

РОЛЬ МУЛЬТИДОМЕННОЙ СТРУКТУРЫ УРОКИНАЗЫ В РЕГУЛЯЦИИ РОСТА И РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ СОСУДОВ

В. А. ТКАЧУК^{1,2}, О. С. ПЛЕХАНОВА¹, И. Б. БЕЛОГЛАЗОВА¹, Е. В. ПАРФЕНОВА¹

¹ФГБУ Российский кардиологический научно-производственный комплекс
Минздрава РФ, Москва, Россия;

²Факультет фундаментальной медицины Московского государственного
университета им. М. В. Ломоносова, Россия;
e-mail: plekhanova@mail.ru

Активатор плазминогена урокиназного типа, или урокиназа (иРА), представляет собой многофункциональный протеин, играющий особую регуляторную роль в сосудистой стенке и обладающий способностью запускать протеолитические и сигнальные каскады. В статье суммированы полученные авторами результаты и данные литературы, касающиеся роли урокиназы в ремоделировании кровеносных сосудов и ангиогенезе. В настоящее время урокиназу можно рассматривать как перспективную мишень для воздействий, направленных на профилактику рестенозов, предотвращение негативного ремоделирования артерий, стимуляцию роста сосудов при ишемических заболеваниях и подавление ангиогенеза при онкологических заболеваниях.

Ключевые слова: урокиназа, миграция, пролиферация, ремоделирование артерий, ангиогенез.

В 60-е годы прошлого столетия в связи с прогрессом в медицине особое внимание исследователей привлекли процессы фибринолиза. В 1952 году в моче были обнаружены «киназы», способные превращать плазминоген в плазмин [1]. В 1954 году удалось выделить и очистить энзим, непрерывно выделяемый с мочой, названный в связи с этим урокиназой, или урофиринолизокиназой [2,3]. Этот энзим способен вызывать фибринолиз аналогично известной к тому времени стрептокиназе, действуя не прямо как фибринолитический энзим, а через активацию плазминогена [4]. С тех пор урокиназа непрерывно привлекала к себе внимание исследователей, и к настоящему времени опубликовано более 16 000 статей, посвященных этому энзиму. Установлено, что урокиназа представляет собой мультидоменный многофункциональный протеин, превращающий плазминоген в плазмин, который помимо регуляции фибринолиза осуществляет активацию факторов роста, модуляцию цитокинов, шеддинг-рецепторов, фенотипическую трансформацию клеток, экспрессию протеинов и активацию протеолитических каскадов. Эти механизмы обеспечивают стимуляцию миграции и пролиферации клеток под действием урокиназы, ключевых процессов ремоделирования артерий, прогрессирования атеросклероза, рестеноза после процедур реваскуляризации и ангиогенеза при ишемии тканей. Более 20 лет назад нами были начаты

исследования по выяснению механизмов участия урокиназы в процессах ремоделирования сосудов и ангиогенеза. Мы надеялись, что изучение роли отдельных доменов урокиназы в различных функциях этого протеина позволит нам разработать на основе модифицированных форм урокиназы лекарственные препараты, влияющие на эти процессы. Для этого были созданы рекомбинантные конструкции, позволяющие синтезировать разные формы урокиназы и ее отдельные домены (рис. 1), эффекты которых исследовались на моделях миграции и пролиферации сосудистых клеток *in vitro* и моделях ремоделирования сосудов и ангиогенеза у животных *in vivo*.

Структура урокиназы

Урокиназа синтезируется эндотелиальными и гладкомышечными клетками сосудов, эпителиальными клетками, фибробластами, моноцитами/макрофагами, а также клетками злокачественных опухолей различного происхождения [5–7]. В структуре урокиназы выделяют три домена — N-концевой домен, подобный эпидермальному фактору роста, крингл-домен и C-концевой каталитический домен (рис. 2). Урокиназа секретируется клетками в виде одноцепочечного полипептида с молекулярной массой 54 кДа и состоящего из 411 аминокислотных остатков [7]. Одноцепочечная урокиназа не способна проявлять пептидазную активность в отношении синтетических субстратов, но при взаимодействии с плазминогеном способна превращать его в

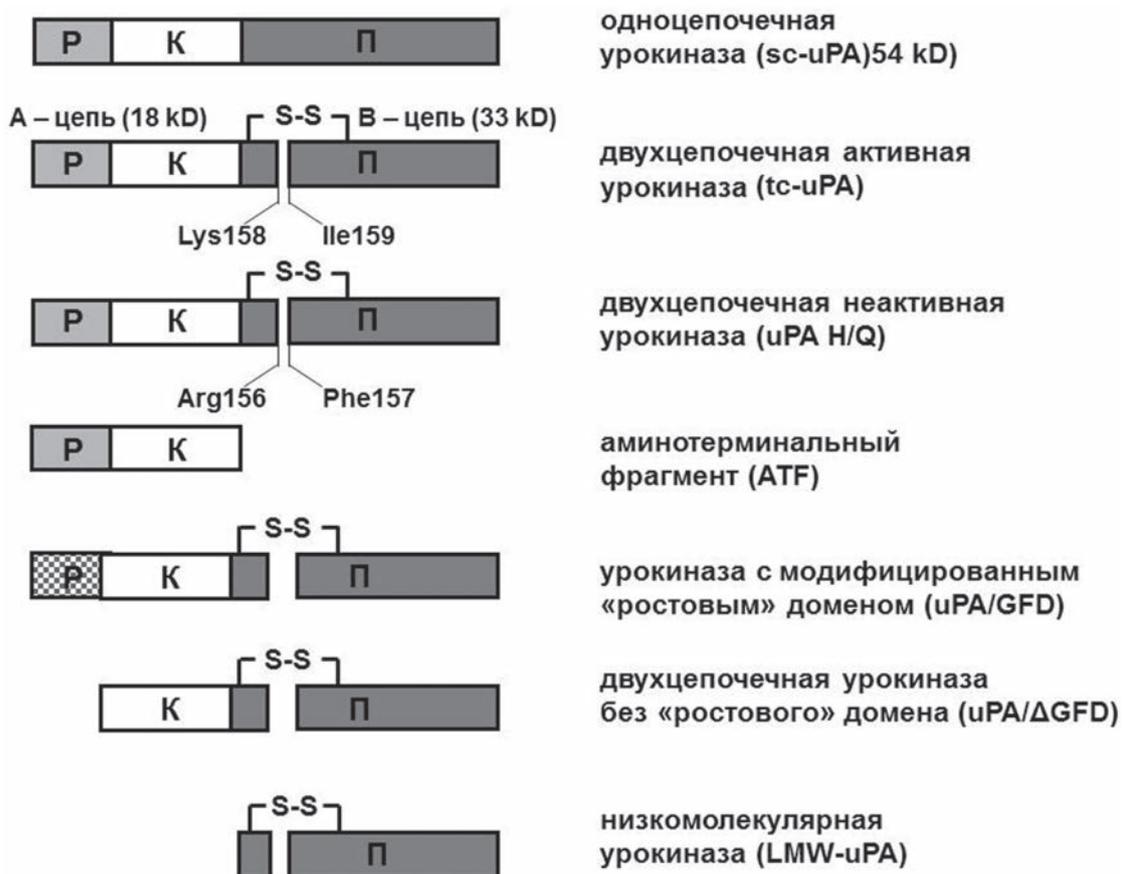


Рис. 1. Формы рекомбинантной урокиназы, полученные в ФГБУ РКНПК. Здесь и на рис. 2: P – домен, подобный фактору роста («ростовой» домен), K – крингл-домен, П – протеолитический домен

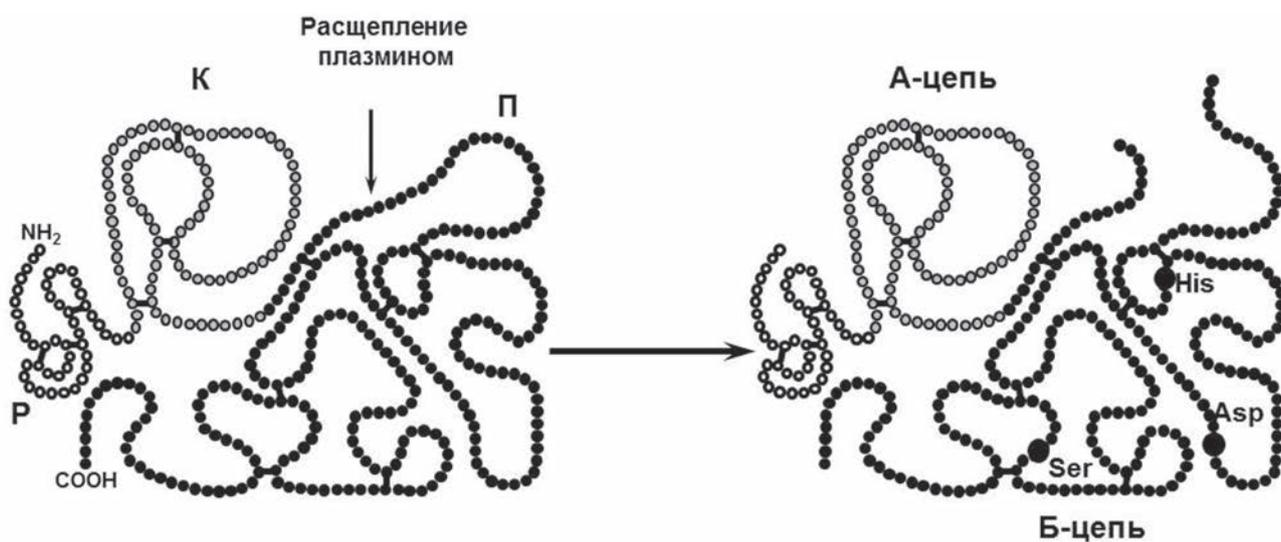


Рис. 2. Структура одноцепочечной и двухцепочечной урокиназы

плазмин. Плазмин, в свою очередь, является активатором урокиназы и переводит одноцепочечную урокиназу в двухцепочечную форму. Двухцепочечная урокиназа обладает протеазной активностью как по отношению к синтетическим субстратам, так и в отношении плазминогена, причем скорость расщепления плазминогена двухцепочечной урокиназой более чем в 200 раз выше, чем одноцепочечной формой [8]. В сосудистой стенке плазмин расщепляет фибрин, что способствует растворению тромба, и наряду с урокиназой активирует матриксные металлопротеиназы (ММП). ММП в свою очередь расщепляют протеины внеклеточного матрикса (ВКМ) и компоненты базальной мембраны, такие как коллаген, фибронектин и ламинин [9]. Протеолитический каскад на мембране ведет к направленному движению клеток благодаря разрушению межклеточных контактов и локальному расщеплению ВКМ. Кроме того, активация и/или высвобождение латентных и связанных с матриксом факторов роста способствует также усилению хемотактического, миграционного и пролиферативного ответов сосудистых клеток.

В двухцепочечной урокиназе полипептидные цепи: А (легкая) и Б (тяжелая) – соединены между собой дисульфидной связью Cys148-Cys279. А-цепь включает в себя «ростовой» домен, подобный фактору роста (growth factor like domain; GFD) и крингл-домен, а протеолитический домен входит в состав Б-цепи. По своей структуре «ростовой» домен гомологичен эпидермальному фактору роста. Похожей структурой обладают мышинный эпидермальный фактор роста mEGF и трансформирующий фактор роста α TGF- α [10]. Крингл-домен вовлечен в регуляцию миграции клеток под действием урокиназы [11], а также обеспечивает взаимодействие с гепарином через три последовательно расположенных аминокислотных остатка Arg108-Arg109-Arg110 [12]. Крингл-домен содержит участки связывания с ингибитором активаторов плазминогена PAI-1 [13] и интегринами [14, 15]. Также показано, что крингл-домен принимает участие в стабилизации комплекса урокиназы с урокиназным рецептором [16]. По своей структуре он гомологичен крингл-доменам таких протеинов, как активатор плазминогена тканевого типа (tPA), плазминоген, протромбин, фактор XII и аполипопротеин [17]. Наибольшая гомология наблюдается со вторым крингл-доменом тканевого активатора плазминогена. Но, несмотря на это, эти домены обладают различными свойствами связывания, крингл-домен tPA

взаимодействует с положительно заряженным остатком лизина у фибрина, а крингл-домен урокиназы связывается с полианионными молекулами, такими как гепарин. И это свойство выделяет крингл-домен урокиназы из всех остальных кринглов. Протеолитический домен содержит активный центр урокиназы His204/Asp255/Ser356 и осуществляет активацию плазминогена, конвертируя его в плазмин, протеазу с широкой субстратной специфичностью, а также ряда факторов роста и матриксных металлопротеиназ.

Сигнализация урокиназы

Домен, подобный фактору роста, обеспечивает высокоаффинное связывание урокиназы с ее рецептором uPAR/CD87 (Kd ~ 10⁻¹⁰–10⁻⁹ M) [18,19]. Рецептор урокиназы локализуется в особых впячиваниях плазматической мембраны – кавеолах, которые содержат большое количество гликофинголипидов, сфингомиелин, полифосфоинозитиды и холестерол. Рецептор урокиназы закорен на мембране через гликозилфосфатидилинозитол (ГФИ) и не имеет трансмембранных участков, что обеспечивает его высокой степенью подвижности в плазматической мембране [18]. Он состоит из трех доменов, гомологичных по структуре (рис. 3).

