанам внеклеточного матрикса [8].

Специфический протеолиз IGFBP-4 под действием РАРР-А осуществляется в линкерном домене IGFBP-4 между Met-135 и Lys-136. При этом образуются два протеолитических фрагмента IGFBP-4: N-концевой (NT-IGFBP-4) и С-концевой (СТ-IGFBP-4) [201]. Однако, NT-IGFBP-4 и СТ-IGFBP-4, по всей видимости, не обладают какой-либо функцией в организме [202].

Структура каталитического домена РАРР-А включает в себя скрученный β -лист из 4 параллельных цепей, расположенный поверх четырёх α -спиралей. В каталитическом домене обнаруживаются 14 остатков цистеина, 12 из которых формируют 6 дисульфидных связей, а 2 остальных (С461 и С600) остаются неспаренными. Активный центр РАРР-А в каталитическом домене находится перед центральной α -спиралью под β -листом. В состав активного центра входят аминокислотные остатки гистидина, которые образуют координационные связи с ионом цинка. Для правильной ориентации иона цинка в активном центре также присутствует канонический аминокислотный остаток метионина, образующий поворот полипептидной цепи. Помимо этого, в каталитическом домене присутствуют два из трёх повторов LNR (Lin12-Notch). Данные повторы

необходимы для связывания с ионами Ca^{2+} , при этом интересно, что в отсутствии Ca^{2+} PAPP-A теряет способность расщеплять IGFBP-4, но не IGFBP-5 [203]. Этот феномен может быть связан с тем, что IGFBP-5 взаимодействует с активным центром PAPP-A посредством якорного пептида длиной 25 аминокислот, который обнаруживается только у IGFBP-5, но не у других субстратов PAPP-A [204].

Акты протеолитического PAPP-A-опосредованного расщепления IGFBP-4 происходят по большей части на поверхности клетки. В нашей лаборатории на моделях первичных культур неонатальных кардиомиоцитов, а также на культурах кардиомиоцитов человека, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) было впервые показано, что PAPP-A способен расщеплять IGFBP-4 в сердечной ткани. Стоит отметить, что такое расщепление происходит как на поверхности клеток, так и в кондиционированной среде. Ввиду того, что IGFBP-4 связывается с IGF, PAPP-A-опосредованное расщепление IGFBP-4 и, как следствие, потеря его функции, как IGF-связывающего белка, приводит к накоплению IGF около внешней стороны мембраны кардиомиоцитов что способствует аутокринной и паракринной регуляции нормального состояния сердечной ткани [87, 205]. Однако, PAPP-A не является единственной протеазой, способной расщеплять IGFBP-4. Показано, что такой функцией обладают металлопротеазы матрикса (MMP), такие как MMP-2, MMP-7 и MMP-9 [187, 206].

Результаты последних исследований указывают на активацию PAPP-A-специфичного протеолиза IGFBP-4 в сердечной ткани при различных сердечно-сосудистых патологиях, речь об этом пойдёт в следующих разделах. Стоит отметить, что изучение протеолитического расщепления IGFBP и напрямую связанная с этим регуляция IGF-сигнального пути является перспективным направлением по поиску новых биомаркеров не только сердечно-сосудистых, но и других заболеваний.

4.4.2 Рецепторы IGF-системы

В состав IGF-сигнальной системы, как было сказано в предыдущих разделах, входят лиганды, клеточные рецепторы, лиганд-связывающие белки и протеазы. Для реализации своей сигнальной функции инсулиноподобные факторы роста IGF специфически взаимодействуют с мембранными рецепторами, в результате чего начинается внутриклеточная передача сигнала. Так, IGF-I связывается с несколькими мембранными рецепторами, основным из которых является рецептор IGF-1R. Этот рецептор принадлежит к семейству тирозинкиназных рецепторов и представляет собой гетеротетрамер ($\alpha_2\beta_2$), имеющий молекулярную массу около 400 кДа. При этом α - и β -субъединицы имеют разную топологию. Так, обе α -субъединицы обнаруживаются во внеклеточном пространстве и непосредственно отвечают за связывание лиганда, а две β -субъединицы располагаются в мембранном бислое, заякоривая таким образом всю молекулу рецептора в мембране. Внутриклеточные домены β -субъединиц для осуществления функции дальнейшей передачи сигнала обладают тирозинкиназной активностью. После связывания лиганда с рецептором происходит аутофосфорилирование последнего, а затем фосфорилирование аминокислотных остатков тирозина последующих участников сигнальных каскадов. Таким образом происходит передача сигнала от IGF-I внутрь клетки. Интересным является факт обнаружения IGF-1R в ядерной фракции клеток. Это позволяет сделать заключение, что данный рецептор может присутствовать в мембране ядра. Более того, этот рецептор был обнаружен в мембране Т-трубочек неонатальных кардиомиоцитов. Все эти данные говорят в пользу того, что IGF-1R способен регулировать процессы, которые происходят в различных клеточных компартментах [108]. IGF-1R является не единственным рецептором, с которым связываются молекулы IGF-I. Так, например, среди рецепторов IGF-I стоит отметить INSR (инсулиновый рецептор). Оба этих рецептора имеют гетеротетрамерное строение и сходные пути передачи сигнала внутрь клетки. Более того, высокое сходство IGF-1R и INSR позволяет им формировать гибридные рецепторы, которые имеют в своём составе субъединицы и IGF-1R, и INSR, при этом лигандами для таких гибридных рецепторов могут являться молекулы не только IGF-I, но и IGF-II [207]. Третьим рассмотренным

здесь рецептором IGF-системы является IGF-2R, у которого по сравнению с IGF-1R отсутствуют тирозинкиназные домены. При взаимодействии IGF-II с IGF-2R происходит эндоцитоз лиганд-рецепторного комплекса. С помощью данного механизма IGF-2R уменьшает количество доступного IGF-II, что, в свою очередь, негативно влияет на активность IGF-сигнального пути [207]. При этом IGF-2R способен передавать сигнал через гетеротримерные G-белки. Такой тип передачи сигнала активирует протеинкиназу C- α , Ca^{2+} -кальмодулин-зависимую протеинкиназу II, а также MAP-киназу (ERK), белковые факторы, участвующие в развитии гипертрофии миокарда [208, 209].

5. Роль IGF-сигнального пути в развитии патологических процессов в миокарде

5.1 Физиологическая и патологическая гипертрофия

Несмотря на тот факт, что и IGF-I, и IGF-II играют важную роль одновременно в эмбриональном развитии сердца и в поддержании его нормальной работы в постнатальном периоде развития, преобладающую роль в развитии сердца играет IGF-II. Показано, что уровень мРНК *IGF-II* в тканях желудочков сердца значительно превышает таковой для мРНК для IGF-I. При этом с началом постнатального периода развития экспрессия IGF-II снижается вплоть до количеств, которые не детектируются. Как было сказано в предыдущих разделах обзора литературы данной работы, именно IGF-II выступает в роли основного молекулярного фактора, который стимулирует митотическое деление клеток в процессе зародышевого развития. Молекулярные эффекты IGF-II связаны с взаимодействием с тирозинкиназными рецепторами IGF-1R и INSR (рис.8). Дальнейшая передача сигнала приводит к активации сигнальных путей ERK/MAPK и (PI3K)/Akt. Показано, что активация сигнального пути (PI3K)/Akt в сердце способствует развитию сердечной гипертрофии и дисфункции миокарда. Наблюдаемые эффекты достигаются благодаря тому, что Akt инактивирует

факторы Forkhead box O (FOXO: FOXO1 и FOXO3). Инактивация происходит вследствие Akt-опосредованного фосфорилирования белковых факторов FOXO, это приводит к транслокации FOXO в цитоплазму, что, в свою очередь, снижает их транскрипционную активность. Снижение транскрипционной активности негативно влияет на процесс пролиферации миокарда. Помимо Akt сходный эффект на FOXO осуществляется благодаря активности фактора сигнального MAPK киназы ERK. Как было сказано выше, FOXO являются транскрипционными факторами. Эти транскрипционные факторы связываются с промоторами генов, которые ассоциированы с процессами аутофагии в кардиомиоцитах. FOXO1 и FOXO3 являются антигипертрофическими факторами. Так, FOXO3 поддерживает нормальный размер кардиомиоцитов, ингибируя их рост и способствуя развитию аутофагических процессов. Также этот транскрипционный фактор активировывает гены, ассоциированные с работой антиоксидантной системы. Помимо этого, FOXO3 позитивно влияет на экспрессию малой некодирующей РНК miR-1m, которая снижает количество IGF-I [210]. В экспериментах по IGF-индуцированной гипертрофии миокарда было показано, что FOXO3 активирует экспрессию белка Atrogin-1, что вызывает значительное уменьшение размера кардиомиоцитов сердца *in vivo* [211]. Среди мишеней Akt-посредованной регуляции помимо FOXO происходит регуляция белков Bcl-2, BAD, GSK-3 β [212]. Bcl-2 (B cell lymphoma-2), например, известен как регулятор апоптоза, при этом этот белковый фактор способен как индуцировать, так и подавлять процесс апоптоза. При этом как подавление активности сигнального пути (PI3K)/Akt, так и селективное ингибирование Bcl-2 препятствуют развитию гипертрофии в сердечной ткани [213]. BAD, относящийся к тому же семейству, что и Bcl-2, является проапоптотическим фактором. BAD способен фосфорилироваться посредством активности сигнального пути (PI3K)/Akt. Фосфорилирование BAD приводит к его взаимодействию с другими белками, что, в свою очередь, способствует развитию подавлению активности Bcl-2 и Bcl-x_L. [214]. Схожим образом сигнальный путь (PI3K)/Akt влияет на GSK-3 β (Glycogen synthase kinase 3 β). Фосфорилирование (PI3K)/Akt подавляет её активность. В результате подавление активности GSK-3 β

происходит изменение активности транскрипционных и трансляционных факторов в миокарде, что также приводит к развитию гипертрофии [215].

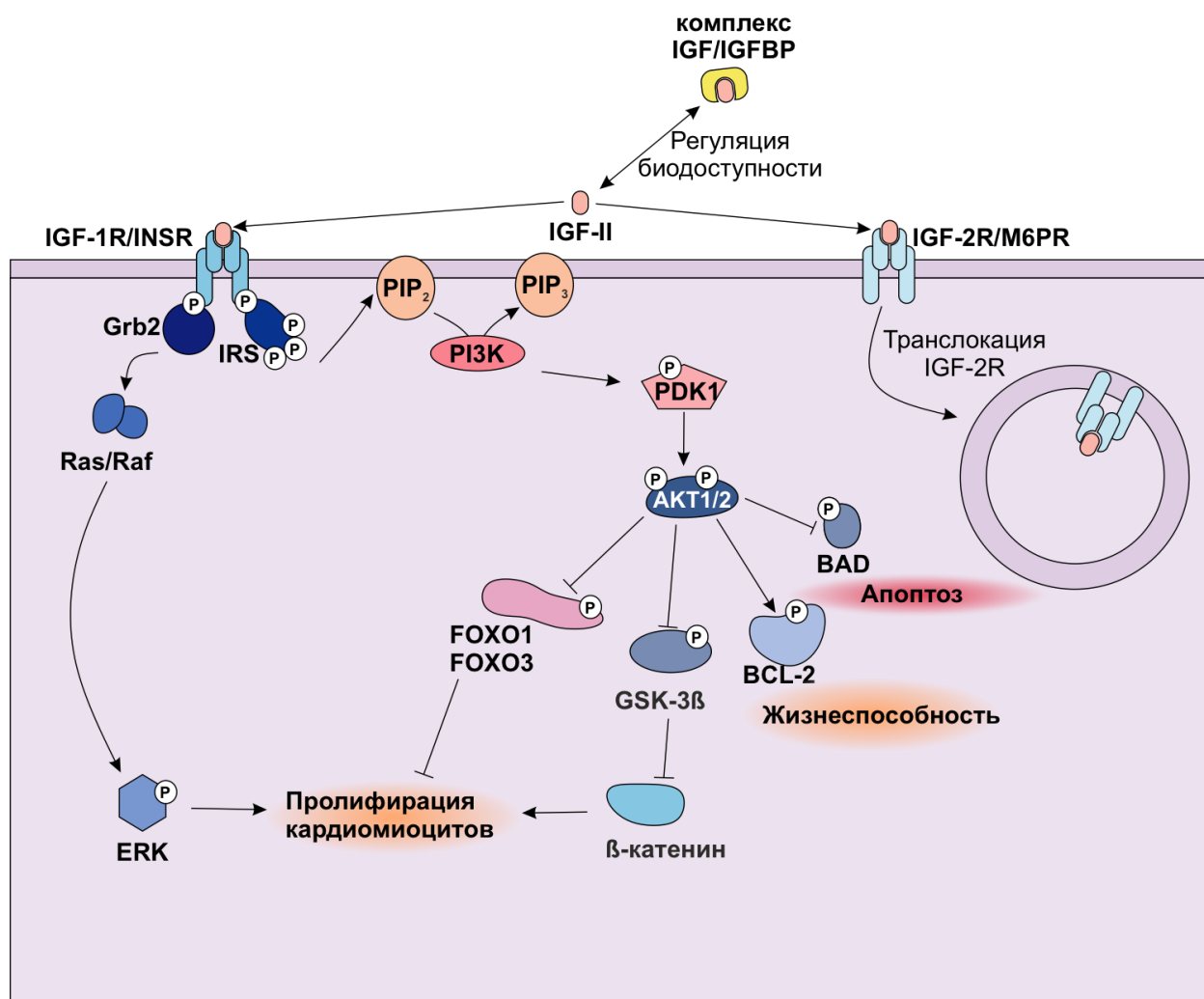


Рисунок 8. Основные участники сигнальных каскадов, запускаемых IGF-II и вызываемые ими эффекты [76]. Grb2 – белок 2, связанный с рецептором фактора роста, ERK – внеклеточная сигнал-регулируемая киназа, IRS – субстрат инсулинового рецептора, PIP₂ – фосфотидилиназитол-2-фосфат, PI3K – липидные киназы, фосфорилирующие 3-гидроксильную группу фосфоинозитола и фосфоинозитидов, PIP₃ – фосфотидилиназитол-3-фосфат, PDK – киназа пируватдегидрогеназы 1, AKT1/2 – серин-треониновая протеинкиназа B alpha/beta, FOXO – Forkhead box O факторы, BCL-2 – регулятор апоптоза В-клеточной лимфомы-2, BAD – агонист белка клеточной гибели, связанный с BCL-2, GSK-3β – киназа гликогенсинтазы 3β. Описание в тексте.

При взаимодействии IGF-I с соответствующими рецепторами происходит регуляция ряда процессов в сердечной ткани, среди которых можно отметить сократимость, метаболизм, гипертрофию, аутофагию, апоптоз и другие. Данная регуляция происходит в результате связывания IGF-I с его мембранным рецептором IGF-1R. В результате происходит дальнейшая передача сигнала в кардиомиоцитах. На начальных стадиях внутриклеточной передачи сигнала происходит аутофосфорилирование рецептора и фосфорилирование остатков тирозина ряда субстратов. Стоит отметить, что с IGF-1R способен связываться как IGF-I, так и IGF-II, вследствие чего многие сигнальные пути, в которых участвуют эти лиганды, пересекаются. Например, при активации сигнального пути (PI3K)/Akt, как было сказано выше, происходит подавление транскрипционных факторов FOXO. Также сигнальный путь (PI3K)/Akt посредством активации протеинкиназы Akt активирует белок mTOR (mammalian target of rapamycin), среди функций которого стоит отметить повышение белкового синтеза и подавление аутофагии. Регуляцию синтеза белков mTOR осуществляет посредством фосфорилирования белкового фактора, который способен связывать три изоформы эукариотических факторов инициации трансляции (eIF4E) – 4E-BP – и две изоформы киназы S6 (S6K). Стоит отметить, что *in vivo* mTOR находится в виде двух функционально различных комплексов: mTORC1 и mTORC2. В норме mTORC1 необходим для развития сердечно-сосудистой системы в эмбриогенезе и для постнатального поддержания структуры и функций сердечной ткани. Одновременно с этим подавление активности mTORC1 препятствует развитию патологической гипертрофии и повышает устойчивость кардиомиоцитов к стрессу, вызванному старением. Активность mTOR была исследована у мышей на фоне заболевания LEOPARD, названным на основе аббревиатуры, обозначающей основные особенности этого расстройства: множественные лентиго (L), нарушения проводимости ЭКГ (E), глазной гипертелоризм (O), стеноз легочной артерии (P), аномалии гениталий (A), задержку роста (R) и нейросенсорную глухоту (D). На фоне заболевания LEOPARD у мышей неконтролируемо возрастает активность

mTOR, а ингибирование mTOR рапамицином полностью нивелирует возникшее гипертрофированное состояние сердечной мышцы [216]. Также mTORC1 способен фосфорилировать белок ULK, ингибируя его активность, заключающуюся в деградации белков и органелл при аутофагии [217].

Рецептор IGF-1R передаёт сигнал внутри клетки посредством двух канонических сигнальных путей: (PI3K)/Akt и ERK (рис.9). Помимо этого, известно, что передача сигнала может происходить и с помощью неканонический для IGF-сигналинга пути, который происходит через G-белки. В частности, было показано, что некоторые эффекты IGF-I ингибируются блокатором гетеротримерных Gi белков – Petrussis toxin (PTX), или коклюшный токсин – в некоторых клеточных линиях. Эти результаты говорят в пользу того, что активность IGF-1R в передаче внутриклеточного сигнала связана с Gi-белками. Помимо этого, для IGF-1R показана физическая ассоциация с представителями семейства G-белков $G_{\alpha i}$ и G_{β} . Степень такой ассоциации увеличивается в результате взаимодействия с IGF-1R молекулы IGF-I. Эффектом от передачи сигнала через G-белки, в свою очередь, является активация мембранной фосфолипазы C (PLC). PLC увеличивает количество инозитол 1, 4, 5 – трифосфата, такое увеличение приводит к регуляции транскрипции, опосредованной Ca^{2+} [108].

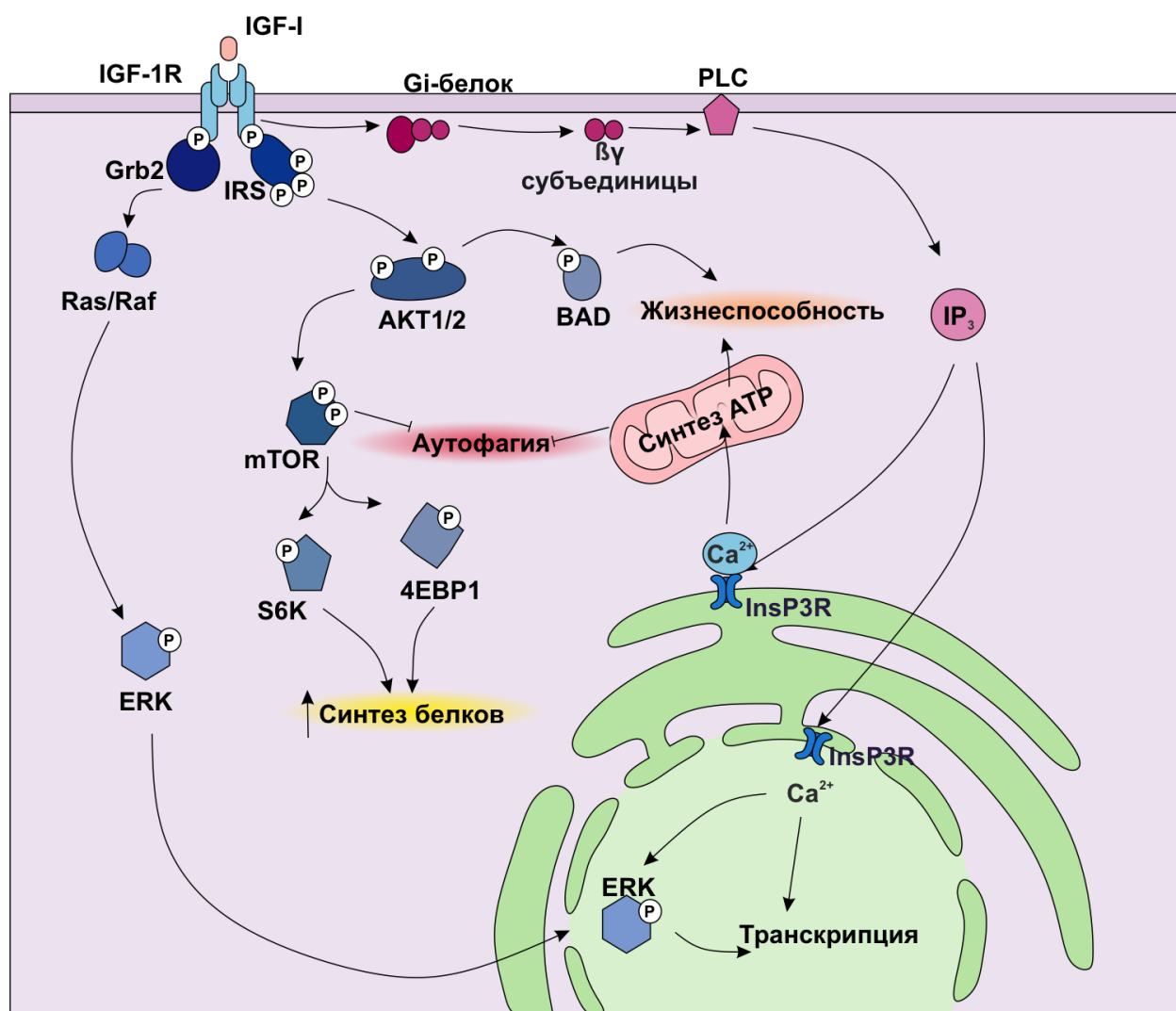


Рисунок 9. Канонические (выделены синим цветом) и неканонический (выделен красным цветом) пути передачи сигнала от IGF-I через IGF-1R рецептор [76]. Grb2 – белок 2, связанный с рецептором фактора роста, ERK – внеклеточная сигнал-регулируемая киназа, IRS – субстрат инсулинового рецептора, AKT1/2 – серин-треониновая протеинкиназа B alpha/beta, BAD – агонист белка клеточной гибели, связанный с BCL-2, mTOR – серин-треониновая протеинкиназа (mechanistic target of rapamycin) 4EBP1 – белок, связывающий три изоформы эукариотических факторов инициации трансляции, S6K – изоформа киназы S6, PLC – фосфолипаза C, IP₃ – инозитол-1,4,5-трифосфат, InsP3R – инозитолтрифосфатный рецептор. Описание в тексте.

Развитие и дальнейшее поддержание нормальной работы сердечно-сосудистой системы находится под контролем большого количества молекулярных

сигнальных путей. При этом каждый из таких путей тонко регулируется, а нарушение регуляции ведёт к серьёзным негативным последствиям, среди которых можно выделить гипертрофию, а также другие патологические состояния. В миокарде можно индуцировать гипертрофию с использованием таких молекулярных факторов, как ангиотензин-II, эндотелин-I, норадреналин, IGF-I и другие. При этом в развитии физиологической гипертрофии миокарда основную роль играет сигнальный путь IGF-I/PI3K/Akt. Так, у мышей с пониженной активностью сигнального пути IGF-I/PI3K/Akt наблюдается нормальный или уменьшенный размер сердца, а также сниженный гипертрофический ответ при физической нагрузке. В экспериментах на мышах по изучению эффектов от повышенной активности IGF-I/PI3K/Akt было показано, что размер сердца оставался в пределах нормы, как и гипертрофический ответ на физическую нагрузку. Помимо этого отмечалась высокая устойчивость к инфаркту миокарда, дилатационной кардиомиопатии и развитию артериальной гипертензии [218]. В предыдущих разделах обзора литературы было отмечено, что в результате нарушения активности FOXO, mTOR, Bcl-2 происходит развитие патологической гипертрофии. Помимо сигнального пути IGF-I/PI3K/Akt, рассматриваемого в качестве главного фактора в развитии физиологической гипертрофии, также в этом процессе может участвовать сигнальный путь ERK. Так, например, путь ERK активируется на фоне ранней адаптивной концентрической гипертрофии, однако такая активация снижается при поздней деструктивной эксцентрической гипертрофии (компенсаторная гипертрофия миокарда, при которой происходит утолщение стенки миокарда с дилатацией сердечной полости). Показано, что сигнальный путь ERK способен активироваться через рецепторы, которые связаны с G-белками. При этом такая активация происходит на фоне повышенного давления. Так, в экспериментах на мышах, которые были мутантны по одному из компонентов ERK сигнального пути, обнаруживалась повышенная чувствительность к повышенному давлению, при этом не происходило развития гипертрофического ответа в ответ на поперечное сужение аорты. Таким образом, понижение активности ERK-сигнального каскада ассоциировано с

трансформацией от компенсаторной к патологической гипертрофической сердечной недостаточности при избыточном давлении и роль ERK в этом процессе заключается в предотвращении эксцентричного роста миокарда [219]. По всей видимости, помимо описанных выше эффектов сигнальный путь ERK участвует также в транспорте IGF-2R через мембрану. Так, использование ингибиторов ERK-сигнального пути, в свою очередь, уменьшает количество IGF-2R в клеточной мембране [220].

Ранее в нашей лаборатории было показано, что при эндотелин-1 индуцированной гипертрофии кардиомиоцитов в первичной культуре кардиомиоцитов крысы наблюдается повышение PAPP-A специфичного протеолиза IGFBP-4, что, в свою очередь, может приводить к увеличению концентрации свободного IGF-II в примембранном пуле. Можно предположить, что данный процесс может являться потенциальным компенсаторным механизмом в ответ на развитие патологической гипертрофии миокарда [87]. Эти данные позволяют обозначить потенциально разные роли IGF-I и IGF-II в регуляции и развитии физиологической и патологической гипертрофии миокарда: IGF-I выступает в качестве фактора, который ведёт к развитию физиологической гипертрофии, как следствия внешних факторов, в то время как IGF-II ответственен за уменьшение последствий развившейся патологической гипертрофии.

5.2 Атеросклероз

Сигнальная система IGF участвует в развитии атеросклероза посредством активации гладкомышечных клеток и макрофагов, а также с помощью инициации процессов ангиогенеза и рестеноза [5]. Атеросклероз является многофакторным заболеванием, обладающим сложной патофизиологией. Показано, что при атеросклерозе IGF-I локально вырабатывается эндотелиальными и гладкомышечными клетками стенок сосудов и обнаруживается в плазме крови [221]. Также известно, что в формировании атеросклеротических бляшек помимо IGF играет роль система белков, регулирующих их биодоступность, то есть IGFBP

[72]. Биодоступность IGF, в частности, достигается благодаря действию протеолитических ферментов, расщепляющих IGFBP. Так, некоторые работы указывают на проатерогенную роль протеазы RAPP-A, которая способна специфически расщеплять IGFBP-4. Повышенный уровень RAPP-A обнаруживается в плазме крови у пациентов с такими заболеваниями сердечно-сосудистой системы, как ИБС, бессимптомная гиперлипидемия, нестабильная стенокардия, острый инфаркт миокарда, атеросклеротические заболевания периферических артерий и другими [222–226]. При повышенной экспрессии RAPP-A в гладкомышечной ткани артерий происходит повышение темпов развития атеросклеротического поражения сосудов. Эти результаты делают протеазу RAPP-A атерогенным фактором. На основании этого факта в ряде исследований RAPP-A был использован в качестве потенциальной мишени в терапии атеросклеротических заболеваний [227]. В пользу того, что RAPP-A является атерогенным фактором также говорит то, что в экспериментах на мышах по ингибированию RAPP-A посредством высокоспецифичных антител через 10 недель обнаруживалось уменьшение количества атеросклеротических бляшек на 70% по сравнению с контрольной группой. Такой эффект оставался постоянным на фоне искусственно повышенного уровня холестерина и триглицеридов [119, 227].

Участие RAPP-A в атеросклерозе доказывают результаты экспериментов на мышах по исследованию эффектов от гипер- и гипоекспрессии RAPP-A. В результате оверэкспрессии RAPP-A в гладкомышечных клетках артерий у мышей происходило увеличение площади поражения артерий, при этом количество очагов поражений при этом не изменялось. Сниженная экспрессия RAPP-A препятствовала развитию атеросклеротических изменений в сосудах у мышей, дефицитных по аполипопротеину E на фоне диеты с высоким содержанием жиров. При этом в экспериментах по ингибированию активности RAPP-A с помощью высокоспецифичных антител было показано, что происходит снижение количества атеросклеротических бляшек в аорте. [227–229]. Было показано, что проатерогенная роль RAPP-A зависит также от локализации протеолитической активности фермента по отношению к IGFBP-4. При протеолизе IGFBP-4, который

происходил во внеклеточной среде, не было обнаружено увеличения площади области поражения стенок сосудов [230].

На основании результатов исследований, которые были приведены выше, можно заключить, что RAPP-A может выступать в качестве потенциальной терапевтической мишени для лечения атеросклероза через подавление её протеолитической активности. В свете того, что RAPP-A является потенциальной терапевтической мишенью, стоит обратить внимание на известные ингибиторы RAPP-A. Одним из известных ингибиторов протеолитической активности RAPP-A является станнинокальцин-2 (STC-2), который может образовывать ковалентный комплекс с RAPP-A, ингибируя её [231]. Среди других ингибиторов RAPP-A известны микроРНК miR-490-2p, повышенная экспрессия которой понижает протеолитическую деградацию IGFBP-4 [232], станины и вещества, имеющие антиоксидантную природу [233].

5.3 IGF-система и метаболический синдром

В настоящее время хорошо известно, что пациенты с диабетом 2 типа имеют значительно большую частоту и худший прогноз ССЗ, чем люди, не страдающие диабетом [234–237]. По всей видимости, этот факт можно объяснить наличием некоторых сопутствующих факторов (например, гипертония), но нельзя исключать наличия дополнительных механизмов, через которые взаимосвязаны ССЗ и диабет. При этом устойчивость организма к инсулину, что является ключевой особенностью диабета 2 типа и метаболического синдрома, сама по себе ассоциирована с развитием патологий сердечно-сосудистой системы [238].

В ряде работ показано, что существует взаимосвязь между уровнями циркулирующего IGF-I и наличием ССЗ. При этом в большинстве исследований было детектировано снижение уровня IGF-I на фоне повышения риска развития ССЗ [239–242]. Усиление деградации IGFBP-3, опосредованной действием протеолитических ферментов, которое наблюдается при развитии диабета и ССЗ, по всей видимости представляет собой компенсаторный механизм, нацеленный на

увеличение концентрации IGF-I в плазме крови [243, 244]. Причинная роль снижения уровня IGF-I в развитии ССЗ и диабета хорошо объясняется при исследовании пациентов с полиморфизмом в промоторной области гена *IGF-I* [245]. В случае отсутствия интактного аллеля гена *IGF-I* наблюдается недостаток белка IGF-I. Данное состояние было выявлено у 12% из более 2000 индивидуумов. В таком случае риск развития диабета и инфаркта миокарда повышается в 1,7 раз, при этом у пациентов с дефицитом IGF-I и с диабетом 2 типа в 3,4 раза увеличивается риск инфаркта миокарда. Эти данные говорят в пользу того, что отклонение в уровне IGF-I является особенностью метаболического синдрома, который остаётся до конца неизученным. Не менее интересен тот факт, что низкие концентрации IGF-I и IGFBP-1 в крови независимо связаны с метаболическим синдромом и резистентностью к инсулину [246].

5.4 Компоненты IGF-сигнального пути как биомаркёры ССЗ и их диагностическое значение

5.4.1. IGF-I и IGFBP-3

Показано, что IGF-I является прогностическим маркёром острого инфаркта миокарда. При этом пороговое значение концентрации в сыворотке крови для IGF-I при данном заболевании составляет 137 нг/мл. Более высокие концентрации ассоциируются с улучшением функциональных параметров сердца, в то время как более низкие ассоциируются с плохим прогнозом для выздоровления. При этом наблюдается сильная корреляция между увеличением концентраций IGF-I и IGFBP-3 [115]. Помимо того, что IGFBP-3 и IGF-I выступают в роли прогностических маркёров инфаркта миокарда, показано, что в тандеме эти молекулярные факторы являются диагностическими маркёрами для ишемической болезни сердца: низкие концентрации IGF-I и IGFBP-3 ассоциированы с этим заболеванием [247]. Также известно, что низкие концентрации IGF-I в сыворотке

крови наблюдаются при хронической и прогрессирующей сердечной недостаточности наряду с кахексией [248].

5.4.2. IGF-II.

При остром инфаркте миокарда показано снижение в сыворотке пациентов не только IGFBP-3 и IGF-I, но и IGF-II. При этом снижение концентраций этих трёх компонентов сигнальной системы IGF наблюдается непосредственно после инфаркта, однако, через неделю их концентрации достигают нормальных значений [249].

5.4.3. PAPP-A

Протеаза PAPP-A, играющая значимую роль в регуляции биодоступности IGF, является маркёром ОКС. PAPP-A был детектирован в нестабильных атеросклеротических бляшках на стенках кровеносных сосудов [5]. Также сильная линейная корреляция была обнаружена между уровнем PAPP-A и уровнями двух других известных маркёров ранних стадий атеросклероза (концентрация кальция в коронарных артериях и толщина интима-медиа сонных артерий). Так, при пороговом значении концентрации PAPP-A равном 2,35 нг/мл, чувствительность и специфичность его как маркёра атеросклероза была оценена в 94,3% и 63,9% соответственно [250]. Более того, циркулирующий PAPP-A является сильным прогностическим маркёром, предполагается, что его прогностическая способность превосходит таковую для сTnI [251, 252].

5.4.3. IGFBP-4

В ряде работ показано, что повышение уровня фрагментов IGFBP-4 в крови ассоциировано с возрастанием риска развития ОКС у пациентов с ишемической болезнью сердца и повышением риска летального исхода от ССЗ у больных диабетом 1 типа [9, 162]. Также было показано, что у больных острой сердечной недостаточностью СТ-IGFBP-4 является прогностическим маркером риска

летального исхода [10, 11]. Стоит отметить, что одним из самых распространенных патологических изменений в сердечной ткани при СН является патологическая гипертрофия кардиомиоцитов, в результате которой происходит увеличение сердечной мышечной массы.

5.4.4. IGFBP-5

Роль IGFBP-5, синтезируемого и секретируемого большим количеством типов клеток, как биомаркёра сердечно-сосудистых заболеваний, была показана при ишемической болезни сердца. Так, в сыворотке пациентов концентрация IGFBP-5 достоверно коррелировала с уровнями IGF-I, -II и IGFBP-3, которые, в свою очередь, повышались [173].

6. Кардиопротекторная роль IGF в сердечной ткани

Несмотря на большое количество данных о роли IGF-сигнального пути в развитии сердечно-сосудистых патологий, в ряде исследований описываются кардиопротекторные свойства IGF при различных ССЗ. Например, на модели спонтанно гипертензивных крыс были показаны кардиопротекторные эффекты IGF-I в сердечной ткани [253]. В других исследованиях были продемонстрированы положительные эффекты гиперэкспрессии IGF-II и IGF-I на функции сердца мышей после инфаркта миокарда [254, 255]. Также в работе Винсигуэрра и соавторов было показано, что повышенная экспрессия IGF-I приводит к повышению экспрессии кардиопротекторных генов в экспериментах на неонатальных кардиомиоцитах, переведённых в гипертрофированное состояние [256]. При этом гиперэкспрессия IGF-1R вызывает гипертрофию сердца, которая не связана с изменениями веса других органов. Стоит отметить, что увеличение всего органа являлось следствием увеличения в размерах кардиомиоцитов и не было ассоциировано с патологическим фенотипом, а, напротив, определялось аналогично физиологическому фенотипу, проявляемому у трансгенных мышей с мутацией

сaPI3K в эксперименте Шиои и соавторов [257, 258]. Также было продемонстрировано, что повышенная экспрессия IGF-I в сердечной ткани может ослаблять (или полностью предотвращать) сократительную и метаболическую дисфункцию, вызванную питанием с высоким содержанием жиров [178]. Также было показано, что избыточная экспрессия IGF-1R кардиомиоцитами предотвращает фиброз сердца, ассоциированный с диабетом 1 типа и диастолическую дисфункцию [259].

В ряде работ на животных моделях было показано, что внутривенное введение IGF-I улучшает переносимость ишемии и восстановление сердечной функции после инфаркта миокарда [260, 261]. IGF-1 повышает усвоение глюкозы в организме и устойчивость к ишемии при гипертрофии миокарда, а введение IGF-I пациентам с хронической сердечной недостаточностью улучшает работу сердца за счет снижения постнагрузки и, возможно, за счет положительного инотропного эффекта – увеличения силы сокращения сердца [262]. В целом, эти результаты ещё раз говорят в пользу того, что кардиоспецифическая терапия на основе IGF-I может являться перспективным и действенным инструментом для профилактики ССЗ.

Регуляция развития патологических и кардиопротекторных процессов в миокарде является одним из ключевых факторов поддержания физиологической активности сердца. Сигнальная система, активируемая инсулиноподобными факторами роста 1 и 2 (IGF-I, IGF-II), представляет собой путь клеточного сигналинга, оказывающий как позитивное, так и негативное влияние на миокард (рис.10).

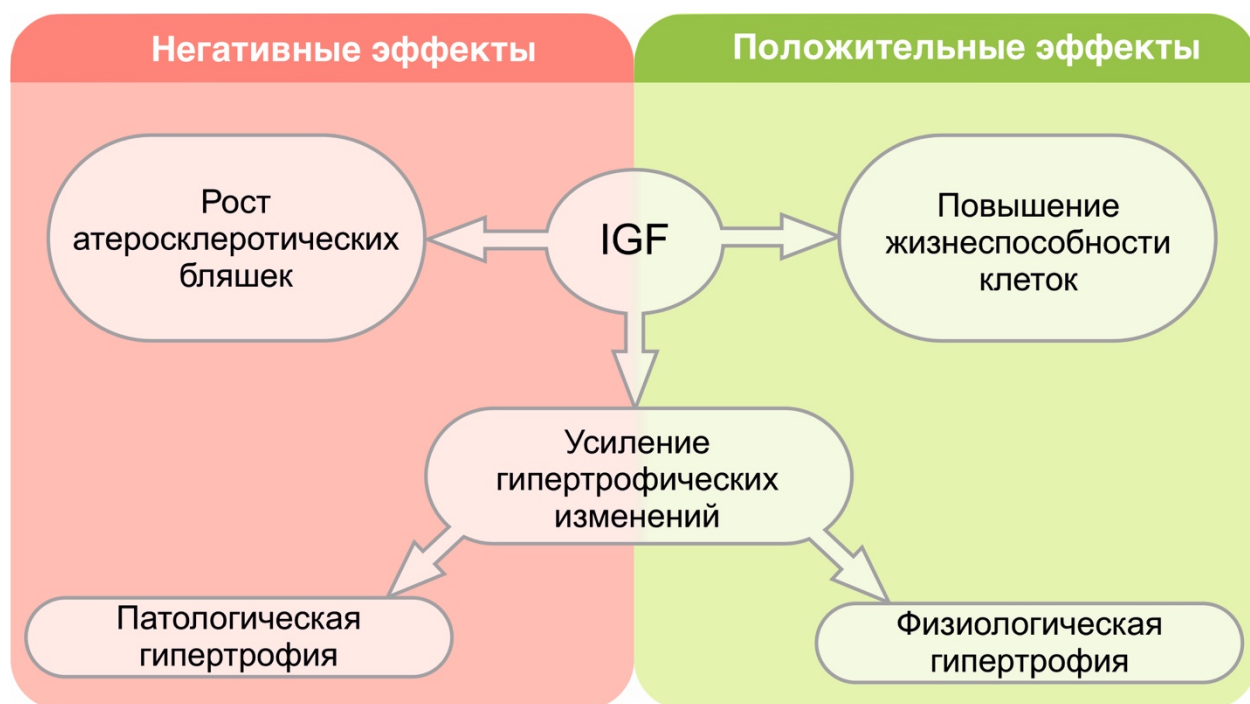


Рисунок 10. Положительные и негативные эффекты, оказываемые IGF в сердечной ткани. По [76], с изменениями.

С одной стороны, IGF активируют развитие кардиопротекторных механизмов, играющих адаптивную и в некоторых случаях даже компенсаторную роль при различных стрессовых воздействиях. С другой стороны, инициация IGF-сигнального каскада сопряжена с развитием широкого спектра сердечно-сосудистых патологий. Степень выраженности позитивного и негативного воздействия IGF варьируется в широких пределах. Поэтому исследования регуляции IGF-сигнального пути в миокарде являются актуальной фундаментальной и прикладной задачей, а ключевые компоненты IGF-системы – перспективными мишенями для терапевтического воздействия.