Домены рецептора формируют практически непрерывный β -слой. Все три домена собраны в правозакрученной ориентации, формируя фактически глобулярный рецептор. В центре глобулы находится центральная конусообразная полость глубиной 19 Å, которая сформирована β -складчатыми слоями трех доменов. Причем при взаимодействии с урокиназой происходит смещение третьего домена более чем на 12 Å и сближение первого и второго доменов, и взаимодействие между этими доменами осуществляется за счет контакта между His47-Asn259 и Arg53-Asp254 [20]. Ранее было показано, что в «ростовом» домене урокиназы за взаимодействие с uPAR отвечают аминокислотные остатки, расположенные с одной стороны плоскости Ω -петли Asn22, Tyr2425, Ile28, и Trp30 [21]. Недавно полученные нами результаты предполагают новый механизм связывания ростового домена урокиназы с рецептором, при котором отсутствие четкой вторичной структуры урокиназы не влияло на взаимодействие с рецептором [22]. При этом все три домена участвуют в формировании высокоаффинного участка связывания с урокиназой. Имеющиеся данные позволяют предположить, что при связывании урокиназы с высокоаффинным

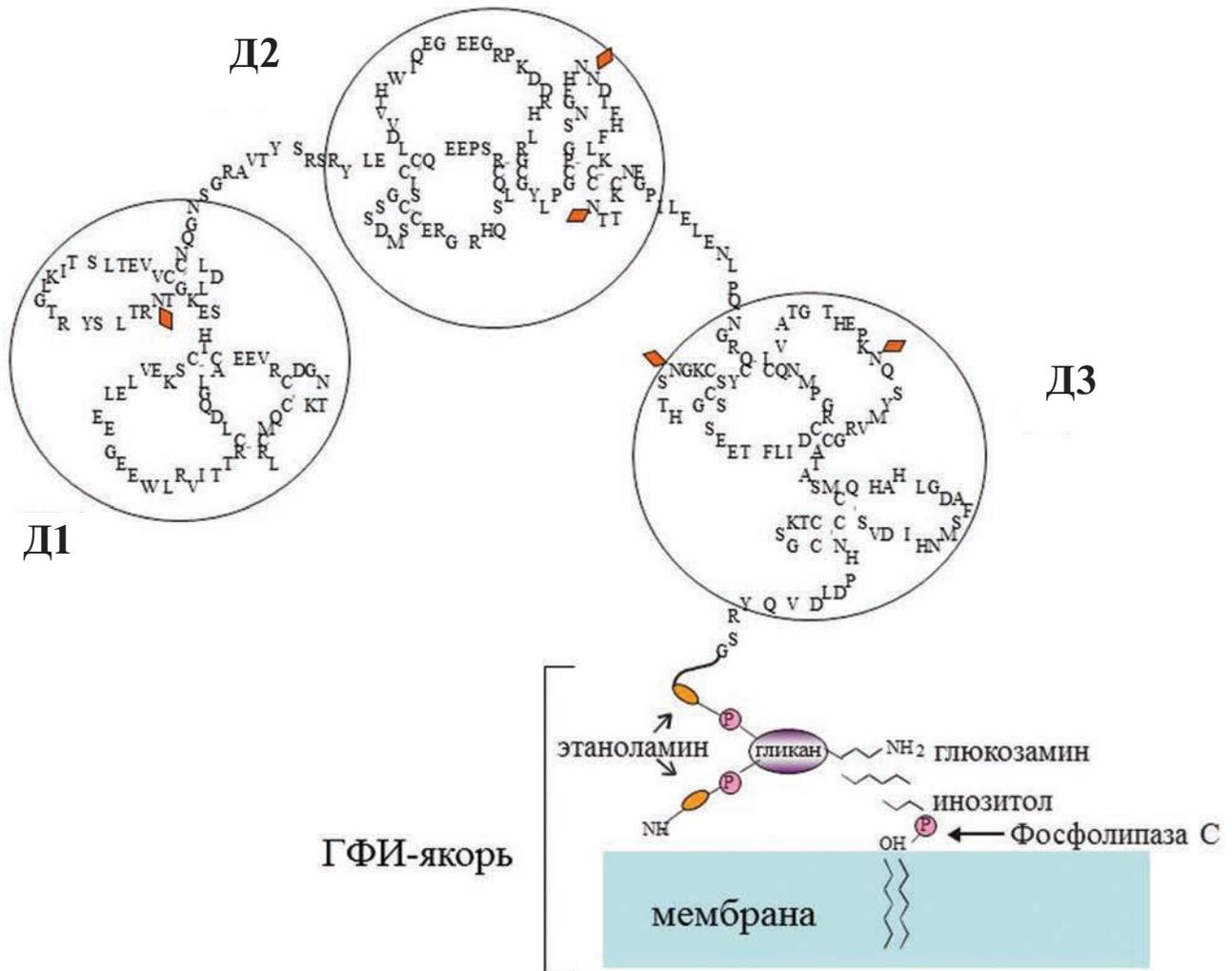


Рис. 3. Структура урокиназного рецептора. Рецептор представлен в виде последовательности аминокислотных остатков (а.о.), состоящей из трех доменов: Д1 (1–77 а.о.), Д2 (93–177 а.о.) и Д3 (193–272 а.о.). Схематично указан состав гликозилфосфатидинозитольного якоря, связывающего рецептор с плазматической мембраной

рецептором экспонируются участки в крингл-домене для взаимодействия с другими мишенями на поверхности клетки и запуска миграции [23]. При взаимодействии урокиназы с урокинасным рецептором происходит сближение первого и третьего домена, таким образом, происходит замыкание рецептора в кольцо и экспонирование активного участка –SRSRY– между первым и вторым доменами [24]. При этом экспонируются участки, отвечающие за сигнальные функции рецептора, а также образуются общие места связывания с протеинами внеклеточного матрикса и интегринными, образованными и урокиназой, и рецептором. Кроме того было показано, что рекомбинантный uPAR со сшивкой между первым и вторым доменами обладал идентичной константой свя-

зывания, что и нативный рецептор [25]. Таким образом, связывание урокиназы с рецептором индуцирует изменения рецепторного протеина важные для реализации ряда физиологических процессов, а рецептор, связываясь с урокиназой, изменяет ее свойства.

Связанная с рецептором одноцепочечная урокиназа активируется плазмином более эффективно, чем свободная [26]. Кроме того, в комплексе с uPAR/CD87 урокиназа медленнее подвергается отщеплению домена GFD под действием плазмина. В отличие от полноразмерного протеина форма урокиназы, лишенная «ростового» домена, не только не способна взаимодействовать с uPAR/CD87, но и подвергается быстрому эндоцитозу и внутриклеточной деградации. Таким образом, uPAR спо-

способствует увеличению времени «полужизни» функционально активной урокиназы на поверхности клетки [27].

Для осуществления внутриклеточной сигнализации uPAR/CD87 необходимо образование комплекса рецептора с трансмембранными протеинами. uPAR/CD87 также может взаимодействовать с интегринами, такими как лейкоцитарный $\beta 2$ -интегрин Mac-1 (CD11b/CD18), а также $\beta 1$ -, $\beta 3$ -интегрины и с рецептором витронектина $\alpha(v)\beta 5$ [28,29]. Урокиназа модифицирует взаимодействие рецептора с интегринами [30]. Взаимодействие урокиназы с uPAR/CD87 вызывает внутриклеточную сигнализацию, которая опосредует миграцию гладкомышечных клеток (ГМК), фибробластов и других клеток, а также клеточную адгезию, пролиферацию и дифференцировку [31]. Урокиназа может одновременно связываться с двумя рецепторами на поверхности клетки: с uPAR/CD87 через GFD и с интегрином Mac-1 через крингл- и протеолитический домены [15]. Кроме того, крингл-домен урокиназы может связываться с другим, пока недостаточно изученным, специфическим рецептором урокиназы [11]. Крингл-домен также вовлечен в индукцию внутриклеточной сигнализации, миграции и адгезии клеток [23, 32].

A-цепь урокиназы способна взаимодействовать с рецепторами семейства липопротеинов низкой плотности (LDLR): протеином, родственном рецептору липопротеинов низкой плотности/рецептор $\alpha 2$ -макроглобулина (LRP/ $\alpha 2$ -MR) и рецептором липопротеинов очень низкой плотности (VLDLR) [31]. Эти рецепторы обеспечивают интернализацию с поверхности клетки комплекса урокиназы с ингибитором через ямки, окаймленные кластрином. Сродство урокиназы к этим рецепторам ($K_d \sim (1-2) \cdot 10^{-8}$ М) хуже, чем сродство к рецептору uPAR/CD87 ($10^{-10}-10^{-9}$ М), в связи с этим высокоаффинное взаимодействие урокиназы с uPAR/CD87 может предотвращать связывание урокиназы с LRP/ $\alpha 2$ -MR и последующую ее деградацию [34]. Эндоцитоз урокиназы через LRP/ $\alpha 2$ -MR или VLDLR индуцирует также внутриклеточную сигнализацию и адгезию клеток [35].

Сигнальные эффекты урокиназы могут быть опосредованы как через uPAR/CD87, LRP/ $\alpha 2$ -MR, так и через другие, связывающие урокиназу, протеины [36] (рис. 4). Показано, что миграция, индуцированная урокиназой, ассоциирована с активацией Src- и Janus-киназ [31]. uPAR/CD87 копреципитируется с тирозинными протеинкиназами Hsk, Fyn, Lyn, Frg,

Jak1, and Tyk2 [31, 37]. Хемотаксис, индуцируемый урокиназой, опосредован G-протеинами (ГТФ-связывающими протеинами) [37]. Связывание урокиназы с uPAR/CD87 приводит к активации киназ Hsk-, FAK-, MAP-киназ (p38, ERK1,2 (p42/44)), паксиллина, протеинкиназы C ϵ (PKC ϵ), фосфорилированию цитокератинов 8 и 18, протеина p130CAS и ДНК-связывающих активаторов транскрипции STAT-1 и STAT-2 [31]. Связывание урокиназы с LRP/ $\alpha 2$ -MR ведет к активации протеинкиназы A с вовлечением Gs-протеинов [38]. Для индукции кринглзависимой миграции под действием урокиназы необходима специфическая активация p38 MAP-киназного каскада с активацией малого ГТФ-связывающего протеина Rho [39]. В клетках эндотелия урокиназа активирует MAP-киназную сигнализацию посредством связывания с uPAR/CD87 и активации протеинкиназы C [40].

uPAR/CD87 был идентифицирован в комплексе с некоторыми семействами – интегринов, такими как $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ и $\beta 5$ [41–45]. Компоненты матрикса способствуют выборочной ассоциации uPAR/CD87 и интегринов. Так, uPAR- и $\beta 3$ -интегрины способны образовывать комплексы только на витронектине, но не на таких субстратах, как фибронектин, ламинин или полилизин. Интегрин $\alpha 5$ локализовался с uPAR на фибронектине, $\alpha 5$ и αv – на витронектине, $\alpha 3$ и $\beta 6$ – на ламинине [44]. uPAR/CD87, связываясь с $\beta 1$ -интегринными, блокирует их адгезивные функции, но, в то же время, через собственные участки связывания с витронектином стимулирует клеточную адгезию на витронектине. uPAR-зависимая адгезия на витронектине коррелирует с формированием мембранного комплекса, включающего интегрин $\beta 1$, кавеолин и uPAR [43]. Также $\beta 1$ - и витронектинзависимым образом, урокиназа стимулирует миграцию клеток рака груди MCF-7 [46]. Одним из основных партнеров комплекса uPA-uPAR является $\alpha 3\beta 1$ -интегрин. Показано, что урокиназа стимулирует формирование комплекса uPAR- $\alpha 3\beta 1$ на клетках MDA-MB-231, что сопровождается расплыванием клеток и фосфорилированием FAK (протеин фокальной адгезии) на таких субстратах, как фибронектин и коллаген 1-го типа [47]. Образование комплекса между $\alpha 3\beta 1$ и uPAR в эпителиальных клетках приводит к активации Src-киназы и значительному снижению экспрессии E-кадгерина с последующим разрушением межклеточных контактов [48]. Также было показано, что рецептор урокиназы может связываться с рядом интегринов на соседней клет-

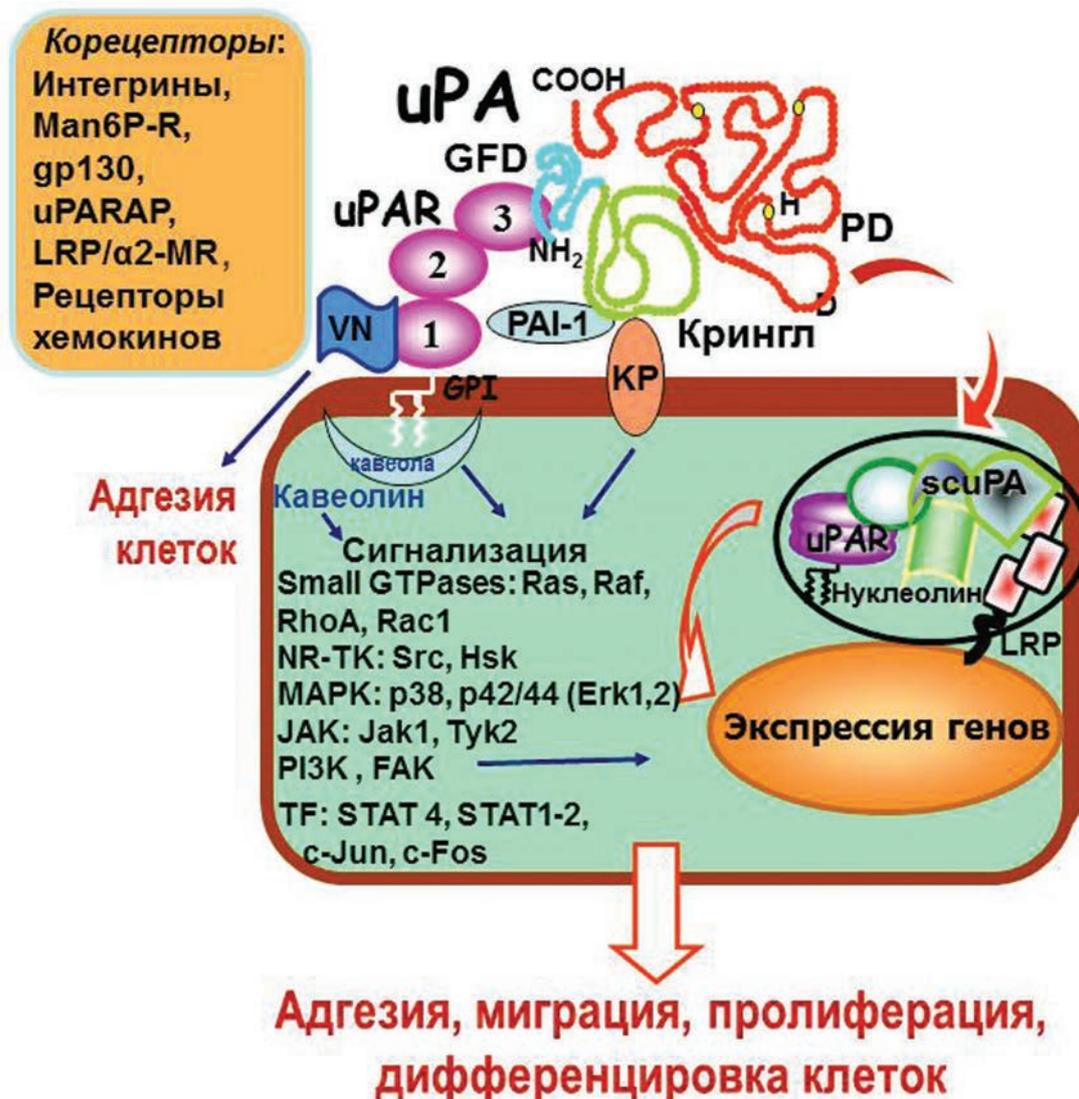


Рис. 4. Взаимодействие урокиназы с рецептором (uPAR/CD87) и крингелсвязывающим протеином (KP) индуцирует внутриклеточные сигнальные каскады, ведущие к адгезии, миграции, пролиферации и дифференцировке клеток. GFD – домен, подобный фактору роста; PD – протеолитический домен; GPI – гликозилфосфатидилинозитольный якорь; VN – витронектин; PAI-1 – ингибитор активаторов плазминогена; scuPA – одноцепочечная урокиназа; LRP – рецептор липопротеинов низкой плотности; LRP/ α ₂-MR – протеин, родственник рецептору липопротеинов низкой плотности/рецептор α 2-макроглобулина; MAPK – mitogen-activated protein kinases; JAK – tyrosine protein kinases; STAT – ДНК-связывающие активаторы транскрипции; TF – факторы транскрипции; PI3K – фосфоинозитид-3-киназа; FAK – киназа фокальных контактов; NR-TK – нерепеторная тирозинкиназа; Man6P-R – манноза-6-фосфат/рецептор инсулиноподобного фактора роста II; gp130 – сигнальный посредник интерлейкина 6; uPARAP – протеин, ассоциированный с урокиназным рецептором

ке – α 4 β 1, α 6 β 1 и α 9 β 1, способствуя тем самым межклеточному взаимодействию и адгезии. Ассоциация uPAR с α 5 β 1-интегрином в клетках карциномы HEP-3, экспрессирующих высокий уровень uPAR, обеспечивает клеточную адгезию на фибронектин, сопровождаемую

активацией ERK1/2. Ассоциация uPAR с α 5 β 1 индуцирует в интегрене появление дополнительного сайта для фибронектина в дополнение к связывающему RGD-сайту. Недавно на uPAR был идентифицирован сайт связывания с α 5 β 1 во втором домене (130–142 а.о.) Тем не

менее для связывания с интегрином необходимы все три домена рецептора как в случае витронектина и урокиназы [49].

Показано функциональное взаимодействие uPAR с β 2-интегринами, например, рецептор комплемента 34-го типа (CR3, CD11 β /CD18, Mac-1) [44]. uPAR/CD87, Mac-1 и Src-киназы (p60^{fyn}, p53/56^{lyn}, p58/64^{hck}, p59^{fgf}) образуют единый рецепторный комплекс на поверхности моноцитов [50]. Взаимодействие uPAR с Mac-1 ингибирует способность интегрин связываться со своим лигандом, фибриногеном из-за близкого расположения участков связывания фибриногена (I домен) и uPAR [51]. Трехмолекулярный комплекс uPA – uPAR – Mac-1 регулирует клеточную адгезию, миграцию и фибринолиз и усиливает опосредованную урокиназой активацию плазминогена. Протеиновый ингибитор урокиназы PAI-1 связывается и инактивирует uPA–uPAR комплексы. Это не только ограничивает протеолиз, но и освобождает Mac-1 от ингибирования, опосредованного uPA–uPAR. PAI-1 может также полностью блокировать как uPAR-, так и α v-интегринопосредованное связывание витронектина, указывая тем самым, что все три рецептора могут связывать витронектин сходным образом. В сосудистых ГМК происходит зависимое от урокиназы и ее рецептора фосфорилирование витронектина казеинкиназой-2, ведущее к улучшению его связывания с интегринами и uPAR/CD87 [52]. Недавно был обнаружен мембранный протеин, ассоциированный с uPAR (uPARAP или Endo180), который принимает участие в интернализации коллагена для его внутриклеточной деградации. Комплекс uPAR с uPARAP играет ключевую роль в деградации матрикса [53].

Недавно мы выявили новый сигнальный путь урокиназы, зависимый от ее крингл-домена и ассоциированный с ее быстрой транслокацией в ядро с помощью нуклеолина, что позволяет урокиназе участвовать в регуляции транскрипции генов [32]. С помощью клеточной визуализации урокиназы методом флуоресцентной микроскопии в клетках HeLa мы показали существование ядерной транслокации урокиназы (рис. 5). Как видно на рис. 5, транслокация урокиназы в ядро не зависит от присутствия ростового домена урокиназы. В то же время наличие в молекуле урокиназы крингл-домена оказалось обязательным для ее ядерной транслокации. Урокиназа, проникнув в ядро, вызывает экспрессию гладкомышечного α -актина. При повреждении зависимое от урокиназы превращение фибробластоподоб-

ных клеток в миобласты, клетки мигрируют, пролиферируют, что важно при развитии констриктивного ремоделирования сосудов.

Роль междоменных взаимодействий в молекуле урокиназы в стимуляции миграции клеток

Крингл-домен вовлечен в регуляцию миграции клеток под действием урокиназы [11] и принимает участие в стабилизации комплекса урокиназы с урокиназным рецептором [16, 54]. Данные, полученные в нашей лаборатории, свидетельствуют о том, что крингл-домен урокиназы, а также форма, лишенная ростового домена, которая не связывается с «классическим» урокиназным рецептором, способны вызывать активацию p38- и p42/44-МАР-киназ и миграцию клеток. Показано, что на поверхности ГМК крингл-домен связывается с протеином, который отличается от урокиназного рецептора и интегринов [11]. В этом случае активация миграции под действием крингл-домена может происходить и без участия урокиназного рецептора. Нами было показано [11], что форма урокиназы, лишенная крингл-домена, не обладает хемотаксическими свойствами, несмотря на способность связываться с урокиназным рецептором. При сравнении хемотаксических свойств различных форм урокиназы мы выяснили, что нативная урокиназа и урокиназа без ростового домена проявляют хемотаксическую активность, взаимодействуя или только с кринглсвязывающим протеином, или с урокиназным рецептором и кринглсвязывающим протеином.

Проведенные нами структурные исследования указали на потенциальную возможность существования внутримолекулярных взаимодействий между крингл-доменом и ростовым доменом урокиназы, которые влияют на ее хемотаксические свойства. Мы обнаружили, что крингл-домен способен конкурировать с рецептором за связывание с иммобилизованной нативной урокиназой, а именно с ее ростовым доменом. Урокиназа с модифицированным ростовым доменом не только не связывалась с клетками, но и не активировала миграцию [55, 56]. С использованием этой формы мы показали, что крингл-домен в составе модифицированной урокиназы взаимодействует с модифицированным ростовым доменом внутри одной и той же молекулы, что не позволяет кринглу связываться с ростовым доменом иммобилизованной нативной урокиназы. Наши данные позволили предположить, что ростовой и крингл-домены могут взаимодействовать

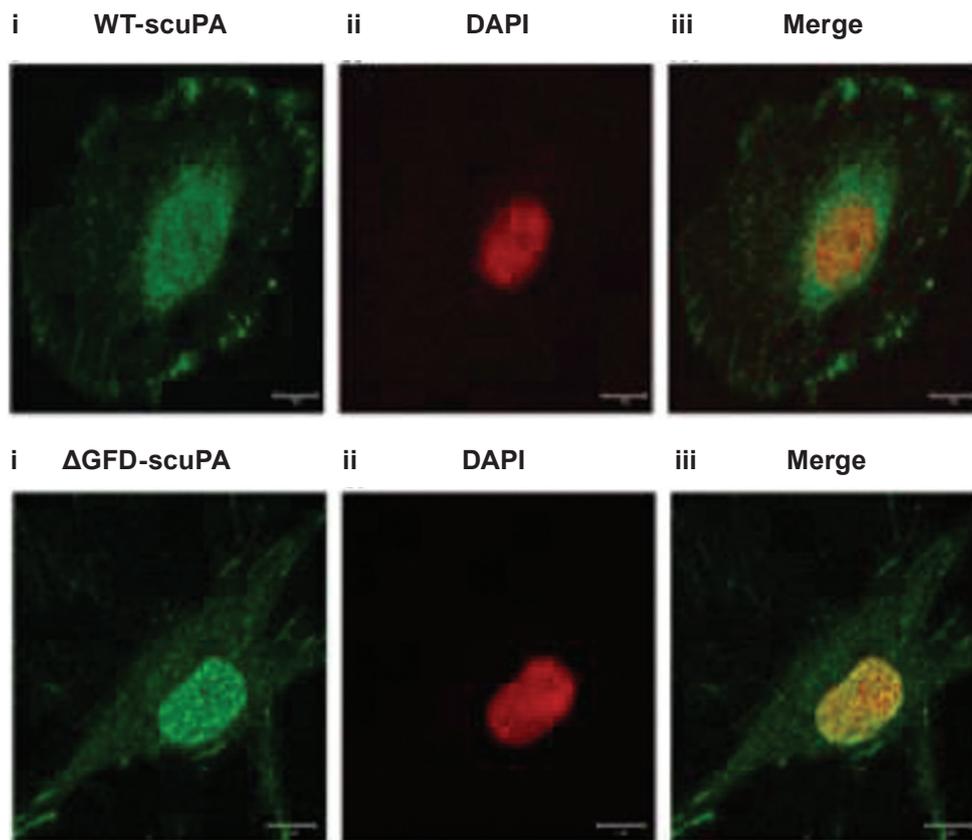


Рис. 5. Транслокация урокиназы в клеточное ядро. Клетки HeLa инкубировали 30 мин в присутствии 10 нМ нативной урокиназы (WT-scuPA, верхний ряд) или урокиназы без ростового домена (Δ GFD-scuPA, нижний ряд), затем визуализировали с помощью антител к урокиназе или ядерного красителя DAPI. Merge — наложение изображений, полученных при визуализации с помощью антител к урокиназе или DAPI

между собой как в составе одной молекулы, так и в составе разных молекул, если внутри-молекулярные взаимодействия разобщены под влиянием связывания с другими протеинами. Также можно предположить, что ростовой домен экранирует крингл в молекуле урокиназы и «не позволяет» последнему связаться со своим рецептором до тех пор, пока ростовой домен не свяжется с рецептором урокиназы. Взаимодействие урокиназного рецептора с ростовым доменом урокиназы вызывает экспонирование крингл-домена и позволяет ему взаимодействовать с дополнительными мишенями клеточной мембраны («кринглсвязывающим протеином» и интегринами) [23]. Показано также, что взаимодействие урокиназы с ее «классическим» рецептором (uPAR) вызывает «пермиссивный» эффект для взаимодействия крингл-домена с другими мишенями на поверхности клетки. На основе наших данных можно предположить, что «классический»

рецептор урокиназы служит «адаптором» для урокиназы, а при связывании крингл-домена урокиназы со своим рецептором происходит непосредственная активация внутриклеточной сигнализации и стимуляция миграции клеток.

Недавно мы показали существование на клетках *дополнительных участков связывания для урокиназы*, один из которых взаимодействует с урокиназой через ее протеолитический домен [27], тогда как другой проявлял способность связывать крингл-домен. Взаимодействие со вторым участком не зависело от присутствия в структуре урокиназы «ростового» домена и приводило к стимуляции урокиназой миграции клеток [11]. Также было установлено, что на поверхности клеток может происходить образование формы урокиназы, лишенной ростового домена, которая не способна связываться с uPAR. Урокиназа без ростового домена подвергалась при этом быстрому LRP-зависимому эндоцитозу и внутриклеточной деградации

[27]. Поскольку было показано, что LRP опосредует активацию миграции и пролиферации клеток, а также вовлечен в регуляцию проницаемости сосудистой стенки [57], мы предположили, что новая мишень, совместно с LRP, может обеспечивать связывание урокиназы без «ростового» домена с поверхностью клеток, а также принимать участие в регуляции ее энзиматической и хемотактической активности. Нами была обнаружена новая мишень связывания урокиназы на поверхности клеток, отличная от uPAR/CD87, — фибулин-5 [58]. Удалось установить, что урокиназа способна непосредственно взаимодействовать с фибулином-5 через протеолитический домен.