Регуляция биодоступности IGF осуществляется протеазой PAPP-A за счет её специфической протеолитической активности по отношению к белку IGFBP-4. В результате протеолитической реакции происходит высвобождение IGF из комплекса с IGFBP-4. Таким образом, IGF может взаимодействовать со своим рецептором и влиять на такие процессы как клеточный рост, пролиферация, миграция и ангиогенез. Повышение уровня фрагментов IGFBP-4 может

свидетельствовать об увеличении количества IGF в примембранном пуле. В зависимости от своей концентрации, IGF может выступать и как кардиопротектор и как индуктор гипертрофических изменений.

В этой связи тонкая регуляция концентрации IGF в примембранном пуле чрезвычайно важна для нормального функционирования сердца и также может принимать участие в развитии адаптивных реакций при патологических изменениях миокарда. Как упоминалось ранее, патологическая гипертрофия миокарда зачастую сопровождается многими ССЗ. Также, несмотря на то что на сегодняшний день было продемонстрировано множество исследований показывающих повышение концентрации фрагментов IGFBP-4 в крови пациентов до развития осложнений ССЗ, до сих пор не было показано, что протеолиз IGFBP-4 под действием RAPP-A происходит в сердечной ткани в норме.

Поэтому **целью настоящей работы** являлось исследование роли протеазы RAPP-A в сердечной ткани в норме и при гипертрофии.

Для достижения данной цели нами были поставлены следующие **задачи**:

5. Разработать и охарактеризовать модельные системы для исследования протеолиза IGFBP-4 под действием RAPP-A в кардиомиоцитах в норме;
6. Изучить особенности протекания протеолитического расщепления IGFBP-4 под действием RAPP-A, используя разработанные модельные системы;
7. Разработать и охарактеризовать модельные системы для исследования протеолиза IGFBP-4 под действием RAPP-A в кардиомиоцитах при гипертрофии;
8. Исследовать особенности протекания протеолиза IGFBP-4 под действием RAPP-A в культурах кардиомиоцитов, переведённых в гипертрофированное состояние.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все использованные биохимические реактивы имели аналитическую чистоту и были приобретены в компаниях ПанЭко (Россия), Диа-М (Россия), РусХим (Россия), Sigma-Aldrich (США), Thermo Fisher Scientific (США), Merck (США), Bio-Rad (США). Реактивы, использованные для проведения культурально-биологических работ, были приобретены в компаниях ПанЭко (Россия), Диа-М (Россия), HyClone (США), Sigma-Aldrich (США) и Costar (Нидерланды). Также для проведения исследования были использованы следующие реагенты: вторичные антитела, меченные флуоресцентным красителем Alexa 594, специфичные к Fc-фрагментам мышинных антител, а также фаллоидин, меченный Alexa 488, и краситель DAPI (Thermo Fisher Scientific, США). Моноклональные антитела: специфичные к сердечному тропонину Т (клон TnT406), специфичные к сердечному тропонину I (клон MF4), антитела, специфичные к NT-IGFBP-4 (клоны IBP180, IBP3) и CT-IGFBP-4 (клоны IBP182, IBP163), антитела, специфичные к GFAP (клон GFAP81), рекомбинантные белки IGFBP-4, PAPP-A, NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4, а также человеческий эндогенный BNP (HyTest, Финляндия). Часть экспериментов проводилась с использованием рекомбинантных белков IGFBP-4 и IGF-II (БелкиАнтитела РФ, Россия).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Культурально-биологические методы исследования

1.1 Экспериментальные животные

В работе использовали самцов крыс линии Wistar, полученных из вивария ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии». Животных содержали в помещении для содержания лабораторных животных в режиме двенадцатичасового светового дня с доступом к корму и воде *ad libitum*. В экспериментах использовали крыс на разных стадиях

онтогенеза: неонатальные – 2-4 дня и взрослые – 60-90 дней. Нулевым днем постнатального развития считали день родов.

1.2. Выделение первичной культуры кардиомиоцитов из сердец неонатальных крыс

Четырёх 2–4-дневных крыс обрабатывали спиртом, затем декапитировали, извлекали сердца, помещали в стерильный однократный раствор Кребса-Гензелейта (КНВ) (HEPES 250 мМ, рН 7,4, NaCl 1,18 М, KCl 48 мМ, MgSO₄ 12,5 мМ, K₂HPO₄ 12,5 мМ) на льду. Затем переносили фалькон в стерильный бокс и далее работали в стерильных условиях под ламинаром. Сердца механически измельчали с помощью ножниц, после чего добавляли 1 мл раствора коллагеназы (приготовленный на 1хКНВ, в концентрации 5 мг/мл, содержащий 5 мкМ CaCl₂) и инкубировали 10 минут при 37°C и 5% CO₂ в CO₂-инкубаторе, затем разбивали ткань на отдельные клетки с помощью пипетирования. Дожидались оседания фрагментов ткани и отбирали супернатант. Полученный супернатант центрифугировали 5 минут при 800 rpm, после чего новый супернатант отбрасывали, а осадок ресуспендировали в 1 мл стерильной культуральной среды DMEM (DMEM, 10% ЭТС + 40 мкг/мл гентамицина) и временно помещали в CO₂-инкубатор. К нерасщепленным остаткам ткани повторно добавляли 1 мл коллагеназы, перемешивали переворачиванием пробирки 3-4 раза, и инкубировали 10 минут при тех же условиях. Затем повторно отбирали супернатант, центрифугировали и клеточный осадок ресуспендировали в культуральной среде DMEM. Повторяли 5 раз до полного растворения ткани. После этого первые две фракции расщеплённой ткани отбрасывали, так как в них содержится большое количество клеток соединительной ткани и крови. После оседания клеток в оставшихся фракциях, супернатант отбрасывали, а клеточный осадок повторно ресуспендировали в культуральной среде DMEM, для дополнительной очистки от следовых количеств коллагеназы. После этого все фракции объединяли, предварительно профильтровав через сеточку с порами диаметром 100 мкм.

Рассаживали клетки в нужной плотности и растили в культуральной среде DMEM, содержащей 10% ЭТС в течение 4 дней, заменяя среду раз в два дня.

1.3. Получение культуры кардиомиоцитов человека из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК)

Культура кардиомиоцитов человека, полученная из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, была любезно предоставлена коллегами из лаборатории клеточной биологии в ФНКЦ Физико-Химической медицины им. Академика Ю.М. Лопухина. Культура кардиомиоцитов была дифференцирована из линии человеческих ИПСК endo-iPS12. Данная линия была получена из HUVEC (клетки эндотелия пупочной вены человека) здорового донора. Клетки культивировались в культуральных планшетах покрытых Matrigel (BD, Franklin Lakes, NJ, USA). Среду меняли ежедневно. Для дифференцировки ИПСК в кардиомиоциты клетки растили в 24-луночных планшетах с плотностью 40000 клеток/см². При достижении 80-90% конфлюэнтности начинали дифференцировку с использованием набора для дифференциации желудочковых кардиомиоцитов STEMdiffTM Cardiomyocyte Differentiation Kit (Stemcell Technologies) в соответствии с протоколом производителя. На 50-й день культивирования получали культуру кардиомиоцитов, которую использовали для *in vitro* экспериментов [205].

1.4. Получение первичной культуры кардиомиоцитов из взрослых крыс

После месяца содержания крыс в виварии, как контрольной, так и МКТ-группы, выделяли первичную культуру кардиомиоцитов по протоколу Алам и соавторов с небольшими изменениями [9]. Крыс инъецировали 200 мкл гепарина (5000 ME), после чего инкубировали 10 минут, чтобы избежать образования тромбов. После этого крысу декапитировали, вырезали сердце, промывали его в растворе КНВ, после чего подвешивали через аорту к установке Лангендорфа. Промывали сердце с помощью 100 мл раствора КНВ в течение 15 минут, после чего заменяли раствор

на раствор ферментов, содержащий 0,6 мг/мл коллагеназы II типа (Gibco) и 0,05 мг протеазы из *Streptomyces griseus* (Sigma Aldrich) и 25 мкМ CaCl₂. Промывали сердце раствором коллагеназы и протеазы в течение 40 минут, после чего сердце помещали в чашку Петри с физиологическим раствором КНВ, содержащим ингибитор сокращения кардиомиоцитов 2,3-бутандион моноксим (БДМ). Сердце очищали от соединительной ткани и удаляли предсердия. Желудочки механически измельчали и пипетировали, чтобы разбить ткань на клетки. Далее суспензию клеток фильтровали через клеточный фильтр с порами диаметром 100 мкм и центрифугировали при низких оборотах в течение 3 минут для удаления нецелевых клеток. Супернатант отбрасывали, а осадок ресуспендировали в физиологическом растворе КНВ, содержащем 1 мг/мл БДМ, 10 мг/мл БСА и 100 мкМ CaCl₂, после чего дожидались оседания клеток. Супернатант отбрасывали, а осадок повторно ресуспендировали в том же растворе и центрифугировали при низких оборотах в течение 3 минут. Затем осадок ресуспендировали в культуральной среде DMEM, содержащей 10% ЭТС. Клетки высевали в культуральные 24-луночные планшеты, покрытые фибронектином (40 мкг/мл) и инкубировали в течение 2 часов для прикрепления кардиомиоцитов.

1.5. Определение площади кардиомиоцитов

Для оценки степени гипертрофических изменений производили измерение площади кардиомиоцитов. Измерение проводили посредством программного обеспечения Image J (Fiji) на снимках, полученных с помощью флуоресцентного или конфокального микроскопа. Для определения площади клеток использовали сигнал после иммуноцитохимического окрашивания от цитоплазматических маркёров (TnT или TnI, actin) (См. раздел 2.1. «Иммуноцитохимическое окрашивание культур кардиомиоцитов»). В программе ImageJ вводили значение масштабной шкалы в мкм, соответствующее размерам изображения в пикселях, после чего с помощью предустановленных плагинов программы ImageJ и последовательности команд Analyze-Measure рассчитывали значение площади отдельной клетки в мкм². Для этого по границе клеток строили ломаную линию,

которая замыкалась в многоугольник. Для каждого снимка рассчитывали площадь как минимум 15 кардиомиоцитов, затем полученные значения использовали для расчёта среднего значения площади клеток.

1.6. Характеристика выраженности гипертрофии при МКТ-индуцированной гипертрофии миокарда

Для измерения давления в правом желудочке (ПЖ) животным вводили катетер в правую яремную вену и направляли в правый желудочек, регистрируя давление с помощью датчика. Степень выраженности МКТ-индуцированной гипертрофии ПЖ оценивали как отношение массы ПЖ к массе сердца в процентах. Коэффициент массы ПЖ и лёгких рассчитывали, как отношение массы сердца или лёгких к массе тела в процентах.

1.7. Определение частоты сокращений кардиомиоцитов

Частоту сокращений кардиомиоцитов определяли, фиксируя сокращение во времени в 10 точках культуры, чтобы оценить равномерность и регулярность сокращений. Для этого визуально отслеживали акты сокращений кардиомиоцитов за определённый отрезок времени, а затем проводили пересчёт на количество сокращений в минуту.

1.8. Индукция гипертрофического ответа кардиомиоцитов под действием эндотелина-1 и норадреналина

В выбранные лунки 24-луночного планшета с кардиомиоцитами, содержащие свежую культуральную среду, вносили раствор эндотелина-1, приготовленный на бидистиллированной воде, до конечных концентраций 20 нМ, 50 нМ и 100 нМ. Процент бидистиллированной воды в конечном объёме не превышал 0,25% от всего объёма среды в лунке. В контрольные лунки добавляли бидистиллированную воду. Инкубировали клетки с эндотелином-1 в клеточном инкубаторе в течение 24 и 48 часов при 37°C и 5% CO₂. В отдельных лунках

планшета с культурой кардиомиоцитов проводили индукцию гипертрофии под действием норадреналина. В лунки добавляли раствор норадреналина, приготовленный на бидистиллированной воде, в концентрациях 2 мкМ, 5 мкМ и 10 мкМ. Процент бидистиллированной воды в конечном объеме не превышал 0,1% от всего объема среды в лунке. Для повышения стабильности норадреналина в культуральной среде во все экспериментальные лунки дополнительно вносили аскорбиновую кислоту до конечной концентрации 0,1 мМ. В контрольные лунки добавляли аскорбиновую кислоту и воду. Инкубировали клетки с норадреналином в течение 24 и 48 часов при 37°C и 5% CO₂. Для оценки размеров клеток фотографировали кардиомиоциты в режиме фазового контраста в норме и после инкубации с эндотелином-1 или норадреналином.

1.9. Индукция гипертрофии сердца под действием монокроталина

Крыс линии Wistar случайным образом распределяли в контрольную группу и группу, получавшую монокроталин (МКТ). Рассчитывали количество МКТ для инъекции животным из расчёта 60 мг/кг. МКТ, приготовленный на 60% спирте в дозе 20 мг/мл вводили крысам подкожно в вентральную часть грудной клетки, контрольной группе вводили аналогичную дозу 60% спирта. После чего содержали крыс в виварии в течение месяца.

1.10. Проточная цитофлуориметрия

Клетки отделяли от подложки с помощью раствора трипсин–ЭДТА (0,25%) при 37°C и 5% CO₂. Затем добавляли стерильную культуральную среду DMEM, содержащую 3% ЭТС, для ингибирования протеолитической активности трипсина. Клеточные суспензии центрифугировали при 300g в течение 5 мин при 25°C, удаляли супернатант и 3 раза промывали клетки ФСБ. Затем клетки фиксировали в 4% параформальдегиде в течение 30 мин на льду и осторожно промывали 3 раза холодным ФСБ. Каждый образец инкубировали на льду в течение 30 мин с

холодным 80% этанолом с последующей трёхкратной промывкой буфером FACS (ФСБ с добавлением 1% ЭТС). Затем клетки инкубировали с контролем изотипа IgG и антителами TnT406 к сердечной изоформе тропонина Т человека в буфере FACS в течение ночи при температуре + 4°C. Затем каждый образец инкубировали в буфере FACS со вторичными анти-мышинными поликлональными антителами, конъюгированными с Alexa-488 (Thermo Fisher Scientific, США), на льду в течение 30 минут. Клетки дважды промывали буфером FACS, а затем смешивали с равным объёмом раствора DAPI (200 нг/мл). Анализ методом проточной цитометрии проводили на проточном цитометре ACEA Novocyte Novosampler (ACEA Biosciences, Сан-Диего, Калифорния, США). Оценивали распределение популяций клеток на основании регистрации прямого (малоуглового) светорассеяния (FSC) и флуоресценции метки Alexa-488 (FITC). Значения FSC пропорциональны размерам клетки, так как данный параметр детектируется вблизи оси лазерного луча, падающего на клетку в прямом направлении под углом примерно 20°. В результате измерения прямого (малоуглового) светорассеяния, характеризующего размеры клеток, была отобрана популяция целых клеток и отбрасывалась популяция клеточного дебриса.

На основании распределения популяции, детектируемой по изотипическому контролю, выставляли параметры для детекции клеточной популяции, детектируемой по кардиотропонину Т. Значения FITC-A соответствуют детекции флуоресцентной метки Alexa-488.

1.11. Приготовление клеточных лизатов

Для приготовления клеточных лизатов клетки промывали 3 раза ФБС с последующим добавлением 300 мкл буфера для лизиса (ФСБ с 0,1%-ным содержанием Triton X-100, 20 мкг/мл фенилметилсульфонилфторида (PMSF), 3 мкг/мл апротинина, 1 мкМ пепстатина А). Затем образцы подвергали ультразвуковой обработке с помощью аппарата Branson Sonifier (США) при 10% амплитуде в течение 10 секунд, затем пробы замораживали и хранили при

температуре -20°C . Концентрацию белка в клеточных лизатах определяли с помощью анализа белка по Брэдфорду. Полученные значения были использованы для нормализации концентраций PAPP-A, BNP, NT- и CT-IGFBP-4, а также значений флуоресценции AlamarBlue (CPS – counts per second).

2. Биохимические методы исследования

2.1. Исследование жизнеспособности культур кардиомиоцитов с помощью AlamarBlue

На первой стадии культуру кардиомиоцитов избавляли от компонентов культуральной среды посредством нескольких последовательных промывок ФСБ (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na_2HPO_4 , 1,76 мМ KH_2PO_4 , pH 7,4). После чего добавляли 900 мкл культуральной среды и 100 мкл AlamarBlue. Инкубировали в течение 4 часов при 37°C и 5% CO_2 . Затем измеряли значения флуоресценции на планшетном ридере CLARIOstar^{Plus} при 590 нм. Значения нормировали на количество тотального белка в лунке, после чего пересчитывали значение в лунке после обработки индуктором гипертрофии (CPS_n) на значение флуоресценции в лунке без индуктора гипертрофии (CPS₀). Получали относительные единицы, которые представляли как CPS_n/CPS₀/мг белка.

2.2. Иммуноцитохимическое окрашивание культур кардиомиоцитов

На первой стадии культуру кардиомиоцитов избавляли от компонентов культуральной среды посредством нескольких последовательных промывок ФСБ (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na_2HPO_4 , 1,76 мМ KH_2PO_4 , pH 7,4). Затем проводили фиксацию и пермеабиллизацию мембран клеток при комнатной температуре посредством обработки клеток раствором 4% параформальдегида в течение 15 минут и последующей обработкой раствором 0,1% Тритона X-100, соответственно. После промывки с помощью ФСБ для блокировки мест неспецифической сорбции антител в лунки планшета вносили раствор 1% ЭТС на ФСБТ (ФСБ, 0,5% Tween20, pH 7,4) и инкубировали 30 минут при комнатной

температуре. На следующей стадии клетки переводили в раствор первичных антител, высокоспецифичных к сердечной изоформе тропонина Т (406, Hytest, Финляндия) или тропонина I (MF4, Hytest, Финляндия) с конечной концентрацией 2 мкг/мл, приготовленный в буфере ФСБТ, содержащем 1% ЭТС. Клетки с раствором первичных антител инкубировали в течение ночи при +4°C. Затем лунки планшета промывали ФСБТ и переводили клетки в раствор вторичных антител, высокоспецифичных к Fc-фрагментам антител мыши, конъюгированные с флуоресцентной меткой Alexa-594, с конечной концентрацией 2 мкг/мл, приготовленный на буфере ФСБТ, содержащем 1% ЭТС. Также в состав этого раствора входил специфический маркер актина фаллоидин, конъюгированный с флуоресцентной меткой Alexa-488, в указанных производителем разведениях. Клетки в растворе вторичных антител и фаллоидина инкубировали в течение двух часов при комнатной температуре, затем промывали ФСБТ и добавляли интеркалирующий краситель хроматина DAPI, приготовленный на ФСБ, в указанном производителем разведении. Инкубацию проводили в течение 10 минут при комнатной температуре. После последней отмывки полученные окрашенные препараты кардиомиоцитов анализировали с помощью конфокального микроскопа Olympus FV3000. Также в качестве контроля проводили иммуноцитохимическое окрашивание по методике, описанной выше, без первичных антител, а также с помощью первичных антител (GFAP81) того же изотипа, что и антитела к кардиотропонину (IgG2a), специфичных к глиальному фибриллярному кислому белку (GFAP).

2.3. Протеолитическое расщепление IGFBP-4 под действием PAPP-A в полученной культуре

Для количественного анализа протеолиза IGFBP-4 в среде кардиомиоцитов использовали метод Лаурсена и его коллег [8] с некоторыми модификациями. В качестве субстрата использовали смесь, содержащую рекомбинантные белки IGFBP-4 и IGF-II человека, а также CaCl₂, растворенные в буфере ТСБ (50 мМ Tris-

HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl). Смесь инкубировали 30 минут при комнатной температуре для формирования комплекса IGFBP-4 с IGF-II. Затем субстратную смесь добавляли в среду кардиомиоцитов. Инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение определенных промежутков времени (от 1 до 24 часов). По завершении инкубации реакцию останавливали добавлением ЭДТА до конечной концентрации 5 mM. В полученных образцах среды определяли концентрацию NT-IGFBP-4, CT-IGFBP-4 методом флуоресцентного иммуноанализа «сэндвич»-типа. Полученные значения нормировали на тотальный белок, измеренный методом Бредфорда.

2.4. Измерение концентрации N- и C-концевых фрагментов IGFBP-4 в кондиционированной среде кардиомиоцитов методом флуороиммунного анализа «сэндвич»- типа (ФИА)

Концентрации N- и C- концевых фрагментов IGFBP-4 в кондиционированной среде определяли методом неопитоп-специфичного флуороиммунного анализа «сэндвич»-типа с использованием пар антител IBP3-IBP180^{Eu*} и IBP182-IBP163^{Eu*}. В качестве «нижних» антител были использованы моноклональные антитела IBP3 (NT-IGFBP-4) и IBP182 (CT-IGFBP-4), а в качестве детекторных антител – моноклональные антитела IBP180 (NT-IGFBP-4) и IBP163 (CT-IGFBP-4, конъюгированные с хелатом европия. Все измерения проводили в двух повторностях. В лунки 96-ти луночного полистрольного планшета вносили по 100 мкл раствора антител в ФСБ с концентрацией 10 мкг/мл. Планшет инкубировали в течение часа при комнатной температуре при перемешивании и отмывали промывочным буфером (10 mM Трис-HCl, pH 7,8, 150 mM NaCl, 0,05% NaN₃, 0,05% БСА, 0,025% Tween20). После этого в каждую лунку планшета вносили 50 мкл образца, разведённого в буфере для анализа (50 mM Трис-HCl буфер, 0,9% NaCl, 0,01% Tween 40, 0,5% бычьего сывороточного альбумина, 0,05% NaN₃ pH 7,7) и 50 мкл детекторных антител (2 мкг/мл) в буфере для анализа, конъюгированных со стабильным хелатом европия (Eu^{3*}). Для измерения CT-IGFBP-4 в буфер для анализа добавляли NaCl для снижения кросс-реактивности антител по отношению к полноразмерной форме IGFBP-4. Планшеты инкубировали 1 час при комнатной

температуре при постоянном перемешивании, затем вновь отмывали промывочным буфером. После этого в лунки вносили по 200 мкл раствора для усиления флуоресценции LANFIA (1,75 M NaSCN, 1 M NaCl, 50 mM глицин-NaOH, 5 mM NaHCO₃, 5% глицерин, 20% пропанол-1, pH 10), инкубировали в течение 3 мин при комнатной температуре при перемешивании, затем детектировали флуоресценцию на планшетном анализаторе Victor X (Perkin Elmer) в режиме Eu³⁺ при длине волны 365 нм. Полученные значения нормировали на тотальный белок, измеренный методом Бредфорда.

2.5. Измерение концентрации натрийуритического пептида В (BNP) в кондиционированной среде кардиомиоцитов методом флуориммунного анализа «сэндвич»-типа

Концентрацию BNP определяли методом флуориммунного анализа «сэндвич»-типа с использованием пары антител 24C5-AbBNP2^{Eu³⁺*}. В качестве «нижних» антител были использованы моноклональные антитела 24C5, а в качестве детекторных антител – моноклональные антитела AbBNP2^{Eu³⁺*}. Все измерения проводили в двух повторностях. В лунки 96-ти луночного полистирольного планшета вносили по 100 мкл раствора антител в ФСБ с концентрацией 2 мкг/мл. Планшет инкубировали в течение часа при комнатной температуре при перемешивании и отмывали промывочным буфером. После этого в каждую лунку планшета вносили 100 мкл образца, разведённого в буфере для анализа и инкубировали 1 час при комнатной температуре при перемешивании и отмывали промывочным буфером. После этого вносили по 50 мкл детекторных антител (4 мкг/мл), конъюгированных со стабильным хелатом европия, в аналогичном буфере. Планшеты инкубировали час при комнатной температуре при постоянном перемешивании, затем вновь отмывали промывочным буфером. После этого в лунки вносили по 200 мкл раствора для усиления флуоресценции LANFIA, инкубировали в течение 3 мин при комнатной температуре при перемешивании, затем детектировали флуоресценцию на планшетном анализаторе Victor X (Perkin

Elmer) в режиме Europium при 365 нм. Полученные значения нормировали на тотальный белок, измеренный методом Бредфорда.

2.6. Измерение концентрации димерного PAPP-A в кондиционированной среде культуры кардиомиоцитов, дифференцированной из ИПСК методом ФИА «сэндвич»-типа

Клеткам заменяли среду на свежую, затем клетки культивировали в инкубаторе в течение 1, 3 и 24 часов, после чего отбирали кондиционированную среду и замораживали. Для измерения концентрации PAPP-A в кондиционированной среде использовали метод ФИА «сэндвич»-типа с использованием пары антител 10E2-10E1^{Eu*}, специфичной к димерной то есть протеолитически активной изоформе PAPP-A. В качестве «нижних» антител были использованы моноклональные антитела 10E2, а в качестве детекторных антител – моноклональные антитела 10E1^{Eu3*}. Все измерения проводили в двух повторностях. В лунки 96-ти луночного полистирольного планшета вносили по 100 мкл раствора антител в ФСБ с концентрацией 2 мкг/мл. Планшет инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре при перемешивании и отмывали промывочным буфером. После этого в каждую лунку планшета вносили 100 мкл образца, разведённого в буфере для анализа и инкубировали 1 час при комнатной температуре при перемешивании и отмывали промывочным буфером. После этого вносили по 50 мкл детекторных антител (4 мкг/мл), конъюгированных со стабильным хелатом европия, в аналогичном буфере. Планшеты инкубировали 1 час при комнатной температуре при постоянном перемешивании, затем вновь отмывали промывочным буфером. После этого в лунки вносили по 200 мкл раствора для усиления флуоресценции LANFIA, инкубировали в течение 3 мин при комнатной температуре при перемешивании, затем детектировали флуоресценцию на планшетном анализаторе Victor X (Perkin Elmer) в режиме Europium при 365 нм. Полученные значения нормировали на тотальный белок, измеренный методом Бредфорда.

2.7. Измерение концентрации белка методом Бредфорда

20 мкл образца в трех разведениях (в 2, 5 и 10 раз) помещали в лунку 96-луночного планшета, затем добавляли 200 мкл рабочего раствора Coomassie G250 и инкубировали на шейкере при комнатной температуре в течение 5 минут. Затем проводили измерение оптического поглощения при 595 нм с использованием планшетного ридера CLARIOstar^{Plus}. По результатам измерений считали среднее значение по трем разведениям и нормировали на среднее значение.

3. Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9.0. Данные представлены в виде среднего +/- стандартного отклонения или среднего +/- стандартной ошибки среднего. Количество отдельных измерений (n) указано в подписях к рисункам. Для оценки распределения выборки был выполнен тест Шапиро–Уилка. Для сравнения данных с нормальным распределением проводился t-критерий Стьюдента или однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Различия считались достоверными при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Роль PAPP-A в сердечной ткани в норме

1.1. *Разработка модельных систем для изучения роли PAPP-A в сердечной ткани*

В нашей работе для исследования роли PAPP-A в развитии такого сложного и многофакторного патологического состояния как гипертрофия сердечной ткани мы поставили задачу разработать как *in vitro*, так и *in vivo* подходы к моделированию данной патологии кардиомиоцитов. На первом этапе нашей работы мы сосредоточились на разработке *in vitro* модельных систем.

1.1.1 *Характеристика клеточных культур кардиомиоцитов методом фазового контрастирования*

Сердечная ткань имеет гетерогенную природу и представлена различными типами клеток. В связи с этим для исследования молекулярных механизмов функционирования различных белков в сердечной мышечной ткани в норме и при патологических состояниях *in vitro* необходимо использовать изолированную культуру кардиомиоцитов. Наиболее широко используемой клеточной моделью для исследования таких процессов является первичная культура неонатальных кардиомиоцитов крысы, так как является наиболее физиологически близкой по биохимическим и физиологическим свойствам к клеткам интактного миокарда. Данная культура имеет ряд преимуществ, прежде всего, процедура выделения первичной культуры из неонатальных крыс является менее трудоемкой и более быстрой, чем выделение первичной культуры из взрослых крыс [263].

В настоящем исследовании для изучения роли PAPP-A в сердечной ткани в норме и при гипертрофии были использованы три модельные системы:

1) Первичная культура кардиомиоцитов, полученная из неонатальных крыс. К ограничениям данной модели можно отнести гетерогенность: культура содержит не только кардиомиоциты (10-70%), но и другие типы клеток, включая

фибробласты, гладкомышечные клетки и клетки эндотелия. Это затрудняет интерпретацию результатов, поскольку не всегда ясно, какие из наблюдаемых эффектов связаны именно с кардиомиоцитами. Другими ограничениями данной модели являются различия в функционировании белков - механизмы функционирования белков в неонатальном и взрослом сердце могут отличаться, что может влиять на результаты исследования. К несомненным преимуществам данной модели можно отнести простоту выделения и культивирования неонатальных кардиомиоцитов и высокую жизнеспособность.

2) Культура кардиомиоцитов, полученная из ИПСК. Данная модель обладает рядом преимуществ, первым из которых является высокая однородность культуры: содержание кардиомиоцитов в культуре может достигать 98-100%, что значительно облегчает интерпретацию результатов экспериментов, проводимых с использованием данной культуры. Вторым важным преимуществом этой модели является возможность проводить эксперименты на кардиомиоцитах человека, что особенно важно для исследования специфических особенностей сердечной ткани человека. Ограничением данной модели может являться неполная дифференцировка получаемых кардиомиоцитов. Поэтому данная модель требует проведения дополнительного этапа характеристики культуры для подтверждения успешности дифференцировки полученных кардиомиоцитов, например, методом проточной цитофлуориметрии.

3) Первичная культура кардиомиоцитов, полученная из сердец взрослых крыс. Данная модель обладает рядом преимуществ: высокая степень дифференцировки - культура состоит преимущественно из высокодифференцированных кардиомиоцитов, что максимально приближает её к условиям *in vivo*. Зрелость - кардиомиоциты, полученные из сердца взрослой особи, соответствуют по своей зрелости кардиомиоцитам миокарда. Основным ограничением данной модели является низкая жизнеспособность получаемых кардиомиоцитов.

Таким образом, использование различных модельных систем, обладающих как преимуществами, так и недостатками, позволяет получить более полную картину роли PAPP-A в сердечной ткани в норме и при гипертрофии.

На первом этапе нашей работы все культуры кардиомиоцитов были охарактеризованы методом фазового контрастирования (рис. 11).

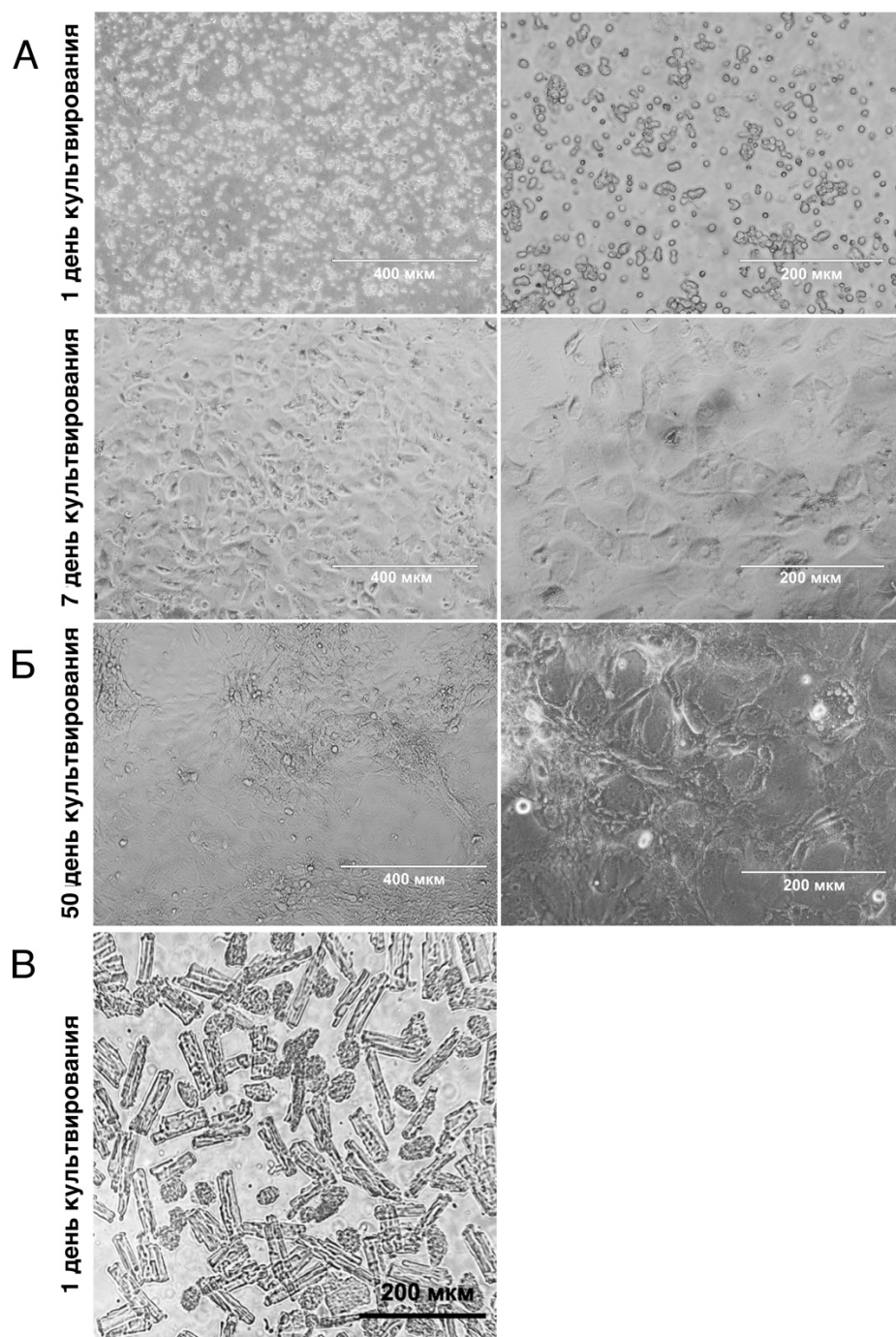


Рисунок 11. Фотографии культур кардиомиоцитов, сделанные в режиме фазового контраста: А - первичной культуры кардиомиоцитов из неонатальных крыс, на 1

и 7 дни культивирования, Б - типичной культуры человеческих кардиомиоцитов, полученных из ИПСК на 50 день культивирования и В - первичной культуры взрослых кардиомиоцитов крысы на 1 день культивирования.

На рисунке 11А представлена динамика изменения морфологии неонатальных кардиомиоцитов во времени. На 7-й день культивирования, культура приобретала фенотип, соответствующий кардиомиоцитам. Так как полученная культура являлась первичной, в ней содержались как клетки, морфологически похожие на целевые кардиомиоциты, представляющие собой слаженно сокращающийся синцитий с частотой 11 ударов в минуту, так и другие клетки, имеющие фенотип фибробластов и эндотелиальных клеток. Неонатальные кардиомиоциты имеют меньшие размеры, чем зрелые кардиомиоциты и обладают высокой способностью к регенерации, что позволяет сердцу быстро расти и адаптироваться в процессе раннего развития. Кардиофибробласты представляют собой несимметричные крупные относительно других веретеновидные клетки, имеющие многочисленные отростки. Данные клетки, как правило, имеют большой объём цитоплазмы, а также вытянутое или овальное ядро. Эндотелиальные клетки представляют собой тонкие плоские клетки, напоминающие пластинки. Клетки эндотелия имеют меньший размер по сравнению с другими клетками сердечной ткани и небольшой объём цитоплазмы.

Культура кардиомиоцитов человека, дифференцированная из ИПСК, была любезно предоставлена коллегами из лаборатории клеточной биологии в ФНКЦ Физико-Химической медицины им. Академика Ю.М. Лопухина. Данная культура была дифференцирована из человеческих ИПСК линии endo-IPS12. После культивирования в течение 50 дней, как описано в разделе «Методы исследования», полученная популяция человеческих кардиомиоцитов, дифференцированная из линии endo-IPS12, представляла собой клеточный синцитий (рис. 11Б) и демонстрировала сокращение с частотой 22 удара в минуту, что является важнейшей характеристикой формирования сократительного аппарата в кардиомиоцитах при успешной дифференцировке из ИПСК. При

микроскопировании полученной культуры можно было видеть, что кардиомиоциты демонстрировали скоординированное волнообразное и ритмичное сокращение.

Третьей модельной системой, используемой в данном исследовании, является первичная культура кардиомиоцитов, полученная из взрослых крыс (рис. 11В). Культура представляет собой большое количество отдельных клеток с одинаковой морфологией, не объединённых в единый синцитий. Несомненным преимуществом данной клеточной культуры является то, что её можно выделять из взрослых особей, а также тот факт, что первые несколько часов в ней полностью сохраняется морфология, присущая изолированным кардиомиоцитам. После прикрепления к субстрату, в качестве которого был использован фибронектин, как описано в разделе «Методы исследования», кардиомиоциты имели чётко выраженную цилиндрическую форму и либо совсем не демонстрировали сокращения, либо были заметны единичные сокращения отдельных клеток.

Уже на второй день культивирования кардиомиоциты меняли свою морфологию, большое количество клеток откреплялось от субстрата и умирало. Поэтому все эксперименты проводились в течение суток после выделения первичной культуры кардиомиоцитов. Данная особенность первичной культуры кардиомиоцитов, полученных из взрослых крыс, является основным недостатком данной модели, не позволяющим проводить на ней длительные эксперименты.

1.1.2 Характеристика клеточных культур кардиомиоцитов методом иммуноцитохимического окрашивания

Для более детальной характеристики модельных систем на следующем этапе нашей работы мы определяли содержание кардиомиоцитов в полученных культурах, или чистоту культур. Для этого было проведено иммуноцитохимическое окрашивание с использованием антител, конъюгированных с флуоресцентной меткой Alexa-555, специфичных к сердечным изоформам тропонина I и T, белкам, входящим в состав тропонинового комплекса кардиомиоцитов и поэтому являющимися специфичными маркёрами данного типа клеток и сердечной ткани в целом. Также в полученных культурах выявляли хроматин с использованием интеркалирующего ядерного красителя DAPI и F-актин с использованием фаллоидина, конъюгированного с флуоресцентной меткой Alexa-488. Все полученные культуры фотографировали и оценивали содержание кардиомиоцитов, рассчитывая отношение количества клеток с детектированным тропонином I или T к общему количеству клеток для каждого снимка.

На серии фотографий ниже представлены результаты флуоресцентной микроскопии после иммуноцитохимического окрашивания культур кардиомиоцитов (рис. 12).

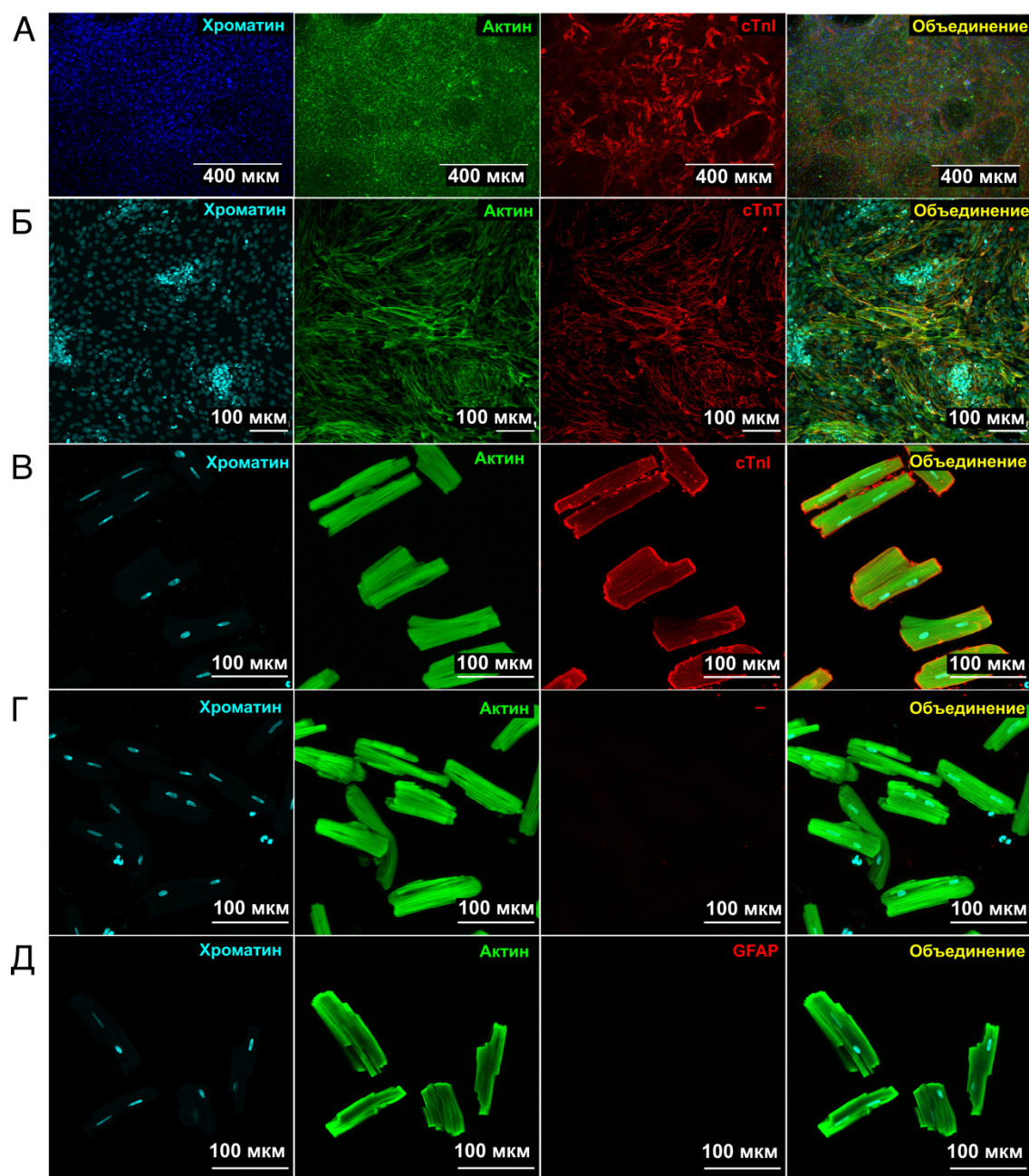


Рисунок 12. Иммунофлуоресцентное окрашивание с использованием (слева направо) флуоресцентного ядерного красителя DAPI (синий); фаллоидина, конъюгированного с флуоресцентной меткой Alexa-488 (зеленый); вторичных антител конъюгированных с флуоресцентной меткой Alexa-555 (красный); объединение фотографий, сделанных в трёх флуоресцентных каналах при одинаковом увеличении. А - типичная первичная культура кардиомиоцитов, полученная из неонатальных крыс; Б - типичная культура кардиомиоцитов,

полученная из ИПСК человека; В, Г, Д - типичная культура кардиомиоцитов, полученная из взрослых крыс. Окрашивание с помощью моноклональных антител, специфичных к сердечной изоформе тропонина I человека (клон MF4) (А и В); антител, специфичных к сердечной изоформе тропонина Т человека (клон TnT406) (Б); без первичных антител (Г); с использованием антител специфичных к GFAP (клон GFAP81) (Д). Описание в тексте.

На основании изображений оценивали чистоту полученных культур, или содержание кардиомиоцитов. Общую площадь, занимаемую культурой, оценивали по сигналам в зеленом канале от актина, так как он присутствует во всех клетках культуры, и принимали её за 100 %. Ввиду того, что сердечные изоформы тропонина I и Т являются маркёрами кардиомиоцитов, количество кардиомиоцитов в культурах оценивали как процент площади, занимаемой клетками с детектируемым тропонином I или Т, от площади, занимаемой всеми клетками полученной культуры.

Таким образом, из представленных на рисунке 12А результатов заметно содержание как клеток, детектируемых по кардиотропонину I, так и примесных клеток. После подсчёта соотношения площади данных типов клеток содержание кардиомиоцитов в полученной первичной культуре неонатальных кардиомиоцитов составило $60\% \pm 10\%$ от площади конфлюэнта.

Ввиду незрелости кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК, окрашивание проводили с использованием антител специфичных к сердечной изоформе тропонина Т - TnT406 (Hytest, Финляндия), так как известно, что уровни сердечного тропонина I у кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК, отсутствуют или снижены в пользу изоформы медленного скелетного тропонина I [264]. Данная изоформа медленного скелетного тропонина I обнаруживается в сердце во время развития и по мере созревания сердечной мышцы сменяется на сердечную изоформу тропонина I [265, 266]. В случае же первичных культур кардиомиоцитов, выделенных из неонатальных и взрослых крыс, сердечная

изоформа тропонина I детектировалась с помощью специфичных моноклональных антител MF4 (Hytest, Финляндия).

Из представленных на рисунке 12Б результатов видно, что тропонин Т детектируется практически во всех клетках культуры кардиомиоцитов, полученных из ИПСК. Присутствие сердечной изоформы тропонина Т в полученных кардиомиоцитах, как и сокращение, является важной характеристикой релевантности данной клеточной модели. Среднее содержание кардиомиоцитов в нескольких независимо дифференцированных культурах кардиомиоцитов составило $97\% \pm 2\%$, что говорит о том, что полученную культуру можно использовать для проведения модельных экспериментов для исследования роли RARР-А в ткани сердечной мышцы.

На рисунке 12В представлена характеристика типичной первичной культуры кардиомиоцитов, полученной из взрослых крыс, методом иммуноцитохимического окрашивания с использованием антител специфичных к кардиотропонину I, имеющих IgG2a изотип. Для контроля специфичности видимых сигналов проводили окрашивание без первичных антител (рис. 12Г), чтобы исключить возможное неспецифическое взаимодействие вторичных поликлональных антител, конъюгированных с флуоресцентной меткой Alexa-555. Также провели контрольное иммуноцитохимическое окрашивание с использованием антител того же изотипа (IgG2a), что и антитела к тропонину I, но специфичных к глиальному фибриллярному кислому белку (GFAP), являющемуся маркером астроцитов (рис. 12Г). Контрольные окрашивания были проведены и в других культурах кардиомиоцитов, показав аналогичные результаты. Отсутствие сигнала при окрашивании препаратов культур кардиомиоцитов вторичными антителами, а также антителами к GFAP, имеющих изотип IgG2a, говорит о высокой специфичности используемых антител к кардиотропонину, а также о том, что сигналы, визуализированные с помощью флуоресцентной микроскопии, действительно принадлежат тропонину I и тропонину Т.

Кардиомиоциты, полученные из сердец взрослых крыс, имеют четкую цилиндрическую форму и выраженную поперечнополосатую исчерченность,

свойственную клеткам мышечной ткани сердца. Сердечная изоформа тропонина I детектируется во всех клетках, что говорит о высокой степени чистоты полученной культуры. Также об этом свидетельствует однообразие морфологии клеток культуры. Таким образом можно заключить, что культура представлена исключительно кардиомиоцитами и чистота полученной культуры составляет 100%.

1.1.3 Характеристика культуры кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК, методом проточной цитофлуориметрии

Метод проточной цитофлуориметрии широко используется для количественной оценки чистоты полученных клеточных культур. Данный метод имеет ряд несомненных преимуществ: поскольку проточный цитометр способен анализировать тысячи клеток в секунду, возможно анализировать большие популяции клеток, также данный метод обладает высокой чувствительностью по сравнению с анализом изображений после иммуноцитохимического окрашивания и позволяет обнаружить даже небольшое количество клеток с интересующими исследователя параметрами или свойствами. Данный метод позволяет анализировать популяцию клеток сразу по нескольким параметрам, таким как размер, гранулярность, экспрессия поверхностных маркеров или внутриклеточных белков. Также следует упомянуть, что цитофлуориметрический анализ проводится автоматически, что позволяет минимизировать произвольные субъективные факторы исследователя и получить точные количественные данные о популяции клеток. Таким образом, данный метод является одним из наиболее точных и объективных методов в анализе популяций клеточных культур.

Данный анализ обязательно используется для мониторинга процесса дифференцировки, а также для оценки качества дифференцировки ИПСК в популяцию каких-либо высокодифференцированных клеток организма человека, таких как кардиомиоциты. Поэтому в нашей работе чистоту и степень дифференцировки полученной культуры кардиомиоцитов человека,

дифференцированных из ИПСК, дополнительно оценивали с помощью метода проточной цитофлуориметрии с использованием первичных поликлональных антител Mouse IgG – Isotype Control, в качестве изотипического контроля, и антител, специфичных к сердечной изоформе тропонина Т человека. Ниже представлены результаты исследования (рис. 13).

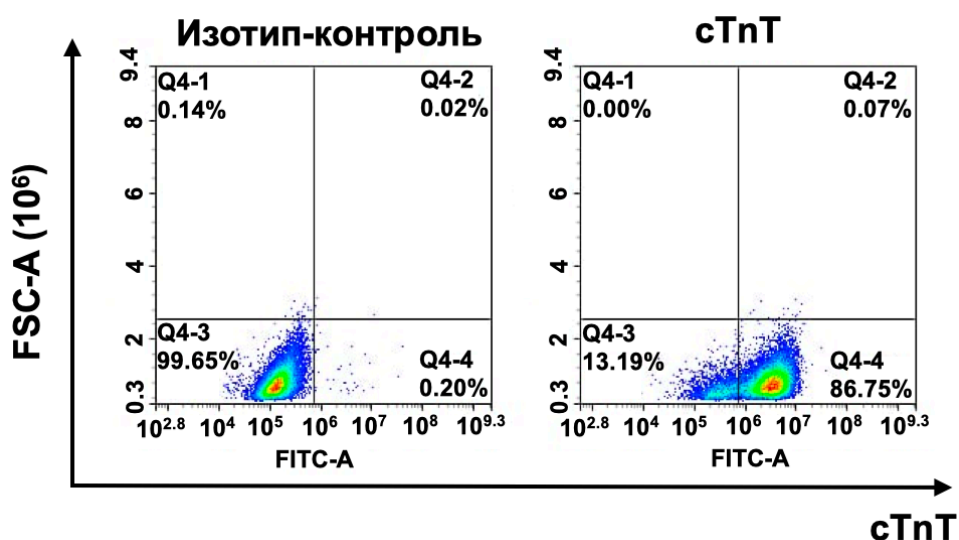


Рисунок 13. Результаты анализа чистоты культуры кардиомиоцитов человека, дифференцированных из ИПСК, методом проточной цитофлуориметрии. (FSC-A – прямое (малоугловое) светорассеяние, FITC-A – флуоресценция Alexa-488).

Из данных, представленных на рисунке 13, видно, что наибольшая популяция клеток, детектируемая по тропонину Т, лежит правее области, выделенной по изотипическому контролю, что говорит о высокой степени дифференцировки полученной культуры. Чистота полученной культуры по результатам проточной цитофлуориметрии составила 87%. Различия в результатах определения чистоты культуры кардиомиоцитов методом иммуноцитохимического окрашивания могут быть связаны с большей точностью метода проточной цитофлуориметрии, так как он позволяет проанализировать и разделить на отдельные популяции клетки культуры. Далее, для оценки чистоты культуры кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК, мы опирались на результаты, полученные методом проточной цитофлуориметрии.

Стоит отметить, что анализ чистоты культур методом проточной цитофлуориметрии был проведен только для культуры кардиомиоцитов человека, дифференцированных из ИПСК. Это связано с тем, что неонатальные и взрослые кардиомиоциты крысы, использованные в данном исследовании, обладали низкой жизнеспособностью после процедуры диссоциации и обработки, необходимой для проточной цитофлуориметрии, а метод проточной цитофлуориметрии подразумевает под собой достаточно жёсткую обработку клеток под действием ферментов и механического воздействия, которая может привести к их гибели. Это особенно актуально для неонатальных и взрослых кардиомиоцитов крысы, которые более чувствительны к механическому и химическому воздействию. В то же время кардиомиоциты из ИПСК человека обладают большей устойчивостью к процедурам диссоциации и обработки, что позволило успешно провести анализ методом проточной цитофлуориметрии. Несмотря на то, что метод проточной цитофлуориметрии не использовался в случае других культур кардиомиоцитов, нам удалось определить чистоту культур методом иммуноцитохимического окрашивания, который подошёл для всех типов культур кардиомиоцитов, использованных в данной работе.

Таким образом, были охарактеризованы модельные системы, основанные на трёх типах культур кардиомиоцитов. Подробнее разница в характеристиках данных культур будет описана в разделе «Обсуждение результатов».

1.1.4 Измерение концентрации RAPP-A в кондиционированной среде полученных культур кардиомиоцитов

В 2013 году Д'Элия и соавторами было проведено измерение концентрации RAPP-A в кондиционированной среде клеток предшественников кардиомиоцитов, в результате чего было показано, что этот тип клеток секретировал димерную форму RAPP-A, в то время как тетрамерная форма отсутствовала [267]. Известно, что именно димерная форма RAPP-A обладает протеолитической активностью в

отношении IGFBP-4 и IGFBP-5, таким образом являясь важнейшим регулятором биодоступности IGF. Поэтому измерение концентрации PAPP-A в кондиционированной культуре кардиомиоцитов проводили методом флуороиммунного анализа «сэндвич»-типа, с использованием пары антител 10E2-10E1 (HyTest, Финляндия), специфичной к димерной, то есть протеолитически активной форме PAPP-A человека. Однако несмотря на то, что PAPP-A человека и крысы гомологичны на 91%, данные антитела не детектировали димерный PAPP-A в кондиционированной среде первичных культур кардиомиоцитов, выделенных из сердец неонатальных и взрослых крыс. Нам удалось детектировать димерный PAPP-A только в кондиционированной среде кардиомиоцитов человека, дифференцированных из ИПСК. Ниже приведены результаты измерений концентрации димерного PAPP-A в кондиционированной среде культуры кардиомиоцитов человека, дифференцированных из ИПСК (рис.14).

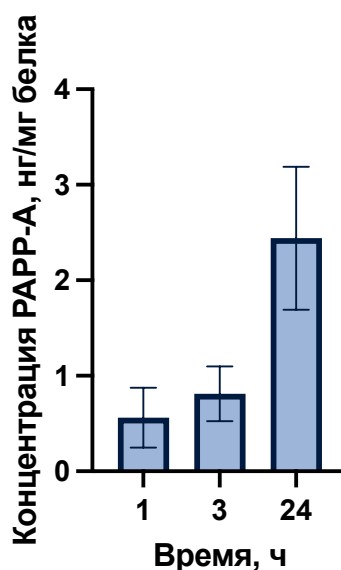


Рисунок 14. Концентрация димерного PAPP-A в кондиционированной среде культуры кардиомиоцитов человека, дифференцированных из ИПСК. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего, $n = 4$.

Из представленных на рисунке 14 данных видно, что концентрация димерного PAPP-A в кондиционированной среде кардиомиоцитов человека, дифференцированных из ИПСК через 1, 3 и 24 часа культивирования, составляет

0,56 $\pm$ 0,22 нг/мг белка, 0,81 $\pm$ 0,14 нг/мг белка, 2, 44 $\pm$ 0,93 нг/мг белка. Таким образом было показано, что кардиомиоциты способны экспрессировать PAPP-A.

1.2 Характеристика протекания специфического протеолиза IGFBP-4 под действием PAPP-A в норме

Установив, что кардиомиоциты способны экспрессировать PAPP-A, мы обратились к исследованию протеолитического расщепления IGFBP-4 под действием PAPP-A. Ранее было установлено, что димерная форма PAPP-A расщепляет IGFBP-4 в различных типах клеток, включая фибробласты [2, 268], клетки яичника [4], гранулезные клетки [269], гладкомышечные клетки сосудов [5, 270, 271], клетки стромы эндометрия [272], адипоциты сердечной ткани [3] и клетки-предшественники сердца [267]. Однако, до настоящего времени не было доказательств протеолитического расщепления IGFBP-4 под действием PAPP-A в кондиционированной среде кардиомиоцитов.

В нашей работе мы анализировали протеолитическое расщепление IGFBP-4 под действием PAPP-A, измеряя концентрации NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 в кондиционированной среде трех различных культур кардиомиоцитов методом ФИА «сэндвич-типа» с использованием антител, специфичных к неоэпитопам, образующимся в результате специфического расщепления IGFBP-4 под действием PAPP-A.

1.2.1 Протеолитическое расщепление и накопление фрагментов IGFBP-4 в кондиционированной среде культур кардиомиоцитов

Сначала мы исследовали протеолиз IGFBP-4 под действием PAPP-A, секретлируемого в среду первичной культурой кардиомиоцитов, полученных из неонатальных крыс. Как видно на рисунке ниже (рис. 15, кривые 4), в процессе протеолиза IGFBP-4 в кондиционированной среде кардиомиоцитов образуются фрагменты NT-IGFBP-4 (рис. 15 (слева)) и CT-IGFBP-4 (рис.15, (справа)). Чтобы

удостовериться в достоверности полученных результатов, концентрации фрагментов IGFBP-4 также были измерены в трёх видах контрольных экспериментов (рис. 15, кривые 1-3). В первом случае мы инкубировали стерильную культуральную среду при аналогичных условиях и промежутках времени, что и кондиционированную среду с субстратной смесью, чтобы убедиться в отсутствии в ней фрагментов IGFBP-4, которые могли бы вносить вклад в измерения экспериментальных проб (рис.15, кривая 1). Во втором случае мы добавляли к стерильной культуральной среде субстратную смесь. Данный контрольный эксперимент позволяет проверить, не содержит ли культуральная среда и, входящая в ее состав фетальная бычья сыворотка, каких-либо ферментов, протеолизующих IGFBP-4 (рис.15, кривая 2). В третьем случае к стерильной культуральной среде помимо субстратной смеси, содержащей IGFBP-4, IGF-II и Ca^{2+} , добавляли рекомбинантный димерный PAPP-A. В ходе данного эксперимента можно проверить оптимальность подобранных условий эксперимента для функционирования PAPP-A, и, также, косвенным образом убедиться в отсутствии в среде ингибирующих агентов (рис.15, кривая 3).

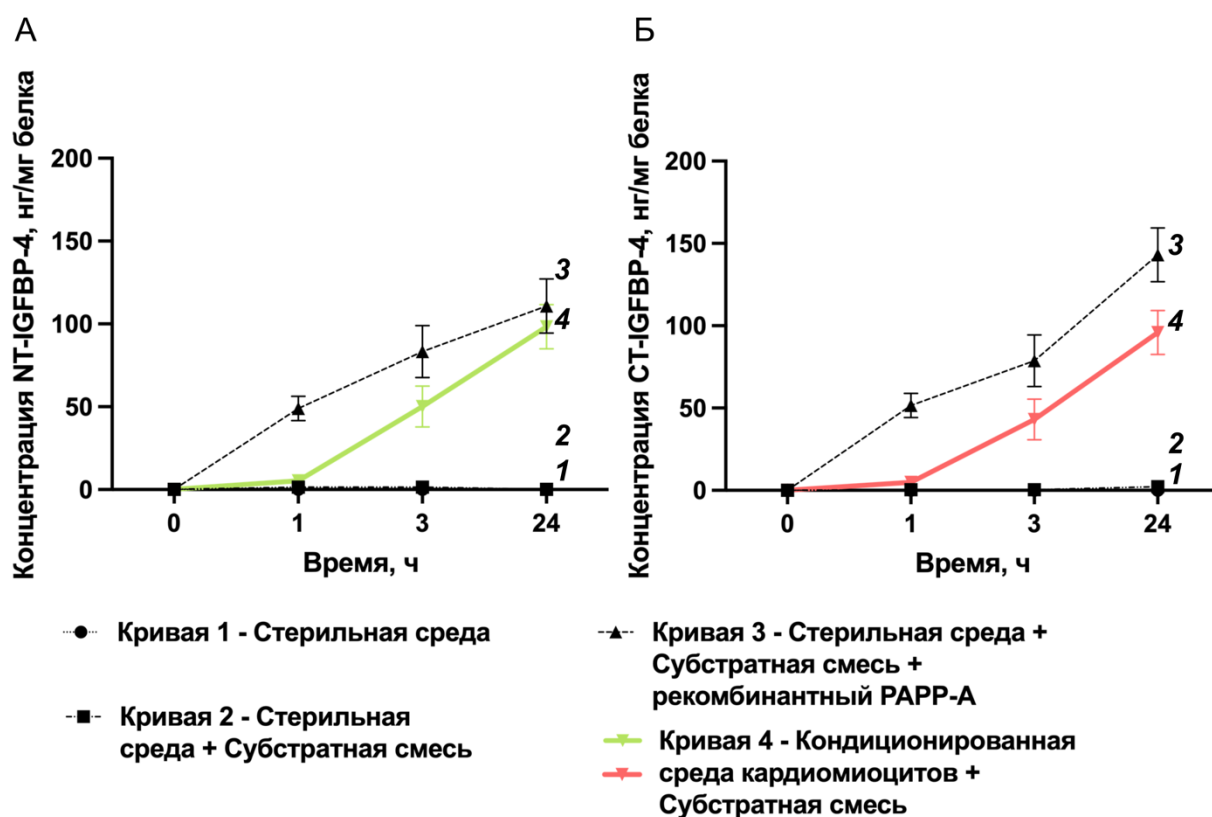


Рисунок 15. Динамика образования NT-IGFBP-4 (А) и СТ-IGFBP-4 (Б) в ходе протеолитической реакции IGFBP-4 в течение 1, 3 и 24 часов. Стерильная среда DMEM, проинкубированная с субстратной смесью в присутствии рекомбинантного димерного PAPP-A (кривая 3), кондиционированная клеточная среда, проинкубированная с субстратной смесью в присутствии первичной культуры кардиомиоцитов крысы (кривая 4), стерильная среда DMEM, проинкубированная с субстратной смесью (кривая 2), стерильная среда DMEM, проинкубированная те же промежутки времени (кривая 1). Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение, n=11.

Концентрации фрагментов IGFBP-4 в кондиционированной среде (рис.15, кривая 4) через 1, 3 и 24 часа от начала протеолитической реакции составляли 4,3 $\pm$ 5,2 нг/мл, 41,1 $\pm$ 7,3 нг/мл и 47,9 $\pm$ 10,2 нг/мл (NT-IGFBP-4) и 3,9 $\pm$ 4,1 нг/мл, 43,1 $\pm$ 8,3 нг/мл и 80,1 $\pm$ 12,2 нг/мл (СТ-IGFBP-4) соответственно. То есть, наблюдалось накопление фрагментов IGFBP-4 в кондиционированной среде во времени. При этом в образцах стерильной культуральной среды образования фрагментов обнаружено не было (рис.15, кривые 1 и 2).

Важно отметить, что на начальных временных промежутках протеолитической реакции N- и С-концевые фрагменты IGFBP-4 не детектировались в кондиционированной среде кардиомиоцитов. Также при проведении контрольного эксперимента с инкубацией субстратной смеси в стерильной среде в присутствии 500 нг/мл рекомбинантного PAPP-A в течение 1, 3 и 24 часов (рис. 15, кривая 3) концентрация фрагментов IGFBP-4 была в 2 раза выше, чем в отсутствие PAPP-A. Данные результаты говорят о том, что модельная система подходит для изучения протеолиза IGFBP-4 под действием PAPP-A,

Следует отметить, что несмотря на схожий характер динамики накопления фрагментов IGFBP-4, концентрации детектируемых фрагментов отличались. Это может быть связано с тем, что иммунохимическая система, использованная для детекции С-фрагмента IGFBP-4, обладает большей чувствительностью по отношению к СТ-IGFBP-4, а также кросс-реактивностью по отношению к

полноразмерному белку IGFBP-4, поэтому полученные концентрации СТ-IGFBP-4 выше, чем концентрации NT-IGFBP-4. Помимо этого, разница в концентрациях фрагментов, наблюдаемая нами, может быть связана с различием в стабильности N- и С-фрагментов. Поэтому наиболее удобным для количественного анализа протеолиза IGFBP-4 является детекция NT-IGFBP-4.

К сожалению, в культуре взрослых кардиомиоцитов нам не удалось детектировать NT-IGFBP-4 с помощью пары антител, используемой в случае неонатальных кардиомиоцитов крысы и кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК (рис. 16 А и В). Поэтому мы попробовали определить уровень протеолиза IGFBP-4 в кондиционированной среде взрослых кардиомиоцитов, измерив концентрацию СТ-IGFBP-4 с помощью высоко специфичных антител. Только с помощью данной пары антител нам удалось оценить уровень протеолиза IGFBP-4 (рис. 16 Б), поэтому далее в случае взрослых кардиомиоцитов крысы, мы оценивали уровень протеолиза IGFBP-4 по концентрации С-фрагмента IGFBP-4.

Ниже представлены результаты измерений после исследования накопления фрагментов IGFBP-4 во всех полученных культурах кардиомиоцитов.

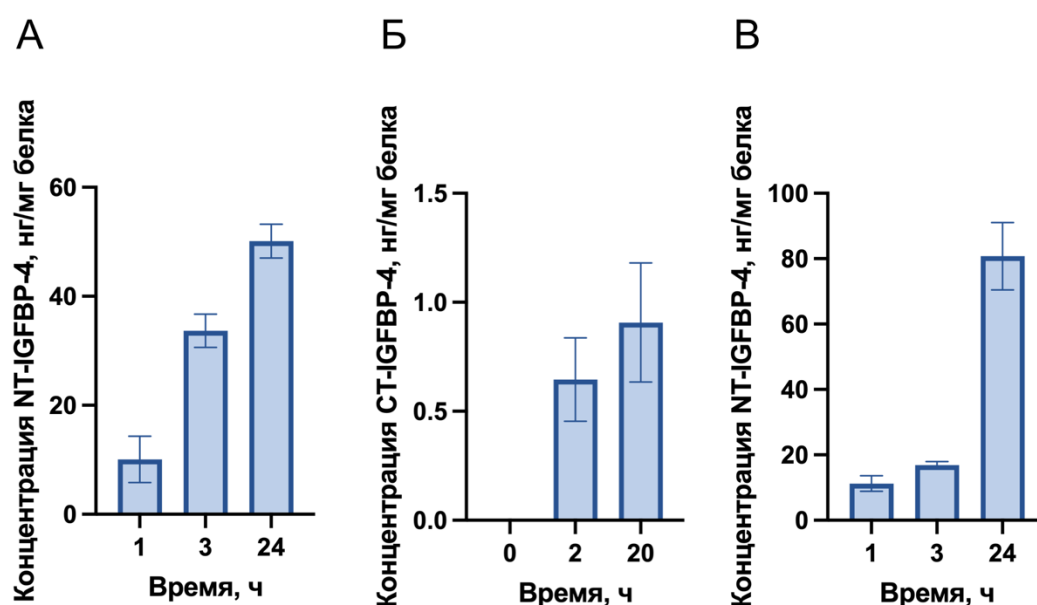


Рисунок 16. Накопление N- и С-фрагмента IGFBP-4 в кондиционированной среде: А – первичной культуры кардиомиоцитов, полученной из неонатальных крыс; Б –

первичной культуры кардиомиоцитов, полученной из взрослых крыс; В – культуры кардиомиоцитов человека, дифференцированных из ИПСК. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего, n=9 (А), n=5 (Б), n= 5 (В).

Как видно из рис. 16, в случае неонатальной культуры кардиомиоцитов (рис. 16 А) и культуры кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК (рис. 16 Б), уровень протеолиза сопоставим, однако в случае культуры взрослых кардиомиоцитов протекает на очень низком уровне, по сравнению с другими культурами (рис. 16 В). Такие различия могут быть связаны с вариациями в концентрации протеазы PAPP-A на поверхности разных типов кардиомиоцитов, а также с разницей в протеолитической активности PAPP-A.

Вариации в уровне протеолиза IGFBP-4 под действием PAPP-A могут быть обусловлены тем, что культуры кардиомиоцитов обладают разной степенью зрелости. В случае неонатальных кардиомиоцитов и кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК, уровень протеолиза значительно выше, так как данные клетки являются менее зрелыми и находятся в процессе формирования цитоскелета и внутриклеточных структур, в связи с чем требуют большего количества ростового фактора IGF, который и высвобождается в процессе протеолиза IGFBP-4 под действием PAPP-A. В случае же культуры взрослых кардиомиоцитов крысы, которая представлена зрелыми высокодифференцированными клетками, потребность в ростовых факторах может быть значительно ниже, в сравнении с менее зрелыми кардиомиоцитами, с чем может быть связана существенная разница в уровне протеолиза IGFBP-4.

Тем не менее, на основании данных, представленных на рисунках 15 и 16, нам удалось установить, что протеолитическое расщепление IGFBP-4 протекает в кардиомиоцитах в норме, причем наблюдается положительная динамика накопления NT- и СТ-IGFBP-4 фрагментов в кондиционированной среде во всех случаях. Данные фрагменты IGFBP-4 ассоциированы со специфической активностью PAPP-A, поскольку для измерения фрагментов IGFBP-4 были

использованы антитела специфичные к неоэпитопам, образующимся после специфического расщепления IGFBP-4 под действием PAPP-A.

1.2.2 Влияние IGF-II на протекание PAPP-A-зависимого протеолиза IGFBP-4 в культурах кардиомиоцитов

Высвобождение молекул IGF из комплекса с IGF связывающими белками (IGFBP) является важным механизмом регуляции уровня IGF в организме. В процессе протеолиза IGFBP под действием специфических протеаз происходит расщепление IGFBP с образованием двух фрагментов IGFBP и активного IGF. Известно, что PAPP-A-зависимый протеолиз IGFBP-4 преимущественно протекает, когда IGFBP-4 находится в комплексе с IGF-II [8, 273]. Как упоминалось ранее, помимо IGFBP-4 протеаза PAPP-A проявляет специфическую активность и по отношению к IGFBP-5, однако протеолиз IGFBP-5 является IGF-независимым [200]. В 2001 году Лоурсен и соавторы показали, что протеолиз IGFBP-4 под действием PAPP-A протекает в отсутствие IGF на очень низком уровне и усиливается в несколько раз в присутствии IGF, при этом взаимодействие PAPP-A непосредственно с IGF установлено не было. Таким образом, было показано, что IGF усиливает протеолиз за счёт взаимодействия с IGFBP-4, а не с PAPP-A [274]. Поэтому на следующем этапе работы мы исследовали влияние IGF-II на протекание протеолиза IGFBP-4 в условиях трёх модельных систем. Для этого мы провели протеолитическое расщепление IGFBP-4 под действием PAPP-A (См. раздел 2.2. «Материалы и методы исследования») в присутствии и в отсутствие IGF-II в составе субстратной смеси. Ниже приведены результаты данных экспериментов (рис.17).

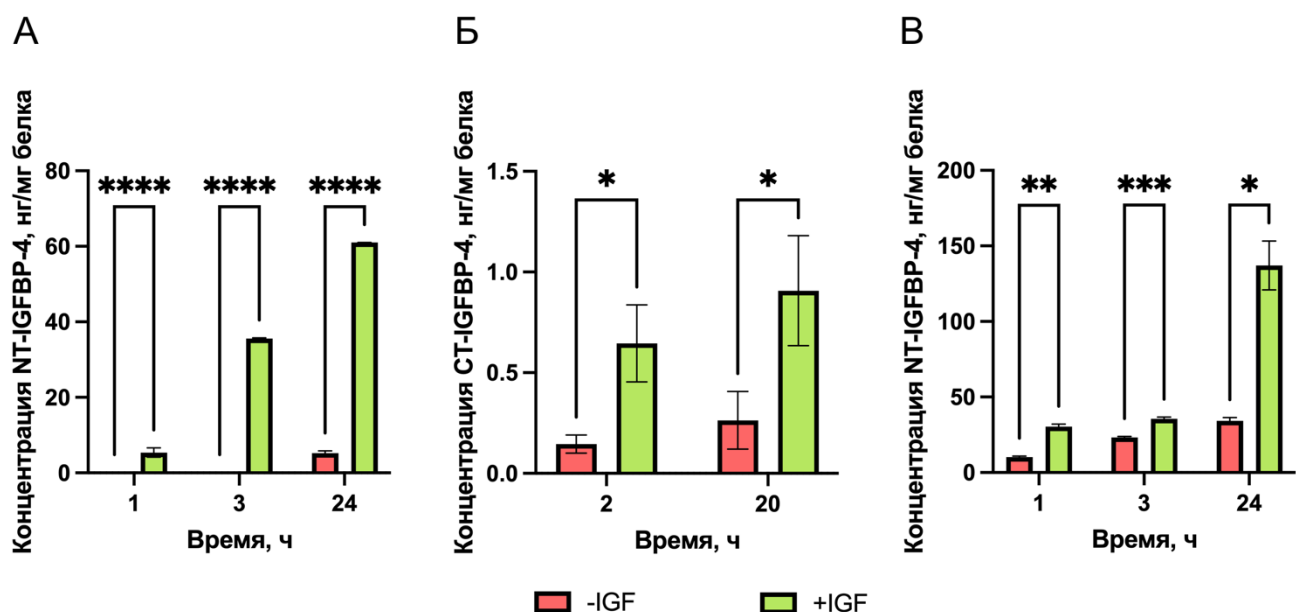


Рисунок 17. Влияние IGF-II на PAPP-A-зависимый протеолиз IGFBP-4 в: А – первичной культуре кардиомиоцитов, полученной из неонатальных крыс; Б – первичной культуре кардиомиоцитов, полученной из взрослых крыс; В – культуре кардиомиоцитов человека, дифференцированных из ИПСК. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение, $n=9$ (А), $n=5$ (Б), $n=5$ (В); ****- $p<0,0001$, *** - $p<0,001$, ** - $p<0,01$, * - $p<0,05$ Статистически значимые различия между группами определяли по двухфакторной ANOVA.

Из представленных результатов видно, что в случае всех модельных систем концентрация фрагментов IGFBP-4 после протеолиза в присутствии IGF-II (рис.17, зелёные столбцы диаграмм) выше, чем в отсутствии IGF-II (рис.17, красные столбцы диаграмм). Так, в случае первичной культуры кардиомиоцитов, полученной из неонатальных крыс (рис. 17А) концентрация NT-фрагмента IGFBP-4 после 1, 3 и 24 часов протеолитической реакции составила $5,4 \pm 2,8$ нг/мл, $35,6 \pm 0,4$ нг/мл и $61 \pm 0,1$ нг/мл, соответственно. В отсутствии IGF, NT-IGFBP-4 детектировался только после 24 часовой инкубации в концентрации $5,2 \pm 1,5$ нг/мл. В случае культуры кардиомиоцитов человека, дифференцированных из ИПСК (рис. 17В) и первичной культуры кардиомиоцитов из взрослых крыс (рис. 17Б), протеолиз в присутствии IGF-II протекает эффективнее, чем в отсутствии IGF-II в 1,5 – 3 раза и в 10 – 15 раз, соответственно. Тем не менее, в отсутствии IGF-II в

случае 24-часовой инкубации в культуре неонатальных кардиомиоцитов крысы и протеолиза в культуре кардиомиоцитов человека, дифференцированных из ИПСК, а также в культуре кардиомиоцитов, полученной из взрослых крыс, детектируется NT-IGFBP-4, хотя и в меньших концентрациях, чем в присутствии IGF-II при аналогичном времени протеолитической реакции. Этот факт можно объяснить вероятной способностью кардиомиоцитов секретировать эндогенный IGF-II, так как ранее была показана экспрессия мРНК *IGF-II* в кардиомиоцитах [111]. По-видимому, IGF-II, эндогенно синтезированного кардиомиоцитами, становится достаточно для образования комплекса с IGFBP-4, в результате чего увеличивается эффективность протеолиза IGFBP-4.

Таким образом, на основании результатов, представленных на рисунке 17, показывающих, что протеолиз IGFBP-4 протекает эффективнее в присутствии IGF-II во всех модельных системах, можно заключить, что в кондиционированной среде кардиомиоцитов в норме протекает RAPP-A-зависимый протеолиз IGFBP-4.

1.2.3 Ингибирование RAPP-A специфичного протеолиза IGFBP-4 с использованием фенантролина-1,10 и ЭДТА

Протеаза RAPP-A, или ассоциированный с беременностью белок А плазмы, является матриксной металлопротеазой, содержащей в своем активном центре ион Zn^{2+} [1, 275]. Ион цинка, расположенный в каталитическом центре RAPP-A, координирован посредством специального консенсусного мотива. Кроме этого, важную структурную роль в координации иона цинка выполняет остаток метионина (Met-556) [276]. В структуре RAPP-A присутствуют 3 Lin12-Notch повтора (LNR): LNR1 и LNR2 обнаруживаются в протеолитическом домене, в то время как LNR3 расположен в С-концевом домене молекулы RAPP-A. Показано, что все три повтора способны связывать ионы кальция, что необходимо для реализации протеолитической функции RAPP-A [277]. Таким образом, ионы Ca^{2+} также являются важными регуляторами активности RAPP-A, так как их связывание в LNR-повторах необходимо для координации иона Zn^{2+} в активном центре.

На следующем этапе нашей работы мы изучали ингибирование RAPP-A-опосредованной протеолитической деградации IGFBP-4 в присутствии фенантролина и ЭДТА в кондиционированной среде кардиомиоцитов. Для этого рекомбинантный димерный RAPP-A, используемый в качестве референсного образца, и культуру кардиомиоцитов человека, дифференцированных из ИПСК, предварительно в течение часа обрабатывали 0,2 мМ фенантролином-1,10, являющимся классическим ингибитором металлопротеаз, связывающим Zn^{2+} [278], и 50 мМ ЭДТА, являющимся хелатором двухвалентных ионов, таких, как Ca^{2+} . Затем проводили протеолиз IGFBP-4 и измеряли концентрацию NT-IGFBP-4, как описано в разделе «Методы исследования». Результаты представлены ниже (рис.18).

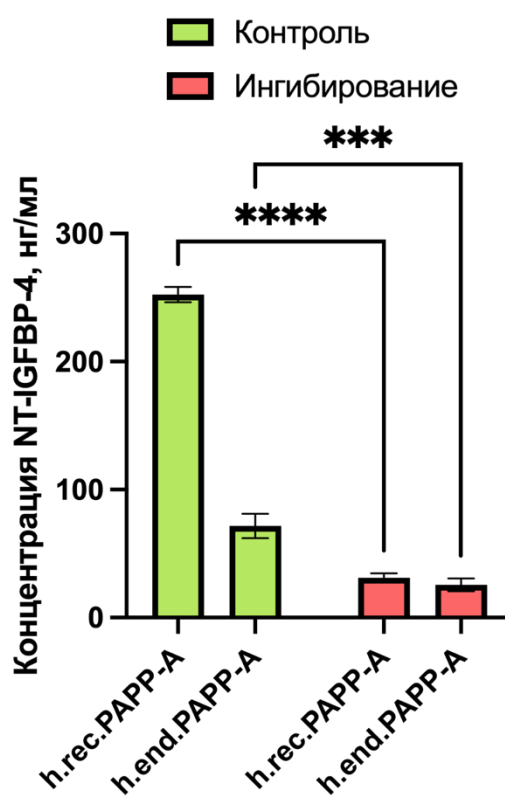


Рисунок 18. Ингибирование RAPP-A-специфичного протеолиза IGFBP-4 в культуре кардиомиоцитов, полученных из ИПСК человека под действием ЭДТА и 1,10-фенантролина в протеолитической реакции *in vitro* (в присутствии рекомбинантного гомодимерного RAPP-A человека (*h.res.RAPP-A*)) ($n=4$) и в кондиционированной среде кардиомиоцитов в присутствии эндогенного RAPP-A

(h.end.RAPP-A)) ($n=4$). Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение. Статистически значимые различия между группами определяли по двухфакторной ANOVA, ***- $p<0,001$, ****- $p<0,0001$.

Из представленного на рисунке 18 графика видно, что концентрация NT-IGFBP-4 после протеолитического расщепления IGFBP-4 в течение 3 часов в стерильной культуральной среде в присутствии человеческого рекомбинантного гомодимерного RAPP-A и в кондиционированной среде кардиомиоцитов составляет 252 ± 12 нг/мл и 71 ± 19 нг/мл, соответственно. Предварительная инкубация гомодимерного RAPP-A и культуры кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК, как с ЭДТА (5 мМ), так и с 1,10-фенантролином (0,2 мМ) вызывала снижение уровня исходного RAPP-A-специфического протеолиза IGFBP-4 на 70% в случае культуры кардиомиоцитов человека, дифференцированных из ИПСК и на 90% - в случае протеолиза IGFBP-4 под действием человеческого рекомбинантного гомодимерного RAPP-A (рис. 18), что может являться дополнительным подтверждением того, что наблюдаемое в культуре кардиомиоцитов протеолитическое расщепление IGFBP-4 осуществляется ферментом, чья активность регулируется ионами Ca^{2+} и Zn^{2+} , т.е. RAPP-A. Сохраняющаяся протеолитическая активность RAPP-A, наблюдаемая как в присутствии кардиомиоцитов, так и в отношении рекомбинантного RAPP-A, может быть связана с дополнительными факторами в секрете клеток, которые могут стабилизировать RAPP-A в отсутствие Zn^{2+} и Ca^{2+} .