Анализ связывания мутантных форм фибулина-5 с иммобилизованной формой урокиназы показал, что урокиназа связывается с формами фибулина-5, содержащими С-глобулярный домен, и не связывается с фибулином-5, лишенным С-глобулярного домена. Таким образом, участок связывания с урокиназой находится в С-глобулярном домене фибулина-5 (аминокислотные остатки 320–448). Фибулин-5 содержит в своей структуре 5 кальцийсвязывающих повторов, гомологичных эпидермальному фактору роста. Мы выяснили, что нативная структура кальцийсвязывающих доменов необходима для связывания фибулина-5 и урокиназы. Хотя урокиназа связывает фибулин-5 через протеолитический домен, фибулин-5 не является ее субстратом и не оказывает влияния на амидолитическую активность урокиназы. При этом фибулин-5 ингибирует реакцию активации плазминогена одноцепочечной урокиназой. Мы показали, что в клетках линии MEF, а также лизатах тканей легкого мышей, лишенных гена фибулина-5, удаление гена фибулина-5 приводит к снижению активности урокиназы как в лизатах клеток линии MEF, так и лизатах легкого мыши. Однако фибулин-5 увеличивает активность урокиназы *in vivo*, не влияя на уровень ее экспрессии. Оказалось, что фибулин-5, связываясь с протеолитическим доменом, защищает uPA от подавления ее активности под действием физиологического ингибитора PAI-1. PAI-1 образует эквимольный ковалентный комплекс с активным центром uPA, полностью ингибируя ее активность. Формирование данного комплекса приводит к быстрому эндцитозу комплекса uPA–uPAR с клеточной поверхности и деградации uPA. В отсутствие фибулина-5 происходит перераспределение содержания урокиназы в ее комплексе с ингибитором PAI-1. Таким образом, высокоаффинное

связывание одноцепочечной урокиназы с интегринсвязывающим протеином внеклеточного матрикса фибулином-5 концентрирует ее в связанном с матриксом виде, препятствуя ее активации плазмином. Полученные данные позволяют предположить, что на лидирующем крае мигрирующей клетки формируется комплекс, включающий урокиназу и фибулин-5, а также uPAR, латерально ассоциированный с интегринами. При увеличении экспрессии фибулина-5 подвижность клеток существенно снижается и наблюдается ингибирование хемотактических свойств урокиназы. Ранее было показано, что в стромальных клетках мышцы фибулин-5 ингибировал зависимую от $\beta 1$ -интегрина и фибронектина гиперэкспрессию ММП-9 [59]. Кроме того, известно, что фибулин-5 в сосудистой стенке связан с тропоэластином, который взаимодействует с интегринами и локализуется на эластических волокнах [60]. Отсутствие фибулина-5 у трансгенных мышей приводило к нарушению эластичности сосудистой стенки, что может иметь значение при remodelировании сосудов, однако эти аспекты требуют дальнейшего изучения. Получены противоречивые данные, касающиеся влияния фибулина на ангиогенез. Так, у животных, лишенных гена фибулина, отмечались подавление опухолевого ангиогенеза и повышенное образование активных форм кислорода [61], в то же время было показано *in vitro* и *in vivo*; что фибулин-5 может блокировать ангиогенез, индуцируя антиангиогенный тромбоспондин-1 и препятствуя сигнализации VEGF(165), и $\alpha 5\beta 1$ -интегриновый рецептор фибронектина [62]. В то же время известно, что при связывании урокиназы с ее рецептором происходит взаимодействие uPAR с $\alpha 5\beta 1$ -интегрином, ведущее к сигнализации и стимуляции адгезии и миграции клеток [63]. В связи с вышеизложенным обнаруженный нами механизм может иметь значение для регуляции процессов ангиогенеза и remodelирования сосудов.

Важными представляются полученные недавно данные о том, что крингл-домен урокиназы может напрямую связываться с $\alpha 5\beta 3$ -интегринами и вызывать внутриклеточную сигнализацию, активацию и адгезию нейтрофилов [14, 64]. Эти данные говорят о том, что крингл-домен урокиназы вовлечен в реализацию ее провоспалительных эффектов, что необходимо учитывать при создании препаратов, ингибирующих эффекты урокиназы. Кроме того, тот факт, что крингл-домен урокиназы способен связываться с интегринами, привел

некоторых исследователей к заключению, что, вероятно, на поверхности клетки при взаимодействии урокиназы с ее классическим рецептором uPAR интегрин взаимодействуют одновременно с крингл-доменом урокиназы и с ее рецептором uPAR, вместе этот комплекс и вызывает внутриклеточную сигнализацию [65].

Протеолитический каскад, индуцируемый урокиназой

Одной из основных функций урокиназы является протеолитическая активация плазминогена в плазмин при расщеплении одиночной пептидной связи в плазминогене (Arg⁵⁶¹–Val⁵⁶²). Плазмин является внеклеточной протеазой с широкой субстратной специфичностью и обладает фибринолитическими свойствами. Тканевой активатор плазминогена является основным для осуществления фибринолитической функции и регуляции гемостаза, тогда как урокиназа играет роль в активации плазминогена на поверхности клеток. Эффективность активации плазминогена урокиназой, главным образом, зависит от ее связывания с uPAR на поверхности клеток [66]. Проурокиназа, связанная с поверхностью клеток, встречается с плазмином, локализованным на клеточной поверхности [67], после чего проурокиназа активируется плазмином [26], и положительная обратная связь замыкается, так как и плазмин, и двухцепочечная урокиназа могут взаимно активировать неактивные формы друг друга. Связывание урокиназы с рецептором сопровождается снижением его латеральной подвижности и локализацией рецептора преимущественно на участках межклеточных контактов, тем самым локализуя протеолитическую активность, опосредованную урокиназой, на лидирующем крае мигрирующей клетки [68].

Помимо фибринолиза плазмин также участвует в расщеплении протеинов внеклеточного матрикса и базальной мембраны, таких как фибриноген, ламинин, коллаген. Кроме того, плазмин опосредует активацию матриксных металлопротеиназ, в том числе коллагеназы (ММП-1), стромелизина (ММП-3) и желатиназы В (ММП-9) [69]. Путем образования плазмина урокиназа обеспечивает расщепление основных компонентов внеклеточного матрикса, ослабление межклеточных контактов и повышение внутритканевой подвижности клеток, принимая участие в регуляции ангиогенеза, ремоделирования сосудов, роста и метастазирования раковых опухолей.

Мы обнаружили, что урокиназа стимулирует образование и высвобождение 92 kDa матриксной металлопротеиназы ММП-9/желатиназы В в моноцитах линий ТНР-1 и U937 [70, 71]. Экспрессия ММП-9 в клетках ТНР-1 под действием урокиназы не зависит от образования плазмина, и не воспроизводится при действии на клетки тканевого активатора плазминогена. Каталитическая активность урокиназы не является обязательным условием для экспрессии ММП-9 клетками ТНР-1, обработанных урокиназой, и, по-видимому, другие домены урокиназы также вовлечены в этот процесс.

Для оценки роли структурных доменов uPA в экспрессии ММП-9 в моноцитах, мы измеряли высвобождение ММП-9 ТНР-1 клетками, которые были стимулированы рекомбинантными формами урокиназы: «дикий тип» uPA (r-uPAwt) с неизменной первичной структурой; r-uPAH/Q без каталитической активности в результате замены His204 на Gln204 в активном центре; r-uPA-GFD без ростового домена; r-uPAH/Q-GFD без ростового домена с заменой в активном центре; r-uPA-KD без крингл-домена; LMW-uPA, низкомолекулярная форма uPA, каталитически активная, но без ростового и крингл-доменов; и r-KD, содержащий только крингл-домен.

По сравнению с остальными формами, «дикий тип» uPA обладает наибольшей способностью индуцировать высвобождение ММП-9 клетками ТНР-1. r-uPAH/Q, r-uPA-GFD, r-uPAH/Q-GFD и r-uPA-KD также способны вызывать экспрессию ММП-9, но степень эффекта в этом случае ниже, чем в присутствии r-uPA (на 40–80% когда 20 нМ протеинов было добавлено к ТНР-1 клеткам). LMW-uPA и r-KD не обладают способностью вызывать высвобождение ММП-9 клетками ТНР-1.

Наши данные свидетельствуют о том, что урокиназа способна индуцировать образование матриксной металлопротеиназы-9 в моноцитах, и этот эффект опосредуется активацией MAP-киназного сигнального пути MEK1/ERK1,2, а также происходит при участии арахидоновой кислоты, образующейся в результате реакции, катализируемой цитозольной формой фосфолипазы A2 [72]. Конечной точкой приложения этого пути может являться активация транскрипционного фактора NFκB, активирующего работу гена *ММП-9*, а также, возможно, ряда других провоспалительных генов. На основании этих данных, можно полагать, что фактор некроза опухолей также является промежу-

точным звеном процесса передачи внутриклеточного сигнала, вызывающего образование ММП-9. Об этом свидетельствуют полученные нами данные, указывающие на возможность подавления способности урокиназы к образованию матриксной металлопротеиназы-9 в присутствии препарата etanercept, блокирующего взаимодействие фактора некроза опухолей с его клеточными рецепторами. В целом процесс образования ММП-9 под действием урокиназы достаточно сложен и включает в себя как стимуляцию компонентов клеточного сигналинга, так и образование промежуточных факторов, в частности фактора некроза опухолей, являющегося мощным провоспалительным агентом.

В нашем недавнем исследовании было обнаружено, что урокиназа стимулирует экспрессию ММП-9 и образование АФК в культивируемых фибробластах (статья направлена в печать). Антиоксидант эбселен нивелирует стимулирующее влияние урокиназы на экспрессию ММП-9 в фибробластах. Сходным, но более выраженным действием обладал фактор некроза опухолей альфа. Полученные данные свидетельствуют о том, что урокиназа может регулировать экспрессию ММП-9 за счет образования АФК в фибробластах, что может играть важную роль в стимуляции миграции фибробластов и развитии констриктивного (негативного) ремоделирования сосудов за счет утолщения адвентиции.

Урокиназа также принимает участие в активации и высвобождении ряда факторов роста, связанных с межклеточным матриксом. Так, было показано участие урокиназы в активации фактора роста гепатоцитов (HGF), который секретируется стромальными фибробластами в виде одноцепочечного биологически неактивного предшественника [73]. Кроме того, урокиназа принимает участие в активации VEGF-189 [74] и плазминзависимым образом в активации TGF- β [75] и Cugb1 [76].

Адгезия и миграция

Было показано, что урокиназа способна стимулировать миграцию эндотелиальных [77], гладкомышечных [78], эпителиальных клеток [79] и моноцитов [80] независимо от ее протеолитической активности. Существует несколько моделей участия урокиназы в запуске клеточной миграции. uPAR играет важную роль в образовании кластеров интегринов и сигнальных молекул, что необходимо для эффективной передачи сигнала от интегриновых рецепторов [51].

Нами было установлено, что крингл-домен урокиназы опосредует ее хемотаксические эффекты на гладкомышечных клетках [11]. Так, крингл-домен урокиназы, а также форма, лишенная ростового домена, которая не связывается с «классическим» рецептором uPAR/CD87, способны вызывать активацию p38 и p42/44 MAP-киназ и миграцию клеток. В серии работ показана активация серин-треониновых киназ, таких как киназы ERK/MAPK под действием урокиназы [37, 50, 80]. При ингибировании данного пути, урокиназа, или ее крингл-домен, не способны активировать миграцию [39]. Показано, что на поверхности ГМК крингл-домен связывается с протеином, который отличается от uPAR и интегринов и активация миграции под действием крингл-домена может происходить и без участия uPAR [11]. Более того, форма урокиназы, лишенная крингл-домена, не обладает хемотаксическими свойствами, несмотря на способность связываться с uPAR [11]. Тем не менее, в случае активации миграции под действием полноразмерной урокиназы, в структуре которой присутствуют как ростовой, так и крингл-домены, оказалось необходимым связывание обоих доменов со своими рецепторами – uPAR и «кринглсвязывающим протеином» (КСП).

Процесс клеточной миграции можно разбить на несколько этапов:

1) Связывание урокиназы с uPAR на гладкомышечных и эндотелиальных клетках приводит к активации Jak/Stat-сигнального пути. Janus киназы, Jak1 и Tyk2, образуют комплекс с uPA-uPAR на лидирующем крае клетки, что, в свою очередь, приводит к транслокации факторов Stat1, Stat2 и Stat4 в ядро клетки [52]. Миграционный ответ опосредуется Tyk2/PI3-K/RhoA/Rho киназным путем.

2) Последующие сигнальные пути требуют ассоциации uPAR с PDGFR-b и зависят от его киназной активности и взаимодействия с PI3-K через Tyr740/Tyr751.

3) Далее, активация STAT1 урокиназой также требует ассоциации рецепторов и PDGFR-киназной активности, однако не зависит от PI3-K.

Методом соиммунопреципитации было показано, что при взаимодействии урокиназы с uPAR в ГМК происходит их ассоциация с PDGFR-b, после чего происходит его активация и димеризация. Причем для этого процесса не требовался протеолитический домен урокиназы [81]. PDGFR-b способен взаимодействовать с STAT1 и непосредственно его фосфорилирует. Авторы предполагают главную

роль STAT1 в регуляции клеточной пролиферации и в повышении времени миграции ГМК на урокиназу путем замедления клеточного цикла (рис. 6).