1.2.4 Исследование локализации протекания RAPP-A специфического протеолиза IGFBP-4

Представленные ранее результаты свидетельствуют о том, что в кондиционированной среде кардиомиоцитов присутствует высоко активная протеаза RAPP-A и её активность возрастает при добавлении IGF. Логичным было задаться вопросом о том, где протекает RAPP-A специфичный протеолиз IGFBP-4.

Как упоминалось выше, RAPP-A является металлопротеазой, ассоциированной с внешней мембраной, или матриксной металлопротеазой. Структура мономерной формы RAPP-A включает в себя три домена: N-концевой ламинин-G-подобный домен, содержащий в своём составе 250 аминокислотных остатков, каталитический домен, состоящий из 350 аминокислотных остатков, выполняющий протеолитическую функцию, и C-концевой домен, состоящий из 5 коротких повторяющихся фрагментов SCR (short consensus repeats) (SCR1 – SCR5), также известных как CCP (complement control repeat modules). SCR3 и SCR4 участвуют в «заякоривании» RAPP-A в мембране благодаря взаимодействию с гликозаминогликанами (GAG) [156, 279]. Чтобы установить локализацию протеолитически активного RAPP-A в культурах кардиомиоцитов, мы отбирали кондиционированную среду и к клеткам добавляли свежую среду. Затем расщепление IGFBP-4 проводилось как в среде, инкубированной с клетками (протеолиз на поверхности клеток), так и в кондиционированной среде (протеолиз в кондиционированной среде) в течение 1, 3 и 24 часов. После этого проводилось измерение концентрации NT-IGFBP-4 (рис. 19).

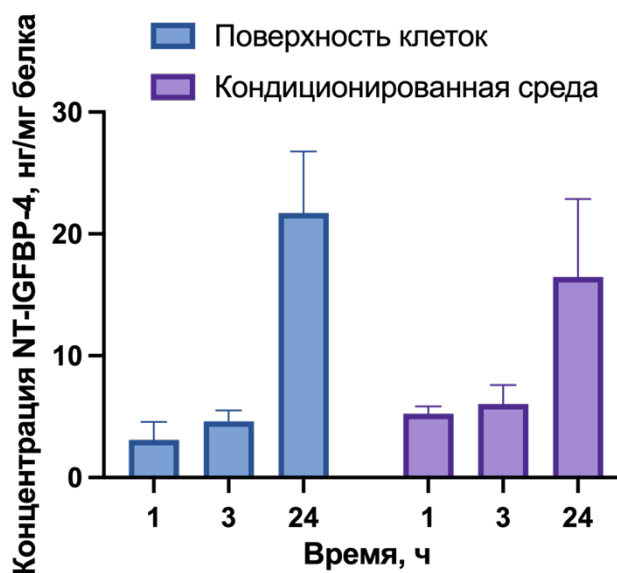


Рисунок 19. Локализация протекания RAPP-A специфичного протеолиза IGFBP-4 в культуре кардиомиоцитов человека, дифференцированных из ИПСК. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего, $n=5$.

Как видно из результатов, представленных на рисунке 19, NT-IGFBP-4 обнаруживался как на поверхности клеток, так и в кондиционированной среде. Концентрация NT-IGFBP-4, образующегося под действием PAPP-A на поверхности кардиомиоцитов человека, полученных из ИПСК (рис. 19), после 1, 3 и 24 часов протеолиза, составила $3 \pm 1,5$ нг/мл, $4,6 \pm 0,9$ нг/мл и $21,7 \pm 5$ нг/мл, соответственно.

Также для исследования локализации протеазы PAPP-A мы использовали гепарин. Известно, что гепарин может ингибировать связывание PAPP-A с поверхностью клеток, конкурируя с GAG за взаимодействие с ним [8]. Чтобы проверить, может ли гепарин удалять PAPP-A с поверхности клеток, культуры кардиомиоцитов инкубировали с гепарином (25 мкг/мл) в течение 1 часа, после чего отбирали кондиционированную среду и заменяли свежей, после чего проводилось расщепление IGFBP-4 как в отобранной кондиционированной среде, так и в свежей среде в течение трёх часов. Влияние гепарина на распределение PAPP-A-специфического протеолитического расщепления IGFBP-4 между поверхностью клеток и кондиционированной средой представлено ниже (рис. 20).

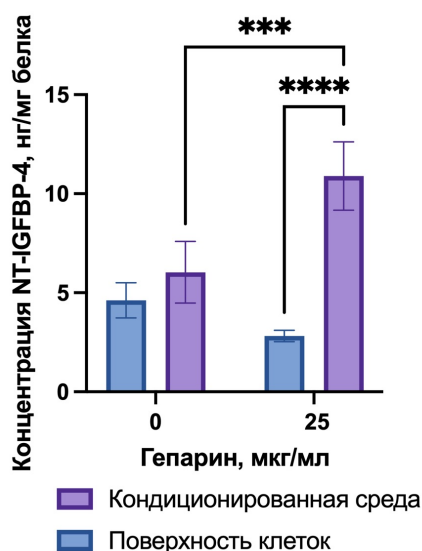


Рисунок 20. Локализация протекания PAPP-A специфичного протеолиза IGFBP-4 в кардиомиоцитах человека, полученных из ИПСК (n=4). Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение. Статистически значимые различия между группами определяли по двухфакторной ANOVA, ***- $p < 0,001$, ****- $p < 0,0001$.

Предварительная инкубация кардиомиоцитов с гепарином перед началом протеолитического расщепления IGFBP-4 приводила к увеличению концентрации NT-IGFBP-4 в 1,5 раза в кондиционированной среде по сравнению с контрольными кардиомиоцитами, дифференцированными из ИПСК. Распределение NT-IGFBP-4, образовавшегося в результате PAPP-A-специфического протеолитического расщепления IGFBP-4 между поверхностью клеток и кондиционированной средой в контрольных необработанных клетках, составило $37.2 \pm 9.8\%$ и $62.8 \pm 8.5\%$ (концентрация NT-IGFBP-4, образовавшегося в результате протеолиза PAPP-A, в обеих фракциях была принята за 100%). После обработки гепарином соотношение изменилось до $17.3 \pm 8.7\%$ и $82.7 \pm 6.1\%$ в соответствующих фракциях. Это свидетельствует о том, что обработка гепарином способствует переходу основной части PAPP-A с мембраны в кондиционированную среду, в то время как примерно 10-20% активного PAPP-A остается на поверхности клеток. Таким образом, активный фермент находится как на поверхности кардиомиоцитов, так и в кондиционированной среде. Таким образом, наши данные показывают, что протеолитически активный PAPP-A находится как на поверхности клеток, так и в кондиционированной среде.

Таким образом, мы впервые показали, что PAPP-A-опосредованный протеолиз IGFBP-4 происходит в кондиционированной среде кардиомиоцитов в трёх независимых клеточных моделях: первичной культуре неонатальных кардиомиоцитов крысы, культуре кардиомиоцитов человека, дифференцированных из ИПСК, а также в первичной культуре взрослых кардиомиоцитов крысы. Специфичность протеолиза была показана с использованием пар антител, специфичных к неопитопу, образующемуся на концах N- и C- концевых фрагментов IGFBP-4 после протеолиза под действием PAPP-A. Дополнительным доказательством PAPP-A-ассоциированного протеолиза IGFBP-4 в кондиционированной среде кардиомиоцитов является преимущественное протекание протеолиза IGFBP-4 в присутствии IGF-II, так как известно, что PAPP-A-ассоциированный протеолиз IGFBP-4 происходит эффективнее, когда IGFBP-4 находится в комплексе с IGF-II. Также было показано

заметное снижение уровня протеолиза в присутствии специфических ингибиторов PAPP-A: фенантролина, связывающего Zn^{2+} , и ЭДТА, хелатирующего Ca^{2+} , являющийся аллостерическим регулятором активного центра PAPP-A. В результате проведения экспериментов в присутствии гепарина, конкурентно взаимодействующего с SCR-остатками на конце PAPP-A, отвечающих за взаимодействие PAPP-A с глюкозаминогликаном на мембране клетки, была определена локализация PAPP-A-специфичного протеолиза IGFBP-4 как на поверхности клеток, так и во внеклеточном пространстве.

Эти результаты свидетельствуют, что полученные кардиомиоциты содержат на наружной поверхности мембраны протеолитически активный PAPP-A, который специфически расщепляет IGFBP-4 как на поверхности клеток, так и во внеклеточном пространстве. Поскольку протеолиз IGFBP-4 под действием PAPP-A ведёт к высвобождению IGF, можно предположить, что кардиомиоциты, так же, как и другие клетки сердца, такие как фибробласты и эндотелиальные клетки, могут накапливать IGF во внеклеточном пространстве, а IGF, в свою очередь, может действовать как аутокринный и паракринный регулятор в здоровой сердечной ткани. Это может обеспечить взаимодействие IGF с его рецепторами и активацию кардиопротекторных эффектов, включая защиту от ишемических повреждений миокарда [280, 281]. На основании полученных результатов, мы выдвинули предположение, что PAPP-A может играть роль в поддержании жизнеспособности кардиомиоцитов в норме, регулируя количество IGF вблизи мембраны кардиомиоцитов.

2. Роль PAPP-A в сердечной ткани при гипертрофии

2.1. *Моделирование гипертрофического ответа в клеточных культурах кардиомиоцитов in vitro и in vivo*

Гипертрофия сердечной ткани – это компенсаторная реакция, возникающая в ответ на увеличение нагрузки на миокард. Как упоминалось выше, существует два вида гипертрофии миокарда: физиологическая, направленная на увеличение фракции выброса и усиление сократительной активности сердца, и патологическая, ассоциированная с развитием сердечной недостаточности и чаще всего приводящая к летальному исходу. Существуют различные подходы к моделированию патологической гипертрофии миокарда. Среди наиболее распространенных моделей выделяют *in vitro* модели, основанные на индукции гипертрофии с помощью прогипертрофических факторов в культуре кардиомиоцитов. В качестве таких индукторов мы использовали эндотелин-1 и норадреналин, которыми независимо стимулировали первичную культуру неонатальных кардиомиоцитов крысы и культуру кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК. Использование данных индукторов широко описано в литературе. Так, например, в ряде работ в случае индукции гипертрофии эндотелином-1 предлагается использовать концентрации от 10 до 100 нМ и инкубацию с ним в течение 24 - 48 часов [283–286]. В случае индукции гипертрофии норадреналином предлагается использовать диапазон концентраций от 0.1 до 20 мкМ и инкубацию с ними в течение 24 - 48 часов [25].

2.1.1 *Эндотелин-1-индуцированная гипертрофия кардиомиоцитов*

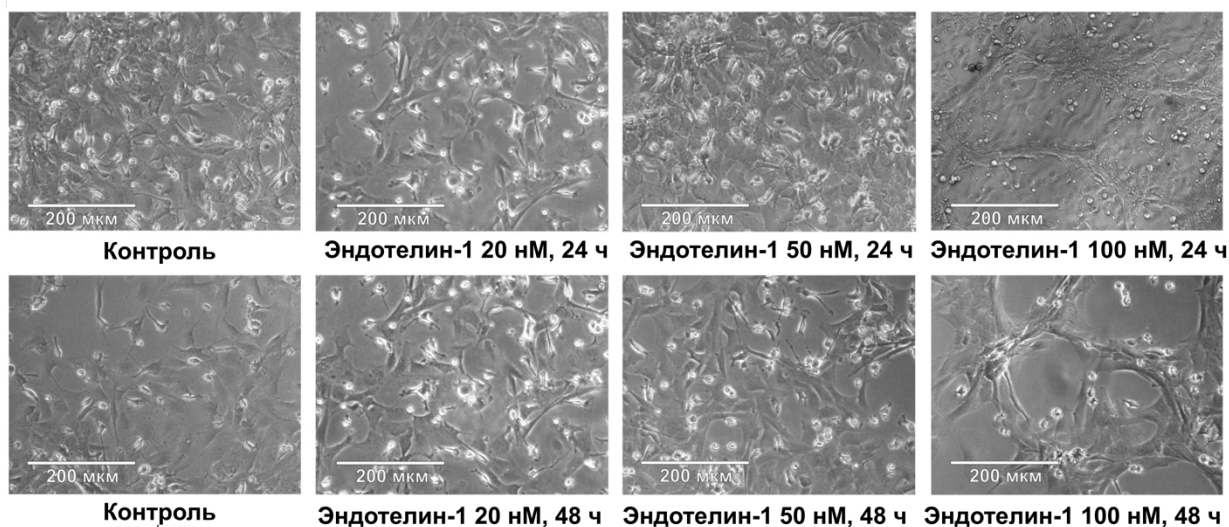
В большом количестве исследований было показано, что инкубация кардиомиоцитов в течение 1-3 суток в присутствии эндотелина-1 в диапазоне концентраций 10–100 нМ стимулирует увеличение клеток в размерах и их переход

в гипертрофированное состояние [23, 282–285]. Показано, что эндотелин-1 является индуктором гипертрофии миокарда (увеличение размера кардиомиоцитов, вызванное изменениями транскрипционной и трансляционной программ) [286]. Поэтому в первом случае для индукции гипертрофических изменений в культурах мы инкубировали кардиомиоциты с различными концентрациями эндотелина-1. Развитие гипертрофии в культурах оценивали по изменению площади кардиомиоцитов после инкубации с эндотелином и концентрации натрийуретического пептида В типа, который является биомаркёром гипертрофии и сердечной недостаточности.

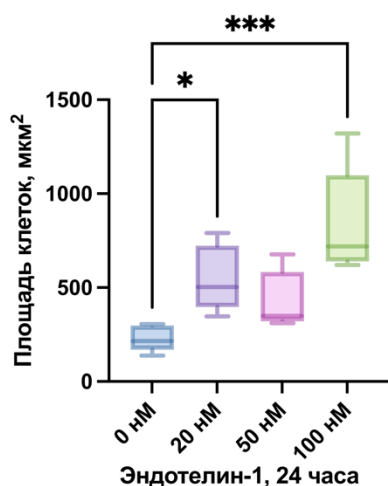
2.1.1.1. Первичная культура кардиомиоцитов, полученная из неонатальных крыс

Ниже приведены фотографии первичной культуры кардиомиоцитов, полученных из неонатальных крыс, сделанные в режиме фазового контраста после 24 и 48-часовой инкубации в присутствии различных концентраций эндотелина-1 (рис. 21).

А



Б



В

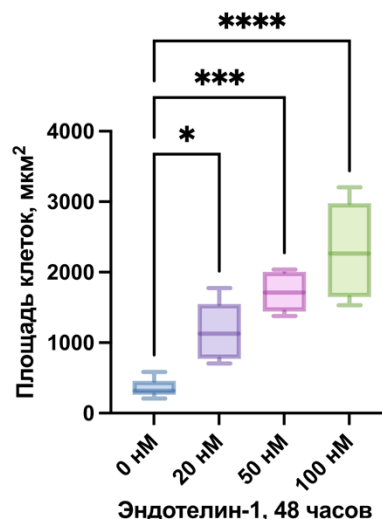


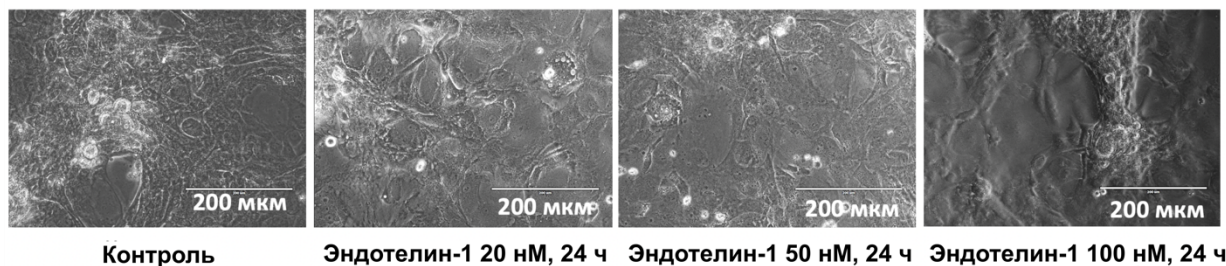
Рисунок 21. Увеличение размеров кардиомиоцитов, полученных из неонатальных крыс, под действием эндотелина-1. А – фотографии кардиомиоцитов после 24 и 48-часовой инкубации с различными концентрациями эндотелина-1, сделанные в режиме фазового контраста; Б – зависимость площади кардиомиоцитов от концентрации эндотелина-1 при инкубации с ним в течение 24 часов. В – зависимость площади кардиомиоцитов от концентрации эндотелина-1 при инкубации с индуктором в течение 48 часов. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение, $n=15$. Статистически значимые различия между группами определяли по двухфакторной ANOVA, * $p<0,05$, ***- $p<0,001$, ****- $p<0,0001$.

Как видно из результатов на рисунке 21, площадь поверхности кардиомиоцитов после инкубации в культуральной среде, содержащей 20, 50 и 100 нМ эндотелина-1, в течение 24 часов и 48 часов инкубации увеличивается в среднем в 2, 1,8 и 4,5 раза и в 3,2, 4,4 и 6,4 раза, соответственно, по сравнению с площадью контрольных кардиомиоцитов (культивированных без добавления эндотелина-1).

2.1.1.2. Культура кардиомиоцитов человека, дифференцированная из ИПСК

Далее приведены результаты аналогичного исследования в культуре кардиомиоцитов человека, дифференцированных из ИПСК. Аналогично подбирали оптимальное время инкубации и концентрацию эндотелина-1 (рис.22). При этом инкубация с эндотелином-1 длительностью более 24 часов приводила к значительному снижению жизнеспособности кардиомиоцитов, поэтому более длительную инкубацию для данной культуры кардиомиоцитов не проводили.

А



Б

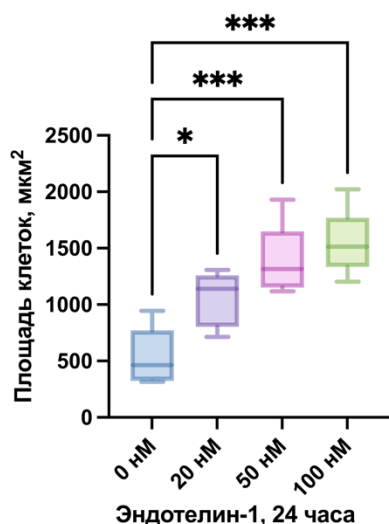


Рисунок 22. Индукция гипертрофии в культуре кардиомиоцитов человека, дифференцированной из ИПСК, под действием эндотелина-1. А – фотографии кардиомиоцитов после 24-часовой инкубации с различными концентрациями эндотелина-1, сделанные в режиме фазового контраста; Б – зависимость площади кардиомиоцитов от концентрации эндотелина-1 при инкубации с ним в течение 24 часов. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение, $n=15$. Статистически значимые различия между группами определяли по двухфакторной ANOVA, $*p<0,05$, $***-p<0,001$.

Экспериментальные данные (рис. 22) демонстрируют, что инкубация кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК, с эндотелином-1 в концентрациях 20, 50 и 100 нМ приводит к увеличению размеров клеток (рис. 22А). Площадь клеток, обработанных эндотелином-1, увеличивается в 2, 2,6 и 2,8 раза соответственно по сравнению с контрольными кардиомиоцитами (рис. 22Б). Также

важно отметить, что при концентрации эндотелина-1 100 нМ наблюдается значительное снижение жизнеспособности клеток через 24 часа. Это связано с цитотоксическим эффектом эндотелина-1, подтверждённым в ранее опубликованных исследованиях [255, 287].

2.1.2 Норадреналин-индуцированная гипертрофия кардиомиоцитов

В качестве альтернативного индуктора для перевода клеток в гипертрофированное состояние нами был использован норадреналин, который широко применяется для индукции гипертрофии кардиомиоцитов [25, 288]. Мы инкубировали кардиомиоциты с норадреналином в диапазоне концентраций от 2 до 10 мкМ в течение 24 или 48 часов, после чего клетки фотографировали, определяли их размеры и рассчитывали площадь, как описано в разделе «Методы исследования».

2.1.2.1 Культура кардиомиоцитов человека, дифференцированная из ИПСК

Далее приведены результаты данного исследования на культуре кардиомиоцитов человека, дифференцированных из ИПСК (рис. 23).

A

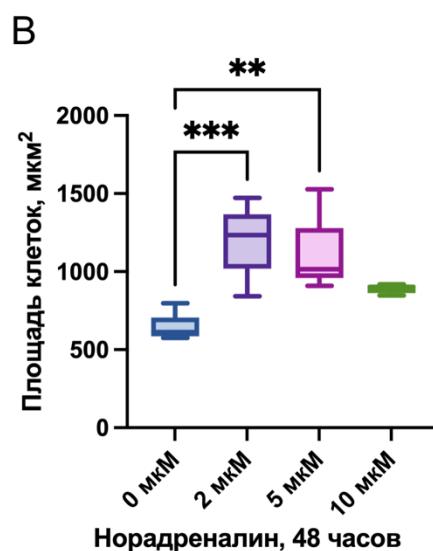
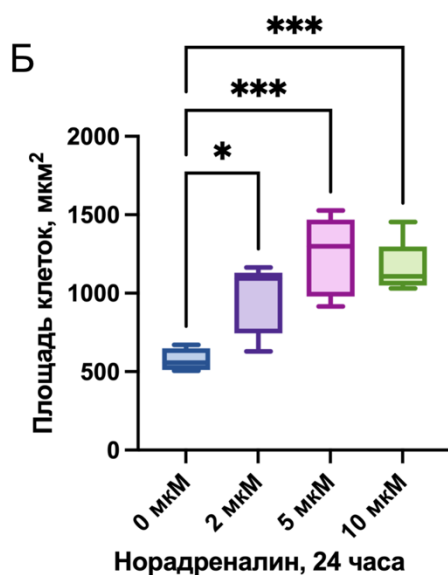
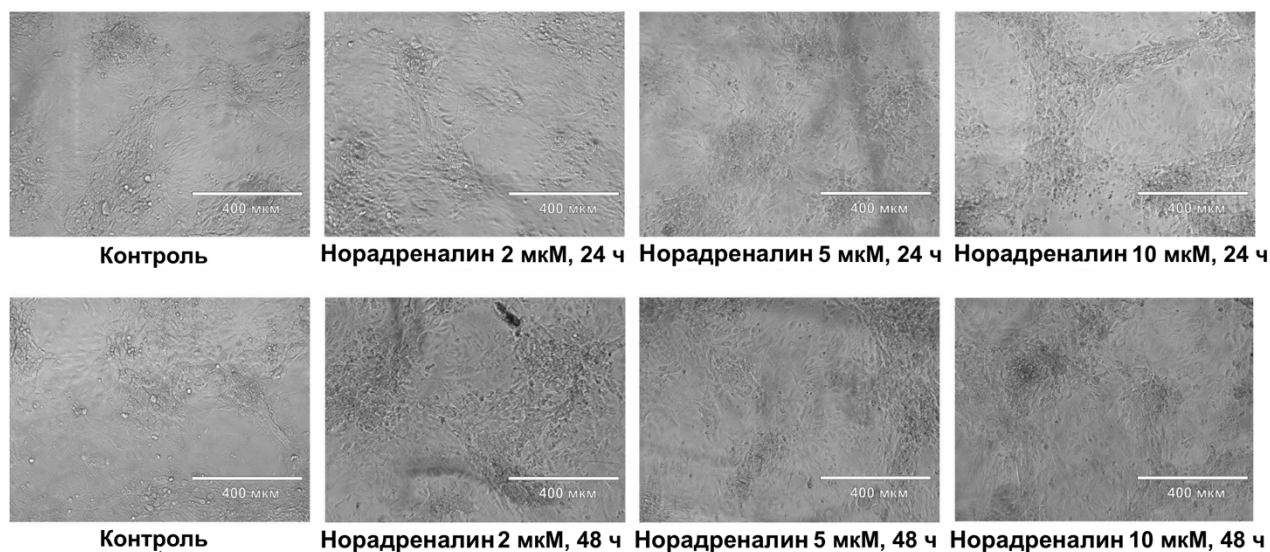


Рисунок 23. Индукция гипертрофии в культуре кардиомиоцитов человека, дифференцированной из ИПСК, под действием норадреналина. А – фотографии кардиомиоцитов после 24 и 48-часовой инкубации с различными концентрациями норадреналина, сделанные в режиме фазового контраста; Б – зависимость площади кардиомиоцитов от концентрации норадреналина при инкубации с индуктором в течение 24 часов. В – зависимость площади кардиомиоцитов от концентрации норадреналина при инкубации с ним в течение 48 часов. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение, $n=15$. Статистически

значимые различия между группами определяли по двухфакторной ANOVA, $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***-p<0,001$.

Как можно видеть из представленных результатов (рис. 23), после инкубации с 2, 5 и 10 мкМ норадреналином площадь поверхности кардиомиоцитов увеличивается в 1,6, 2,1 и 2 раза соответственно по сравнению с площадью контрольных кардиомиоцитов, инкубированных при тех же условиях в отсутствие норадреналина. Также следует отметить, что после 24- часовой инкубации с 10 мкМ норадреналином наблюдалось снижение количества жизнеспособных кардиомиоцитов в культуре, что может быть вызвано тем, что в высокой концентрации норадреналин так же, как и эндотелин-1, проявляет цитотоксические свойства [289].

Чтобы оценить влияние используемых концентраций эндотелина-1 и норадреналина на жизнеспособность кардиомиоцитов, мы провели анализ с использованием красителя AlamarBlue.

2.1.3 Исследование жизнеспособности культур кардиомиоцитов с помощью AlamarBlue после индукции гипертрофии in vitro под действием эндотелина-1 и норадреналина

На следующем этапе нашей работы мы анализировали жизнеспособность клеток после обработки индукторами гипертрофии с помощью AlamarBlue, или резазуринового синего, способного проникать в клетки. AlamarBlue - это реагент на основе резазурина, который выполняет функцию индикатора жизнеспособности клеток, определяя восстановительную способность клеток. Изначально резазурин находится в окисленном состоянии и практически не флуоресцирует. При попадании в живые клетки резазурин восстанавливается до резоруфина – соединения красного цвета, обладающего высокой флуоресценцией. Изменения жизнеспособности можно легко обнаружить с использованием планшетного ридера, измеряя флуоресценцию при 590 нм. Полученные данные нормировали на

тотальный белок в соответствующей лунке (мг белка) после чего пересчитывали изменение жизнеспособности клеток после обработки индуктором гипертрофии (CPS_n) относительно контрольной лунки, куда индукторы не добавляли (CPS_0).

Ниже на рисунке 24 приведены результаты данного эксперимента.

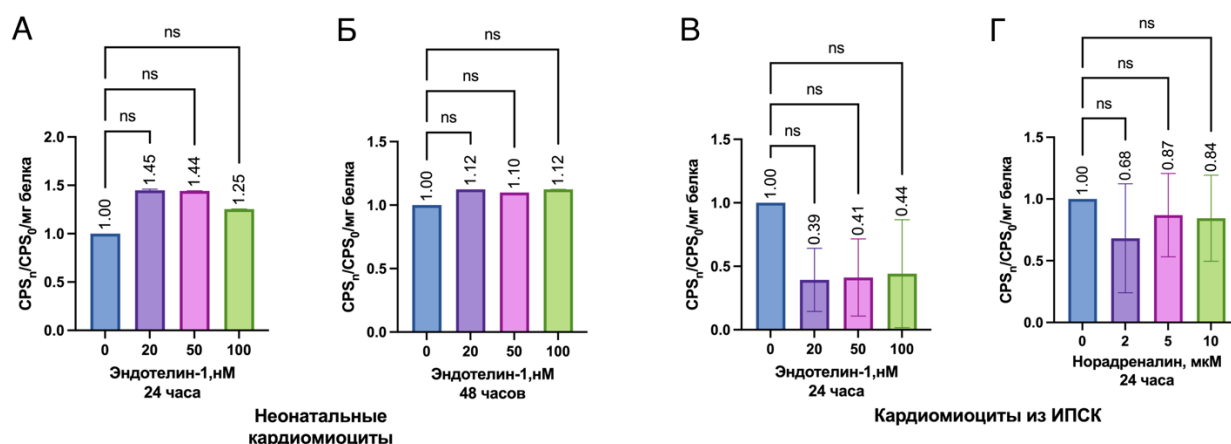


Рисунок 24. Анализ жизнеспособности культур кардиомиоцитов с помощью AlamarBlue после индукции гипертрофии *in vitro* под действием эндотелина-1 и норадреналина. А – первичная культура кардиомиоцитов неонатальных крыс после обработки эндотелином-1 в течение 24 часов; Б – первичная культура кардиомиоцитов неонатальных крыс после обработки эндотелином-1 в течение 48 часов; В – культура кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК, после обработки эндотелином-1 в течение 24 часов; Г – культура кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК, после обработки норадреналином в течение 24 часов. Данные представлены в относительных единицах CPS_n/CPS_0 /мг белка, где CPS_n – значение флуоресценции в лунке после обработки индуктором гипертрофии, CPS_0 – значение флуоресценции в лунке без индуктора гипертрофии, мг белка – мг тотального белка в лунке. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение, $n=4$. Статистически значимые различия между группами определяли по двухфакторной ANOVA, значения считались достоверными при $p<0,05$, ns – различия статистически не достоверны.

Из представленных выше графиков (рис. 24) видно, что после обработки неонатальных кардиомиоцитов эндотелином-1, а также 24-часовой обработки кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК, эндотелином-1 и норадреналином не наблюдается каких-либо статистически значимых различий в жизнеспособности кардиомиоцитов. Тем не менее, в случае кардиомиоцитов, полученных из ИПСК, заметна тенденция к снижению жизнеспособности после обработки как эндотелином-1, так и норадреналином, что согласуется с данными литературы. Далее мы обратились к моделированию гипертрофии в условиях *in vivo*.

2.1.4 Монокроталин-индуцированная модель гипертрофии миокарда в первичной культуре кардиомиоцитов, полученной из взрослых крыс

Среди современных подходов, используемых для моделирования гипертрофии в сердечной ткани, наиболее перспективным и приближенным к реальным физиологическим условиям является развитие гипертрофии на моделях животных *in vivo*. Общий принцип моделирования гипертрофии в этом случае заключается в создании таких стрессовых условий, как, например, гипоксия или лекарственные воздействия, при которых у экспериментальных животных нарушается работа сердечно-сосудистой системы и возникает потребность в компенсации функции миокарда. Для моделирования гипертрофии нами была выбрана модель создания лёгочной гипертензии, индуцированная монокроталином (МКТ). МКТ при попадании внутрь организма, способствует постепенному развитию лёгочной гипертензии и, как следствие, гипертрофии правого желудочка. Главным преимуществом модели МКТ-индуцированной гипертрофии миокарда является исключение какого-либо оперативного вмешательства кроме однократной инъекции в начале эксперимента, что делает данный подход наиболее удобным и простым. Для характеристики динамики развития патологических изменений *in vivo* в сотрудничестве с коллегами с кафедры физиологии человека и животных Биологического факультета МГУ проводили еженедельное

взвешивание, а также еженедельное измерение систолического артериального давления (АД) у всех экспериментальных животных. Спустя месяц содержания крыс в виварии мы проводили измерение давления в правом желудочке сердца, а также массу лёгких и массу всех отделов сердца у животных контрольной и МКТ-групп, после чего высчитывали коэффициенты масс соответствующих органов и индексы развития гипертрофии.

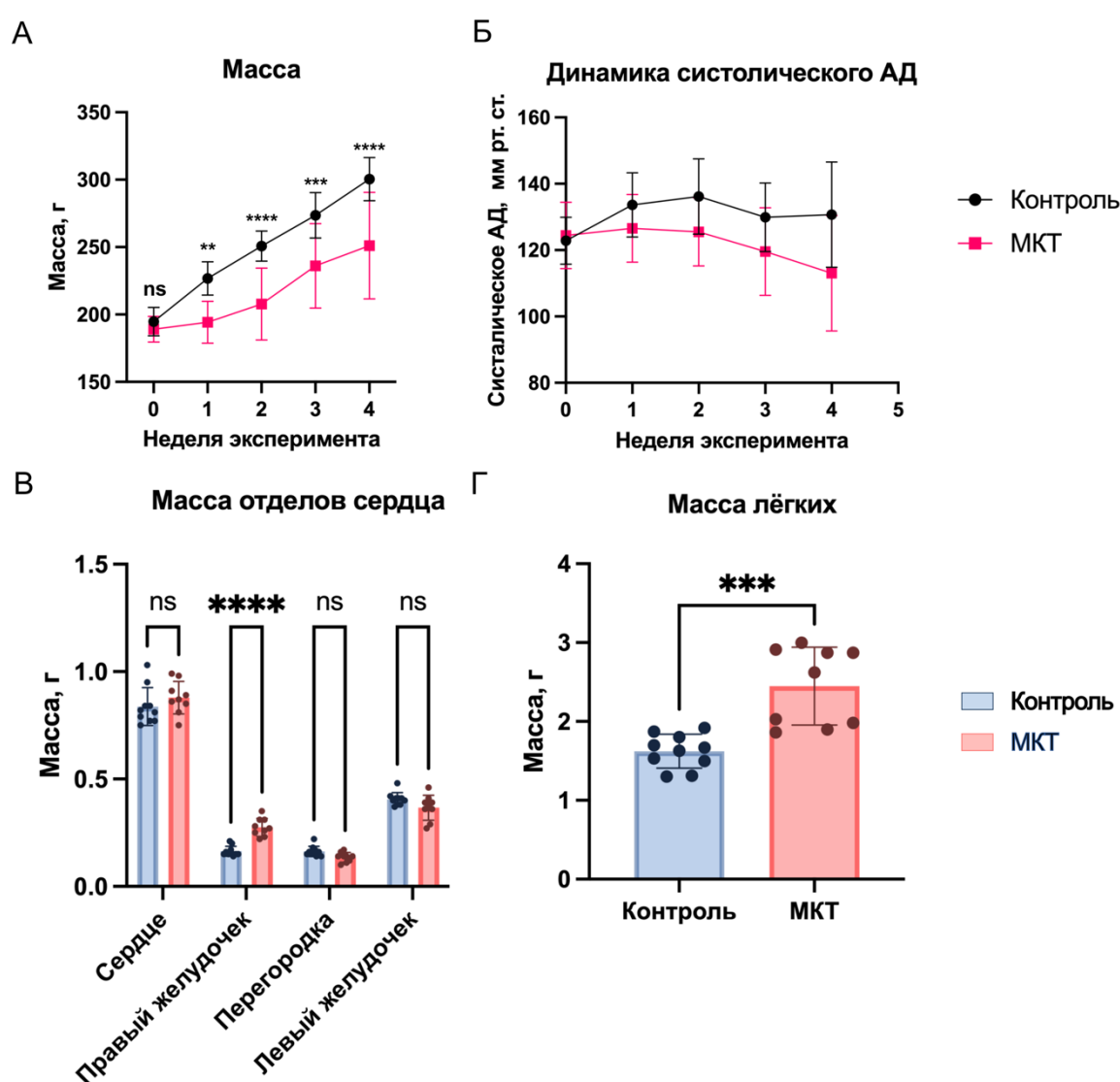


Рисунок 25. Динамика изменения массы (А) и систолического АД (Б) экспериментальных животных, изменение массы отделов сердца (В) и изменение массы лёгких (Г) у МКТ-крыс (n=9) по сравнению с группой контрольных крыс (n=10). Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение. Статистически значимые различия между группами определяли по А -

двухфакторной ANOVA, ** - $p < 0,01$, ***- $p < 0,001$, ****- $p < 0,0001$; В - двухфакторной ANOVA, **** - $p < 0,0001$; Г - непарному *t*-тесту, *** - $p < 0,001$.

Развитие МКТ-индуцированной лёгочной гипертензии сопровождалось статистически достоверным увеличением веса крыс контрольной группы, по сравнению с крысами МКТ-группы (рис. 25А). На рисунке 25Б представлена динамика систолического АД в течение 4 недель эксперимента. В нулевой точке среднее значение систолического артериального давления составило $122,9 \text{ мм.рт.ст.} \pm 7 \text{ мм.рт.ст.}$ для контрольной группы и $124,4 \pm 10 \text{ мм.рт.ст.}$ для МКТ-группы и статистически достоверно не изменялось с течением времени. При проведении анализа массы отделов сердца было показано, что статистически достоверные различия наблюдаются лишь в массе правого желудочка крыс МКТ-групп, по сравнению с крысами контрольной группы. Масса правого желудочка МКТ-животных была в 1,75 раз больше, по сравнению с массой правого желудочка крыс контрольной группы, что говорит о развитии гипертрофии (рис.25В). Также мы наблюдали статистически достоверное увеличение массы лёгких у крыс из МКТ-группы в 1,5 раза по сравнению с контрольной группой (рис.25Г).

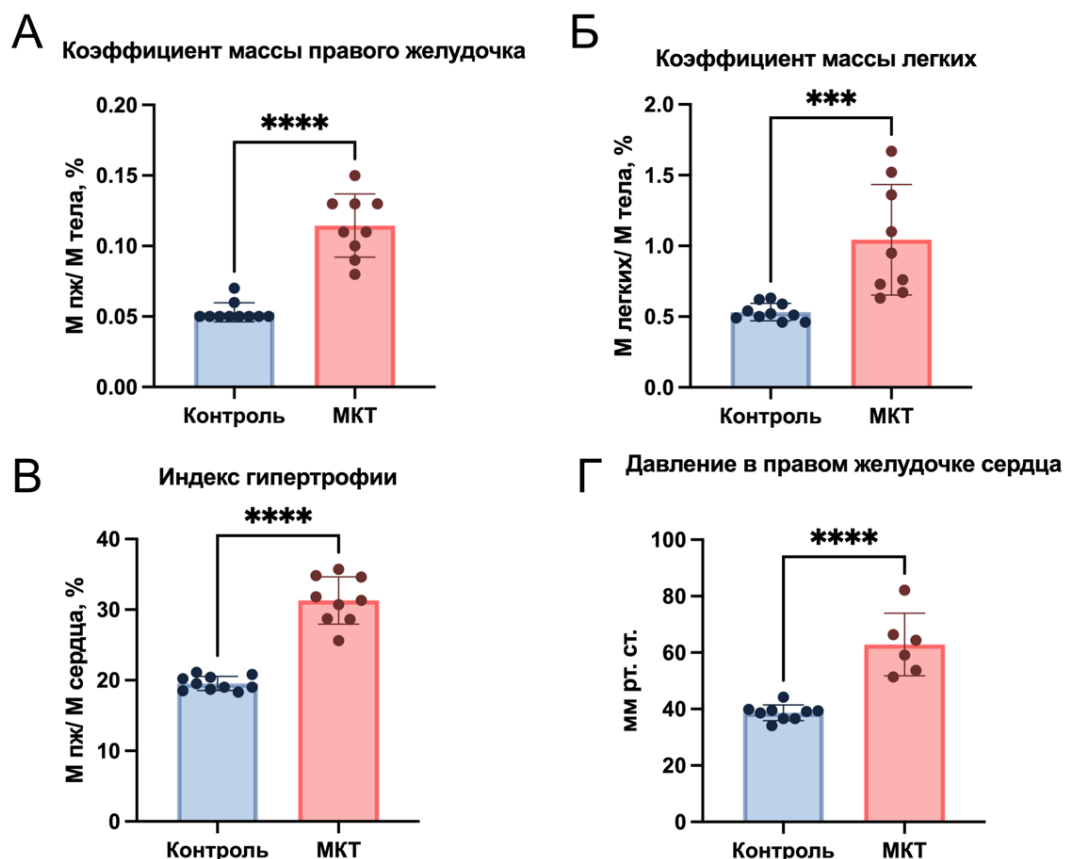


Рисунок 26. Коэффициенты массы правого желудочка (А), легких (Б) и индекс выраженности гипертрофии правого желудочка (В), рассчитанные у двух анализируемых групп крыс, разница давления в правом желудочке (Г) крыс МКТ-группы по сравнению с контрольной группой. Исследуемые группы: Контроль (n=10), МКТ (n=9). Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение. Статистически значимые различия между контрольной и МКТ группами определяли по непарному t-тесту, *** - $p < 0,001$, **** - $p < 0,0001$).

Также были определены коэффициенты массы правого желудочка (рис.26А) и массы лёгких (рис.26Б). Коэффициент массы правого желудочка МКТ-группы статистически достоверно превышает аналогичный коэффициент массы правого желудочка контрольной группы в 2 раза. Коэффициент массы легких статистически достоверно выше в МКТ-группе в 1,96 раз, что соотносится с изменением коэффициента массы правого желудочка. Также был определен индекс выраженности гипертрофии правого желудочка по отношению его массы к массе сердца. По графику на рисунке 26В видно, что индекс выраженности гипертрофии

в МКТ-группе в 1,6 раз выше по сравнению с контрольной группой. Из рисунка 26Г видно, что в МКТ-группе наблюдается увеличение давления в правом желудочке по сравнению с контролем в 1,6 раз.

После развития гипертрофии мы выделяли кардиомиоциты из контрольных и гипертрофированных сердец взрослых крыс, как описано в «Методах исследования», после чего фотографировали полученные культуры в режиме фазового контраста и проводили измерение площади кардиомиоцитов в культуре в программе Image J (рис.27), а также определяли жизнеспособность полученных кардиомиоцитов с помощью Alamar Blue.

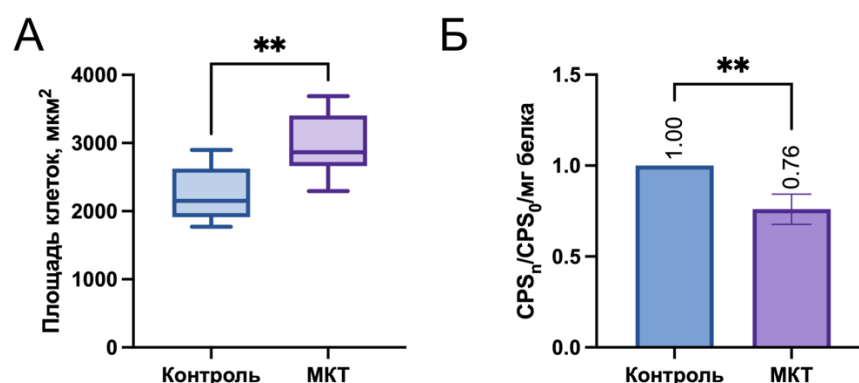


Рисунок 27. Изменение площади взрослых кардиомиоцитов МКТ-группы ($n=15$) по сравнению с кардиомиоцитами контрольной группы ($n=15$) (А). Изменение жизнеспособности культур кардиомиоцитов (Б) с помощью AlamarBlue в относительных единицах $\text{CPS}_n/\text{CPS}_0/\text{мг белка}$, где CPS_n - значение флуоресценции в культуре кардиомиоцитов МКТ-группы ($n=4$), CPS_0 – значение флуоресценции в культуре кардиомиоцитов контрольной группы ($n=4$), мг белка – мг тотального белка) Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение. Статистически значимые различия между контрольной и МКТ группами определяли по непарному t -тесту, ** - $p<0,01$.

По представленному на рисунке 27А графику видно, что площадь кардиомиоцитов при МКТ-ассоциированной гипертрофии в среднем в 1,3 раза выше по сравнению с кардиомиоцитами из контрольной группы. Также видно, что жизнеспособность кардиомиоцитов полученных из сердец крыс из МКТ-группы

ниже по сравнению с контролем в 1,3 раза. По-видимому, развитие гипертрофических изменений в культуре кардиомиоцитов под действием МКТ приводит к снижению жизнеспособности кардиомиоцитов. Полученные данные свидетельствуют о развитии гипертрофии правого желудочка, а также о сохранении гипертрофических изменений в культуре кардиомиоцитов.

2.2 Измерение концентрации натрийуретического пептида В (BNP) в полученных культурах

Натрийуретические пептиды играют решающую роль в поддержании сердечно-сосудистого гомеостаза. Данные пептиды повсеместно используются для диагностики, лечения и прогнозирования сердечной недостаточности в клинических условиях [290–292]. Натрийуретический пептид В-типа (BNP) относится к семейству пептидных гормонов, схожих по своей структуре и функциям. Являясь вазодилатирующим агентом, BNP участвует в регуляции кровяного давления и водно-солевого обмена в организме. Было показано, что натрийуретические пептиды, обладая сосудорасширяющим, натрийуретическим и мочегонным действием, способны проявлять защитные свойства по отношению к гипертрофическим изменениям и фиброзу миокарда [293, 294]. На сегодняшний день определение уровня BNP с использованием иммунохимических диагностических систем является важным инструментом для ранней диагностики сердечной недостаточности [295].

Поэтому для подтверждения гипертрофических изменений в культурах кардиомиоцитов мы проводили измерение концентрации натрийуретического пептида В (BNP) в кондиционированной среде методом флуороиммунного анализа «сэндвич»-типа с использованием антител, специфичных к BNP (рис. 28).

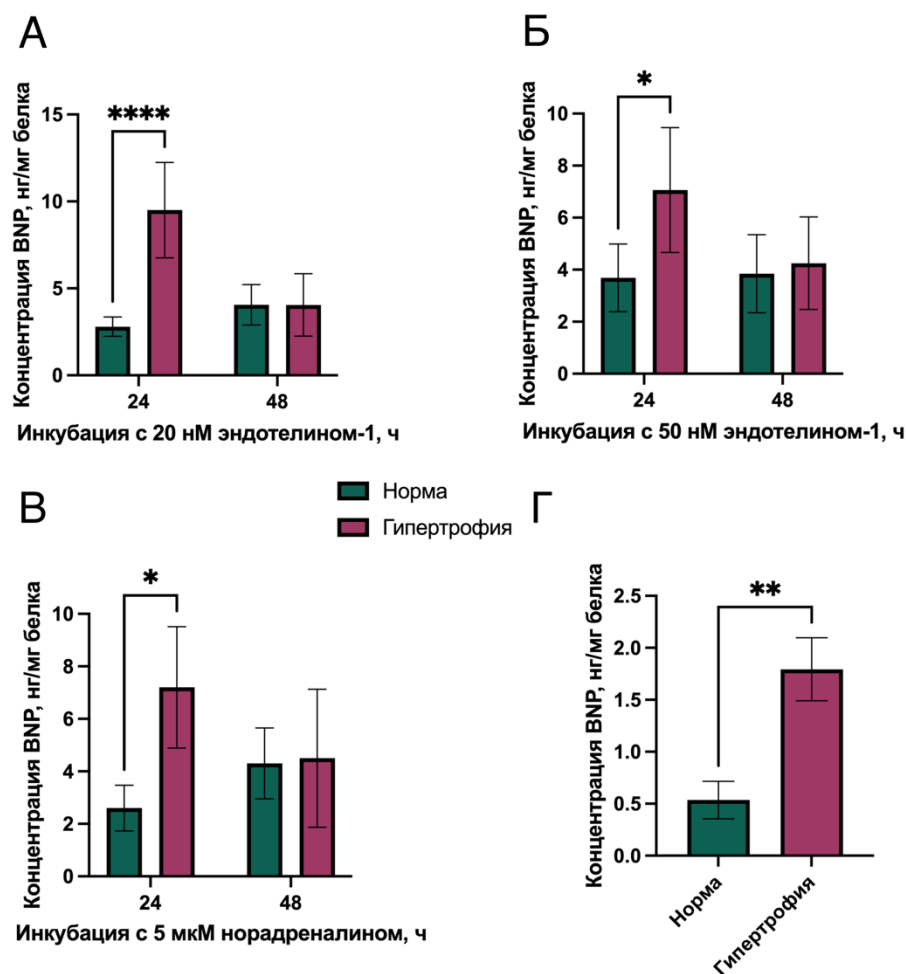


Рисунок 28. Концентрация BNP в кондиционированной среде, определенная ФИА «сэндвич» типа: А- первичная культура неонатальных кардиомиоцитов после инкубации с 20 нМ эндотелином-1 ($n=5$); Б- культура кардиомиоцитов человека, дифференцированная из ИПСК, после инкубации с 50 нМ эндотелином-1 в течение 24 и 48 ч. ($n=5$); В- культура кардиомиоцитов человека, дифференцированная из ИПСК, после инкубации с 5 мкМ норадреналином в течение 24 ч. ($n=3$), Г – первичная культура кардиомиоцитов, полученная из взрослых крыс контрольной и МКТ-групп ($n=5$). Статистически значимые различия между группами определяли: А, Б, В - по двухфакторной ANOVA, * - $p<0,05$, ****- $p<0,0001$; Г - непарному t -тесту, ** - $p<0,01$.

Мы обнаружили, что в первичной культуре кардиомиоцитов, полученная из сердец неонатальных крыс, после инкубации кардиомиоцитов с эндотелином-1 в течение 24 часов в концентрации 20 нМ в кондиционированной среде наблюдается

достоверное повышение по сравнению с контрольными клетками концентрации BNP (рис. 28А). Таким образом, инкубация первичной культуры кардиомиоцитов в присутствии эндотелина-1 в концентрации 20 нМ в течение 24 часов подходит для моделирования гипертрофического ответа кардиомиоцитов, и дальнейшие исследований мы проводили при этой концентрации эндотелина-1.

Результаты измерения концентрации BNP в культуре кардиомиоцитов человека, дифференцированных из ИПСК, после индукции гипертрофии под действием эндотелина-1 приведены на рисунке 26Б. Видно, что при 24-часовой инкубации клеточной культуры с 50 нМ эндотелином-1 концентрация BNP в кондиционированной среде достоверно увеличивается в среднем в 1,8 раз по сравнению с контрольными негипертрофированными кардиомиоцитами. Таким образом, можно заключить, что инкубация клеточной культуры кардиомиоцитов человека в присутствии эндотелина-1 в концентрации 50 нМ в течение 24 часов является оптимальной для моделирования гипертрофического ответа кардиомиоцитов.

По аналогии с моделированием гипертрофического ответа под действием эндотелина-1 мы измеряли концентрацию BNP в кондиционированной среде кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК, инкубированных с норадреналином (рис. 28В). Видно, что при 24-часовой инкубации культуры кардиомиоцитов с 5 мкМ норадреналином концентрация BNP в кондиционированной среде достоверно увеличивается в среднем в 3 раза по сравнению с контрольными негипертрофированными кардиомиоцитами, поэтому оптимальными условиями, при которых происходит переход кардиомиоцитов в гипертрофированное состояние, мы считали инкубацию кардиомиоцитов в присутствии 5 мкМ норадреналина в течение 24 часов. Таким образом, основываясь на результатах, приведенных выше на рисунках 21-24 и на рисунке 28, были определены оптимальные концентрации для перевода культур в гипертрофированное состояние *in vitro*.

В случае *in vivo* модели МКТ-ассоциированной гипертрофии сердечной ткани мы также измеряли концентрацию BNP в кондиционированной среде в

норме и при патологических изменениях (рис. 28Г). Как видно из представленных данных, концентрация BNP в кондиционированной среде гипертрофированных кардиомиоцитов в 3 раза выше по сравнению с кардиомиоцитами, полученными из контрольных животных, что говорит о развитии гипертрофии под действием монокроталина. Таким образом, повышение уровня BNP в культуре кардиомиоцитов, полученных из взрослых крыс после индукции гипертрофии *in vivo*, говорит о сохранении гипертрофических изменений кардиомиоцитов на клеточном уровне.

2.3 Измерение концентрации RAPP-A в кондиционированной среде культуры кардиомиоцитов

На предыдущих этапах нашего исследования было показано, что кардиомиоциты в норме способны секретировать RAPP-A, что указывает на потенциальную роль протеазы RAPP-A в регуляции функционирования здоровой сердечной ткани. Следующим важным этапом данного исследования было изучение того, как гипертрофические изменения влияют на концентрацию RAPP-A для определения его потенциального значения в патофизиологии гипертрофии миокарда.

Поэтому далее мы измеряли концентрацию RAPP-A с использованием пары антител, специфичной к человеческому димерному RAPP-A. На рисунке ниже приведены результаты таких измерений в кондиционированной среде культуры кардиомиоцитов человека, дифференцированных из ИПСК после индукции гипертрофии под действием эндотелина-1 и норадреналина (рис. 29).

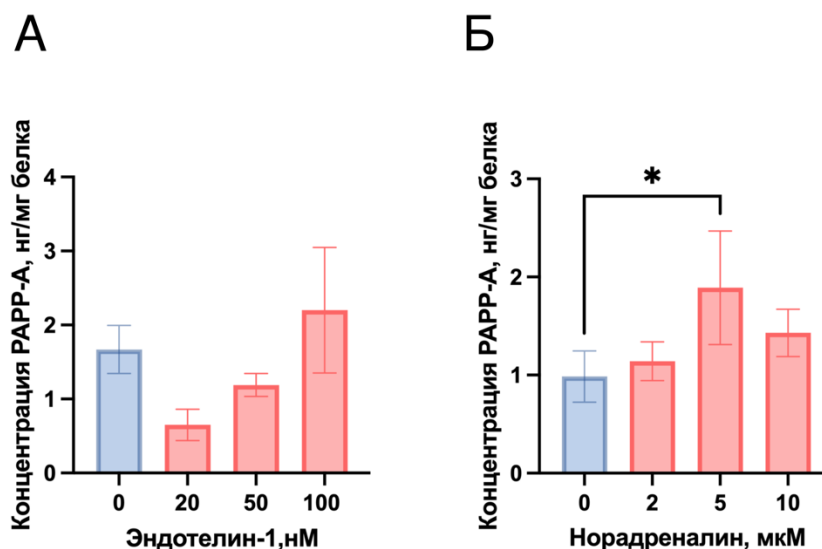


Рисунок 29. Концентрация димерного RAPP-A в кондиционированной среде кардиомиоцитов человека, полученных из ИПСК, при различных концентрациях А – эндотелина-1 ($n=3$), Б – норадреналина ($n=3$). Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение. Статистически значимые различия между группами определяли по двухфакторной ANOVA, * - $p<0,05$.

Из представленных графиков видно, что в случае гипертрофии, индуцированной с помощью эндотелина-1 (рис. 29А), не наблюдается статистически достоверных изменений в концентрациях димерного RAPP-A. Во втором случае статистически достоверное повышение концентрации димерного RAPP-A в кондиционированной среде культуры кардиомиоцитов по сравнению с контролем наблюдается при инкубации культуры с 5 мкМ норадреналином в течение 24 часов (рис. 29Б). При этом концентрация димерного RAPP-A повышается в 2 раза. Эндотелин-1 и норадреналин имеют разные механизмы действия и активируют разные сигнальные пути, с чем может быть связана разница в эффектах на экспрессию RAPP-A в этих моделях.

2.4 Изучение специфического протеолиза IGFBP-4 под действием RAPP-A при гипертрофии

На финальном этапе нашей работы мы проводили измерение уровня протеолиза IGFBP-4 при гипертрофических изменениях кардиомиоцитов с использованием пары антител, специфичных к неоэпиту, образующемуся на N-фрагменте IGFBP-4 после специфического протеолиза под действием PAPP-A (рис. 30).

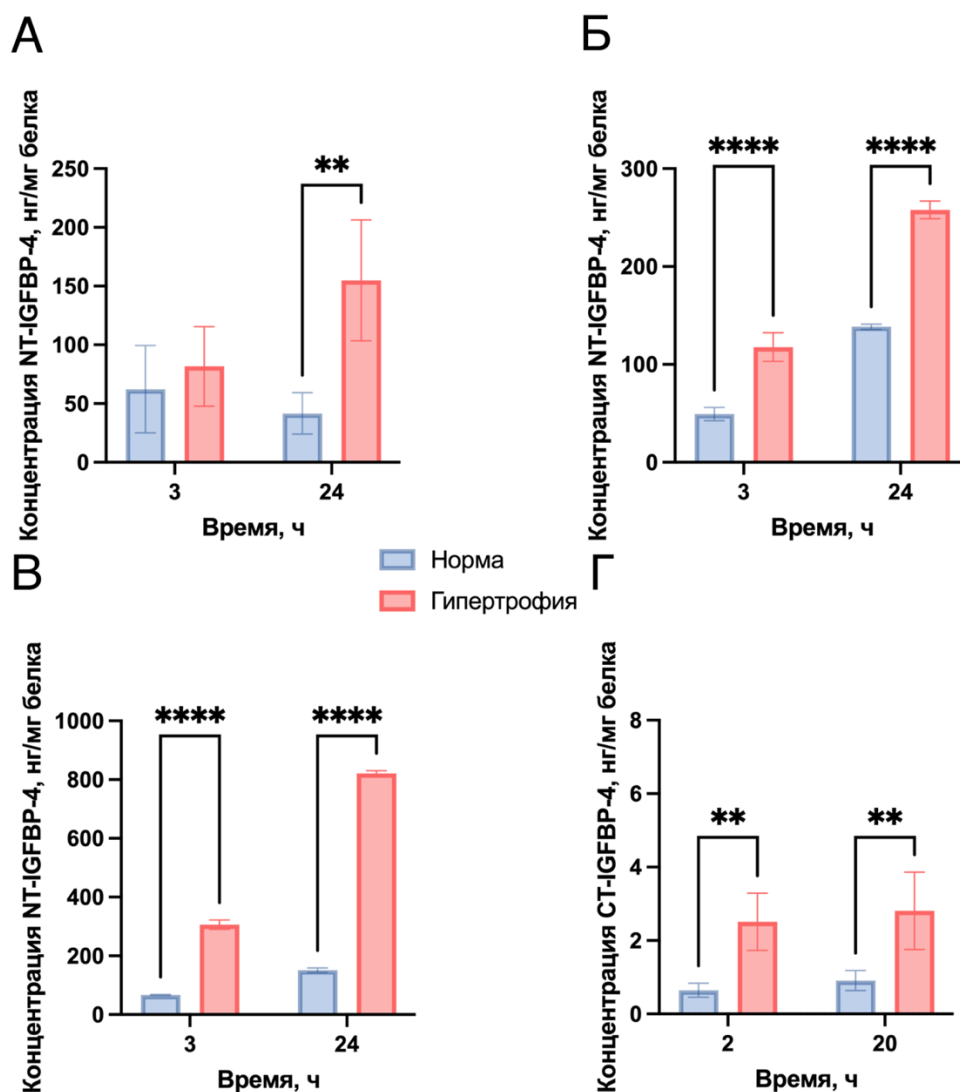


Рисунок 30. Концентрация NT- и CT-IGFBP-4 в кондиционированной среде: А- первичной культуры кардиомиоцитов, полученной из неонатальных крыс, после инкубации с эндотелином-1 в концентрации 20 нМ в течение 24 часов. $n=5$, $**p<0.01$; Б- культуры кардиомиоцитов человека, дифференцированной из ИПСК, после инкубации с эндотелином-1 в концентрации 50 нМ в течение 24 часов. ($n=5$, $****p<0,0001$); В- культуры кардиомиоцитов человека, дифференцированной из ИПСК, после инкубации с норадреналином в концентрации 5 мкМ в течение 24

часов. ($n=3$, **** $p<0,0001$), Г – первичной культуры кардиомиоцитов, полученной из взрослых крыс после индукции гипертрофии под действием монокроталина ($n=5$).

Из представленных на рисунке 30 результатов видно, что концентрация NT-IGFBP4, измеренная после протеолиза IGFBP-4 в первичной культуре кардиомиоцитов, полученной из неонатальных крыс и переведенной в гипертрофированное состояние под действием 20 нМ эндотелина-1, превышала значения концентрации N-фрагмента в контрольных клетках (рис.30А, Норма), в 1,2 и 3,7 раза. В случае гипертрофии под действием эндотелина-1 (рис. 30Б) в культуре кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК уровень протеолиза после 3 и 24 часов протеолитической реакции повышается в 2,5 и 1,9 раз соответственно по сравнению с контрольными негипертрофированными кардиомиоцитами. В случае же гипертрофического ответа после инкубации с норадреналином (рис. 30В) уровень протеолиза после 3 и 24 часов протеолитической реакции повышается в 5 и 5,3 раза соответственно. Следует отметить, что усиление протеолиза IGFBP-4 под действием RAPP-A коррелирует со степенью гипертрофии кардиомиоцитов, оцененной ранее по возрастанию концентрации BNP (рис. 28). Интересно, что при индукции гипертрофии в культуре кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК, под действием эндотелина-1 повышение уровня протеолиза IGFBP-4 не коррелирует с изменением концентрации RAPP-A. При этом в случае индукции гипертрофии в данной культуре под действием норадреналина повышение уровня протеолиза хорошо соотносится с увеличением концентрации RAPP-A в кондиционированной среде. Также в случае монокроталин-индуцированной гипертрофии на модели первичной культуры кардиомиоцитов, полученных из взрослых крыс (рис. 30Г), наблюдается увеличение концентрации СТ-IGFBP-4 в 3 раза, по сравнению с уровнем СТ-IGFBP-4 в норме.

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют об усилении протекания протеолиза IGFBP-4 под действием RAPP-A при гипертрофических изменениях кардиомиоцитов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Моделирование функционирования сердечной ткани, основные возможности и ограничения используемых моделей

Сердечно-сосудистая система является одной из важнейших систем организма человека, которая обеспечивает слаженную работу всего организма в целом. Для координации работы жизненно важных органов и систем между собой необходима тонкая клеточная сигнализация, обеспечивающая передачу сигналов, приводящих к формированию тех или иных клеточных ответов. Одними из главных участников передачи таких сигналов, являются молекулы-лиганды, которые распространяются по всему организму с током крови, лимфы и других тканевых жидкостей. Лиганды, взаимодействуя со специфичными рецепторами на поверхностях клеток-мишеней, запускают определенные молекулярные механизмы или каскады, которые приводят к тем или иным клеточным эффектам. Зачастую изменения в каких-либо параметрах определенного клеточного сигнального пути могут говорить о развитии каких-либо нарушений и выступать в качестве маркёров определённых патологических состояний. На сегодняшний день заболевания сердечно-сосудистой системы остаются основной причиной смертности и инвалидизации населения в промышленно развитых странах. Одним из наиболее часто встречающихся ССЗ является сердечная недостаточность. Сердечная недостаточность характеризуется снижением способности какого-либо отдела сердца эффективно перекачивать кровь, в результате чего сердце перестаёт справляться со своей функцией, что приводит к нарушению кровоснабжения всего организма в целом. Зачастую данное заболевание сопровождается развитием патологических состояний в сердечной ткани, одним из наиболее часто встречающихся из них является гипертрофия миокарда. Данное патологическое состояние характеризуется увеличением толщины миокарда в результате

увеличения в размерах кардиомиоцитов, а также объёма внеклеточного матрикса. Как упоминалось выше, ткань сердечной мышцы гетерогенна и представлена различными типами клеток, что сильно затрудняет исследования роли отдельных клеточных популяций в функционировании сердечной мышцы в норме и при патологических состояниях. Широко используемым подходом для исследования молекулярных механизмов функционирования сердечной ткани является получение изолированной культуры кардиомиоцитов, которую можно получать либо как первичную культуру из сердец, либо проводя дифференцировку из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Также для подобного рода исследований можно использовать иммортализованные линии кардиомиоцитов, использование которых широко описано в литературе [28].

Использование первичной культуры кардиомиоцитов, полученной непосредственно из сердца, сопряжено с рядом сложностей, главной из которых является гетерогенность финальной культуры (содержание кардиомиоцитов в ней составляет 10-70%, остальная часть клеток представлена фибробластами, гладкомышечными клетками и клетками эндотелия). Контаминация другими типами клеток сердечной ткани может вносить свой вклад в изучаемые молекулярные механизмы, влияя на исход эксперимента. Тем не менее, данная модель является наиболее приближенной по физиологическим свойствам к ткани сердечной мышцы.

В нашем исследовании мы работали с двумя видами первичных культур кардиомиоцитов, выделенных из сердец неонатальных и взрослых крыс. Основным преимуществом модели неонатальных кардиомиоцитов, является способность длительное время находиться в культивируемом состоянии. Ведение культуры таких кардиомиоцитов может продолжаться от нескольких недель до нескольких месяцев. Также несомненным преимуществом является доступность неонатальных крыс и простота протокола выделения первичной неонатальной культуры кардиомиоцитов, не требующего дополнительного адгезирующего субстрата. Однако, как уже упоминалось, первичная культура кардиомиоцитов гетерогенна.

Чистота такой культуры колеблется от 10 до 70 % по содержанию кардиомиоцитов относительно других клеток. Дополнительно культивирование такой культуры осложняется тем, что другие клеточные популяции сердечной ткани такие, как например кардиофибробласты, способны к более активной пролиферации, в результате чего соотношение кардиомиоцитов к другим клеткам сердечной ткани в культуре, может изменяться по ходу эксперимента. В нашей работе чистота полученной первичной культуры неонатальных кардиомиоцитов составляла 60%. Данное значение было получено исходя из результатов иммуноцитохимического окрашивания с использованием антител специфичных к кардиотропонину I. При такой чистоте полученной культуры необходимо учитывать вклад других клеток культуры в изучаемые процессы, нормируя результаты на количество кардиомиоцитов. Ещё одним недостатком первичной культуры кардиомиоцитов, полученной из неонатальных крыс, является их не полная дифференцировка. При формировании зрелого кардиомиоцита, происходит изменение его морфологии за счёт формирования цитоскелета и сократительного аппарата мышечной клетки сердца. Неонатальные кардиомиоциты зачастую не успевают сформироваться в зрелые кардиомиоциты из-за чего данная модель может не полностью отражать характеристики зрелых кардиомиоцитов.

Также в данном исследовании в качестве одной из модельных систем использовалась первичная культура кардиомиоцитов, полученная из взрослых крыс. Данная модельная система имеет ряд преимуществ по сравнению с первичной культурой, полученной из неонатальных крыс. Во-первых, особенности протокола выделения первичной культуры взрослых кардиомиоцитов позволяют получить культуру с очень высоким процентом содержания кардиомиоцитов. В нашем исследовании чистота культуры, аналогично основанная на результатах иммуноцитохимического окрашивания с использованием антител, специфичных к кардиотропонину I – маркёру кардиомиоцитов, составила 100% от площади конфлюэнта. Во-вторых, несомненным преимуществом данной модели является получение высокодифференцированных зрелых кардиомиоцитов. Первичная

культура кардиомиоцитов, полученная из взрослых крыс, представлена кардиомиоцитами имеющими характерную удлинённую цилиндрическую форму и выраженную поперечную исчерченность. Все вышеперечисленные особенности первичной культуры взрослых кардиомиоцитов делают её наиболее приближенной моделью к зрелой мышечной ткани сердца. Однако, использование данной модели сопряжено с рядом сложностей. Как правило, протоколы выделения первичной культуры кардиомиоцитов из взрослых крыс включают в себя множество стадий и занимают длительное время. Зрелые кардиомиоциты являются высокодифференцированными клетками, организованными в виде клеточного синцития, функции которых направлены на эффективное производство энергии для поддержания сократительной функции. Такие клетки требуют определённого клеточного окружения и для успешного культивирования требуют наличия определённого адгезионного субстрата. В нашей работе в качестве такого субстрата использовался фибронектин. Ещё одним недостатком данной модели является её низкая жизнеспособность. Взрослые кардиомиоциты живут в условиях культивирования на подложке до четырёх дней, что осложняет проведение длительных экспериментов и требует постоянного мониторинга количества живых клеток в культуре.

В качестве третьей модельной системы была выбрана культура кардиомиоцитов, полученная из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека. Данная культура была получена из клеток здорового донора. Главным преимуществом этой культуры кардиомиоцитов является её релевантность для человека, так как дифференцированные кардиомиоциты генетически идентичны пациенту, что позволяет изучать влияние каких-либо заболеваний и патологических изменений на реального человека. Также технология дифференцировки ИПСК в кардиомиоциты позволяет получить культуру клеток определенного типа с высокой степенью чистоты, что очень удобно, если необходимо изучить вклад определенной клеточной популяции в тот или иной процесс. Другим несомненным преимуществом данной модели является

высокая жизнеспособность полученных кардиомиоцитов. Это особенно важно в случае необходимости проведения длительных экспериментов. Но и у этой модели есть ряд ограничений. Получение кардиомиоцитов из ИПСК является сложным и дорогостоящим процессом. Данная модельная система имеет множество особенностей культивирования, а протоколы получения таких культур многостадийны и занимают от 3 недель до нескольких месяцев. Также, как и в случае с неонатальной культурой кардиомиоцитов, зачастую кардиомиоциты полученные из ИПСК не дифференцируются в зрелые кардиомиоциты до конца, поэтому полученные результаты не всегда будут отражать функциональные характеристики кардиомиоцитов миокарда. В нашей работе полученная культура кардиомиоцитов имела чистоту 97% по результатам иммуноцитохимического окрашивания и около 86% по результатам проточной цитофлуориметрии.

Выбор антител для иммунохимического окрашивания кардиомиоцитов был обусловлен различиями в экспрессии изоформ тропонина в разных типах культур. В частности, в культуре кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК, мы использовали антитела специфичные к сердечной изоформе тропонина Т, так как известно, что уровни сердечного тропонина I у кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК, отсутствуют или снижены в пользу изоформы медленного скелетного тропонина I [264]. Это связано с тем, что кардиомиоциты, полученные из ИПСК, находятся в незрелом состоянии и не полностью дифференцированы. В процессе развития кардиомиоцитов у млекопитающих происходит переключение экспрессии изоформ тропонина I от медленной скелетной изоформы тропонина I к сердечной изоформе тропонина I [265, 266]. В случае же первичных культур кардиомиоцитов, выделенных из неонатальных и взрослых крыс, мы использовали антитела к сердечной изоформе тропонина I, так как кардиомиоциты в данных типах культур являлись более зрелыми. Мы посчитали, что выбор антител к сердечной изоформе тропонина Т для оценки чистоты культуры кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК, релевантным, так как эта изоформа является более распространенной в незрелых

кардиомиоцитах, и ее детектирование позволяет провести более точную оценку созревания кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК человека.

Таким образом, были разработаны и охарактеризованы три модельные системы для исследования роли протеазы RAPP-A в сердечной ткани в норме. Сочетание трёх различных подходов к моделированию сердечной ткани позволяет получить наиболее точное представление о процессах, протекающих в сердечной мышце в норме.

2. Особенности протекания протеолиза IGFBP-4, ассоциированного со специфической активностью RAPP-A в культурах кардиомиоцитов в норме

RAPP-A, IGFBP-4 и протеолитические фрагменты IGFBP-4 играют ключевую роль в патогенезе ССЗ, включая ишемическую болезнь сердца, острый коронарный синдром и острую сердечную недостаточность [5, 9, 11]. Также считается, что RAPP-A осуществляет протеолитическое расщепление IGFBP-2, -4 и -5, способствуя таким образом повышению биодоступности IGF в различных линиях клеток и тканях [296]. В нескольких исследованиях на моделях мышей с миокардиальной травмой IGF был использован в качестве кардиопротектора, так как известно, что в норме эти факторы также могут поддерживать жизнеспособность и функционирование кардиомиоцитов [280, 281]. Однако, механизмы биодоступности IGF и роль RAPP-A в сердечной ткани в норме и при гипертрофии пока не были тщательно изучены. В данной работе мы показали, что специфическое протеолитическое расщепление IGFBP-4 под действием RAPP-A происходит в кондиционированной среде трёх независимых культур кардиомиоцитов. Концентрация димерного RAPP-A в кондиционированной среде культуры кардиомиоцитов человека, дифференцированных из ИПСК, после 24 часов культивации была определена на уровне до 2.4 ± 1.5 нг/мг белка. Этот уровень был сопоставим с ранее измеренными концентрациями RAPP-A в

кондиционированной среде клеток гладких мышц сосудов [270, 271] и фибробластов [2, 268], несмотря на некоторые ограничения, касающиеся различных методов, применяемых для измерения концентрации RAPP-A [267]. Д'Элия и соавторы измеряли концентрацию RAPP-A методом FIA в кондиционированной среде клеток-предшественников кардиомиоцитов (CaPC) и обнаружили, что RAPP-A являлся гомодимером. Концентрация RAPP-A в кондиционированной среде кардиомиоцитов человека, дифференцированных из ИПСК, которая была измерена в данной работе, превысила концентрацию RAPP-A в кондиционированной среде клеток-предшественников кардиомиоцитов (CaPC) в 100 раз. Для пересчёта концентрации в мМЕ/л (милли-международные единицы на литр) были преобразованы в нг/мл в соответствии с соотношением 30 мМЕ/литр – 10 нг/мл, описанным Куин и соавторами [297]. Такое различие между концентрациями RAPP-A в клетках предшественниках кардиомиоцитов и кардиомиоцитах, дифференцированных из ИПСК, может указывать на важность RAPP-A-зависимого расщепления IGFBP-4 для последующего высвобождения IGF в зрелой сердечной ткани.

Наше исследование подтверждает, что протеолитическое расщепление IGFBP-4 в кондиционированной среде культур кардиомиоцитов ассоциировано с протеолитической активностью RAPP-A, что было показано различными подходами. Для измерения уровня протеолитических фрагментов NT-IGFBP-4 и СТ-IGFBP-4 мы использовали антитела, специфичные к неоэпиту [9–11, 162], образующемуся в результате специфического протеолиза IGFBP-4 под действием RAPP-A. Полученные концентрации NT-IGFBP-4 в кондиционированной среде кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК, были сравнимы с концентрациями NT-IGFBP-4 в кондиционированной среде кардиомиоцитов неонатальных крыс [87]. В случае с концентрацией СТ-IGFBP-4 в кондиционированной среде культуры взрослых кардиомиоцитов крысы наблюдалось значительное снижение уровня протеолиза по сравнению с другими модельными системами. Вероятно, это связано с тем, что кардиомиоциты, выделенные из взрослых крыс являются зрелыми высокодифференцированными

клетками. Известно, что уровни IGF-II повышены при эмбриональном развитии, однако в постнатальном развитии его концентрации снижаются. В процессе PAPP-A зависимого протеолиза IGFBP-4 происходит высвобождение IGF-II, который вероятно не требуется в больших количествах, если клетка полностью прошла стадии дифференцировки до зрелого высокодифференцированного кардиомиоцита, чем и объясняются пониженные уровни фрагмента СТ-IGFBP-4 в кондиционированной среде культуры взрослых кардиомиоцитов крысы. Экспрессия PAPP-A в неонатальном и взрослом здоровом организме различается. В неонатальном периоде наблюдается высокая экспрессия PAPP-A, которая постепенно снижается по мере роста и развития. Аналогично и в нашей работе была заметна существенная разница между уровнем протеолиза IGFBP-4 под действием PAPP-A в культуре неонатальных кардиомиоцитов по сравнению с культурой взрослых кардиомиоцитов.

Протеолитическое расщепление IGFBP-4 под действием PAPP-A, которое мы наблюдали во всех трёх культурах кардиомиоцитов, было IGF-зависимым. Это подтверждает, что видимый нами протеолиз IGFBP-4 ассоциирован с протеолитической активностью PAPP-A. Мы также изучали ингибирующее воздействие ЭДТА и 1,10-фенантролина на протеолитическое расщепление IGFBP-4 в кондиционированной среде кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК, в сравнении с рекомбинантным гомодимерным PAPP-A человека. Сопоставимые эффекты как ЭДТА, так и 1,10-фенантролина на PAPP-A-специфическое протеолитическое расщепление IGFBP-4 в кондиционированной среде кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК (70%) и человеческим рекомбинантным гомодимерным PAPP-A (90%) предоставляют дополнительное доказательство того, что протеолиз IGFBP-4 является PAPP-A специфичным. Следует отметить, что инкубация кардиомиоцитов в присутствии больших концентраций ингибиторов не приводила к большему снижению уровня протеолиза IGFBP-4. Однако, ранние исследования специфичного ингибирования протеолитической активности PAPP-A по отношению к IGFBP-4, измеренные методом вестерн-блот анализа фрагментов IGFBP-4, показали, что ЭДТА и 1,10-

фенантролин полностью блокировали протеолитическую активность RAPP-A [298]. Различия в данных могут быть объяснены более низкой чувствительностью вестерн-блот анализа, примененного в работе Беснард и соавторов [298] по сравнению с флуороиммунным анализом, который проводился в настоящем исследовании. Наблюдаемая остаточная протеолитическая активность RAPP-A как в кардиомиоцитах, дифференцированных из ИПСК, так и в пробах с рекомбинантным RAPP-A, может быть связана с дополнительными молекулярными факторами, синтезируемыми клетками, которые стабилизируют RAPP-A в отсутствие Zn^{2+} и Ca^{2+} .

Наши результаты также показывают, что протеолитически активный RAPP-A локализуется как на поверхности клеток, так и секретируется ими во внешнюю среду. Это согласуется с данными, полученными Лоурсен и соавторами в других линиях клеток [8]. После обработки гепарином уровень RAPP-A-зависимого протеолиза IGFBP-4 увеличился во внеклеточной среде по сравнению с поверхностью клеток. Это свидетельствует о том, что гепарин может отщеплять RAPP-A с поверхности клеток.

Также наши результаты указывают на то, что полученные кардиомиоциты могут содержать на внешней мембране протеолитически активный RAPP-A, который специфически расщепляет IGFBP-4 как на поверхности клеток, так и во внеклеточном пространстве. Поскольку протеолиз IGFBP-4 под действием RAPP-A ведет к высвобождению IGF, можно предположить, что кардиомиоциты так же, как и другие клетки сердца, такие как фибробласты и эндотелиальные клетки, могут накапливать IGF во внеклеточном пространстве, а IGF, в свою очередь, может действовать как аутокринный и паракринный регулятор в здоровой сердечной ткани. Это может обеспечить взаимодействие IGF с определенными рецепторами IGF и активацию кардиопротекторных эффектов, включая защиту от ишемических повреждений миокарда [280, 281]. Таким образом, результаты данного этапа исследования указывают на то, что RAPP-A может играть роль в поддержании жизнеспособности и функционирования кардиомиоцитов в здоровом сердце.

3. Особенности моделирования гипертрофии в модельных системах *in vitro* и *in vivo*

Гипертрофия сердечной ткани – это компенсаторная реакция, возникающая в ответ на увеличение нагрузки на миокард. Как было сказано выше, существует два вида гипертрофии миокарда: физиологическая, направленная на увеличение фракции выброса и усиление сократительной активности сердца, и патологическая, ассоциированная с развитием сердечной недостаточности и чаще всего приводящая к летальному исходу. Существуют различные подходы к моделированию патологической гипертрофии миокарда. Среди наиболее распространенных моделей выделяют *in vitro* модели, основанные на индукции гипертрофии с помощью прогипертрофических факторов в культуре кардиомиоцитов. В качестве таких индукторов мы использовали эндотелин-1 и норадреналин, которыми стимулировали первичную культуру неонатальных кардиомиоцитов крысы и культуру кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК. Мы подбирали оптимальные концентрации индукторов гипертрофии, при которых были заметны наибольшие гипертрофические изменения, однако жизнеспособность клеток не была значительно снижена.

Для оценки перевода культур в гипертрофированное состояние мы анализировали изменение площади кардиомиоцитов после обработки эндотелином-1 или норадреналином. Далее во всех модельных системах мы проводили дополнительную оценку перевода культур в гипертрофированное состояние, измеряя концентрацию BNP в кондиционированной среде культур кардиомиоцитов. Также нами был проведен анализ жизнеспособности культур кардиомиоцитов, до и после обработки гипертрофирующими агентами с использованием метода Alamar blue.

Для неонатальной культуры кардиомиоцитов крысы оптимальной оказалась концентрация эндотелина-1 20 нМ и инкубация с ней в течение 24 часов, при которой с одной стороны происходило максимальное увеличение клеток в

размерах, а с другой стороны сохранялась их жизнеспособность. Также было показано, что в случае индукции гипертрофии под действием эндотелина-1 в первичной культуре неонатальных кардиомиоцитов крысы статистически значимые различия в концентрациях BNP наблюдались после обработки кардиомиоцитов 20 нМ эндотелином-1 в течение 24 часов. Данное значение концентрации эндотелина-1, а также длительность инкубации, согласуется с данными литературы, описывающими модельные системы гипертрофии кардиомиоцитов [23, 282–285].

В культуре кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК, мы проводили индукцию гипертрофии под действием эндотелина-1 и норадреналина. При добавлении эндотелина в концентрациях от 20 до 100 нМ в течение 24 часов наблюдалось увеличение клеток в размерах, что косвенно указывало на развитие гипертрофических изменений в кардиомиоцитах. При анализе изображений было заметно уменьшение числа живых клеток в культуре, поэтому мы провели анализ жизнеспособности с использованием Alamar Blue. По результатам данного теста не было показано статистически достоверных различий, однако была заметна тенденция к снижению жизнеспособности после обработки эндотелином-1. Далее мы проанализировали уровень BNP в кондиционированной среде, показав, что статистически достоверное увеличение его концентрации наблюдается после обработки кардиомиоцитов 50 нМ эндотелином-1 в течение 24 часов. Поэтому для дальнейших исследований была выбрана концентрация эндотелина-1 50 нМ с инкубацией в течение 24 часов для перевода культуры кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК, в гипертрофированное состояние.