Также было показано, что активация ERK может быть опосредована образованием комплекса uPAR с EGFR [82]. Roztocil и соавторы показали, что крингл-домен урокиназы запускает клеточную миграцию через Gai, сопряженный с G-протеином PI3-K зависимый процесс, в котором участвует EGFR и включает в себя ERK1/2 и p38MAPK [83]. Причем миграция, вызванная крингл-доменом, оказалась плазминзависимой и MMP-зависимой. То есть при связывании урокиназы с uPAR клетка с помощью направленного протеолиза расчищает себе путь, а крингл-домен урокиназы запускает внутриклеточный сигналинг, который способствует непосредственно движению клетки.

На линии опухолевых клеток MCF-7 было показано, что uPAR и β 1-интегрины участвуют в миграции, стимулированной урокиназой, посредством активации сигнального каскада с участием Ras, MEK, ERK и MLCK [46]. Также было показано, что образование комплекса uPAR – фибронектин-интегриновый рецептор фибронектина α v β 1 приводит к повышению уровня активации ERK [84].

Методом соиммунопреципитации было показано связывание uPAR с нерецепторными Src тирозиновыми киназами: p59^{fyn}, p53/56^{lyn}, p53/59^{hsk}, p55^{fer} [85], p60^{fyn}, p53/p56^{lyn}, p56&p59^{hsk}, p59^{fer} [50].

На почечных эндотелиальных клетках линии TCL было показано, что кластеризация uPAR и урокиназа с помощью моноклональных антител способствовала ассоциации киназы JAK1 с uPAR, вследствие чего происходило фосфорилирование и димеризация Stat1, и индуцировалась ядерная транслокация, приводящая к его связыванию со специфическими сайтами на ДНК GAS (сайт активации интерферон- γ) и ISRE (интерферонстимулированный элемент ответа). Более вероятно, что сигнал внутрь клетки опосредует протеин gp130, который также солюбилизовался с uPAR [86]. Интерлейкин-6-рецептор- β (gp130) является цитокиновым рецептором, который связывает цитокины, например IL-6, и принимает участие в активации Src-киназ и Jak/Stat сигнального пути. Протеин gp130 также может ассоциироваться с uPAR и активировать JAK/STAT-путь [85, 86], что позволяет предположить его роль в качестве трансмембранного адаптера, служащего для передачи сигнала от урокиназы внутрь клетки.

Рецептор урокиназы, взаимодействуя с интегринными, влияет не только на клеточные функции, но и на адгезионнозависимую внутриклеточную сигнализацию. При блокировании этого взаимодействия происходит блокировка ассоциации семейства Src-киназ с β -интегринными. Было показано, что uPAR стабилизирует кавеолин – интегринный комплекс, в то время как члены семейства Src соединяются с β -цепью интегрина через кавеолин-1. Взаимодействие src с интегринными

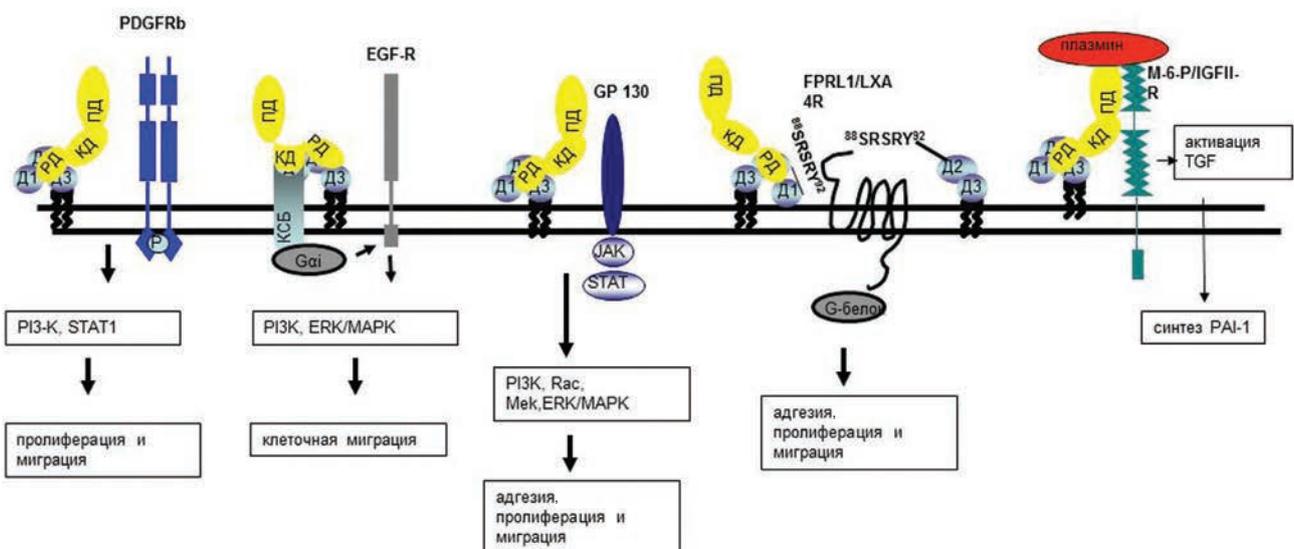


Рис. 6. Некоторые важные взаимодействия урокиназы и ее рецептора, ведущие к адгезии, миграции и пролиферации клеток

необходимо для запуска адгезионнозависимой клеточной миграции. Для клеточной миграции необходим целый набор протеинов, осуществляющих физическую связь между внеклеточным матриксом и цитоскелетом. В таких фокальных контактах содержатся интегрины – рецепторы ВКМ, а цепи актина прикреплены к цитоплазматической стороне с помощью винкулина, паксиллина и талина [87]. Мигрирующая клетка разрушает контакты с ВКМ и перестраивает их на мигрирующий край клетки [88].

На линиях раковых клеток была показана функциональная ассоциация uPAR с Src и FAK (киназы фокальных контактов) и то, что Src и FAK совместно участвуют в запуске внутриклеточной сигнализации для клеточной миграции [89].

Известен еще один механизм влияния урокиназы на миграцию клетки, заключающийся в сближении доменов 1-го и 3-го рецептора при взаимодействии uPA с uPAR. При этой структурной перестройке рецептора происходит высвобождение последовательности SRSRY между 1- и 2-ым доменами, которая стимулирует миграцию моноцитов, фибробластов и ГМК. Если во время взаимодействия урокиназы и uPAR не происходит ингибирования протеолитического домена урокиназы, она способна «раскусывать» участок между первым и вторым доменом uPAR, тем самым, высвобождая SRSRY. Было показано, что FPRL1 (гомолог fMLP-рецептора) опосредует клеточную миграцию, вызванную экспонированием SRSRY [80]. Также было показано, что при стимуляции клеток этим пептидом происходит активация p56/p59hck тирозиновой киназы через G-протеины [90].

Kjøller и соавторы показали, что uPAR, взаимодействуя с витронектином, инициирует p130Cas/Rac-зависимый сигнальный путь, приводящий к реорганизации актина и повышению клеточной подвижности, и в то же время служит в качестве адгезионного рецептора, необходимого для этих процессов [91].

Эндоцитоз

Установлено, что интернализация урокиназы, а также других лигандов через рецепторы, подобные рецептору LDL сопровождается активацией сигнальных систем клетки, приводящей к активации внутриклеточных протеинкиназ. Через последовательности Asp-Pro-X-Tyr рецепторы, родственные рецептору LDL, взаимодействуют с цитоплазматическим адаптерным протеином Dab-1, что приводит к

связыванию и регулированию активации нерецепторных тирозиновых киназ семейств Src и Abl [92], а также протеина tau, стабилизирующего микротрубочки [104]. Члены семейства LDLR также принимают участие в активации MAPK-зависимого сигнального пути и влияют на адгезию клеток [35]. Кроме того, было показано, что LRP/ α_2 -MR ассоциирован с гетеротримерными G-протеинами и принимает участие в активации PKA [38]. Интернализация урокиназы, а также других лигандов через LRP сопровождается активацией сигнальных систем, например, происходит активация протеинкиназы А. Также было показано LRP-зависимое влияние uPAR на уровень активации Rac1 в клетках мышинных эмбриональных фибробластов [93]. Интересно также отметить, что после интернализации комплекса uPA-uPAR-PAI-1 с помощью LRP и его деградации в лизосомах uPAR рециркулирует на клеточную поверхность, причем преимущественно в новообразующиеся фокальные контакты на лидирующем конце клетки [94]. Для миграции клетки необходим процесс эндоцитоза комплекса урокиназа-uPAR-PAI-1, с дальнейшим перераспределением рецептора на лидирующий край клетки. Также была показана одновременная интернализация урокиназного рецептора и интегрин бета-1 [95].

На рис. 7 представлено схематическое изображение одного из возможных вариантов событий в клетке, происходящих при клеточной миграции, вызванной урокиназой.

Пролиферация и апоптоз

Митогенная активность урокиназы наблюдалась на многих типах клеток, в том числе на человеческих эпидермальных клетках, нормальных и злокачественных клетках почки и клетках меланомы [96, 97]. Недавние исследования показали, что пролиферация раковых клеток человека зависит от взаимодействия комплекса uPA-uPAR с интегринными, что ведет к активации p38 MAPK [98]. Gyetko и коллеги показали, что у мышей, нокаутных по урокиназе, пролиферация Т-клеток оказалась сниженной [99]. На раковых клетках была показана способность ростового домена урокиназы запускать клеточную пролиферацию на остеобластоподобных клетках [100], клетках меланомы [101], клетках остеосаркомы человека SaOs-2, раковых клетках молочной железы [102, 103]. Причем для этого эффекта необходимым являлось фукозилирование Thr18 в ростовом домене урокиназы [104]. Gandhari и соавторы полагают, что митогенная активность

урокиназы опосредуется через ERK/MAPK-сигнальный путь, запускаемый интегринами. Урокиназа может стимулировать синтез ДНК и пролиферацию ГМК сосудов независимо от протеолитической активности и взаимодействия с uPAR [101,105]. Урокиназа может также индуцировать пролиферацию клеток посредством активации комплекса uPAR/CD87, казеинкиназы-2 и транспортного протеина нуклеолина [52]. Нуклеолин регулирует транскрипцию и репликацию ДНК, рост клеток и ангиогенез [32].

Многие типы клеток, выделенные из злокачественных образований у человека, таких как рак желудка, молочной железы, прямой кишки, остеосаркома и рак легкого устойчивы к апоптозу [106]. Недавние исследования отметили корреляцию между системой урокиназа-рецептор и чувствительностью клетки к запрограммированной смерти. Gutierrez и соавторы установили, что при имплантации клеток фибросаркомы T241 в мышь с нокаутом по урокиназе уменьшается пролиферация клеток опухоли и повышается индуцирование апоптоза [107]. При векторной трансфекции антисмысловой siRNA к урокиназе происходило снижение пролиферации и повышение апоптоза клеток рака молочной железы MDA-MB-231, а при экзогенном добавлении и инкубации этих клеток с uPA происходит активация ERK/MAP-киназ [102]. Более того, при инкубировании MDA-MB-231 клеток с антителами к uPA, которые блокировали взаимодействие uPA-uPAR, наблюдалось снижение количества фосфорилированных ERK/MAP-киназ и повышение апоптоза [108]. При блокировании специфическими антителами uPA или uPAR происходило одинаковое повышение апоптоза клеток. Показано, что активирование MAPK/ERK повышало экспрессию uPA и uPAR. Антиапоптозные свойства ERK/MAPK, вероятно, могут быть следствием их способности к активации киназ семейства Rsk, которые в свою очередь фосфорилируют протеин BAD – ответственный за апоптоз и транскрипционный фактор CREB (cAMP response element binding protein) – ответственный за выживание клетки [109]. Оба Rsk-опосредованных механизма приводят к апоптозу. Wick и соавторы показали положительную корреляцию между уровнем Bcl-2 в злокачественных клетках глиомы с экспрессией металлопротеиназ и поверхностной урокиназой. Авторы предполагают, что Bcl-2 в раковых клетках способствует клеточной миграции и инвазии, влияя на экспрессию uPA и металлопротеиназ [110]. Один из важнейших

факторов, опосредующий апоптоз, – рецептор гибели клеток Fas (CD95), принадлежащий к семейству TNF (фактор некроза опухоли). Этот рецептор состоит из внеклеточной части, взаимодействующей с лигандом FasL (CD95L) и внутриклеточной части, ответственной за передачу сигналов апоптоза. Barnhart и соавторы показали, что при инкубации FasL с опухолевыми клетками, которые суперэкспрессируют Fas, происходит повышение клеточной подвижности инвазии. Блокирование антителами uPA снижало данные эффекты. Авторы предполагают, что FasL может индуцировать транскрипцию генов *NF-kB*, *ERK/MAPK* и *uPA* [111]. Alfano и соавторы показали, что уровень экспрессии uPAR положительно коррелирует с устойчивостью к апоптозу в линиях клеток: эпителиальных пигментных клетках сетчатки и эмбриональных эпителиальных клетках почки. Взаимодействие урокиназы с uPAR приводило к повышению регуляции антиапоптозного Bcl-xL, фактора, который необходим для зависимой от урокиназы антиапоптозной активности [112, 113].