В качестве альтернативного индуктора для перевода клеток в гипертрофированное состояние *in vitro* нами был использован норадреналин, который широко применяется для индукции гипертрофии кардиомиоцитов [25, 288]. В данном случае использовались концентрации норадреналина 2-10 мкМ и инкубации в течение 24 – 48 часов. Аналогично, как и в случае с эндотелином-1, подбирались оптимальные концентрации норадреналина для культуры кардиомиоцитов, полученных из ИПСК человека исходя из результатов обсева

площади кардиомиоцитов, а также их жизнеспособности. Было показано что добавление норадреналина в диапазоне концентраций от 2 до 10 мкМ в течение 24 часов приводило к увеличению площади клеток, однако не оказывало значимого воздействия на жизнеспособность культуры. Уровень BNP достоверно повышался приблизительно в 3 раза в кондиционированной среде кардиомиоцитов после обработки норадреналином в концентрации 5 мкМ в течение 24 часов. Поэтому данные условия считались оптимальными для перевода культуры в гипертрофированное состояние под действием норадреналина.

Развитие гипертрофических изменений в сердечной ткани - сложный и многофакторный процесс, поэтому *in vitro* моделирование не всегда может отражать реальную картину данной патологии. Использование *in vivo* моделей создания гипертрофических изменений миокарда является наиболее приближенным к физиологическим процессам развития гипертрофии миокарда. Существует множество подходов к моделированию гипертрофии *in vivo*, многие из которых ранее были рассмотрены в разделе «Обзор литературы». Мы остановились на модели МКТ-индуцированной гипертрофии миокарда, так как данная модель очень удобна тем, что не требует сложных хирургических операций - после однократной инъекции монокроталина в течение месяца развивается лёгочная гипертензия, как следствие приводящая к гипертрофии правого желудочка. Мы показали, что в МКТ-группе наблюдается статистически достоверное увеличение массы правого желудочка и массы легких по сравнению с контролем. При МКТ-индуцированной лёгочной гипертензии ранее было показано увеличение массы лёгких, ассоциированное с фибротическими изменениями лёгочной ткани. Также у животных МКТ-группы наблюдалась сниженная динамика набора веса по сравнению с контролем, что косвенно указывает на развитие патологических изменений в организме. Интересно, что статистически достоверных изменений в динамиках систолического АД в течение месяца между группами не наблюдалось, однако наблюдалось различие в давлении в правом желудочке по прошествии 4 недель с момента инъекции МКТ. Такой результат скорее всего связан с тем, что

при МКТ-индуцированной лёгочной гипертензии в первую очередь нарушается малый круг кровообращения, практически не затрагивая левый круг кровообращения. Спустя месяц содержания крыс в виварии мы проводили выделение первичных культур кардиомиоцитов из взрослых крыс, которые характеризовали на предмет сохранения гипертрофического фенотипа. Проводили сравнение площади и жизнеспособности кардиомиоцитов, полученных из крыс МКТ-группы, с кардиомиоцитами, полученными из контрольных животных, и увидели увеличение кардиомиоцитов в 1,3 раза по сравнению с контролем, а также снижение жизнеспособности кардиомиоцитов в 1,3 раза в МКТ-группе по сравнению с контролем. Все описанные выше результаты свидетельствуют о развитии МКТ-индуцированной гипертрофии миокарда.

Важным результатом в исследовании уровня BNP в модельных системах, задействованных в нашей работе, является повышение уровня BNP в первичной культуре кардиомиоцитов взрослых крыс, полученной после индукции гипертрофии *in vivo* под действием монокроталина по сравнению с контрольной культурой, выделенной из контрольных животных, которым монокроталин не вводился. Данные результаты говорят о том, что гипертрофические изменения, которые развивались в *in vivo* модельной системе, сохраняются на клеточном уровне, и данная модель релевантна для изучения RAPP-A ассоциированного протеолиза IGFBP-4, как процесса, протекающего на клеточном уровне.

Таким образом, в данной работе была задействована комбинация из трех подходов к моделированию гипертрофических изменений в сердечной ткани. Использование разных модельных систем, имеющих как свои возможности, так и ограничения, позволяет приблизиться к наиболее реальной картине развития патологической гипертрофии миокарда.

4. При гипертрофии кардиомиоцитов происходит повышение уровня протеолиза IGFBP-4, ассоциированного со специфической активностью PAPP-A

Изучение прогностических и диагностических биомаркеров ССЗ и установление причин их повышенной концентрации в крови пациентов при различных патологических состояниях сердечной ткани является актуальной задачей как с прикладной биомедицинской, так и фундаментальной научной точек зрения. Данное исследование было направлено на установление взаимосвязи между уровнем PAPP-A-специфичного протеолиза IGFBP-4 в кардиомиоцитах и их гипертрофическими изменениями. В ряде исследований было показано, что повышение уровня протеолиза IGFBP-4, а также экспрессии PAPP-A связаны с риском развития множества ССЗ [5, 9, 11, 162, 283]. Однако механизмов, лежащих в основе этих явлений, до сих пор показано не было.

В нашем исследовании мы предположили, что гипертрофия миокарда является одним из факторов, способствующих увеличению уровня протеолиза IGFBP-4. Поэтому мы провели моделирование гипертрофического ответа в трёх независимых культурах кардиомиоцитов, используя в качестве индукторов гипертрофии *in vitro* эндотелин-1 и норадреналин, а *in vivo* – монокроталин. Мы обнаружили, что уровень протеолиза IGFBP-4 в кондиционированной среде гипертрофированных культур кардиомиоцитов выше, чем в контрольных негипертрофированных кардиомиоцитах во всех модельных системах. Данные результаты указывают на взаимосвязь между повышением концентраций N- и C-концевых фрагментов IGFBP-4 и гипертрофическими изменениями кардиомиоцитов, сопровождающими многие ССЗ. Также они проясняют функцию PAPP-A в миокарде в норме и при его гипертрофических изменениях. Можно предположить, что усиление PAPP-зависимого протеолиза IGFBP-4 при гипертрофических изменениях кардиомиоцитов приводит к повышению активации IGF по сравнению с нормой. Функции IGF при патологиях миокарда неоднозначны. С одной стороны, ряд исследований описывает кардиопротекторные свойства IGF

при различных сердечно-сосудистых патологиях, включая гипертрофию [221, 256]. В 2009 году Винсигуэра и соавторы показали, что повышенная экспрессия IGF-I в гипертрофированных неонатальных кардиомиоцитах повышает экспрессию кардиопротекторных генов адипонектина, *UCP-1* и *MT-2* (гены, экспрессия которых связана с низкой вероятностью возникновения ССЗ) [256]. Недавно на модели спонтанно гипертензивных крыс было показано кардиопротекторное действие IGF-1 [253]. В работах Лин и соавторов [255] и Суи и соавторов [254] гиперэкспрессия IGF-I и IGF-II улучшала функцию сердца после инфаркта миокарда у мышей. Однако, в ряде других исследований было показано, что IGF может являться индуктором патологической гипертрофии кардиомиоцитов [44, 299, 300]. Можно предположить, что высвобождение IGF в результате RAPP-A-специфичного протеолиза IGFBP-4 при гипертрофических изменениях кардиомиоцитов может приводить к усилению гипертрофии миокарда.

В моделях гипертрофии, индуцированных эндотелином-1 и норадреналином, наблюдается различная корреляция между уровнем протеолиза IGFBP-4 и экспрессией RAPP-A.

Известно, что эндотелин-1 связывается со своими специфическими рецепторами ET_A и ET_B, которые, в свою очередь, связаны с семейством G-белков, которые отвечают за дальнейшую передачу сигнала внутри клетки. Благодаря данному сигнальному каскаду эндотелин-1 активирует сигнальный путь MAPK, который, в свою очередь, активирует транскрипционные факторы, такие как AP-1 и NF-κB, что приводит к усиленному синтезу белка и гипертрофии миокарда. Помимо этого, сигнал от рецепторов эндотелина-1 может передаваться через белок β-аррестин, который, в свою очередь, регулирует активность ряда других транскрипционных факторов. Однако, в нашем исследовании экспрессия RAPP-A при индукции гипертрофии под действием эндотелина-1 не увеличивалась, вероятно, из-за отсутствия специфичных для RAPP-A сигнальных путей.

Норадреналин активирует β-адренергические рецепторы, запускающие сигнальный путь PKA (протеинкиназа A), который также приводит к активации транскрипционных факторов и гипертрофии. В нашем исследовании экспрессия

РАРР-А при индукции гипертрофии под действием норадреналина возрастает в отличие от эндотелина-1. Известно, что транскрипция РАРР-А регулируется рядом сигнальных путей в различных тканях. Показано, что в почках транскрипция РАРР-А регулируется с помощью сигнального пути РКА [301], а в фибробластах, остеобластах, артериальных гладкомышечных клетках, эндотелиальных клетках и ряде других регуляция транскрипции РАРР-А происходит с помощью провоспалительных цитокинов, IL-1 β и фактора некроза опухоли-альфа (TNF- α) [279]. По всей видимости, регуляция экспрессии РАРР-А в сердечной ткани происходит с помощью сигнальных путей, напрямую связанных с эффектами норадреналина. Возможно, регуляция пути РКА, задействованного в сигнальном эффекте норадреналина при гипертрофии сердечной ткани, может объяснять возрастание экспрессии РАРР-А на фоне индукции гипертрофии в нашей модельной системе, однако это является предметом отдельного исследования. У пациентов с СН различные нейроэндокринные системы могут активироваться и вызывать такие наиболее часто встречающиеся симптомы как тахикардию и сопутствующее повышение системного сосудистого сопротивления, следствием которых является гипертрофия миокарда [302, 303]. Кроме того, устойчивая нейрогормональная активация играет ключевую роль в прогрессировании СН [304]. Ренин–ангиотензин–альдостероновая система (РААС), вазопрессиновая система и симпатическая нервная система (СНС) могут быть ответственны за патогенетические механизмы, приводящие к сохранению патофизиологии и ухудшению симптомов СН. Кроме того, было показано, что сигнальные пути этих нейрогормональных систем, включая бета-адренергический и РААС-пути, ответственны за неадаптивные процессы ремоделирования и аритмогенность [305]. Известно, что нейрогормональная активация является одним из известных механизмов индукции гипертрофических изменений миокарда [304]. Активация симпатической нервной системы приводит к повышению уровня норадреналина в крови вследствие усиления передачи сигналов СНС и высвобождения норадреналина из адренергических нейронов и сопутствующего «перетекания» в плазму, а также из-за снижения поглощения адренергическими нервными

окончаниями. Высокие уровни норадреналина напрямую коррелируют с тяжестью СН. Из всего вышесказанного можно заключить, что норадреналин-индуцированная гипертрофия кардиомиоцитов может быть наиболее близкой моделью патологической гипертрофии *in vitro*, которая развивается на фоне СН.

Таблица. Сравнительный анализ свойств индукторов гипертрофии эндотелина-1 и норадреналина.

Свойство	Эндотелин-1	Норадреналин
Природа	Пептидный гормон	Катехоламин, нейромедиатор
Источник в организме	Экспрессия эндотелиальными клетками кровеносных сосудов	Высвобождение нейронами симпатической нервной системой
Физиологическая роль в организме	Регуляция сосудистого тонуса, маркер сердечно-сосудистых заболеваний	Ключевой нейромедиатор сердечно-сосудистой системы
Активация рецепторов	Активирует ET-A и ET-B, запускает сигнальные пути MAPK, PKC, PKD и кальцийнейрин	Активирует β 1-AR рецепторы, повышает уровень cAMP, активирует PKA и влияет на метаболизм кальция
Цитотоксичность	В больших концентрациях токсичен для клеток	Менее токсичен для клеток

Таким образом, и эндотелин-1, и норадреналин приводят к гипертрофии, но задействуют разные пути, что, по-видимому, и объясняет различия в экспрессии RAPP-A. Таким образом, увеличение уровня RAPP-A специфичного протеолиза IGFBP-4 при гипертрофии кардиомиоцитов может быть связано как с увеличением уровня экспрессии протеазы, так и с повышением её активности.

Модель МКТ-гипертрофии может быть не самой точной, так как она не всегда адекватно отражает патогенез гипертрофии при СН, в виду того, что патологическая гипертрофия миокарда не всегда сопряжена с легочной гипертензией. Существуют случаи, когда гипертрофия может быть адаптивной

реакцией на повышенную нагрузку, не приводя к развитию гипертензии. Например, при физических нагрузках происходит гипертрофия миокарда, но это не является патологией.

Исследование корреляции протеолиза IGFBP-4 с концентрацией PAPP-A в разных моделях позволило углубить понимание механизмов развития гипертрофии и ее связи с сигнальными путями, протеолизом и экспрессией PAPP-A. Полученные данные могут иметь значение для разработки новых стратегий лечения и профилактики кардиоваскулярных заболеваний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании были разработаны и охарактеризованы три модельные системы для изучения роли протеазы PAPP-A в сердечной ткани в норме. Сочетание трёх модельных систем с различными подходами к моделированию сердечной ткани позволяет получить более полное и точное представление о процессах, протекающих в миокарде в физиологических условиях.

Результаты исследования демонстрируют, что культивируемые кардиомиоциты экспрессируют протеолитически активный PAPP-A на своей поверхности. PAPP-A специфически расщепляет IGFBP-4 как на поверхности клеток, так и во внеклеточном пространстве. Поскольку протеолиз IGFBP-4 под действием PAPP-A приводит к высвобождению IGF, можно предположить, что кардиомиоциты, а также другие клетки сердечной ткани (фибробласты и эндотелиальные клетки), могут накапливать IGF во внеклеточном пространстве за счёт данного процесса. IGF, в свою очередь, может действовать как аутокринный и паракринный регулятор в здоровой сердечной ткани. Высвобождение IGF в результате специфического протеолиза IGFBP-4 под действием PAPP-A может стимулировать взаимодействие IGF с его рецепторами и активировать кардиопротекторные эффекты, включая защиту от ишемических повреждений миокарда. Таким образом, полученные данные указывают на то, что PAPP-A может играть важную роль в поддержании жизнеспособности и функционирования кардиомиоцитов в здоровом сердце.

Также в нашем исследовании использовалась комбинация нескольких моделей *in vitro* и *in vivo* для моделирования гипертрофических изменений в сердечной ткани. Индукция гипертрофии кардиомиоцитов *in vitro* под действием эндотелина-1 и норадреналина, а также индукция гипертрофии *in vivo* под действием монокроталина позволила нам приблизиться к реалистичной картине развития патологической гипертрофии миокарда.

Изучение корреляции между уровнем протеолиза IGFBP-4 и концентрацией PAPP-A в разных моделях гипертрофии позволило расширить понимание

механизмов развития гипертрофии сердечной ткани и ее связи с регуляцией биодоступности IGF. Усиление протеолиза IGFBP-4 под действием PAPP-A, приводящее к высвобождению IGF при гипертрофии кардиомиоцитов, может служить как компенсаторным механизмом для снижения негативных последствий гипертрофии, так и механизмом, усиливающим эти изменения (рис. 31).

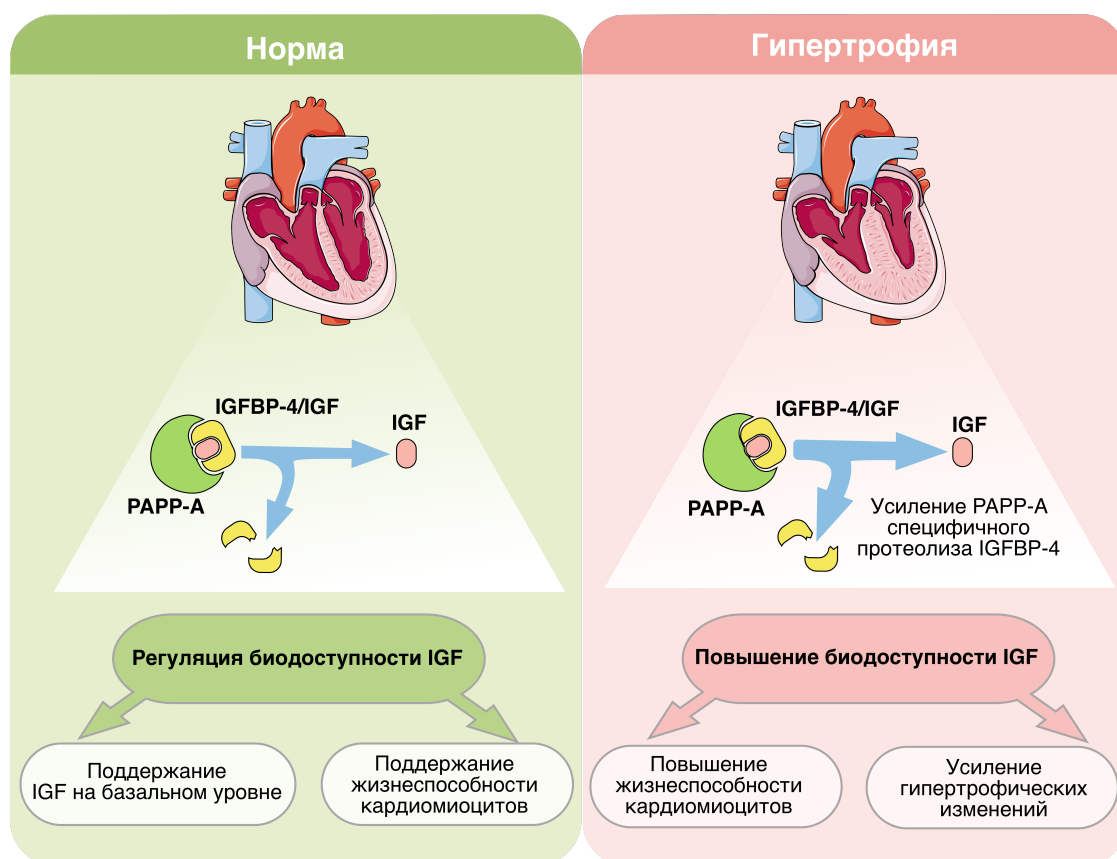


Рисунок 31. Роль PAPP-A в сердечной ткани в норме и при гипертрофии.

Исходя из результатов данного исследования можно заключить, что PAPP-A-специфичный протеолиз IGFBP-4 протекает на поверхности кардиомиоцитов как в норме, так и при гипертрофических изменениях. Во-первых, полученные данные позволяют предположить, что в сердечной ткани в норме биодоступность IGF зависит от экспрессии и активности PAPP-A, что может играть ключевую роль в регуляции жизнеспособности кардиомиоцитов. Во-вторых, усиление протеолиза IGFBP-4 под действием PAPP-A и, как следствие, повышение концентрации IGF при гипертрофии может служить как компенсаторным механизмом для

минимизации негативных последствий гипертрофических изменений, так и фактором, стимулирующим эти изменения. Таким образом, данное исследование демонстрирует, что усиление RAPP-A зависимой протеолитической деградации IGFBP-4 связано с гипертрофическими изменениями миокарда, что, в свою очередь, проясняет роль протеазы RAPP-A в здоровой сердечной ткани и при её гипертрофических изменениях. Наконец, описанный механизм усиления протеолитической деградации IGFBP-4 под действием RAPP-A при гипертрофии, открывает широкие возможности для изучения новых механизмов развития ССЗ, которые сопровождаются развитием патологической гипертрофии миокарда.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны и охарактеризованы три модельные системы на основе культур кардиомиоцитов для исследования протеолиза IGFBP-4 в сердечной ткани в норме;
2. Впервые установлено, что в норме в культурах кардиомиоцитов протекает RAPP-A-зависимый протеолиз IGFBP-4 как на поверхности клеток, так и в кондиционированной среде;
3. Разработаны и охарактеризованы три модельные системы на основе культур кардиомиоцитов, переведенных в гипертрофированное состояние *in vitro* под действием эндотелина-1 и норадреналина и *in vivo* под действием монокроталина;
4. Гипертрофия сопровождается усилением протеолиза IGFBP-4 под действием RAPP-A независимо от используемого типа клеточной культуры и способа моделирования гипертрофического ответа.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю глубокую благодарность моему научному руководителю кандидату биологических наук Серебряной Дарье Владимировне за чуткое руководство, вдохновение, помощь и поддержку на всех этапах подготовки данного исследования. Выражаю глубокую благодарность кандидату биологических наук Артемьевой Марине Михайловне за помощь в работе с лабораторными животными, проведение операций, а также помощь в обработке данных по физиологической характеристике моделей гипертрофии. Выражаю глубокую благодарность доктору биологических наук Лагарьковой Марии Андреевне, кандидату биологических наук Лебедевой Ольге Сергеевне и Дарье Владимировне Голиусовой за возможность работы с кардиомиоцитами, полученными из ИПСК и за терпеливое обучение работе с ними. Выражаю глубокую благодарность сотрудникам компании Hytest: кандидату биологических наук Постникову Александру Борисовичу за продуктивное обсуждение данной работы на семинарах, помощь и поддержку, а также за предоставление реактивов для данного исследования; кандидату биологических наук Коневу Алексею Александровичу за предоставление пар антител на фрагменты белка IGFBP-4; кандидату биологических наук Катрухе Ивану Алексеевичу за предоставление антител на различные изоформы кардиотропонина и кандидату биологических наук Семенову Александру Геннадиевичу за предоставление антител на BNP. Также выражаю глубокую благодарность доктору биологических наук Гусеву Николаю Борисовичу и доктору биологических наук Лопиной Ольге Дмитриевне за ценные замечания, вопросы и комментарии, возникшие при обсуждении данной работы. Выражаю глубочайшую благодарность заведующему кафедрой биохимии доктору биологических наук Катрухе Алексею Генриховичу, всем сотрудникам и преподавателям кафедры биохимии за поддержку, теплую и дружескую атмосферу и ценные знания, полученные в ходе подготовки и выполнения данного исследования. И наконец, выражаю глубочайшую благодарность своей семье за всестороннюю поддержку на всех этапах подготовки кандидатской диссертации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hjortebjerg R. IGFBP-4 and PAPP-A in normal physiology and disease // Growth Hormone & IGF Research. — 2018. — Vol. 41. — P. 7-22.
2. Lawrence J.B., Oxvig C., Overgaard M.T., Sottrup-Jensen L., Gleich G.J., Hays L.G., Yates J.R., Conover C.A. The insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein-A // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 1999. — Vol. 96. — No. 6. — P. 3149-3153.
3. Conover C.A., Bale L.K., Frye R.L., Schaff H.V. Cellular characterization of human epicardial adipose tissue: highly expressed PAPP-A regulates insulin-like growth factor I signaling in human cardiomyocytes // Physiological Reports. — 2019. — Vol. 7. — Cellular characterization of human epicardial adipose tissue. — No. 4. — P. e14006.
4. Conover C.A., Oxvig C., Overgaard M.T., Christiansen M., Giudice L.C. Evidence That the Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-4 Protease in Human Ovarian Follicular Fluid Is Pregnancy Associated Plasma Protein-A // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. — 1999. — Vol. 84. — No. 12. — P. 4742-4745.
5. Bayes-Genis A., Conover C.A., Overgaard M.T., Bailey K.R., Christiansen M., Holmes D.R., Virmani R., Oxvig C., Schwartz R.S. Pregnancy-Associated Plasma Protein A as a Marker of Acute Coronary Syndromes // New England Journal of Medicine. — 2001. — Vol. 345. — No. 14. — P. 1022-1029.
6. Iams W.T., Lovly C.M. Molecular Pathways: Clinical Applications and Future Direction of Insulin-like Growth Factor-1 Receptor Pathway Blockade // Clinical Cancer Research. — 2015. — Vol. 21. — Molecular Pathways. — No. 19. — P. 4270-4277.
7. Gururajan P., Gurumurthy P., Nayar P., Rao G.S.N., Babu R.S., Sarasabharati A., Cherian K.M. Pregnancy associated plasma protein-A (PAPP-A) as an early marker for the diagnosis of acute coronary syndrome // Indian Heart Journal. — 2012. — Vol. 64. — No. 2. — P. 141-145.
8. Laursen L.S., Overgaard M.T., Nielsen C.G., Boldt H.B., Hopmann K.H., Conover

C.A., Sottrup-Jensen L., Giudice L.C., Oxvig C. Substrate specificity of the metalloproteinase pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) assessed by mutagenesis and analysis of synthetic peptides: substrate residues distant from the scissile bond are critical for proteolysis // *Biochemical Journal*. — 2002. — Vol. 367. — Substrate specificity of the metalloproteinase pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) assessed by mutagenesis and analysis of synthetic peptides. — No. 1. — P. 31-40.

9. Postnikov A.B., Smolyanova T.I., Kharitonov A.V., Serebryanaya D.V., Kozlovsky S.V., Tryshina Y.A., Malanicev R.V., Arutyunov A.G., Murakami M.M., Apple F.S., Katrukha A.G. N-terminal and C-terminal fragments of IGFBP-4 as novel biomarkers for short-term risk assessment of major adverse cardiac events in patients presenting with ischemia // *Clinical Biochemistry*. — 2012. — Vol. 45. — No. 7-8. — P. 519-524.

10. Konev A.A., Serebryanaya D.V., Koshkina E.V., Rozov F.N., Filatov V.L., Kozlovsky S.V., Kara A.N., Katrukha A.G., Postnikov A.B. Glycosylated and non-glycosylated NT-IGFBP-4 in circulation of acute coronary syndrome patients // *Clinical Biochemistry*. — 2018. — Vol. 55. — P. 56-62.

11. Konev A.A., Kharitonov A.V., Rozov F.N., Altshuler E.P., Serebryanaya D.V., Lassus J., Harjola V., Katrukha A.G., Postnikov A.B. CT-IGFBP-4 as a novel prognostic biomarker in acute heart failure // *ESC Heart Failure*. — 2020. — Vol. 7. — No. 2. — P. 434-444.

12. Banerjee I., Fuseler J.W., Price R.L., Borg T.K., Baudino T.A. Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. — 2007. — Vol. 293. — No. 3. — P. H1883-H1891.

13. Litviňuková M., Talavera-López C., Maatz H., Reichart D., Worth C.L., Lindberg E.L., Kanda M., Polanski K., Heinig M., Lee M., Nadelmann E.R., Roberts K., Tuck L., Fasouli E.S., DeLaughter D.M., McDonough B., Wakimoto H., Gorham J.M., Samari S., Mahbubani K.T., Saeb-Parsy K., Patone G., Boyle J.J., Zhang H., Zhang H., Viveiros A., Oudit G.Y., Bayraktar O.A., Seidman J.G., Seidman C.E., Nosedá M., Hubner N., Teichmann S.A. Cells of the adult human heart // *Nature*. — 2020. — Vol. 588. —

No. 7838. — P. 466-472.

14. Tirziu D., Giordano F.J., Simons M. Cell Communications in the Heart // *Circulation*. — 2010. — Vol. 122. — No. 9. — P. 928-937.

15. Meyer D., Birchmeier C. Multiple essential functions of neuregulin in development // *Nature*. — 1995. — Vol. 378. — No. 6555. — P. 386-390.

16. Ashley E., Chun H.J., Quertermous T. Opposing cardiovascular roles for the angiotensin and apelin signaling pathways // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. — 2006. — Vol. 41. — No. 5. — P. 778-781.

17. Gray G., Toor I., Castellan R., Crisan M., Meloni M. Resident cells of the myocardium: more than spectators in cardiac injury, repair and regeneration // *Current Opinion in Physiology*. — 2018. — Vol. 1. — Resident cells of the myocardium. — P. 46-51.

18. González-Rosa J.M., Burns C.E., Burns C.G. Zebrafish heart regeneration: 15 years of discoveries // *Regeneration*. — 2017. — Vol. 4. — Zebrafish heart regeneration. — No. 3. — P. 105-123.

19. Talman V., Kivelä R. Cardiomyocyte—Endothelial Cell Interactions in Cardiac Remodeling and Regeneration // *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. — 2018. — T. 5. — C. 101.

20. Parmacek M.S., Solaro R.J. Biology of the troponin complex in cardiac myocytes // *Progress in Cardiovascular Diseases*. — 2004. — Vol. 47. — No. 3. — P. 159-176.

21. MacKenna D. Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis // *Cardiovascular Research*. — 2000. — T. 46. — № 2. — C. 257-263.

22. Frey N., Olson E.N. Cardiac Hypertrophy: The Good, the Bad, and the Ugly // *Annual Review of Physiology*. — 2003. — Vol. 65. — Cardiac Hypertrophy. — No. 1. — P. 45-79.

23. Archer C.R., Robinson E.L., Drawnel F.M., Roderick H.L. Endothelin-1 promotes hypertrophic remodelling of cardiac myocytes by activating sustained signalling and transcription downstream of endothelin type A receptors // *Cellular Signalling*. — 2017. — Vol. 36. — P. 240-254.

24. Bernardo B.C., Weeks K.L., Pretorius L., McMullen J.R. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies // *Pharmacology & Therapeutics*. — 2010. — Vol. 128. — Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy. — No. 1. — P. 191-227.
25. Simpson P. Norepinephrine-stimulated hypertrophy of cultured rat myocardial cells is an alpha 1 adrenergic response. // *Journal of Clinical Investigation*. — 1983. — Vol. 72. — No. 2. — P. 732-738.
26. Kuznetsov A.V., Javadov S., Sickinger S., Frotschnig S., Grimm M. H9c2 and HL-1 cells demonstrate distinct features of energy metabolism, mitochondrial function and sensitivity to hypoxia-reoxygenation // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. — 2015. — Vol. 1853. — No. 2. — P. 276-284.
27. Onódi Z., Visnovitz T., Kiss B., Hambalkó S., Koncz A., Ágg B., Váradi B., Tóth V.É., Nagy R.N., Gergely T.G., Gergő D., Makkos A., Pelyhe C., Varga N., Reé D., Apáti Á., Leszek P., Kovács T., Nagy N., Ferdinandy P., Buzás E.I., Görbe A., Giricz Z., Varga Z.V. Systematic transcriptomic and phenotypic characterization of human and murine cardiac myocyte cell lines and primary cardiomyocytes reveals serious limitations and low resemblances to adult cardiac phenotype // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. — 2022. — Vol. 165. — P. 19-30.
28. Jimenez-Tellez N., Greenway S.C. Cellular models for human cardiomyopathy: What is the best option? // *World Journal of Cardiology*. — 2019. — T. 11. — Cellular models for human cardiomyopathy. — № 10. — C. 221-235.
29. Gisone I., Cecchetti A., Ceccherini E., Persiani E., Morales M.A., Vozzi F. Cardiac tissue engineering: Multiple approaches and potential applications // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. — 2022. — T. 10. — Cardiac tissue engineering. — C. 980393.
30. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors // *Cell*. — 2006. — Vol. 126. — No. 4. — P. 663-676.
31. Некрасов Е., Лагарькова М., Киселев С. Индуцированные плюрипотентные

стволовые клетки как модель для изучения болезней человека. — 2011. — Т. 6. — № 2. — С. 32-37.

32. Zhang J., Wilson G.F., Soerens A.G., Koonce C.H., Yu J., Palecek S.P., Thomson J.A., Kamp T.J. Functional Cardiomyocytes Derived From Human Induced Pluripotent Stem Cells // *Circulation Research*. — 2009. — Vol. 104. — No. 4.

33. Itzhaki I., Rapoport S., Huber I., Mizrahi I., Zwi-Dantsis L., Arbel G., Schiller J., Gepstein L. Calcium Handling in Human Induced Pluripotent Stem Cell Derived Cardiomyocytes // *PLoS ONE*. — 2011. — Vol. 6. — No. 4. — P. e18037.

34. Germanguz I., Sedan O., Zeevi-Levin N., Shtrichman R., Barak E., Ziskind A., Eliyahu S., Meiry G., Amit M., Itskovitz-Eldor J., Binah O. Molecular characterization and functional properties of cardiomyocytes derived from human inducible pluripotent stem cells // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. — 2011. — Vol. 15. — No. 1. — P. 38-51.

35. Gherghiceanu M., Barad L., Novak A., Reiter I., Itskovitz-Eldor J., Binah O., Popescu L.M. Cardiomyocytes derived from human embryonic and induced pluripotent stem cells: comparative ultrastructure // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. — 2011. — Vol. 15. — Cardiomyocytes derived from human embryonic and induced pluripotent stem cells. — No. 11. — P. 2539-2551.

36. Snir M., Kehat I., Gepstein A., Coleman R., Itskovitz-Eldor J., Livne E., Gepstein L. Assessment of the ultrastructural and proliferative properties of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. — 2003. — Vol. 285. — No. 6. — P. H2355-H2363.

37. Lundy S.D., Zhu W.-Z., Regnier M., Laflamme M.A. Structural and Functional Maturation of Cardiomyocytes Derived from Human Pluripotent Stem Cells // *Stem Cells and Development*. — 2013. — Vol. 22. — No. 14. — P. 1991-2002.

38. Jacot J.G., Martin J.C., Hunt D.L. Mechanobiology of cardiomyocyte development // *Journal of Biomechanics*. — 2010. — Vol. 43. — No. 1. — P. 93-98.

39. Prakash Y.S., Cody M.J., Housmans P.R., Hannon J.D., Sieck G.C. [No title found] // *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. — 1999. — Т. 20. — № 7. — С. 717-723.

40. Bray M., Sheehy S.P., Parker K.K. Sarcomere alignment is regulated by myocyte shape // *Cell Motility*. — 2008. — Vol. 65. — No. 8. — P. 641-651.
41. Radisic M., Park H., Shing H., Consi T., Schoen F.J., Langer R., Freed L.E., Vunjak-Novakovic G. Functional assembly of engineered myocardium by electrical stimulation of cardiac myocytes cultured on scaffolds // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2004. — Vol. 101. — No. 52. — P. 18129-18134.
42. Sathaye A., Bursac N., Sheehy S., Tung L. Electrical pacing counteracts intrinsic shortening of action potential duration of neonatal rat ventricular cells in culture // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. — 2006. — Vol. 41. — No. 4. — P. 633-641.
43. Deng X.-F., Rokosh D.G., Simpson P.C. Autonomous and Growth Factor-Induced Hypertrophy in Cultured Neonatal Mouse Cardiac Myocytes: Comparison With Rat // *Circulation Research*. — 2000. — Vol. 87. — Autonomous and Growth Factor-Induced Hypertrophy in Cultured Neonatal Mouse Cardiac Myocytes. — No. 9. — P. 781-788.
44. Ito H., Hiroe M., Hirata Y., Tsujino M., Adachi S., Shichiri M., Koike A., Nogami A., Marumo F. Insulin-like growth factor-I induces hypertrophy with enhanced expression of muscle specific genes in cultured rat cardiomyocytes. // *Circulation*. — 1993. — Vol. 87. — No. 5. — P. 1715-1721.
45. Fu J.-D., Rushing S.N., Lieu D.K., Chan C.W., Kong C.-W., Geng L., Wilson K.D., Chiamvimonvat N., Boheler K.R., Wu J.C., Keller G., Hajjar R.J., Li R.A. Distinct Roles of MicroRNA-1 and -499 in Ventricular Specification and Functional Maturation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes // *PLoS ONE*. — 2011. — Vol. 6. — No. 11. — P. e27417.
46. Louch W.E., Sheehan K.A., Wolska B.M. Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. — 2011. — Vol. 51. — No. 3. — P. 288-298.
47. Bupha-Intr T., Haizlip K.M., Janssen P.M.L. Role of Endothelin in the Induction of Cardiac Hypertrophy In Vitro // *PLoS ONE*. — 2012. — Vol. 7. — No. 8. — P. e43179.
48. Daka B., Olausson J., Larsson C.A., Hellgren M.I., Råstam L., Jansson P.-A.,

- Lindblad U. Circulating concentrations of endothelin-1 predict coronary heart disease in women but not in men: a longitudinal observational study in the Vara-Skövde Cohort // BMC Cardiovascular Disorders. — 2015. — Vol. 15. — Circulating concentrations of endothelin-1 predict coronary heart disease in women but not in men. — No. 1. — P. 146.
49. Kawanabe Y., Nauli S.M. Endothelin // Cellular and Molecular Life Sciences. — 2011. — Vol. 68. — No. 2. — P. 195-203.
50. Jain A., Atale N., Kohli S., Bhattacharya S., Sharma M., Rani V. An assessment of norepinephrine mediated hypertrophy to apoptosis transition in cardiac cells: A signal for cell death // Chemico-Biological Interactions. — 2015. — Vol. 225. — An assessment of norepinephrine mediated hypertrophy to apoptosis transition in cardiac cells. — P. 54-62.
51. Zhang C., Shan X.-L., Liao Y.-L., Zhao P., Guo W., Wei H.-C., Lu R. Effects of stachydrine on norepinephrine-induced neonatal rat cardiac myocytes hypertrophy and intracellular calcium transients // BMC Complementary and Alternative Medicine. — 2014. — Vol. 14. — No. 1. — P. 474.
52. Thandapilly S.J., Louis X.L., Yang T., Stringer D.M., Yu L., Zhang S., Wigle J., Kardami E., Zahradka P., Taylor C., Anderson H.D., Netticadan T. Resveratrol prevents norepinephrine induced hypertrophy in adult rat cardiomyocytes, by activating NO-AMPK pathway // European Journal of Pharmacology. — 2011. — Vol. 668. — No. 1-2. — P. 217-224.
53. Rapacciuolo A., Esposito G., Caron K., Mao L., Thomas S.A., Rockman H.A. Important role of endogenous norepinephrine and epinephrine in the development of in vivo pressure-overload cardiac hypertrophy // Journal of the American College of Cardiology. — 2001. — Vol. 38. — No. 3. — P. 876-882.
54. Takahashi N., Calderone A., Izzo N.J., Mäki T.M., Marsh J.D., Colucci W.S. Hypertrophic stimuli induce transforming growth factor-beta 1 expression in rat ventricular myocytes. // Journal of Clinical Investigation. — 1994. — Vol. 94. — No. 4. — P. 1470-1476.
55. Berenji K., Drazner M.H., Rothermel B.A., Hill J.A. Does load-induced ventricular

hypertrophy progress to systolic heart failure? // American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. — 2005. — Vol. 289. — No. 1. — P. H8-H16.

56. Hartner A. Strain differences in the development of hypertension and glomerular lesions induced by deoxycorticosterone acetate salt in mice // Nephrology Dialysis Transplantation. — 2003. — Vol. 18. — No. 10. — P. 1999-2004.

57. Karatas A., Hegner B., De Windt L.J., Luft F.C., Schubert C., Gross V., Akashi Y.J., Gürgen D., Kintscher U., Da Costa Goncalves A.C., Regitz-Zagrosek V., Dragun D. Deoxycorticosterone Acetate-Salt Mice Exhibit Blood Pressure-Independent Sexual Dimorphism // Hypertension. — 2008. — Vol. 51. — No. 4. — P. 1177-1183.

58. Westermann D., Becher P.M., Lindner D., Savvatis K., Xia Y., Fröhlich M., Hoffmann S., Schultheiss H.-P., Tschöpe C. Selective PDE5A inhibition with sildenafil rescues left ventricular dysfunction, inflammatory immune response and cardiac remodeling in angiotensin II-induced heart failure in vivo // Basic Research in Cardiology. — 2012. — Vol. 107. — No. 6. — P. 308.

59. Rockman H.A., Ono S., Ross R.S., Jones L.R., Karimi M., Bhargava V., Ross J., Chien K.R. Molecular and physiological alterations in murine ventricular dysfunction. // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 1994. — Vol. 91. — No. 7. — P. 2694-2698.

60. Mustonen E., Leskinen H., Aro J., Luodonpää M., Vuolteenaho O., Ruskoaho H., Rysä J. Metoprolol Treatment Lowers Thrombospondin-4 Expression in Rats with Myocardial Infarction and Left Ventricular Hypertrophy // Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology. — 2010. — Vol. 107. — No. 3. — P. 709-717.

61. Mohammed S.F., Storlie J.R., Oehler E.A., Bowen L.A., Korinek J., Lam C.S.P., Simari R.D., Burnett J.C., Redfield M.M. Variable phenotype in murine transverse aortic constriction // Cardiovascular Pathology. — 2012. — Vol. 21. — No. 3. — P. 188-198.

62. Hu P., Zhang D., Swenson L., Chakrabarti G., Abel E.D., Litwin S.E. Minimally invasive aortic banding in mice: effects of altered cardiomyocyte insulin signaling during pressure overload // American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. — 2003. — Vol. 285. — Minimally invasive aortic banding in mice. — No. 3. —

P. H1261-H1269.

63. deAlmeida A.C., Van Oort R.J., Wehrens X.H.T. Transverse Aortic Constriction in Mice // *Journal of Visualized Experiments*. — 2010. — No. 38. — P. 1729.