Ранее мы показали, что для стимуляции миграции сосудистых ГМК под действием урокиназы необходимо наличие ее протеолитически активного домена [114]. Кроме того, мы обнаружили новый сигнальный механизм, вовлеченный в регуляцию пролиферации клеток и ремоделирования артерий. Используя siRNA мы доказали, что в сосудистых ГМК урокиназа стимулирует образование активных форм кислорода за счет стимуляции экспрессии NADP-оксидаз *pox1*, *pox4* и *pox22* [115] и, таким образом, стимулирует пролиферацию ГМК. На рис. 8 представлено схематическое изображение механизмов, способствующих пролиферации клеток под действием урокиназы.

Ремоделирование сосудов и урокиназа

Ремоделирование сосудов представляет собой процесс адаптации, включающий в себя тысячи структурных и функциональных изменений сосудистой стенки, которые возникают при заболеваниях, старении и повреждении сосуда [116]. Механизмы, участвующие в ремоделировании сосудистой стенки включают гиперплазию интимы и меди, изменения внеклеточного коллагена и эластина, а также эндотелиальной функции и фиброза. Из-за сложности и множественности процессов трудно обнаружить единый механизм, способствующий неблагоприятному ремоделированию сосудов. Многолетние исследования функций активатора плазминогена урокиназного типа

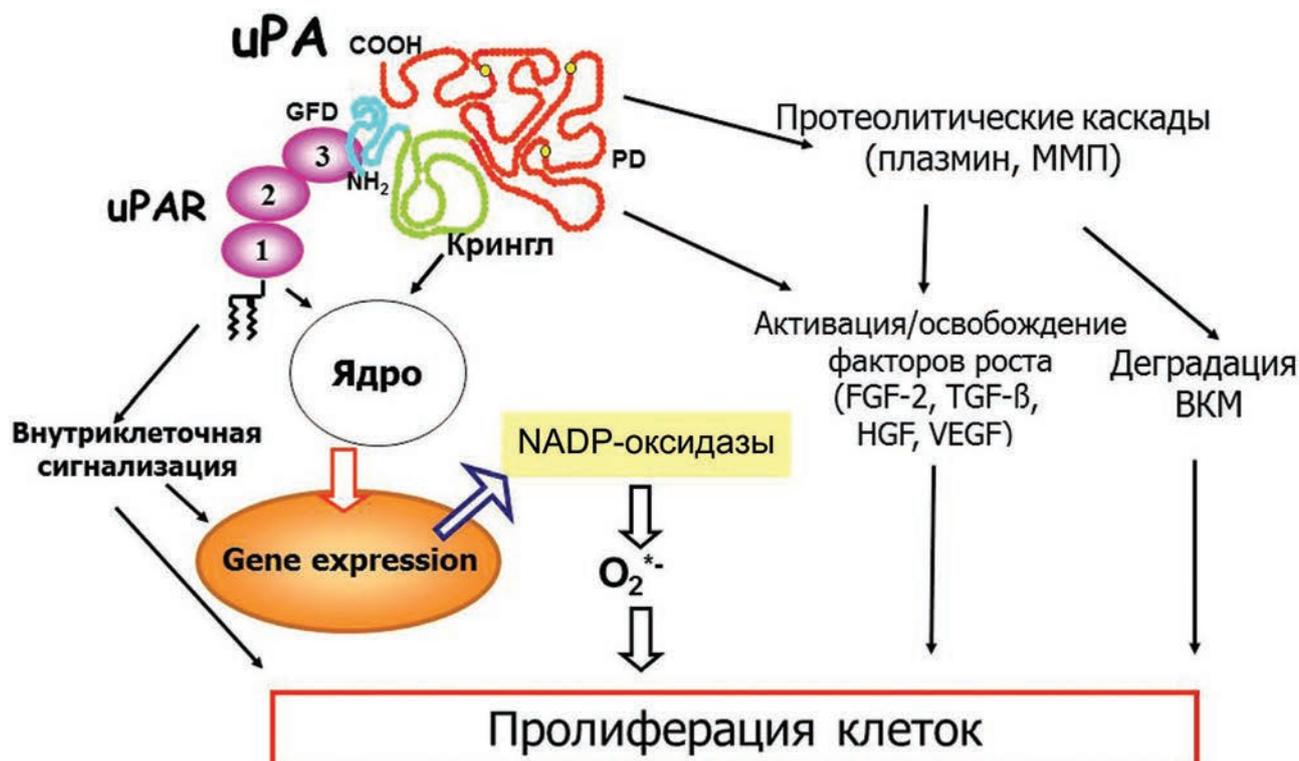


Рис. 8. Схема механизмов, способствующих пролиферации клеток под действием урокиназы. uPA – урокиназа; uPAR – рецептор урокиназы uPAR/CD87; GFD – домен, подобный фактору роста; PD – протеолитический домен; MMP – матричные металлопротеиназы; FGF – фактор роста фибробластов; PDGF – тромбоцитарный фактор роста; HGF – фактор роста гепатоцитов; VEGF – сосудисто-эндотелиальный фактор роста; NADP – никотинамидадениндинуклеотидфосфат; ВКМ – внеклеточный матрикс

(урокиназы), а также его влияния на различные патофизиологические механизмы ремоделирования артерий привели нас к заключению, что именно урокиназа является ключевым регулятором ремоделирования в стенке сосудов после механического повреждения.

После внутрисосудистого повреждения при ангиопластике, стентировании или атерозктомии у 20–30% больных в течение 6 месяцев развивается повторное сужение просвета артерии, или рестеноз [117]. Тромботическая и воспалительная реакции начинаются с момента повреждения сосуда и достигают максимума: первая – в течение первых часов, вторая – первых-вторых суток (рис. 9). При этом цитокины и факторы роста, выделяемые тромбоцитами и лейкоцитами, активируют ГМК, которые начинают пролиферировать и мигрировать из меди в интиму. Эти процессы достигают максимума на 7-й день и заканчиваются через месяц после повреждения. На второй неделе мигрировавшие клетки начинают усиленно синтезировать матрикс, процесс

достигает максимума через 3 месяца и продолжается около 6 месяцев. Все эти процессы приводят к развитию неинтимы, фактически новой бляшки, и к ремоделированию сосудистой стенки, что в конечном итоге ведет к сужению просвета и возврату симптомов ишемии (стенокардии) [118]. Мы показали, что урокиназа прямо или опосредовано – через активацию плазмينا, принимает участие во всех этих процессах.

Повышенное содержание урокиназы в периферической крови больных, подвергающихся ангиопластике и стентированию коронарных артерий, соотносится с высоким риском развития рестенозов, и является предиктором ангиографически подтвержденного коронарного рестеноза [5, 119, 120]. Мы обнаружили, что антиген урокиназы и ее активность в плазме пациентов существенно выше у пациентов со стенокардией, чем у здоровых добровольцев [121]. Мы и другие авторы показали, что экспрессия и активность урокиназы повышены в ГМК и макрофагах атеросклеротических, а

Основные процессы ремоделирования артерий после внутрисосудистого повреждения

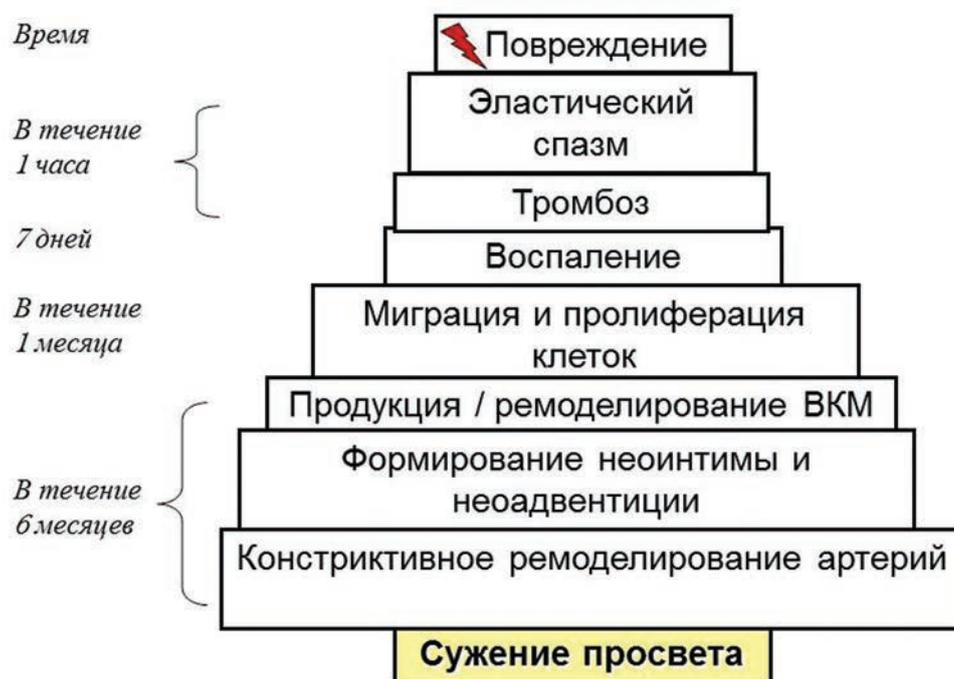


Рис 9. Ремоделирование артерий после внутрисосудистого повреждения. ВКМ – внеклеточный матрикс

также рестенотических бляшек в артериях человека [122]. Было выявлено, что в атеросклеротической бляшке урокиназу экспрессируют преимущественно активированные макрофаги [123]. Повышенная экспрессия урокиназы и ее рецептора обнаруживается в атеросклеротической бляшке, что может способствовать усиленному протеолизу, обуславливающему нестабильность бляшки [123, 124]. Повышение экспрессии урокиназы макрофагами ускоряет прогрессирование атеросклероза и раннюю смерть трансгенных мышей [125]. Помимо этого, являясь фактором хемотаксиса для гладкомышечных клеток, лейкоцитов и моноцитов/макрофагов урокиназа [55, 99], экспрессированная в атеросклеротической бляшке, может способствовать миграции ГМК, еще большему привлечению моноцитов/макрофагов в бляшку и, таким образом, приводить к росту и «дестабилизации» бляшки. Урокиназа может активировать матриксные металлопротеиназы и высвобождать связанные с матриксом факторы роста, в частности, трансформирующий фактор роста β (TGF- β 1), основной фактор роста фибробластов и гранулоцит-макрофаг колониестимулирующий фактор, которые активно

участвуют в процессах атерогенеза [75, 126]. В то же время сами факторы роста стимулируют миграцию и хемотаксис клеток и способны повышать экспрессию урокиназы моноцитами/макрофагами и гладкомышечными клетками [55, 127].

Неспецифическая воспалительная реакция сосудистой стенки на повреждение – важное звено патогенеза как рестеноза, так и атеросклероза [128, 129]. На модели экспериментальной баллонной ангиопластики мы показали, что привлечение в сосуд моноцитов может быть одним из механизмов влияния урокиназы на ремоделирование, так как моноциты являются источником цитокинов и ростовых факторов. Это подтверждается полученными нами данными о том, что урокиназа увеличивает содержание в стенке сосуда мРНК – одного из основных провоспалительных факторов, секретирующихся моноцитами/макрофагами – фактора некроза опухолей альфа (TNF- α) и энзима, осуществляющего его превращение в активную форму (TACE – TNF- α converting enzyme). Нанесение урокиназы вызывало значительное увеличение экспрессии как TNF- α , так и TACE по сравнению

с ее уровнем в контрольной группе, в то время как нанесение тканевого активатора плазминогена подобного эффекта не оказывало [130]. Фактор некроза опухолей- α (TNF- α), вырабатываемый моноцитами/макрофагами, нейтрофилами, а также структурными компонентами сосудистой стенки (гладкомышечными клетками и фибробластами), является важным посредником развития воспаления и вызывает образование и секрецию провоспалительных факторов (интерлейкин-10, кортикостероиды, простагландины) [131].

Несмотря на то, что и тканевой активатор плазминогена, и урокиназа активируют плазминоген с образованием плазмина, их роль в ремоделировании артерий различна. После баллонного повреждения артерии экспрессия тканевого, и урокиназного активаторов плазминогена гладкомышечными клетками меди быстро возрастает [6]. Мы показали, что экспрессия урокиназы повышается уже через 6 часов после повреждения и остается повышенной в течение 4 дней в меди и развивающейся неоинтими [132], то есть в течение того времени, на которое приходится активная пролиферация ГМК в меди и их миграция в формирующуюся неоинтиму [6]. На модели ремоделирования артерий, индуцированного снижением кровотока, мы также обнаружили, что содержание урокиназы коррелировало с ростом неоинтимы, тогда как содержание тканевого активатора плазминогена коррелировало с позитивным ремоделированием артерий [133].

В настоящее время установлено, что урокиназа является обязательным участником реакции сосуда на повреждение [7,134–136]. В исследованиях на трансгенных животных [137] и артериях приматов [138] было установлено, что урокиназа является ключевым фактором развития неоинтимы. Было выявлено, что отсутствие гена урокиназы, также как и отсутствие генов обоих активаторов плазминогена одновременно приводит к подавлению роста неоинтимы. Причем у этих мышей ГМК неоинтимы были лишены способности мигрировать. Неспособность ГМК дефицитных по урокиназе мышей к миграции, а, следовательно, и к формированию неоинтимы, может быть обусловлена участием урокиназы в расщеплении внеклеточного матрикса [137]. Трансгенная гиперэкспрессия урокиназы в интими сосуда у кроликов с атеросклерозом стимулирует констриктивное ремоделирование артерии [123]. Связывание урокиназы с рецептором uPAR/CD87 обеспечивает направленную локальную

деградацию протеинов внеклеточного матрикса по направлению движения клетки. Тем не менее, отсутствие гена урокиназного рецептора не оказывало влияния на ответ сосудистой стенки на повреждение по сравнению с мышами дикого типа [139]. Этот факт указывает на преимущественное значение для заживления сосудистой стенки независимых от рецептора сигнальных путей, активируемых урокиназой.