64. Merino D., Gil A., Gómez J., Ruiz L., Llano M., García R., Hurlé M.A., Nistal J.F. Experimental modelling of cardiac pressure overload hypertrophy: Modified technique for precise, reproducible, safe and easy aortic arch banding-debanding in mice // *Scientific Reports*. — 2018. — Vol. 8. — Experimental modelling of cardiac pressure overload hypertrophy. — No. 1. — P. 3167.

65. Chang S.C., Ren S., Rau C.D., Wang J.J. Isoproterenol-Induced Heart Failure Mouse Model Using Osmotic Pump Implantation // *Experimental Models of Cardiovascular Diseases : Methods in Molecular Biology*/ ред. K. Ishikawa. — New York, NY: Springer New York, 2018. — T. 1816. — C. 207-220.

66. Guo R., Ren J. Alcohol Dehydrogenase Accentuates Ethanol-Induced Myocardial Dysfunction and Mitochondrial Damage in Mice: Role of Mitochondrial Death Pathway // *PLoS ONE*. — 2010. — Vol. 5. — Alcohol Dehydrogenase Accentuates Ethanol-Induced Myocardial Dysfunction and Mitochondrial Damage in Mice. — No. 1. — P. e8757.

67. Zeiss C.J., Gatti D.M., Toro-Salazar O., Davis C., Lutz C.M., Spinale F., Stearns T., Furtado M.B., Churchill G.A. Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Collaborative Cross (CC) Mice Recapitulates Individual Cardiotoxicity in Humans // *G3 Genes|Genomes|Genetics*. — 2019. — Vol. 9. — No. 8. — P. 2637-2646.

68. Lympelopoulous A., Rengo G., Koch W.J. Adrenergic Nervous System in Heart Failure: Pathophysiology and Therapy // *Circulation Research*. — 2013. — Vol. 113. — Adrenergic Nervous System in Heart Failure. — No. 6. — P. 739-753.

69. Rau C.D., Wang J., Avetisyan R., Romay M.C., Martin L., Ren S., Wang Y., Lusis A.J. Mapping Genetic Contributions to Cardiac Pathology Induced by Beta-Adrenergic Stimulation in Mice // *Circulation: Cardiovascular Genetics*. — 2015. — Vol. 8. — No. 1. — P. 40-49.

70. Peng H., Yang X.-P., Carretero O.A., Nakagawa P., D'Ambrosio M., Leung P., Xu J., Peterson E.L., González G.E., Harding P., Rhaleb N.-E. Angiotensin II-induced dilated

cardiomyopathy in Balb/c but not C57BL/6J mice: T-helper lymphocyte 2 and dilated cardiomyopathy in hypertensive mice // *Experimental Physiology*. — 2011. — Vol. 96. — Angiotensin II-induced dilated cardiomyopathy in Balb/c but not C57BL/6J mice. — No. 8. — P. 756-764.

71. Pan X., Shao Y., Wu F., Wang Y., Xiong R., Zheng J., Tian H., Wang B., Wang Y., Zhang Y., Han Z., Qu A., Xu H., Lu A., Yang T., Li X., Xu A., Du J., Lin Z. FGF21 Prevents Angiotensin II-Induced Hypertension and Vascular Dysfunction by Activation of ACE2/Angiotensin-(1-7) Axis in Mice // *Cell Metabolism*. — 2018. — Vol. 27. — No. 6. — P. 1323-1337.e5.

72. Annunziata M., Granata R., Ghigo E. The IGF system // *Acta Diabetologica*. — 2011. — Vol. 48. — No. 1. — P. 1-9.

73. Kiepe D., Ciarmatori S., Haarmann A., Tönshoff B. Differential expression of IGF system components in proliferating vs. differentiating growth plate chondrocytes: the functional role of IGFBP-5 // *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. — 2006. — Vol. 290. — Differential expression of IGF system components in proliferating vs. differentiating growth plate chondrocytes. — No. 2. — P. E363-E371.

74. Roith D.L. The Insulin-Like Growth Factor System // *Experimental Diabetes Research*. — 2003. — Vol. 4. — No. 4. — P. 205-212.

75. Federici M., Porzio O., Zucaro L., Fusco A., Borboni P., Lauro D., Sesti G. Distribution of insulin/insulin-like growth factor-I hybrid receptors in human tissues // *Molecular and Cellular Endocrinology*. — 1997. — Vol. 129. — No. 2. — P. 121-126.

76. Adasheva D.A., Serebryanaya D.V. IGF Signaling in the Heart in Health and Disease // *Biochemistry (Moscow)*. — 2024. — Vol. 89. — No. 8. — P. 1402-1428.

77. Li B., Setoguchi M., Wang X., Andreoli A.M., Leri A., Malhotra A., Kajstura J., Anversa P. Insulin-Like Growth Factor-1 Attenuates the Detrimental Impact of Nonocclusive Coronary Artery Constriction on the Heart // *Circulation Research*. — 1999. — Vol. 84. — No. 9. — P. 1007-1019.

78. Welch S., Plank D., Witt S., Glascock B., Schaefer E., Chimenti S., Andreoli A.M.,

- Limana F., Leri A., Kajstura J., Anversa P., Sussman M.A. Cardiac-Specific IGF-1 Expression Attenuates Dilated Cardiomyopathy in Tropomodulin-Overexpressing Transgenic Mice // *Circulation Research*. — 2002. — Vol. 90. — No. 6. — P. 641-648.
79. Colao A. The GH-IGF-I axis and the cardiovascular system: clinical implications // *Clinical Endocrinology*. — 2008. — Vol. 69. — The GH-IGF-I axis and the cardiovascular system. — No. 3. — P. 347-358.
80. Suleiman M., Singh R., Stewart C. Apoptosis and the cardiac action of insulin-like growth factor I // *Pharmacology & Therapeutics*. — 2007. — Vol. 114. — No. 3. — P. 278-294.
81. Arnqvist H. The Role of IGF-system in Vascular Insulin Resistance // *Hormone and Metabolic Research*. — 2008. — Vol. 40. — No. 09. — P. 588-592.
82. Smith T.J. Insulin-Like Growth Factor-I Regulation of Immune Function: A Potential Therapeutic Target in Autoimmune Diseases? // *Pharmacological Reviews*. — 2010. — Vol. 62. — Insulin-Like Growth Factor-I Regulation of Immune Function. — No. 2. — P. 199-236.
83. Higashi Y., Sukhanov S., Anwar A., Shai S.-Y., Delafontaine P. IGF-1, oxidative stress and atheroprotection // *Trends in Endocrinology & Metabolism*. — 2010. — Vol. 21. — No. 4. — P. 245-254.
84. Saber H., Himali J.J., Beiser A.S., Shoamanesh A., Pikula A., Roubenoff R., Romero J.R., Kase C.S., Vasan R.S., Seshadri S. Serum Insulin-Like Growth Factor 1 and the Risk of Ischemic Stroke: The Framingham Study // *Stroke*. — 2017. — Vol. 48. — Serum Insulin-Like Growth Factor 1 and the Risk of Ischemic Stroke. — No. 7. — P. 1760-1765.
85. Carlzon D., Svensson J., Petzold M., Karlsson M.K., Ljunggren Ö., Tivesten Å., Mellström D., Ohlsson C. Both Low and High Serum IGF-1 Levels Associate With Increased Risk of Cardiovascular Events in Elderly Men // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. — 2014. — Vol. 99. — No. 11. — P. E2308-E2316.
86. Hjortebjerg R., Tarnow L., Jorsal A., Parving H.-H., Rossing P., Bjerre M., Frystyk J. IGFBP-4 Fragments as Markers of Cardiovascular Mortality in Type 1 Diabetes

Patients With and Without Nephropathy // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. — 2015. — Vol. 100. — No. 8. — P. 3032-3040.

87. Serebryanaya D.V., Adasheva D.A., Konev A.A., Artemieva M.M., Katrukha I.A., Postnikov A.B., Medvedeva N.A., Katrukha A.G. IGFBP-4 Proteolysis by PAPP-A in a Primary Culture of Rat Neonatal Cardiomyocytes under Normal and Hypertrophic Conditions // Biochemistry (Moscow). — 2021. — Vol. 86. — No. 11. — P. 1395-1406.

88. Wang W., Sun Y., Mo D.-G., Li T., Yao H.-C. Circulating IGF-1 and IGFBP-2 may be biomarkers for risk stratification in patients with acute coronary syndrome: A prospective cohort study // Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases. — 2023. — Vol. 33. — Circulating IGF-1 and IGFBP-2 may be biomarkers for risk stratification in patients with acute coronary syndrome. — No. 9. — P. 1740-1747.

89. Yu W., Gao H., Hu T., Tan X., Liu Y., Liu H., He S., Chen Z., Guo S., Huang J. Insulin-like growth factor binding protein 2: a core biomarker of left ventricular dysfunction in dilated cardiomyopathy // Hereditas. — 2023. — Vol. 160. — Insulin-like growth factor binding protein 2. — No. 1. — P. 36.

90. Brissenden J.E., Ullrich A., Francke U. Human chromosomal mapping of genes for insulin-like growth factors I and II and epidermal growth factor // Nature. — 1984. — Vol. 310. — No. 5980. — P. 781-784.

91. Tricoli J.V., Rall L.B., Scott J., Bell G.I., Shows T.B. Localization of insulin-like growth factor genes to human chromosomes 11 and 12 // Nature. — 1984. — Vol. 310. — No. 5980. — P. 784-786.

92. Rotwein P., Pollock K.M., Didier D.K., Krivi G.G. Organization and sequence of the human insulin-like growth factor I gene. Alternative RNA processing produces two insulin-like growth factor I precursor peptides // The Journal of Biological Chemistry. — 1986. — T. 261. — № 11. — C. 4828-4832.

93. Smith P.J., Spurrell E.L., Coakley J., Hinds C.J., Ross R.J.M., Krainer A.R., Chew S.L. An Exonic Splicing Enhancer in Human IGF-I Pre-mRNA Mediates Recognition of Alternative Exon 5 by the Serine-Arginine Protein Splicing Factor-2/ Alternative Splicing Factor // Endocrinology. — 2002. — Vol. 143. — No. 1. — P. 146-154.

94. Yakar S., Liu J.-L., Stannard B., Butler A., Accili D., Sauer B., LeRoith D. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 1999. — Vol. 96. — No. 13. — P. 7324-7329.
95. Vassilakos G., Lei H., Yang Y., Puglise J., Matheny M., Durzynska J., Ozery M., Bennett K., Spradlin R., Bonanno H., Park S., Ahima R.S., Barton E.R. Deletion of muscle IGF-I transiently impairs growth and progressively disrupts glucose homeostasis in male mice // *The FASEB Journal*. — 2019. — Vol. 33. — No. 1. — P. 181-194.
96. Fernandez A.M., De La Vega A.G., Torres-Aleman I. Insulin-like growth factor I restores motor coordination in a rat model of cerebellar ataxia // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 1998. — Vol. 95. — No. 3. — P. 1253-1258.
97. Soto M., Cai W., Konishi M., Kahn C.R. Insulin signaling in the hippocampus and amygdala regulates metabolism and neurobehavior // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2019. — Vol. 116. — No. 13. — P. 6379-6384.
98. LeRoith D., Holly J.M.P., Forbes B.E. Insulin-like growth factors: Ligands, binding proteins, and receptors // *Molecular Metabolism*. — 2021. — Vol. 52. — Insulin-like growth factors. — P. 101245.
99. Chao W., D'Amore P.A. IGF2: Epigenetic regulation and role in development and disease // *Cytokine & Growth Factor Reviews*. — 2008. — Vol. 19. — IGF2. — No. 2. — P. 111-120.
100. Baral K., Rotwein P. The insulin-like growth factor 2 gene in mammals: Organizational complexity within a conserved locus // *PLOS ONE*. — 2019. — Vol. 14. — The insulin-like growth factor 2 gene in mammals. — No. 6. — P. e0219155.
101. DeChiara T.M., Robertson E.J., Efstratiadis A. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene // *Cell*. — 1991. — Vol. 64. — No. 4. — P. 849-859.
102. Clemmons D. Involvement of insulin-like growth factor-I in the control of glucose homeostasis // *Current Opinion in Pharmacology*. — 2006. — Vol. 6. — No. 6. — P. 620-625.

103. Uchimura T., Hollander J.M., Nakamura D.S., Liu Z., Rosen C.J., Georgakoudi I., Zeng L. An essential role for IGF2 in cartilage development and glucose metabolism during postnatal long bone growth // *Development*. — 2017. — Vol. 144. — No. 19. — P. 3533-3546.
104. Alberini C.M., Chen D.Y. Memory enhancement: consolidation, reconsolidation and insulin-like growth factor 2 // *Trends in Neurosciences*. — 2012. — Vol. 35. — Memory enhancement. — No. 5. — P. 274-283.
105. Ziegler A.N., Schneider J.S., Qin M., Tyler W.A., Pintar J.E., Fraidenraich D., Wood T.L., Levison S.W. IGF-II Promotes Stemness of Neural Restricted Precursors // *Stem Cells*. — 2012. — Vol. 30. — No. 6. — P. 1265-1276.
106. Ziegler A.N., Feng Q., Chidambaram S., Testai J.M., Kumari E., Rothbard D.E., Constancia M., Sandovici I., Cominski T., Pang K., Gao N., Wood T.L., Levison S.W. Insulin-like Growth Factor II: An Essential Adult Stem Cell Niche Constituent in Brain and Intestine // *Stem Cell Reports*. — 2019. — Vol. 12. — Insulin-like Growth Factor II. — No. 4. — P. 816-830.
107. Song L., Sun Z., Kim D., Gou W., Strange C., Dong H., Cui W., Gilkeson G., Morgan K.A., Adams D.B., Wang H. Adipose stem cells from chronic pancreatitis patients improve mouse and human islet survival and function // *Stem Cell Research & Therapy*. — 2017. — Vol. 8. — No. 1. — P. 192.
108. Troncoso R., Ibarra C., Vicencio J.M., Jaimovich E., Lavandero S. New insights into IGF-1 signaling in the heart // *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. — 2014. — T. 25. — № 3. — C. 128-137.
109. Zhao P., Turdi S., Dong F., Xiao X., Su G., Zhu X., Scott G.I., Ren J. CARDIAC-SPECIFIC OVEREXPRESSION OF INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR I (IGF-1) RESCUES LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED CARDIAC DYSFUNCTION AND ACTIVATION OF STRESS SIGNALING IN MURINE CARDIOMYOCYTES // *Shock*. — 2009. — Vol. 32. — No. 1. — P. 100-107.
110. Tsai T.-C., Shih C.-C., Chien H.-P., Yang A.-H., Lu J.-K., Lu J.-H. Anti-apoptotic effects of IGF-I on mortality and dysmorphogenesis in *tbx5*-deficient zebrafish embryos // *BMC Developmental Biology*. — 2018. — Vol. 18. — No. 1. — P. 5.

111. Engelmann G.L., Boehm K.D., Haskell J.F., Khairallah P.A., Ilan J. Insulin-like growth factors and neonatal cardiomyocyte development: ventricular gene expression and membrane receptor variations in normotensive and hypertensive rats // *Molecular and Cellular Endocrinology*. — 1989. — Vol. 63. — Insulin-like growth factors and neonatal cardiomyocyte development. — No. 1-2. — P. 1-14.
112. Li P., Cavallero S., Gu Y., Chen T.H.P., Hughes J., Hassan A.B., Brüning J.C., Pashmforoush M., Sucov H.M. IGF signaling directs ventricular cardiomyocyte proliferation during embryonic heart development // *Development*. — 2011. — Vol. 138. — No. 9. — P. 1795-1805.
113. Meganathan K., Sotiriadou I., Natarajan K., Hescheler J., Sachinidis A. Signaling molecules, transcription growth factors and other regulators revealed from in-vivo and in-vitro models for the regulation of cardiac development // *International Journal of Cardiology*. — 2015. — Vol. 183. — P. 117-128.
114. Evans-Anderson H.J., Alfieri C.M., Yutzey K.E. Regulation of Cardiomyocyte Proliferation and Myocardial Growth During Development by FOXO Transcription Factors // *Circulation Research*. — 2008. — Vol. 102. — No. 6. — P. 686-694.
115. Lee W.-L., Chen J.-W., Ting C.-T., Ishiwata T., Lin S.-J., Korc M., Wang P.H. Insulin-Like Growth Factor I Improves Cardiovascular Function and Suppresses Apoptosis of Cardiomyocytes in Dilated Cardiomyopathy1 // *Endocrinology*. — 1999. — Vol. 140. — No. 10. — P. 4831-4840.
116. Brade T., Kumar S., Cunningham T.J., Chatzi C., Zhao X., Cavallero S., Li P., Sucov H.M., Ruiz-Lozano P., Duester G. Retinoic acid stimulates myocardial expansion by induction of hepatic erythropoietin which activates epicardial *Igf2* // *Development*. — 2011. — Vol. 138. — No. 1. — P. 139-148.
117. Shen H., Cavallero S., Estrada K.D., Sandovici I., Kumar S.R., Makita T., Lien C.-L., Constancia M., Sucov H.M. Extracardiac control of embryonic cardiomyocyte proliferation and ventricular wall expansion // *Cardiovascular Research*. — 2015. — Vol. 105. — No. 3. — P. 271-278.
118. Barak Y., Hemberger M., Sucov H.M. Phases and Mechanisms of Embryonic Cardiomyocyte Proliferation and Ventricular Wall Morphogenesis // *Pediatric*

Cardiology. — 2019. — Vol. 40. — No. 7. — P. 1359-1366.

119. Hoeflich A., David R., Hjortebjerg R. Current IGFBP-Related Biomarker Research in Cardiovascular Disease—We Need More Structural and Functional Information in Clinical Studies // *Frontiers in Endocrinology*. — 2018. — T. 9. — C. 388.

120. Binoux M., Hossenlopp P. Insulin-Like Growth Factor (IGF) and IGF-Binding Proteins: Comparison of Human Serum and Lymph* // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. — 1988. — Vol. 67. — Insulin-Like Growth Factor (IGF) and IGF-Binding Proteins. — No. 3. — P. 509-514.

121. Bae J.-H., Song D.-K., Im S.-S. Regulation of IGFBP-1 in Metabolic Diseases // *Journal of Lifestyle Medicine*. — 2013. — T. 3. — № 2. — C. 73-79.

122. Sala A., Capaldi S., Campagnoli M., Faggion B., Labò S., Perduca M., Romano A., Carrizo M.E., Valli M., Visai L., Minchiotti L., Galliano M., Monaco H.L. Structure and Properties of the C-terminal Domain of Insulin-like Growth Factor-binding Protein-1 Isolated from Human Amniotic Fluid // *Journal of Biological Chemistry*. — 2005. — Vol. 280. — No. 33. — P. 29812-29819.

123. Haywood N.J., Cordell P.A., Tang K.Y., Makova N., Yuldasheva N.Y., Imrie H., Viswambharan H., Bruns A.F., Cubbon R.M., Kearney M.T., Wheatcroft S.B. Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 1 Could Improve Glucose Regulation and Insulin Sensitivity Through Its RGD Domain // *Diabetes*. — 2017. — Vol. 66. — No. 2. — P. 287-299.

124. Ammoun S., Schmid M.C., Zhou L., Ristic N., Ercolano E., Hilton D.A., Perks C.M., Hanemann C.O. Insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) regulates human schwannoma proliferation, adhesion and survival // *Oncogene*. — 2012. — Vol. 31. — No. 13. — P. 1710-1722.

125. Tang X., Jiang H., Lin P., Zhang Z., Chen M., Zhang Y., Mo J., Zhu Y., Liu N., Chen X. Insulin-like growth factor binding protein-1 regulates HIF-1 α degradation to inhibit apoptosis in hypoxic cardiomyocytes // *Cell Death Discovery*. — 2021. — Vol. 7. — No. 1. — P. 242.

126. Peng X., Ueda H., Zhou H., Stokol T., Shen T., Alcaraz A., Nagy T., Vassalli J., Guan J. Overexpression of focal adhesion kinase in vascular endothelial cells promotes

angiogenesis in transgenic mice // Cardiovascular Research. — 2004. — Vol. 64. — No. 3. — P. 421-430.

127. Lee P.D.K., Conover C.A., Powell D.R. Regulation and Function of Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-1 // Experimental Biology and Medicine. — 1993. — Vol. 204. — No. 1. — P. 4-29.

128. Bar R.S., Boes M., Clemmons D.R., Busby W.H., Sandra A., Dake B.L., Booth B.A. INSULIN DIFFERENTIALLY ALTERS TRANSCAPILLARY MOVEMENT OF INTRAVASCULAR IGFBP-1, IGFBP-2 AND ENDOTHELIAL CELL IGF-BINDING PROTEINS IN THE RAT HEART // Endocrinology. — 1990. — Vol. 127. — No. 1. — P. 497-499.

129. Wolk K., Larsson S.C., Vessby B., Wolk A., Brismar K. Metabolic, Anthropometric, and Nutritional Factors as Predictors of Circulating Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-1 Levels in Middle-Aged and Elderly Men // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. — 2004. — Vol. 89. — No. 4. — P. 1879-1884.

130. Heald A.H., Cruickshank J.K., Riste L.K., Cade J.E., Anderson S., Greenhalgh A., Sampayo J., Taylor W., Fraser W., White A., Gibson J.M. Close relation of fasting insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) with glucose tolerance and cardiovascular risk in two populations // Diabetologia. — 2001. — T. 44. — № 3. — C. 333-339.

131. Laughlin G.A., Barrett-Connor E., Criqui M.H., Kritz-Silverstein D. The Prospective Association of Serum Insulin-Like Growth Factor I (IGF-I) and IGF-Binding Protein-1 Levels with All Cause and Cardiovascular Disease Mortality in Older Adults: The Rancho Bernardo Study // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. — 2004. — Vol. 89. — The Prospective Association of Serum Insulin-Like Growth Factor I (IGF-I) and IGF-Binding Protein-1 Levels with All Cause and Cardiovascular Disease Mortality in Older Adults. — No. 1. — P. 114-120.

132. Aziz A., Haywood N.J., Cordell P.A., Smith J., Yuldasheva N.Y., Sengupta A., Ali N., Mercer B.N., Mughal R.S., Riches K., Cubbon R.M., Porter K.E., Kearney M.T., Wheatcroft S.B. Insulinlike Growth Factor-Binding Protein-1 Improves Vascular Endothelial Repair in Male Mice in the Setting of Insulin Resistance // Endocrinology.

— 2018. — Vol. 159. — No. 2. — P. 696-709.

133. Wheatcroft S.B., Kearney M.T., Shah A.M., Grieve D.J., Williams I.L., Miell J.P., Crossey P.A. Vascular Endothelial Function and Blood Pressure Homeostasis in Mice Overexpressing IGF Binding Protein-1 // *Diabetes*. — 2003. — Vol. 52. — No. 8. — P. 2075-2082.

134. Rajwani A., Ezzat V., Smith J., Yuldasheva N.Y., Duncan E.R., Gage M., Cubbon R.M., Kahn M.B., Imrie H., Abbas A., Viswambharan H., Aziz A., Sukumar P., Vidal-Puig A., Sethi J.K., Xuan S., Shah A.M., Grant P.J., Porter K.E., Kearney M.T., Wheatcroft S.B. Increasing Circulating IGFBP1 Levels Improves Insulin Sensitivity, Promotes Nitric Oxide Production, Lowers Blood Pressure, and Protects Against Atherosclerosis // *Diabetes*. — 2012. — Vol. 61. — No. 4. — P. 915-924.

135. Haywood N.J., Slater T.A., Drozd M., Warmke N., Matthews C., Cordell P.A., Smith J., Rainford J., Cheema H., Maher C., Bridge K.I., Yuldasheva N.Y., Cubbon R.M., Kearney M.T., Wheatcroft S.B. IGFBP-1 in Cardiometabolic Pathophysiology—Insights From Loss-of-Function and Gain-of-Function Studies in Male Mice // *Journal of the Endocrine Society*. — 2020. — Vol. 4. — No. 1. — P. bvz006.

136. Russo V.C., Schütt B.S., Andaloro E., Ymer S.I., Hoeflich A., Ranke M.B., Bach L.A., Werther G.A. Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-2 Binding to Extracellular Matrix Plays a Critical Role in Neuroblastoma Cell Proliferation, Migration, and Invasion // *Endocrinology*. — 2005. — Vol. 146. — No. 10. — P. 4445-4455.

137. Slater T., Haywood N.J., Matthews C., Cheema H., Wheatcroft S.B. Insulin-like growth factor binding proteins and angiogenesis: from cancer to cardiovascular disease // *Cytokine & Growth Factor Reviews*. — 2019. — Vol. 46. — Insulin-like growth factor binding proteins and angiogenesis. — P. 28-35.

138. Khan S. IGFBP-2 Signaling in the Brain: From Brain Development to Higher Order Brain Functions // *Frontiers in Endocrinology*. — 2019. — T. 10. — IGFBP-2 Signaling in the Brain. — C. 822.

139. Yau S.W., Azar W.J., Sabin M.A., Werther G.A., Russo V.C. IGFBP-2 - taking the lead in growth, metabolism and cancer // *Journal of Cell Communication and Signaling*. — 2015. — Vol. 9. — No. 2. — P. 125-142.

140. Hoeflich A., Wu M., Mohan S., Föll J., Wanke R., Froehlich T., Arnold G.J., Lahm H., Kolb H.J., Wolf E. Overexpression of Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-2 in Transgenic Mice Reduces Postnatal Body Weight Gain // *Endocrinology*. — 1999. — Vol. 140. — No. 12. — P. 5488-5496.
141. Wood T.L., Rogler L.E., Czick M.E., Schuller A.G.P., Pintar J.E. Selective Alterations in Organ Sizes in Mice with a Targeted Disruption of the Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-2 Gene // *Molecular Endocrinology*. — 2000. — Vol. 14. — No. 9. — P. 1472-1482.
142. Ko J.M., Park H.K., Yang S., Hwang I.T. Influence of catch-up growth on IGFBP-2 levels and association between IGFBP-2 and cardiovascular risk factors in Korean children born SGA // *Endocrine Journal*. — 2012. — Vol. 59. — No. 8. — P. 725-733.
143. Berry M., Galinier M., Delmas C., Fournier P., Desmoulin F., Turkieh A., Mischak H., Mullen W., Barutaut M., Eurlings L.W., Van Wijk S., Brunner-La Rocca H.-P., Caubere C., Butler J., Roncalli J., Evaristi M.F., Cohen-Solal A., Seronde M.-F., Escamilla R., Ferrières J., Koukoui F., Smih F., Rouet P. Proteomics analysis reveals IGFBP2 as a candidate diagnostic biomarker for heart failure // *IJC Metabolic & Endocrine*. — 2015. — Vol. 6. — P. 5-12.
144. Firth S.M., Baxter R.C. Cellular Actions of the Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins // *Endocrine Reviews*. — 2002. — Vol. 23. — No. 6. — P. 824-854.
145. Varma Shrivastav S., Bhardwaj A., Pathak K.A., Shrivastav A. Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 (IGFBP-3): Unraveling the Role in Mediating IGF-Independent Effects Within the Cell // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. — 2020. — T. 8. — Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 (IGFBP-3). — C. 286.
146. Nguyen K.H., Yao X.-H., Erickson A.G., Mishra S., Nyomba B.L.G. Glucose Intolerance in Aging Male IGFBP-3 Transgenic Mice: Differential Effects of Human IGFBP-3 and Its Mutant IGFBP-3 Devoid of IGF Binding Ability // *Endocrinology*. — 2015. — Vol. 156. — Glucose Intolerance in Aging Male IGFBP-3 Transgenic Mice. — No. 2. — P. 462-474.
147. Scully T., Firth S.M., Scott C.D., De Silva H.C., Pintar J.E., Chan-Ling T., Twigg

- S.M., Baxter R.C. Insulin-like growth factor binding protein-3 links obesity and breast cancer progression // *Oncotarget*. — 2016. — Vol. 7. — No. 34. — P. 55491-55505.
148. Granata R., Broglio F., Migliorino D., Cutrupi S., Baldanzi G., Sireno M., Fubini A., Graziani A., Ghigo E., Pucci A. Neonatal and adult human heart tissues from normal subjects and patients with ischemic, dilated or hypertrophic cardiomyopathy express insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) // *Journal of Endocrinological Investigation*. — 2000. — Vol. 23. — No. 11. — P. 724-726.
149. Pucci A., Zanini C., Granata R., Ghignone R., Iavarone A., Broglio F., Sorrentino P., Bergamasco L., Rinaldi M., Ghigo E. Myocardial Insulin-like Growth Factor-1 and Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3 Gene Expression in Failing Hearts Harvested From Patients Undergoing Cardiac Transplantation // *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. — 2009. — Vol. 28. — No. 4. — P. 402-405.
150. Chang R.-L., Lin J.-W., Hsieh D.J.-Y., Yeh Y.-L., Shen C.-Y., Day C.-H., Ho T.-J., Viswanadha V.P., Kuo W.-W., Huang C.-Y. Long-term hypoxia exposure enhanced IGFBP-3 protein synthesis and secretion resulting in cell apoptosis in H9c2 myocardial cells // *Growth Factors*. — 2015. — Vol. 33. — No. 4. — P. 275-281.
151. Oikonomopoulos A., Sereti K.-I., Conyers F., Bauer M., Liao A., Guan J., Crapps D., Han J.-K., Dong H., Bayomy A.F., Fine G.C., Westerman K., Biechele T.L., Moon R.T., Force T., Liao R. Wnt Signaling Exerts an Antiproliferative Effect on Adult Cardiac Progenitor Cells Through IGFBP3 // *Circulation Research*. — 2011. — Vol. 109. — No. 12. — P. 1363-1374.
152. Oh S., Kim W., Lee O., Kang J., Woo J., Kim J., Glisson B., Lee H. Insulin-like growth factor binding protein-3 suppresses vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma // *Cancer Science*. — 2012. — Vol. 103. — No. 7. — P. 1259-1266.
153. Lee H.-J., Lee J.-S., Hwang S.J., Lee H.-Y. Insulin-like growth factor binding protein-3 inhibits cell adhesion via suppression of integrin $\beta 4$ expression // *Oncotarget*. — 2015. — Vol. 6. — No. 17. — P. 15150-15163.
154. Granata R., Trovato L., Lupia E., Sala G., Settanni F., Camussi G., Ghidoni R., Ghigo E. Insulin-like growth factor binding protein-3 induces angiogenesis through IGF-

- I- and SphK1-dependent mechanisms // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. — 2007. — Vol. 5. — No. 4. — P. 835-845.
155. Lonsdale J., Thomas J., Salvatore M., Phillips R., Lo E., Moore H.F., et al. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project // *Nature Genetics*. — 2013. — Vol. 45. — No. 6. — P. 580-585.
156. Monget P., Oxvig C. PAPP-A and the IGF system // *Annales d'Endocrinologie*. — 2016. — Vol. 77. — No. 2. — P. 90-96.
157. Schneider M.R., Lahm H., Wu M., Hoeflich A., Wolf E. Transgenic mouse models for studying the functions of insulin-like growth factor-binding proteins // *The FASEB Journal*. — 2000. — Vol. 14. — No. 5. — P. 629-640.
158. Ning Y., Schuller A.G.P., Conover C.A., Pintar J.E. Insulin-Like Growth Factor (IGF) Binding Protein-4 Is Both a Positive and Negative Regulator of IGF Activity in Vivo // *Molecular Endocrinology*. — 2008. — Vol. 22. — No. 5. — P. 1213-1225.
159. Miyakoshi N., Qin X., Kasukawa Y., Richman C., Srivastava A.K., Baylink D.J., Mohan S. Systemic Administration of Insulin-Like Growth Factor (IGF)-Binding Protein-4 (IGFBP-4) Increases Bone Formation Parameters in Mice by Increasing IGF Bioavailability via an IGFBP-4 Protease-Dependent Mechanism* // *Endocrinology*. — 2001. — Vol. 142. — No. 6. — P. 2641-2648.
160. Ning Y., Schuller A.G.P., Bradshaw S., Rotwein P., Ludwig T., Frystyk J., Pintar J.E. Diminished Growth and Enhanced Glucose Metabolism in Triple Knockout Mice Containing Mutations of Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3, -4, and -5 // *Molecular Endocrinology*. — 2006. — Vol. 20. — No. 9. — P. 2173-2186.
161. Zhu W., Shiojima I., Ito Y., Li Z., Ikeda H., Yoshida M., Naito A.T., Nishi J., Ueno H., Umezawa A., Minamino T., Nagai T., Kikuchi A., Asashima M., Komuro I. IGFBP-4 is an inhibitor of canonical Wnt signalling required for cardiogenesis // *Nature*. — 2008. — Vol. 454. — No. 7202. — P. 345-349.
162. Konev A.A., Smolyanova T.I., Kharitonov A.V., Serebryanaya D.V., Kozlovsky S.V., Kara A.N., Feygina E.E., Katrukha A.G., Postnikov A.B. Characterization of endogenously circulating IGFBP-4 fragments—Novel biomarkers for cardiac risk assessment // *Clinical Biochemistry*. — 2015. — Vol. 48. — No. 12. — P. 774-780.

163. Duan C., Allard J.B. Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-5 in Physiology and Disease // *Frontiers in Endocrinology*. — 2020. — T. 11. — C. 100.
164. Andress D.L., Birnbaum R.S. A novel human insulin-like growth factor binding protein secreted by osteoblast-like cells // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. — 1991. — Vol. 176. — No. 1. — P. 213-218.
165. Bautista C.M., Baylink D.J., Mohan S. Isolation of a novel insulin-like growth factor (IGF) binding protein from human bone: A potential candidate for fixing IGF-II in human bone // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. — 1991. — Vol. 176. — Isolation of a novel insulin-like growth factor (IGF) binding protein from human bone. — No. 2. — P. 756-763.
166. Liu L., Wang J., Li X., Ma J., Shi C., Zhu H., Xi Q., Zhang J., Zhao X., Gu M. miR-204-5p suppresses cell proliferation by inhibiting IGFBP5 in papillary thyroid carcinoma // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. — 2015. — Vol. 457. — No. 4. — P. 621-626.
167. Zhang W.R., Zhang H.N., Wang Y.M., Dai Y., Liu X.F., Li X., Ding X.B., Guo H. miR-143 regulates proliferation and differentiation of bovine skeletal muscle satellite cells by targeting IGFBP5 // *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*. — 2017. — Vol. 53. — No. 3. — P. 265-271.
168. Camacho-Hubner C., Busby W.H., McCusker R.H., Wright G., Clemmons D.R. Identification of the forms of insulin-like growth factor-binding proteins produced by human fibroblasts and the mechanisms that regulate their secretion // *The Journal of Biological Chemistry*. — 1992. — T. 267. — № 17. — C. 11949-11956.
169. Jones J.I., Gockerman A., Busby W.H., Camacho-Hubner C., Clemmons D.R. Extracellular matrix contains insulin-like growth factor binding protein-5: potentiation of the effects of IGF-I. // *The Journal of cell biology*. — 1993. — Vol. 121. — Extracellular matrix contains insulin-like growth factor binding protein-5. — No. 3. — P. 679-687.
170. Zheng B., Duan C., Clemmons D.R. The Effect of Extracellular Matrix Proteins on Porcine Smooth Muscle Cell Insulin-like Growth Factor (IGF) Binding Protein-5 Synthesis and Responsiveness to IGF-I // *Journal of Biological Chemistry*. — 1998. —

Vol. 273. — No. 15. — P. 8994-9000.

171. Salih D.A.M., Tripathi G., Holding C., Szeszak T.A.M., Gonzalez M.I., Carter E.J., Cobb L.J., Eisemann J.E., Pell J.M. *Insulin-like growth factor-binding protein 5 (Igfbp5)* compromises survival, growth, muscle development, and fertility in mice // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2004. — Vol. 101. — No. 12. — P. 4314-4319.

172. Ning Y., Hoang B., Schuller A.G.P., Cominski T.P., Hsu M.-S., Wood T.L., Pintar J.E. Delayed Mammary Gland Involution in Mice with Mutation of the Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 5 Gene // *Endocrinology*. — 2007. — Vol. 148. — No. 5. — P. 2138-2147.

173. Fischer F., Schulte H., Mohan S., Tataru M., Köhler E., Assmann G., Von Eckardstein A. Associations of insulin-like growth factors, insulin-like growth factor binding proteins and acid-labile subunit with coronary heart disease // *Clinical Endocrinology*. — 2004. — Vol. 61. — No. 5. — P. 595-602.

174. Rho S.B., Dong S.M., Kang S., Seo S.-S., Yoo C.W., Lee D.O., Woo J.S., Park S.-Y. Insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5) acts as a tumor suppressor by inhibiting angiogenesis // *Carcinogenesis*. — 2008. — Vol. 29. — No. 11. — P. 2106-2111.

175. Martin J.L., Willetts K.E., Baxter R.C. Purification and properties of a novel insulin-like growth factor-II binding protein from transformed human fibroblasts // *The Journal of Biological Chemistry*. — 1990. — T. 265. — № 7. — C. 4124-4130.

176. Zhu W., Wu Y., Cui C., Zhao H.-M., Ba J., Chen H., Yu J. Expression of IGFBP-6 in proliferative vitreoretinopathy rat models and its effects on retinal pigment epithelial-J cells // *Molecular Medicine Reports*. — 2014. — Vol. 9. — No. 1. — P. 33-38.

177. Bach L.A. Recent insights into the actions of IGFBP-6 // *Journal of Cell Communication and Signaling*. — 2015. — Vol. 9. — No. 2. — P. 189-200.

178. Zhang C., Lu L., Li Y., Wang X., Zhou J., Liu Y., Fu P., Gallicchio M.A., Bach L.A., Duan C. IGF binding protein-6 expression in vascular endothelial cells is induced by hypoxia and plays a negative role in tumor angiogenesis // *International Journal of Cancer*. — 2012. — Vol. 130. — No. 9. — P. 2003-2012.

179. Bach L.A., Fu P., Yang Z. Insulin-like growth factor-binding protein-6 and cancer // *Clinical Science*. — 2013. — Vol. 124. — No. 4. — P. 215-229.
180. Baxter R.C., Saunders H. Radioimmunoassay of insulin-like growth factor-binding protein-6 in human serum and other body fluids // *Journal of Endocrinology*. — 1992. — T. 134. — № 1. — C. 133-139.
181. Liso A., Venuto S., Coda A.R.D., Giallongo C., Palumbo G.A., Tibullo D. IGFBP-6: At the Crossroads of Immunity, Tissue Repair and Fibrosis // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2022. — Vol. 23. — IGFBP-6. — No. 8. — P. 4358.
182. Liu Y., Huan W., Wu J., Zou S., Qu L. IGFBP6 Is Downregulated in Unstable Carotid Atherosclerotic Plaques According to an Integrated Bioinformatics Analysis and Experimental Verification // *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. — 2020. — Vol. 27. — No. 10. — P. 1068-1085.
183. Frystyk J., Skjærbæk C., Dinesen B., Ørskov H. Free insulin-like growth factors (IGF-I and IGF-II) in human serum // *FEBS Letters*. — 1994. — Vol. 348. — No. 2. — P. 185-191.
184. Berg U., Bang P., Carlsson-Skwirut C. Calpain proteolysis of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) -2 and -3, but not of IGFBP-1 // *bchm*. — 2007. — Vol. 388. — No. 8. — P. 859-863.
185. Clay Bunn R., Fowlkes J.L. Insulin-like growth factor binding protein proteolysis // *Trends in Endocrinology & Metabolism*. — 2003. — Vol. 14. — No. 4. — P. 176-181.
186. Coppock H.A., White A., Aplin J.D., Westwood M. Matrix Metalloprotease-3 and -9 Proteolyze Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-11 // *Biology of Reproduction*. — 2004. — Vol. 71. — No. 2. — P. 438-443.
187. Nakamura M., Miyamoto S., Maeda H., Ishii G., Hasebe T., Chiba T., Asaka M., Ochiai A. Matrix metalloproteinase-7 degrades all insulin-like growth factor binding proteins and facilitates insulin-like growth factor bioavailability // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. — 2005. — Vol. 333. — No. 3. — P. 1011-1016.
188. Hills F.A., Iles R.K., Sullivan M.H. Differential proteolysis of insulin-like growth

factor binding protein-1 (IGFBP-1) in pregnancy // *jpme*. — 2013. — Vol. 41. — No. 3. — P. 241-249.

189. Gibson J.M. Regulation of IGF bioavailability in pregnancy // *Molecular Human Reproduction*. — 2001. — T. 7. — № 1. — C. 79-87.

190. Martino-Echarri E., Fernández-Rodríguez R., Bech-Serra J.J., Plaza-Calonge M.D.C., Vidal N., Casal C., Colomé N., Seoane J., Canals F., Rodríguez-Manzanque J.C. Relevance of IGFBP2 proteolysis in glioma and contribution of the extracellular protease ADAMTS1 // *Oncotarget*. — 2014. — Vol. 5. — No. 12. — P. 4295-4304.