С использованием рекомбинантных форм урокиназы, которые были получены в лаборатории генной инженерии РКНПК Росмедтехнологий, а также нейтрализующих урокиназу антител, предоставленных группой инженерной иммунологии РКНПК Росмедтехнологий, и рекомбинантного тканевого активатора плазминогена мы обнаружили, что в отличие от нативной урокиназы протеолитически неактивная рекомбинантная урокиназа не стимулировала образование неоинтимы и неоадвентиции, вызывала менее выраженное, чем в контроле, утолщение меди и уменьшение просвета артерии (рис. 10). Ее эффект был ближе к эффекту нейтрализующих урокиназу антител, которые подавляли рост неоинтимы и предотвращали сужение просвета артерии, вызванное баллонированием. В то же время форма урокиназы с модифицированным GFD, неспособная связываться с урокиназным рецептором, вызывала эффекты, аналогичные нативной урокиназе [132].

Полученные данные позволили утверждать, что *in vivo* для стимуляции миграции клеток и ремоделирования артерий преимущественное значение имеет протеолитическая активность урокиназы. Эти эффекты весьма специфичны для урокиназы и, вероятно, обусловлены не только ее способностью к образованию плазмина, так как тканевой активатор плазминогена оказывал противоположное действие [140]. Оценивая влияние экзогенной урокиназы на показатели геометрического ремоделирования артерии после баллонирования, мы обнаружили, что она не только стимулирует рост неоинтимы, но вызывает констриктивное ремоделирование артерии (уменьшение площади, описываемой наружной эластичной мембраной и увеличение соотношения интима/медия). Тканевой активатор плазминогена, напротив, вызывал положительное ремоделирование, наряду с подавлением роста неоинтимы [140].

Отрицательное ремоделирование артерии является одним из основных механизмов позднего сужения просвета артерии после ангиопластики без стентирования [141]. Способность

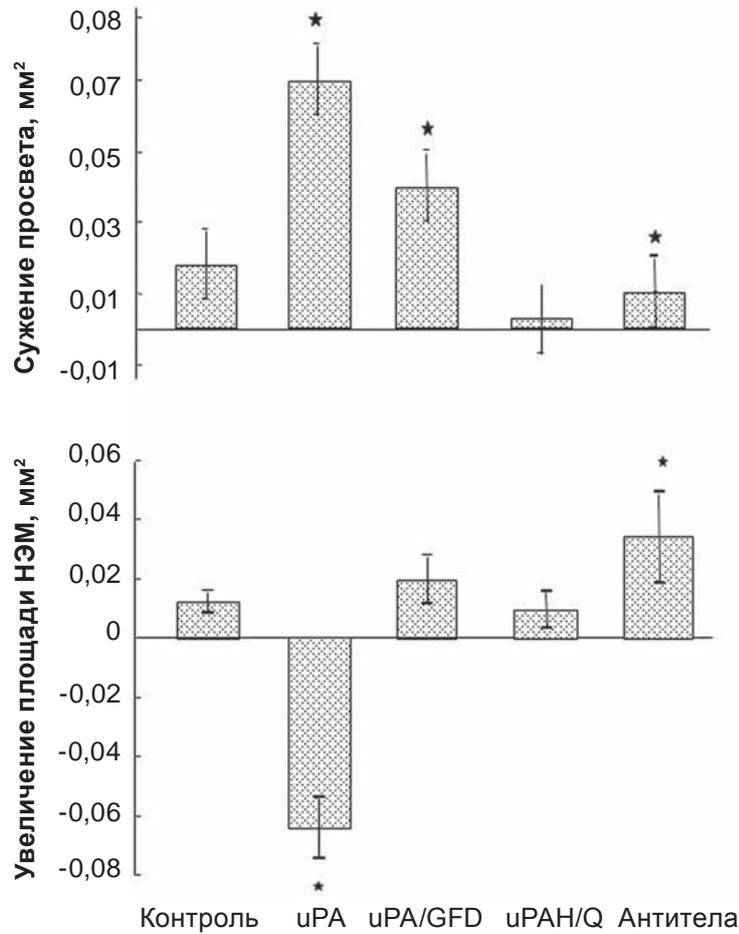


Рис. 10. Ремоделирование сонной артерии крысы после экспериментальной баллонной ангиопластики и нанесения различных форм рекомбинантной урокиназы. Представлено изменение площади просвета артерии (ПП) и площади, описываемой наружной эластичной мембраной (НЭМ), сонной артерии крысы на 4-е сутки после баллонирования и нанесения урокиназы нативной (uPA), с модифицированным ростовым доменом (uPA/GFD), протеолитически неактивной (uPA H/Q) и нейтрализующих ее антител. Контроль – нанесение чистого геля. * $P < 0,05$. В каждой группе по 9 животных

урокиназы вызывать констриктивное ремоделирование поврежденной артерии может быть обусловлена ее влиянием на адвентицию сосуда. Нанесение на адвентицию экзогенной урокиназы стимулирует ее рост, пролиферацию клеток и аккумуляцию α -актинположительных клеток и моноцитарно-макрофагальную инфильтрацию, а нейтрализующие урокиназу антитела, напротив, уменьшают количество клеток сократительного фенотипа и подавляют рост неоадвентиции в ответ на повреждение [142]. При этом, неактивная урокиназа (uPA-H/Q) и тканевой активатор плазминогена не оказывают стимулирующего влияния на аккумуляцию α -актинположительных клеток и макрофагов в поврежденной адвентиции, что указывает на определяющее значение протео-

литической активности урокиназы для осуществления этих процессов.

Во многих работах показана взаимосвязь между ремоделированием сосудов и экспрессией матриксных металлопротеиназ, прежде всего ММП-2 и ММП-9, осуществляющих деградацию внеклеточного матрикса [143–145]. Вовлечение системы матриксных металлопротеиназ в процесс заживления раны после баллонного повреждения доказывает и тот факт, что увеличение экспрессии ингибитора ММП – TIMP-1 подавляет развитие неоинтимы [146], в то время как у мышей с дефицитом TIMP-1 образование неоинтимы после электрического повреждения бедренной артерии было более выраженным. Использование различных ингибиторов ММП приводило к

замедлению образования неоинтимы и подавлению миграции гладкомышечных клеток [147]. Известно также, что между фибринолитической системой (системой активаторы плазминогена–плазмин) и системой матриксных металлопротеиназ существует тесное функциональное взаимодействие [139, 144]. Ранее было показано, что урокиназа может независимо от плазмينا благодаря собственной протеолитической активности активировать ММП [148]. Мы показали влияние урокиназы на экспрессию мРНК ММП-9 в клетках моноцитарных линий [70–72]. Кроме того, в нашем исследовании *in vivo* мы обнаружили, что активаторы плазминогена по-разному влияют на экспрессию и активацию ММП-2 и ММП-9 в баллонированной сонной артерии крысы [149]. Так, возрастание в поврежденном сосуде урокиназы стимулирует увеличение экспрессии ММП-2 и образование активных форм ММП-2 и ММП-9 в ранние сроки после баллонирования. Увеличение в сосуде тканевого активатора плазминогена, напротив, уменьшает экспрессию ММП-2 и не влияет на образование активных форм этих энзимов. Этот факт позволил нам предположить, что урокиназа и тканевой активатор плазминогена могут по-разному влиять на экспрессию генов, кодирующих протеины, участвующие в ремоделировании артерий.

Для выяснения механизмов различного влияния активаторов плазминогена на ремоделирование сосудов, мы провели исследование экспрессии генов в баллонированном сосуде при нанесении на него урокиназы и тканевого активатора плазминогена. Мы обнаружили, что урокиназа оказывала влияние на экспрессию обширной группы провоспалительных генов и генов, регулирующих метаболизм митохондрий и оксидативный стресс [150]. Изменение экспрессии генов, участвующих в регуляции воспаления, под действием урокиназы, и отсутствие подобных изменений под действием тканевого активатора плазминогена свидетельствует о том, что воспалительный каскад, вероятно, вовлечен в стимуляцию роста неоинтимы, констриктивное ремоделирование и, как следствие, уменьшение просвета артерии под действием урокиназы.

Недавние исследования показали, что оксидативный стресс, возникающий в ответ на повреждение сосудистой стенки, играет важную роль в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний, поскольку способствует неблагоприятному ремоделированию сосудов [151]. Известно, что образование супероксид-радикала является одним из ключевых процессов, регу-

лирующих сосудистый тонус и пролиферацию ГМК в стенке сосуда [152]. Повышенная экспрессия NADP-оксидаз в баллонированной артерии представляет собой важный механизм сигнализации, регулирующий рост неоинтимы и ремоделирование артерии и атерогенез [153]. Мы обнаружили, что стимуляция образования АФК и регуляция экспрессии генов, оказывающих влияние на оксидативный стресс, в поврежденной артерии после экспериментальной баллонной ангиопластики *in vivo*, опосредуют усиленное деление клеток под действием урокиназы [115, 154]. Этот новый редоксзависимый механизм действия урокиназы может оказаться ключевым в регуляции роста неоинтимы и развитии неблагоприятного ремоделирования сосудистой стенки. Мы показали, что урокиназа способна повышать экспрессию NAD(P)H оксидаз и продукцию активных форм кислорода (АФК) и регулировать пролиферацию ГМК как аутокринный фактор роста. Недавно нами были получены новые данные, расширяющие представления о сигнальных путях, регулируемых урокиназой, и указывающие на уникальную и многофункциональную природу урокиназы. Мы показали, что урокиназа способна транслоцироваться в ядро и, таким образом, регулировать экспрессию генов [32].

На рис. 11 суммированы механизмы влияния урокиназы на ремоделирование артерий.

Ангиогенез и урокиназа

Ангиогенез представляет собой образование новых капилляров от посткапиллярных венул, которое осуществляется через активацию эндотелиальных клеток, экспрессию в них протеаз, деградацию внеклеточного матрикса, пролиферацию и миграцию этих клеток, образование ими первичных высокопроницаемых сосудистых структур, последующую стабилизацию и «взросление» этих структур за счет привлечения перicyтов и ГМК, а также организации их в сложную трехмерную сосудистую сеть [155]. Основным стимулом к ангиогенезу при физиологических и патологических состояниях является недостаток кислорода (гипоксия или ишемия), который через активатор транскрипции факторов ангиогенеза – индуцируемый гипоксией фактор-1 (HIF-1), индуцирует экспрессию многих ангиогенных факторов и, прежде всего, основного регулятора ангиогенеза как в эмбриональном, так и в постнатальном периоде развития организма – VEGF и его рецепторов. VEGF избирательно стимулирует пролиферацию и миграцию эндо-

Роль урокиназы в ремоделировании артерий

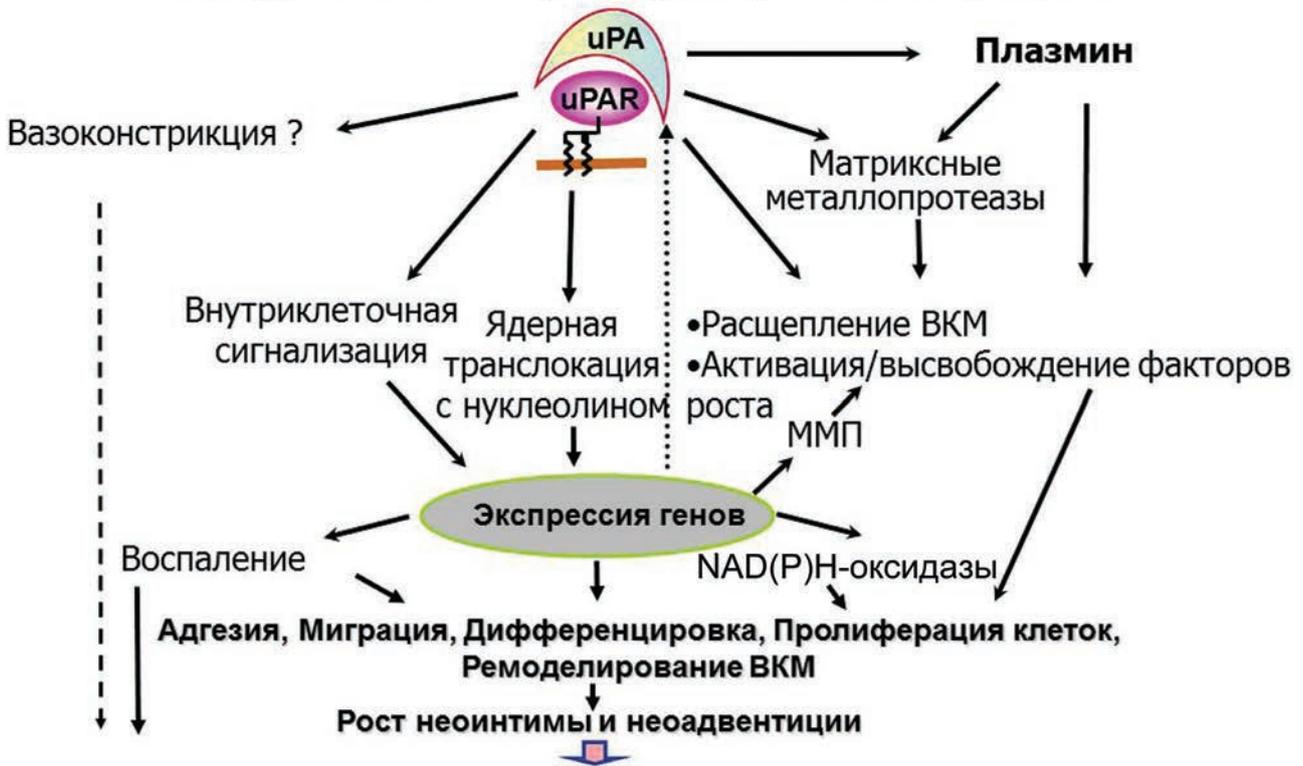


Рис. 11. Механизмы регуляции роста и ремоделирования артерий под действием урокиназы. uPA – урокиназа; uPAR – рецептор урокиназы uPAR/CD87; ВКМ – внеклеточный матрикс; ММП – матриксные металлопротеиназы

телиальных клеток (ЭК), их предшественников и моноцитов, экспрессирующих рецепторы к нему, увеличивает сосудистую проницаемость, способствуя пропотеванию протеинов плазмы в околососудистое пространство, необходимое для миграции ЭК, индуцирует экспрессию эндотелиальной NO-синтазы и образование NO, что способствует вазодилатации и стимулирует экспрессию протеаз, разрушающих связи между ЭК и внеклеточным матриксом, что необходимо для направленной миграции клеток.