191. Giudice L.C., Farrell E.M., Pham H., Lamson G., Rosenfeld R.G. Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins in Maternal Serum Throughout Gestation and in the Puerperium: Effects of a Pregnancy-Associated Serum Protease Activity* // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. — 1990. — Vol. 71. — Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins in Maternal Serum Throughout Gestation and in the Puerperium. — No. 4. — P. 806-816.

192. Maile L.A., Holly J.M.P. Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) proteolysis: occurrence, identification, role and regulation // *Growth Hormone & IGF Research*. — 1999. — Vol. 9. — Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) proteolysis. — No. 2. — P. 85-95.

193. Cohen P., Graves H.C., Peehl D.M., Kamarei M., Giudice L.C., Rosenfeld R.G. Prostate-specific antigen (PSA) is an insulin-like growth factor binding protein-3 protease found in seminal plasma. // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. — 1992. — Vol. 75. — No. 4. — P. 1046-1053.

194. Marinaro J.A., Hendrich E.C., Leeding K.S., Bach L.A. HaCaT human keratinocytes express IGF-II, IGFBP-6, and an acid-activated protease with activity against IGFBP-6 // *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. — 1999. — Vol. 276. — No. 3. — P. E536-E542.

195. Gibson T.L.B., Cohen P. Inflammation-related neutrophil proteases, cathepsin G and elastase, function as insulin-like growth factor binding protein proteases // *Growth Hormone & IGF Research*. — 1999. — Vol. 9. — No. 4. — P. 241-253.

196. Arai T., Arai A., Busby W.H., Clemmons D.R. Glycosaminoglycans inhibit

degradation of insulin-like growth factor-binding protein-5. // *Endocrinology*. — 1994. — Vol. 135. — No. 6. — P. 2358-2363.

197. Shalamanova L., Kübler B., Scharf J.-G., Braulke T. MDCK cells secrete neutral proteases cleaving insulin-like growth factor-binding protein-2 to -6 // *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. — 2001. — Vol. 281. — No. 6. — P. E1221-E1229.

198. Dean R.A., Butler G.S., Hamma-Kourbali Y., Delbé J., Brigstock D.R., Courty J., Overall C.M. Identification of Candidate Angiogenic Inhibitors Processed by Matrix Metalloproteinase 2 (MMP-2) in Cell-Based Proteomic Screens: Disruption of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)/Heparin Affin Regulatory Peptide (Pleiotrophin) and VEGF/Connective Tissue Growth Factor Angiogenic Inhibitory Complexes by MMP-2 Proteolysis // *Molecular and Cellular Biology*. — 2007. — Vol. 27. — Identification of Candidate Angiogenic Inhibitors Processed by Matrix Metalloproteinase 2 (MMP-2) in Cell-Based Proteomic Screens. — No. 24. — P. 8454-8465.

199. Larsen P.H., DaSilva A.G., Conant K., Yong V.W. Myelin Formation during Development of the CNS Is Delayed in Matrix Metalloproteinase-9 and -12 Null Mice // *The Journal of Neuroscience*. — 2006. — Vol. 26. — No. 8. — P. 2207-2214.

200. Overgaard M.T., Boldt H.B., Laursen L.S., Sottrup-Jensen L., Conover C.A., Oxvig C. Pregnancy-associated Plasma Protein-A2 (PAPP-A2), a Novel Insulin-like Growth Factor-binding Protein-5 Proteinase // *Journal of Biological Chemistry*. — 2001. — Vol. 276. — No. 24. — P. 21849-21853.

201. Monget P. Pregnancy-Associated Plasma Protein-A Is Involved in Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-2 (IGFBP-2) Proteolytic Degradation in Bovine and Porcine Preovulatory Follicles: Identification of Cleavage Site and Characterization of IGFBP-2 Degradation // *Biology of Reproduction*. — 2002. — Vol. 68. — Pregnancy-Associated Plasma Protein-A Is Involved in Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-2 (IGFBP-2) Proteolytic Degradation in Bovine and Porcine Preovulatory Follicles. — No. 1. — P. 77-86.

202. Mazerbourg S., Callebaut I., Zapf J., Mohan S., Overgaard M., Monget P. Up date on IGFBP-4: regulation of IGFBP-4 levels and functions, in vitro and in vivo // *Growth*

Hormone & IGF Research. — 2004. — Vol. 14. — Up date on IGFBP-4. — No. 2. — P. 71-84.

203. Kobberø S.D., Gajhede M., Mirza O.A., Kløverpris S., Kjær T.R., Mikkelsen J.H., Boesen T., Oxvig C. Structure of the proteolytic enzyme PAPP-A with the endogenous inhibitor stanniocalcin-2 reveals its inhibitory mechanism // Nature Communications. — 2022. — T. 13. — № 1. — C. 6084.

204. Judge R.A., Sridar J., Tunyasuvunakool K., Jain R., Wang J.C.K., Ouch C., Xu J., Mafi A., Nile A.H., Remarcik C., Smith C.L., Ghosh C., Xu C., Stoll V., Jumper J., Singh A.H., Eaton D., Hao Q. Structure of the PAPP-ABP5 complex reveals mechanism of substrate recognition // Nature Communications. — 2022. — Vol. 13. — No. 1. — P. 5500.

205. Adasheva D.A., Lebedeva O.S., Goliusova D.V., Postnikov A.B., Teriakova M.V., Kopylova I.V., Lagarkova M.A., Katrukha A.G., Serebryanaya D.V. PAPP-A-Specific IGFBP-4 Proteolysis in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes // International Journal of Molecular Sciences. — 2023. — Vol. 24. — No. 9. — P. 8420.

206. Prudova A., Auf Dem Keller U., Butler G.S., Overall C.M. Multiplex N-terminome Analysis of MMP-2 and MMP-9 Substrate Degradomes by iTRAQ-TAILS Quantitative Proteomics // Molecular & Cellular Proteomics. — 2010. — Vol. 9. — No. 5. — P. 894-911.

207. Díaz Del Moral S., Benaouicha M., Muñoz-Chápuli R., Carmona R. The Insulin-like Growth Factor Signalling Pathway in Cardiac Development and Regeneration // International Journal of Molecular Sciences. — 2021. — Vol. 23. — No. 1. — P. 234.

208. Wang K.C.W., Zhang L., McMillen I.C., Botting K.J., Duffield J.A., Zhang S., Suter C.M., Brooks D.A., Morrison J.L. Fetal growth restriction and the programming of heart growth and cardiac insulin-like growth factor 2 expression in the lamb // The Journal of Physiology. — 2011. — Vol. 589. — No. 19. — P. 4709-4722.

209. Wang K.C.W., Brooks D.A., Thornburg K.L., Morrison J.L. Activation of IGF-2R stimulates cardiomyocyte hypertrophy in the late gestation sheep fetus // The Journal of Physiology. — 2012. — Vol. 590. — No. 21. — P. 5425-5437.

210. Xin Z., Ma Z., Jiang S., Wang D., Fan C., Di S., Hu W., Li T., She J., Yang Y. FOXOs in the impaired heart: New therapeutic targets for cardiac diseases // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. — 2017. — Vol. 1863. — FOXOs in the impaired heart. — No. 2. — P. 486-498.
211. Skurk C., Izumiya Y., Maatz H., Razeghi P., Shiojima I., Sandri M., Sato K., Zeng L., Schiekfer S., Pimentel D., Lecker S., Taegtmeyer H., Goldberg A.L., Walsh K. The FOXO3a Transcription Factor Regulates Cardiac Myocyte Size Downstream of AKT Signaling // *Journal of Biological Chemistry*. — 2005. — Vol. 280. — No. 21. — P. 20814-20823.
212. Jung H.J., Suh Y. Regulation of IGF -1 signaling by microRNAs // *Frontiers in Genetics*. — 2015. — T. 5.
213. Meng X., Cui J., He G. Bcl-2 Is Involved in Cardiac Hypertrophy through PI3K-Akt Pathway // *BioMed Research International*. — 2021. — Vol. 2021. — P. 1-8.
214. Xia P., Liu Y., Cheng Z. Signaling Pathways in Cardiac Myocyte Apoptosis // *BioMed Research International*. — 2016. — Vol. 2016. — P. 1-22.
215. Sugden P.H., Fuller S.J., Weiss S.C., Clerk A. Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) in the heart: a point of integration in hypertrophic signalling and a therapeutic target? A critical analysis // *British Journal of Pharmacology*. — 2008. — Vol. 153. — Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) in the heart. — No. S1.
216. Sciarretta S., Volpe M., Sadoshima J. Mammalian Target of Rapamycin Signaling in Cardiac Physiology and Disease // *Circulation Research*. — 2014. — Vol. 114. — No. 3. — P. 549-564.
217. Xu L., Brink M. mTOR, cardiomyocytes and inflammation in cardiac hypertrophy // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. — 2016. — Vol. 1863. — No. 7. — P. 1894-1903.
218. Kim J., Wende A.R., Sena S., Theobald H.A., Soto J., Sloan C., Wayment B.E., Litwin S.E., Holzenberger M., LeRoith D., Abel E.D. Insulin-Like Growth Factor I Receptor Signaling Is Required for Exercise-Induced Cardiac Hypertrophy // *Molecular Endocrinology*. — 2008. — Vol. 22. — No. 11. — P. 2531-2543.
219. Gallo S., Vitacolonna A., Bonzano A., Comoglio P., Crepaldi T. ERK: A Key Player

- in the Pathophysiology of Cardiac Hypertrophy // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2019. — Vol. 20. — ERK. — No. 9. — P. 2164.
220. Huang C., Lee F., Peng S., Lin K., Chen R., Ho T., Tsai F., Padma V.V., Kuo W., Huang C. HSF1 phosphorylation by ERK/GSK3 suppresses RNF126 to sustain IGF-IIR expression for hypertension-induced cardiomyocyte hypertrophy // *Journal of Cellular Physiology*. — 2018. — Vol. 233. — No. 2. — P. 979-989.
221. Higashi Y., Gautam S., Delafontaine P., Sukhanov S. IGF-1 and cardiovascular disease // *Growth Hormone & IGF Research*. — 2019. — Vol. 45. — P. 6-16.
222. Beaudoux J.-L., Burc L., Imbert-Bismut F., Giral P., Bernard M., Bruckert E., Chapman M.J. Serum Plasma Pregnancy-Associated Protein A: A Potential Marker of Echogenic Carotid Atherosclerotic Plaques in Asymptomatic Hyperlipidemic Subjects at High Cardiovascular Risk // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. — 2003. — Vol. 23. — Serum Plasma Pregnancy-Associated Protein A. — No. 1.
223. Štulc T., Malbohan I., Malík J., Fialová L., Soukupová J., Češka R. Increased levels of pregnancy-associated plasma protein-A in patients with hypercholesterolemia: the effect of atorvastatin treatment // *American Heart Journal*. — 2003. — Vol. 146. — Increased levels of pregnancy-associated plasma protein-A in patients with hypercholesterolemia. — No. 6. — P. 1060-1063.
224. Khan N.U., Khan F.A., Khan D.A., Asim N. Pregnancy-associated plasma protein-A levels in individuals with and without coronary artery disease // *Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan: JCPSP*. — 2011. — T. 21. — № 8. — C. 450-454.
225. Gutiérrez-Leonard H., Martínez-Lara E., Fierro-Macías A.E., Mena-Burciaga V.M., Ronquillo-Sánchez M.D., Floriano-Sánchez E., Cárdenas-Rodríguez N. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) as a possible biomarker in patients with coronary artery disease // *Irish Journal of Medical Science (1971 -)*. — 2017. — Vol. 186. — No. 3. — P. 597-605.
226. Mueller T., Dieplinger B., Forstner T., Poelz W., Haltmayer M. Pregnancy-associated plasma protein-A as a marker for long-term mortality in patients with peripheral atherosclerosis: inconclusive findings from the Linz Peripheral Arterial

- Disease (LIPAD) study // *cclm*. — 2010. — Vol. 48. — Pregnancy-associated plasma protein-A as a marker for long-term mortality in patients with peripheral atherosclerosis. — No. 4. — P. 537-542.
227. Conover C.A., Mason M.A., Bale L.K., Harrington S.C., Nyegaard M., Oxvig C., Overgaard M.T. Transgenic overexpression of pregnancy-associated plasma protein-A in murine arterial smooth muscle accelerates atherosclerotic lesion development // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. — 2010. — Vol. 299. — No. 2. — P. H284-H291.
228. Harrington S.C., Simari R.D., Conover C.A. Genetic Deletion of Pregnancy-Associated Plasma Protein-A Is Associated With Resistance to Atherosclerotic Lesion Development in Apolipoprotein E-Deficient Mice Challenged With a High-Fat Diet // *Circulation Research*. — 2007. — Vol. 100. — No. 12. — P. 1696-1702.
229. Conover C.A., Bale L.K., Oxvig C. Targeted Inhibition of Pregnancy-Associated Plasma Protein-A Activity Reduces Atherosclerotic Plaque Burden in Mice // *Journal of Cardiovascular Translational Research*. — 2016. — Vol. 9. — No. 1. — P. 77-79.
230. Boldt H.B., Bale L.K., Resch Z.T., Oxvig C., Overgaard M.T., Conover C.A. Effects of Mutated Pregnancy-Associated Plasma Protein-A on Atherosclerotic Lesion Development in Mice // *Endocrinology*. — 2013. — Vol. 154. — No. 1. — P. 246-252.
231. Jepsen M.R., Kløverpris S., Mikkelsen J.H., Pedersen J.H., Füchtbauer E.-M., Laursen L.S., Oxvig C. Stanniocalcin-2 Inhibits Mammalian Growth by Proteolytic Inhibition of the Insulin-like Growth Factor Axis // *Journal of Biological Chemistry*. — 2015. — Vol. 290. — No. 6. — P. 3430-3439.
232. Sun Y., Chen D., Cao L., Zhang R., Zhou J., Chen H., Li Y., Li M., Cao J., Wang Z. MiR-490-3p modulates the proliferation of vascular smooth muscle cells induced by ox-LDL through targeting PAPP-A // *Cardiovascular Research*. — 2013. — Vol. 100. — No. 2. — P. 272-279.
233. Yu X.-H., He L.-H., Gao J.-H., Zhang D.-W., Zheng X.-L., Tang C.-K. Pregnancy-associated plasma protein-A in atherosclerosis: Molecular marker, mechanistic insight, and therapeutic target // *Atherosclerosis*. — 2018. — T. 278. — Pregnancy-associated

plasma protein-A in atherosclerosis. — C. 250-258.

234. McGill H.C., McMahan C.A. Determinants of atherosclerosis in the young // *The American Journal of Cardiology*. — 1998. — Vol. 82. — No. 10. — P. 30-36.

235. Wilson P. Diabetes mellitus and coronary heart disease // *American Journal of Kidney Diseases*. — 1998. — Vol. 32. — No. 5. — P. S89-S100.

236. Stone P.H., Muller J.E., Hartwell T., York B.J., Rutherford J.D., Parker C.B., Turi Z.G., Strauss H.W., Willerson J.T., Robertson T., Braunwald E., Jaffe A.S. The effect of diabetes mellitus on prognosis and serial left ventricular function after acute myocardial infarction: Contribution of both coronary disease and diastolic left ventricular dysfunction to the adverse prognosis // *Journal of the American College of Cardiology*. — 1989. — Vol. 14. — The effect of diabetes mellitus on prognosis and serial left ventricular function after acute myocardial infarction. — No. 1. — P. 49-57.

237. Singer D.E., Moulton A.W., Nathan D.M. Diabetic Myocardial Infarction: Interaction of Diabetes With Other Preinfarction Risk Factors // *Diabetes*. — 1989. — Vol. 38. — Diabetic Myocardial Infarction. — No. 3. — P. 350-357.

238. Haffner S.M. Cardiovascular Risk Factors in Confirmed Prediabetic Individuals: Does the Clock for Coronary Heart Disease Start Ticking Before the Onset of Clinical Diabetes? // *JAMA*. — 1990. — Vol. 263. — Cardiovascular Risk Factors in Confirmed Prediabetic Individuals. — No. 21. — P. 2893.

239. Colao A., Spiezia S., Di Somma C., Pivonello R., Marzullo P., Rota F., Musella T., Auriemma R.S., De Martino M.C., Lombardi G. Circulating insulin-like growth factor-I levels are correlated with the atherosclerotic profile in healthy subjects independently of age // *Journal of Endocrinological Investigation*. — 2005. — Vol. 28. — No. 7. — P. 440-448.

240. Conti E., Andreotti F., Sciahbasi A., Riccardi P., Marra G., Menini E., Ghirlanda G., Maseri A. Markedly reduced insulin-like growth factor-1 in the acute phase of myocardial infarction // *Journal of the American College of Cardiology*. — 2001. — Vol. 38. — No. 1. — P. 26-32.

241. Juul A., Scheike T., Davidsen M., Gyllenborg J., Jørgensen T. Low Serum Insulin-Like Growth Factor I Is Associated With Increased Risk of Ischemic Heart Disease: A

Population-Based Case-Control Study // *Circulation*. — 2002. — Vol. 106. — Low Serum Insulin-Like Growth Factor I Is Associated With Increased Risk of Ischemic Heart Disease. — No. 8. — P. 939-944.

242. Reeves I., Abribat T., Laramée P., Jasmin G., Brazeau P. Age-related serum levels of insulin-like growth factor-I, -II and IGF-binding protein-3 following myocardial infarction // *Growth Hormone & IGF Research*. — 2000. — Vol. 10. — No. 2. — P. 78-84.

243. Booth B.A., Boes M., Bar R.S. IGFBP-3 proteolysis by plasmin, thrombin, serum: heparin binding, IGF binding, and structure of fragments // *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. — 1996. — Vol. 271. — IGFBP-3 proteolysis by plasmin, thrombin, serum. — No. 3. — P. E465-E470.

244. Bang P., Brismar K., Rosenfeld R.G. Increased proteolysis of insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) in noninsulin-dependent diabetes mellitus serum, with elevation of a 29-kilodalton (kDa) glycosylated IGFBP-3 fragment contained in the approximately 130- to 150-kDa ternary complex. // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. — 1994. — Vol. 78. — No. 5. — P. 1119-1127.

245. Vaessen N., Heutink P., Janssen J.A., Witteman J.C.M., Testers L., Hofman A., Lamberts S.W.J., Oostra B.A., Pols H.A.P., Van Duijn C.M. A Polymorphism in the Gene for IGF-I // *Diabetes*. — 2001. — Vol. 50. — No. 3. — P. 637-642.

246. Heald A.H., Anderson S.G., Ivison F., Laing I., Gibson J.M., Cruickshank K. C-reactive protein and the insulin-like growth factor (IGF)-system in relation to risk of cardiovascular disease in different ethnic groups // *Atherosclerosis*. — 2003. — Vol. 170. — No. 1. — P. 79-86.

247. Kucukhuseyin O., Toptas B., Timirci-Kahraman O., Isbir S., Karsidag K., Isbir T. The Effect of GHR/exon-3 Polymorphism and Serum GH, IGF-1 and IGFBP-3 Levels in Diabetes and Coronary Heart Disease // *In Vivo (Athens, Greece)*. — 2015. — T. 29. — № 3. — C. 371-378.

248. Marra A.M., Bobbio E., D'Assante R., Salzano A., Arcopinto M., Bossone E., Cittadini A. Growth Hormone as Biomarker in Heart Failure // *Heart Failure Clinics*. — 2018. — Vol. 14. — No. 1. — P. 65-74.

249. Wei-Syun Hu, Jin-Ming Hwang, Ying-Lan Tsai, Chia-Hua Kuo, Gwo-Ping Jong, Wu-Hsien Kuo, Fuu-Jen Tsai, Chang-Hai Tsai, Li-Chin Chung, Chih-Yang Huang Association of Serum Cytokines, Human Growth Hormone, Insulin-Like Growth Factor (IGF)-I, IGF-II and IGF-Binding Protein (IGFBP)-3 with Coronary Artery Disease // The Chinese Journal of Physiology. — 2012. — Vol. 55. — No. 4.
250. Guven A., Demircelik B., Selcoki Y., Gurel O., Er O., Aydin H., Bozkurt A., Eryonucu B. A coronary proatherosclerotic marker: Pregnancy-associated plasma protein A and its association with coronary calcium score and carotid intima-media thickness // Advances in Clinical and Experimental Medicine. — 2017. — T. 26. — A coronary proatherosclerotic marker. — № 3. — C. 467-473.
251. Lund J., Qin Q.-P., Ilva T., Pettersson K., Voipio-Pulkki L.-M., Porela P., Pulkki K. Circulating Pregnancy-Associated Plasma Protein A Predicts Outcome in Patients With Acute Coronary Syndrome but No Troponin I Elevation // Circulation. — 2003. — Vol. 108. — No. 16. — P. 1924-1926.
252. Heeschen C., Dimmeler S., Hamm C.W., Fichtlscherer S., Simoons M.L., Zeiher A.M. Pregnancy-associated plasma protein-A levels in patients with acute coronary syndromes // Journal of the American College of Cardiology. — 2005. — Vol. 45. — No. 2. — P. 229-237.
253. Yeves A.M., Burgos J.I., Medina A.J., Villa-Abrille M.C., Ennis I.L. Cardioprotective role of IGF-1 in the hypertrophied myocardium of the spontaneously hypertensive rats: A key effect on NHE-1 activity // Acta Physiologica. — 2018. — Vol. 224. — Cardioprotective role of IGF-1 in the hypertrophied myocardium of the spontaneously hypertensive rats. — No. 2. — P. e13092.
254. Sui Y., Zhang W., Tang T., Gao L., Cao T., Zhu H., You Q., Yu B., Yang T. Insulin-like growth factor-II overexpression accelerates parthenogenetic stem cell differentiation into cardiomyocytes and improves cardiac function after acute myocardial infarction in mice // Stem Cell Research & Therapy. — 2020. — Vol. 11. — No. 1. — P. 86.
255. Lin M., Liu X., Zheng H., Huang X., Wu Y., Huang A., Zhu H., Hu Y., Mai W., Huang Y. IGF-1 enhances BMSC viability, migration, and anti-apoptosis in myocardial infarction via secreted frizzled-related protein 2 pathway // Stem Cell Research &

Therapy. — 2020. — Vol. 11. — No. 1. — P. 22.

256. Vinciguerra M., Santini M.P., Claycomb W.C., Ladurner A.G., Rosenthal N. Local IGF-1 isoform protects cardiomyocytes from hypertrophic and oxidative stresses via SirT1 activity // *Aging*. — 2009. — Vol. 2. — No. 1. — P. 43-62.

257. McMullen J.R., Shioi T., Huang W.-Y., Zhang L., Tarnavski O., Bisping E., Schinke M., Kong S., Sherwood M.C., Brown J., Riggi L., Kang P.M., Izumo S. The Insulin-like Growth Factor 1 Receptor Induces Physiological Heart Growth via the Phosphoinositide 3-Kinase(p110 α) Pathway // *Journal of Biological Chemistry*. — 2004. — Vol. 279. — No. 6. — P. 4782-4793.

258. Shioi T. The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice // *The EMBO Journal*. — 2000. — T. 19. — № 11. — C. 2537-2548.

259. Huynh K., McMullen J.R., Julius T.L., Tan J.W., Love J.E., Cemerlang N., Kiriazis H., Du X.-J., Ritchie R.H. Cardiac-Specific IGF-1 Receptor Transgenic Expression Protects Against Cardiac Fibrosis and Diastolic Dysfunction in a Mouse Model of Diabetic Cardiomyopathy // *Diabetes*. — 2010. — Vol. 59. — No. 6. — P. 1512-1520.

260. Friehs I., Stamm C., Cao-Danh H., McGowan F.X., Del Nido P.J. Insulin-like growth factor-1 improves postischemic recovery in hypertrophied hearts // *The Annals of Thoracic Surgery*. — 2001. — Vol. 72. — No. 5. — P. 1650-1656.

261. Otani H., Yamamura T., Nakao Y., Hattori R., Kawaguchi H., Osako M., Imamura H. Insulin-Like Growth Factor-I Improves Recovery of Cardiac Performance During Reperfusion in Isolated Rat Heart by a Wortmannin-Sensitive Mechanism: // *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. — 2000. — Vol. 35. — Insulin-Like Growth Factor-I Improves Recovery of Cardiac Performance During Reperfusion in Isolated Rat Heart by a Wortmannin-Sensitive Mechanism. — No. 2. — P. 275-281.

262. Donath M.Y., Sötsch G., Yan X.-W., Piva B., Brunner H.-P., Glatz Y., Zapf J., Follath F., Froesch E.R., Kiowski W. Acute Cardiovascular Effects of Insulin-Like Growth Factor I in Patients with Chronic Heart Failure ¹ // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. — 1998. — Vol. 83. — No. 9. — P. 3177-3183.

263. Mitcheson J. Cultured adult cardiac myocytes Future applications, culture methods,

morphological and electrophysiological properties // Cardiovascular Research. — 1998. — T. 39. — № 2. — C. 280-300.

264. Miki K., Deguchi K., Nakanishi-Koakutsu M., Lucena-Cacace A., Kondo S., Fujiwara Y., Hatani T., Sasaki M., Naka Y., Okubo C., Narita M., Takei I., Napier S.C., Sugo T., Imaichi S., Monjo T., Ando T., Tamura N., Imahashi K., Nishimoto T., Yoshida Y. ERR γ enhances cardiac maturation with T-tubule formation in human iPSC-derived cardiomyocytes // Nature Communications. — 2021. — T. 12. — № 1. — C. 3596.

265. Saggin L., Gorza L., Ausoni S., Schiaffino S. Troponin I switching in the developing heart // The Journal of Biological Chemistry. — 1989. — T. 264. — № 27. — C. 16299-16302.

266. Hunkeler N.M., Kullman J., Murphy A.M. Troponin I isoform expression in human heart. // Circulation Research. — 1991. — Vol. 69. — No. 5. — P. 1409-1414.

267. D'Elia P., Ionta V., Chimenti I., Angelini F., Miraldi F., Pala A., Messina E., Giacomello A. Analysis of Pregnancy-Associated Plasma Protein A Production in Human Adult Cardiac Progenitor Cells // BioMed Research International. — 2013. — Vol. 2013. — P. 1-8.

268. Resch Z.T., Oxvig C., Bale L.K., Conover C.A. Stress-activated signaling pathways mediate the stimulation of pregnancy-associated plasma protein-A expression in cultured human fibroblasts // Endocrinology. — 2006. — T. 147. — № 2. — C. 885-890.

269. Conover C.A., Faessen G.F., Ilg K.E., Chandrasekhar Y.A., Christiansen M., Overgaard M.T., Oxvig C., Giudice L.C. Pregnancy-Associated Plasma Protein-A Is the Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-4 Protease Secreted by Human Ovarian Granulosa Cells and Is a Marker of Dominant Follicle Selection and the Corpus Luteum // Endocrinology. — 2001. — Vol. 142. — No. 5. — P. 2155-2155.

270. Conover C.A., Bale L.K., Harrington S.C., Resch Z.T., Overgaard M.T., Oxvig C. Cytokine stimulation of pregnancy-associated plasma protein A expression in human coronary artery smooth muscle cells: inhibition by resveratrol // American Journal of Physiology-Cell Physiology. — 2006. — Vol. 290. — Cytokine stimulation of pregnancy-associated plasma protein A expression in human coronary artery smooth muscle cells. — No. 1. — P. C183-C188.

271. Conover C.A., Harrington S.C., Bale L.K. Differential regulation of pregnancy associated plasma protein-A in human coronary artery endothelial cells and smooth muscle cells // *Growth Hormone & IGF Research*. — 2008. — Vol. 18. — No. 3. — P. 213-220.
272. Giudice L.C., Conover C.A., Bale L., Faessen G.H., Ilg K., Sun I., Imani B., Suen L.-F., Irwin J.C., Christiansen M., Overgaard M.T., Oxvig C. Identification and Regulation of the IGFBP-4 Protease and Its Physiological Inhibitor in Human Trophoblasts and Endometrial Stroma: Evidence for Paracrine Regulation of IGF-II Bioavailability in the Placental Bed during Human Implantation // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. — 2002. — Vol. 87. — Identification and Regulation of the IGFBP-4 Protease and Its Physiological Inhibitor in Human Trophoblasts and Endometrial Stroma. — No. 5. — P. 2359-2366.
273. Laursen L.S., Kjaer-Sorensen K., Andersen M.H., Oxvig C. Regulation of Insulin-Like Growth Factor (IGF) Bioactivity by Sequential Proteolytic Cleavage of IGF Binding Protein-4 and -5 // *Molecular Endocrinology*. — 2007. — Vol. 21. — No. 5. — P. 1246-1257.
274. Laursen L.S., Overgaard M.T., S   R., Boldt H.B., Sottrup-Jensen L., Giudice L.C., Conover C.A., Oxvig C. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) cleaves insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-5 independent of IGF: implications for the mechanism of IGFBP-4 proteolysis by PAPP-A // *FEBS Letters*. — 2001. — Vol. 504. — Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) cleaves insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-5 independent of IGF. — No. 1-2. — P. 36-40.
275. Lin T.-M., Halbert S.P., Spellacy W.N. Measurement of Pregnancy-Associated Plasma Proteins during Human Gestation // *Journal of Clinical Investigation*. — 1974. — Vol. 54. — No. 3. — P. 576-582.
276. Boldt H.B., Overgaard M.T., Laursen L.S., Weyer K., Sottrup-Jensen L., Oxvig C. Mutational analysis of the proteolytic domain of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A): classification as a metzincin // *Biochemical Journal*. — 2001. — Vol. 358. — Mutational analysis of the proteolytic domain of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A). — No. 2. — P. 359-367.

277. Boldt H.B., Kjaer-Sorensen K., Overgaard M.T., Weyer K., Poulsen C.B., Sottrup-Jensen L., Conover C.A., Giudice L.C., Oxvig C. The Lin12-Notch Repeats of Pregnancy-associated Plasma Protein-A Bind Calcium and Determine Its Proteolytic Specificity // *Journal of Biological Chemistry*. — 2004. — Vol. 279. — No. 37. — P. 38525-38531.
278. Vallee B.L., Coombs T.L. Complex formation of 1,10-phenanthroline with zinc ions and the zinc of alcohol dehydrogenase of horse liver // *The Journal of Biological Chemistry*. — 1959. — T. 234. — C. 2615-2620.
279. Conover C.A., Oxvig C. PAPP-A: a promising therapeutic target for healthy longevity // *Aging Cell*. — 2017. — Vol. 16. — PAPP-A. — No. 2. — P. 205-209.
280. Liao Y., Li H., Pi Y., Li Z., Jin S. Cardioprotective effect of IGF-1 against myocardial ischemia/reperfusion injury through activation of PI3K/Akt pathway in rats *in vivo* // *Journal of International Medical Research*. — 2019. — Vol. 47. — No. 8. — P. 3886-3897.
281. Heinen A., Nederlof R., Panjwani P., Spsychala A., Tschaidse T., Reffelt H., Boy J., Raupach A., Gödecke S., Petzsch P., Köhrer K., Grandoch M., Petz A., Fischer J.W., Alter C., Vasilevska J., Lang P., Gödecke A. IGF1 Treatment Improves Cardiac Remodeling after Infarction by Targeting Myeloid Cells // *Molecular Therapy*. — 2019. — Vol. 27. — No. 1. — P. 46-58.
282. Yue T.-L., Gu J.-L., Wang C., Reith A.D., Lee J.C., Mirabile R.C., Kreutz R., Wang Y., Maleeff B., Parsons A.A., Ohlstein E.H. Extracellular Signal-regulated Kinase Plays an Essential Role in Hypertrophic Agonists, Endothelin-1 and Phenylephrine-induced Cardiomyocyte Hypertrophy // *Journal of Biological Chemistry*. — 2000. — Vol. 275. — No. 48. — P. 37895-37901.
283. Yamazaki T., Komuro I., Kudoh S., Zou Y., Shiojima I., Hiroi Y., Mizuno T., Maemura K., Kurihara H., Aikawa R., Takano H., Yazaki Y. Endothelin-1 Is Involved in Mechanical Stress-induced Cardiomyocyte Hypertrophy // *Journal of Biological Chemistry*. — 1996. — Vol. 271. — No. 6. — P. 3221-3228.
284. Nakahashi T., Fukuo K., Inoue T., Morimoto S., Hata S., Yano M., Ogihara T. Endothelin-1 Enhances Nitric Oxide-Induced Cytotoxicity in Vascular Smooth Muscle

// Hypertension. — 1995. — Vol. 25. — No. 4. — P. 744-747.

285. Jen H.-L., Yin W.-H., Chen J.-W., Lin S.-J. Endothelin-1-Induced Cell Hypertrophy in Cardiomyocytes is Improved by Fenofibrate: Possible Roles of Adiponectin // Journal of Atherosclerosis and Thrombosis. — 2017. — Vol. 24. — Endothelin-1-Induced Cell Hypertrophy in Cardiomyocytes is Improved by Fenofibrate. — No. 5. — P. 508-517.

286. Shubeita H.E., McDonough P.M., Harris A.N., Knowlton K.U., Glembotski C.C., Brown J.H., Chien K.R. Endothelin induction of inositol phospholipid hydrolysis, sarcomere assembly, and cardiac gene expression in ventricular myocytes. A paracrine mechanism for myocardial cell hypertrophy // The Journal of Biological Chemistry. — 1990. — T. 265. — № 33. — C. 20555-20562.

287. Hu H.-J., Jiang Z.-S., Zhou S.-H., Liu Q.-M. Hydrogen sulfide suppresses angiotensin II-stimulated endothelin-1 generation and subsequent cytotoxicity-induced endoplasmic reticulum stress in endothelial cells via NF- κ B // Molecular Medicine Reports. — 2016. — Vol. 14. — No. 5. — P. 4729-4740.

288. Bonnefont-Rousselot D., Mahmoudi A., Mougenot N., Varoquaux O., Le Nahour G., Fouret P., Lechat P. Catecholamine effects on cardiac remodelling, oxidative stress and fibrosis in experimental heart failure // Redox Report. — 2002. — Vol. 7. — No. 3. — P. 145-151.

289. Rump A.F.E., Klaus W. Evidence for norepinephrine cardiotoxicity mediated by superoxide anion radicals in isolated rabbit hearts // Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. — 1994. — Vol. 349. — No. 3.

290. Maisel A. B-type natriuretic peptide measurements in diagnosing congestive heart failure in the dyspneic emergency department patient // Reviews in Cardiovascular Medicine. — 2002. — T. 3 Suppl 4. — C. S10-17.

291. McCullough P.A., Nowak R.M., McCord J., Hollander J.E., Herrmann H.C., Steg P.G., Duc P., Westheim A., Omland T., Knudsen C.W., Storror A.B., Abraham W.T., Lamba S., Wu A.H.B., Perez A., Clopton P., Krishnaswamy P., Kazanegra R., Maisel A.S. B-Type Natriuretic Peptide and Clinical Judgment in Emergency Diagnosis of Heart Failure: Analysis From Breathing Not Properly (BNP) Multinational Study // Circulation. — 2002. — Vol. 106. — B-Type Natriuretic Peptide and Clinical Judgment in Emergency Diagnosis of Heart Failure. — No. 4. — P. 416-422.

292. Daniels L.B., Clopton P., Jiang K., Greenberg B., Maisel A.S. Prognosis of Stage A or B Heart Failure Patients With Elevated B-type Natriuretic Peptide Levels // *Journal of Cardiac Failure*. — 2010. — Vol. 16. — No. 2. — P. 93-98.
293. Holmes S.J., Espiner E.A., Richards A.M., Yandle T.G., Frampton C. Renal, endocrine, and hemodynamic effects of human brain natriuretic peptide in normal man. // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. — 1993. — Vol. 76. — No. 1. — P. 91-96.
294. Holtwick R., Van Eickels M., Skryabin B.V., Baba H.A., Bubikat A., Begrow F., Schneider M.D., Garbers D.L., Kuhn M. Pressure-independent cardiac hypertrophy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of the atrial natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A // *Journal of Clinical Investigation*. — 2003. — Vol. 111. — No. 9. — P. 1399-1407.
295. Semenov A.G., Feygina E.E. Standardization of BNP and NT-proBNP Immunoassays in Light of the Diverse and Complex Nature of Circulating BNP-Related Peptides // *Advances in Clinical Chemistry*. — Elsevier, 2018. — Vol. 85. — P. 1-30.
296. Clemmons D.R. 40 YEARS OF IGF1: Role of IGF-binding proteins in regulating IGF responses to changes in metabolism // *Journal of Molecular Endocrinology*. — 2018. — T. 61. — 40 YEARS OF IGF1. — № 1. — C. T139-T169.
297. Qin Q.-P., Kokkala S., Lund J., Tamm N., Voipio-Pulkki L.-M., Pettersson K. Molecular Distinction of Circulating Pregnancy-Associated Plasma Protein A in Myocardial Infarction and Pregnancy // *Clinical Chemistry*. — 2005. — Vol. 51. — No. 1. — P. 75-83.
298. Besnard N., Pisselet C., Monniaux D., Monget P. Proteolytic Activity Degrading Insulin-like Growth Factor-Binding Protein-2, -3, -4, and -5 in Healthy Growing and Atretic Follicles in the Pig Ovary1 // *Biology of Reproduction*. — 1997. — Vol. 56. — No. 4. — P. 1050-1058.
299. Adachi S., Ito H., Akimoto H., Tanaka M., Fujisaki H., Marumo F., Hiroe M. Insulin-like Growth Factor-II Induces Hypertrophy with Increased Expression of Muscle Specific Genes in Cultured Rat Cardiomyocytes // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. — 1994. — Vol. 26. — No. 7. — P. 789-795.
300. Carrasco L., Cea P., Rocco P., Peña-Oyarzún D., Rivera-Mejias P., Sotomayor-Flores C., Quiroga C., Criollo A., Ibarra C., Chiong M., Lavandero S. Role of Heterotrimeric G

Protein and Calcium in Cardiomyocyte Hypertrophy Induced by IGF-1: IGF-1 Signaling and Cardiac Hypertrophy // *Journal of Cellular Biochemistry*. — 2014. — Vol. 115. — Role of Heterotrimeric G Protein and Calcium in Cardiomyocyte Hypertrophy Induced by IGF-1. — No. 4. — P. 712-720.

301. Kashyap S., Hein K.Z., Chini C.C.S., Lika J., Warner G.M., Bale L.K., Torres V.E., Harris P.C., Oxvig C., Conover C.A., Chini E.N. Metalloproteinase PAPP-A regulation of IGF-1 contributes to polycystic kidney disease pathogenesis // *JCI Insight*. — 2020. — Vol. 5. — No. 4. — P. e135700.

302. Grosman-Rimon L., Billia F., Wright E., Carasso S., Elbaz-Greener G., Kachel E., Rao V., Cherney D. Neurohormones, inflammatory mediators, and cardiovascular injury in the setting of heart failure // *Heart Failure Reviews*. — 2020. — Vol. 25. — No. 5. — P. 685-701.

303. Ge Z., Li A., McNamara J., Dos Remedios C., Lal S. Pathogenesis and pathophysiology of heart failure with reduced ejection fraction: translation to human studies // *Heart Failure Reviews*. — 2019. — Vol. 24. — Pathogenesis and pathophysiology of heart failure with reduced ejection fraction. — No. 5. — P. 743-758.

304. Nägele M.P., Barthelmes J., Kreysing L., Haider T., Nebunu D., Ruschitzka F., Sudano I., Flammer A.J. Endocrine hormone imbalance in heart failure with reduced ejection fraction: A cross-sectional study // *Health Science Reports*. — 2022. — Vol. 5. — Endocrine hormone imbalance in heart failure with reduced ejection fraction. — No. 6. — P. e880.

305. Lip G.Y.H., Heinzl F.R., Gaita F., Juanatey J.R.G., Le Heuzey J.Y., Potpara T., Svendsen J.H., Vos M.A., Anker S.D., Coats A.J., Haverkamp W., Manolis A.S., Chung M.K., Sanders P., Pieske B., Document Reviewers:, Gorenk B., Lane D., Boriani G., Linde C., Hindricks G., Tsutsui H., Homma S., Brownstein S., Nielsen J.C., Lainscak M., Crespo-Leiro M., Piepoli M., Seferovic P., Savelieva I. European Heart Rhythm Association/Heart Failure Association joint consensus document on arrhythmias in heart failure, endorsed by the Heart Rhythm Society and the Asia Pacific Heart Rhythm Society // *Europace*. — 2016. — Vol. 18. — No. 1. — P. 12-36.