Для инициации процесса ангиогенеза необходима дестабилизация сосуда – ослабление межклеточных контактов между эндотелиальными клетками, разрушение базальной мембраны, а также локальный протеолиз матриксных протеинов для того, чтобы эндотелиальные клетки или их предшественники из циркулирующей крови могли мигрировать и формировать новые сосуды [156, 157]. Поэтому ангиогенез невозможен без активации внеклеточного протеолиза, осуществляющегося за

счет катализируемого урокиназой образования пламина на поверхности клетки. Известно, что урокиназа и ее рецептор играют важную роль в процессах ангиогенеза [155]. Эндотелиальные клетки, в которых гиперэкспрессирована урокиназа, характеризуются большей инвазивностью *in vitro*, чем интактные [158]. В клинических исследованиях показано, что экспрессия урокиназного рецептора характерна для наиболее «агрессивных» клеток в опухоли и для сосудов, растущих по ее краю, и может быть маркером активного опухолевого ангиогенеза и метастазов [159]. Известно, что инфильтрация тканей моноцитами/макрофагами, секретирующими ангиогенные факторы способствует ангиогенезу [160], а циркулирующие моноциты играют определенную роль в развитии коллатералей [161]. Урокиназа и ее рецептор стимулируют аккумуляцию моноцитов/макрофагов в тканях и участвуют в развитии воспалительного ответа как при ремоделировании артерий, так и при артериогенезе [5, 162].

Урокиназа и образовавшийся под ее действием плазмин инициируют разрушение протеинов базальной мембраны, таких как фибронектин и ламинин. Они также могут активировать и/или высвободить латентные матриксные металлопротеиназы, а также ангиогенные факторы роста, в частности VEGF, bFGF, HGF, TGF β и PDGF, которые в свою очередь способствуют миграции эндотелиальных клеток, их инвазии и пролиферации [18,73,75,77,81,95,155]. Урокиназа опосредует ангиогенные эффекты некоторых факторов роста благодаря как протеолитической активности, так и своим непротеолитическим свойствам.

Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что урокиназа как ключевой регулятор внеклеточного протеолиза и ремоделирования тканей является фактором, опосредующим сигналы к запуску ангиогенеза [5, 155]. Повышение экспрессии урокиназы в эндотелиальных клетках увеличивает их инвазивный потенциал, а добавление антител, блокирующих урокиназный рецептор или протеолитическую активность урокиназы, может подавлять миграцию эндотелиальных клеток и образование капилляроподобных структур [163, 164]. Блокада урокиназного рецептора (uPAR/CD87) с помощью специфических антител подавляет индуцируемые фактором роста фибробластов (bFGF) и эндотелиальным фактором роста сосудов (VEGF) миграцию эндотелиальных клеток и образование капилляроподобных трубочек в фибриновом матриксе [165]. Также было показано, что в клетках эндотелия урокиназа активирует MAP-киназную сигнализацию посредством связывания с uPAR/CD87 и активации протеинкиназы C благодаря протеолитической активности урокиназы, что ведет к миграции эндотелиальных клеток и ангиогенезу [40]. У мышей, нокаутированных по гену урокиназы, подавлен ангиогенез в ишемизированной конечности и ангиогенез в сердце, а VEGF не способен стимулировать ангиогенез в перинфарктной зоне, в то время как у диких мышей он оказывает выраженный ангиогенный эффект [166]. Кроме того, VEGF стимулирует экспрессию урокиназы в сосудистых эндотелиальных клетках [167]. Ангиогенез в сетчатке, индуцированный HGF, также опосредован увеличением активности урокиназы [168]. Нарушение взаимодействия урокиназы с ее рецептором ингибирует усиление миграционной и инвазивной активности эндотелиальных клеток под действием HGF. Эти данные подтверждают, что урокиназа опосредует ангиогенные эффекты факторов роста.

Урокиназа может также стимулировать ангиогенез благодаря активации внутриклеточной сигнализации в эндотелиальных клетках [40].

Мы изучали эффекты внутримиекардиального и внутримышечного введения плазмидной конструкции с комплементарной ДНК (кДНК) урокиназы (человека, крысы и мыши) на моделях ишемии задней конечности у мыши и крысы и инфаркта миокарда (ИМ) у крысы [164,169]. Было показано, что урокиназа стимулирует развитие капилляров и артериол и увеличивает аккумуляцию макрофагов в перинфарктной зоне, уменьшает размер формирующегося ИМ, увеличивает васкуляризацию, ускоряет восстановление перфузии и предотвращает развитие некроза в ишемизированной конечности (рис. 12).

Эффективность плазмидной конструкции с геном урокиназы была близка к эффективности подобной конструкции, содержащей ген *VEGF*, при этом урокиназа не вызывала отек конечности. Следует особо подчеркнуть, что ни в одном из случаев введения плазмид при ИМ и ишемии конечности не было отмечено формирования ангиом. Полученные результаты свидетельствовали о том, что генная терапия путем прямых внутримиекардиальных/внутримышечных инъекций раствора плазмиды с кДНК урокиназы может эффективно стимулировать ангио- и ангиогенез и улучшать перфузию ишемизированных тканей. Мы предполагаем, что преходящее увеличение содержания урокиназы в ишемизированных тканях может привести к стимуляции ангио- и ангиогенеза благодаря активации латентных и высвобождению связанных в матриксе ангиогенных факторов роста; к активации ММП, стимуляции миграции и пролиферации ЭК и ГМК сосудов; потенцированию действия ангиогенных факторов; привлечению моноцитов в участок ишемии и последующей секреции ими ангиогенных факторов и цитокинов; предотвращению тромбоза сосудов, который служит дополнительным фактором, усугубляющим ишемию тканей при нарушениях магистрального кровотока. Использование комбинированной генной терапии VEGF с урокиназой позволяет в 2 раза снизить дозу плазмиды VEGF без потери эффективности и уменьшить побочное действие терапии VEGF, проявляющееся в развитии отеков. На основе плазмидных генетических конструкций с кДНК урокиназы и VEGF-165 созданы лекарственные препараты для генной терапии, которые прошли токсикологические исследования и планируются для клинических испытаний у больных с ишемией нижних конечностей.

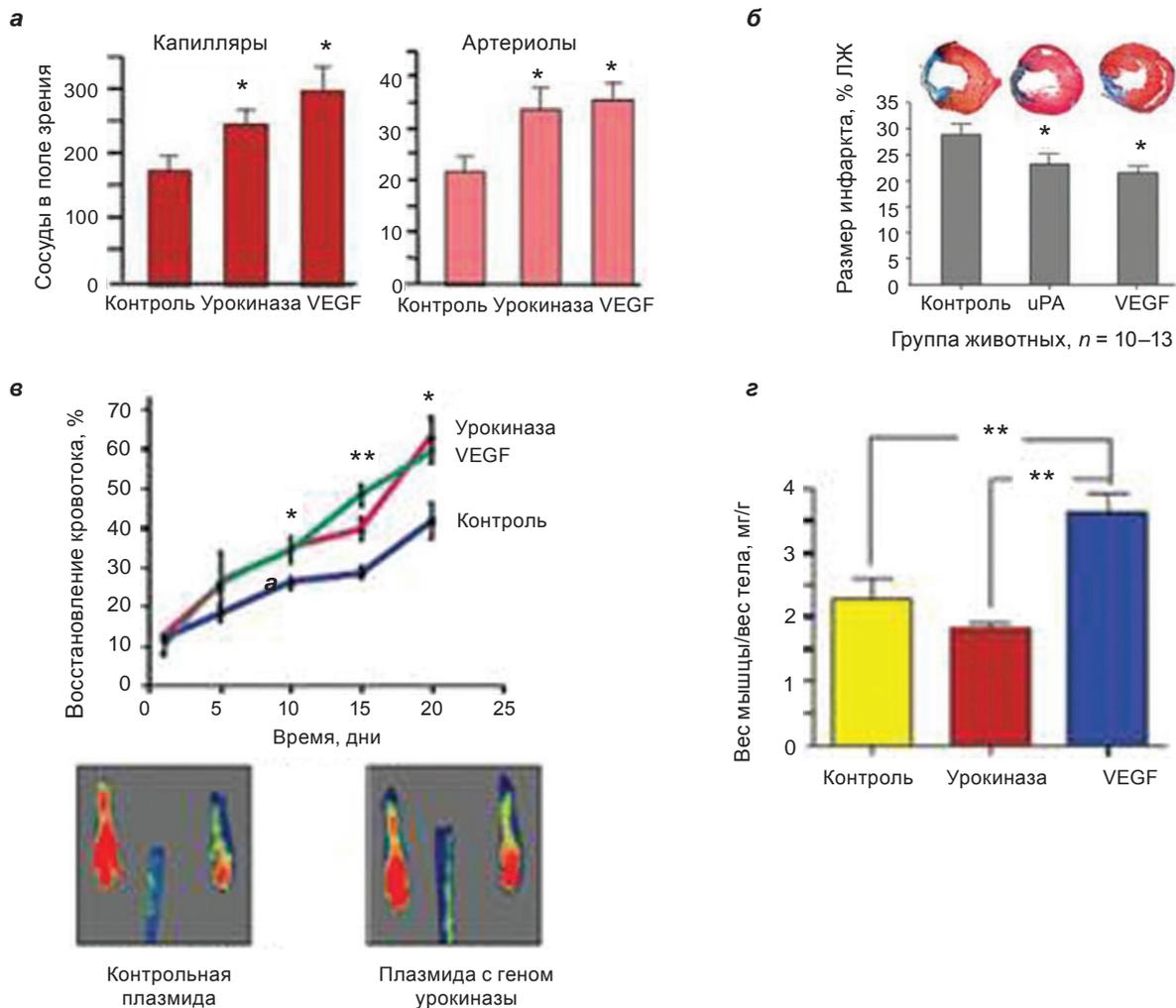


Рис. 12. Влияние прямого введения плазмид с генами урокиназы и VEGF на ангиоартериогенез в сердце крысы и ишемизированной конечности мыши. **а** – Количество капилляров и артериол в периинфарктной зоне на 14-й день после ИМ и введения плазмид (* $P < 0,05$). **б** – Размер формирующегося постинфарктного рубца на 14-е сут. после перевязки ПНА и инъекции плазмид. Данные представлены в виде отношения площади рубца к площади ЛЖ на поперечных срезах сердца. Вверху – окраска срезов сердца по Маллори: богатая коллагеном область рубца окрашивается в синий цвет, а жизнеспособный миокард ЛЖ – в красный. **в** – восстановление перфузии подошвенной области ишемизированной левой конечности мыши (лазерное доплеровское сканирование, пример внизу) после введения плазмид. За 100% принят кровоток в неишемизированной правой конечности; **г** – оценка развития отека по изменению соотношения массы мышцы к массе тела мыши. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

С другой стороны, «связывающий пептид», образующийся в результате протеолитического разрушения урокиназы плазмином или металлопротеиназами в положениях Lys135–Lys136 или Glu143–Leu144, блокирует взаимодействие урокиназы с ее рецептором и вызывает подавление миграции эндотелиальных клеток и ангиогенеза *in vivo*, стимулированных ангиогенными факторами роста, в том числе в опухолях [64]. В то же время, было обнаружено, что «связывающий пептид»

способен запускать внутриклеточную сигнализацию и стимулировать миграцию, связываясь с $\alpha\beta_5$ интегрином, кроме того, при этом взаимодействии усиливается миграция, вызываемая ростовым доменом урокиназы при связывании с рецептором урокиназы [170]. Как было обнаружено в последнем исследовании, разные участки молекулы урокиназы, входящие в состав «связывающего пептида» по-разному влияют на клеточную миграцию. Так, участки 135–143 и 135–158 ингибируют,

тогда как участок 144–158 стимулирует клеточную миграцию, что может представлять собой уникальный механизм регуляции миграции в зависимости от условий, в которых происходит разный протеолитический процессинг молекулы урокиназы [171].

Крингл и аминотерминальный фрагменты урокиназы, не содержащие «связывающего пептида», могут подавлять миграцию эндотелиальных клеток и формирование капиллярноподобных структур [165,172]. Недавно нами получены данные о негативном влиянии протеолитически неактивных рекомбинантных форм урокиназы (uPA HQ и аминотерминального фрагмента) на спонтанную миграцию эндотелиальных клеток. Мы показали способность аминотерминального фрагмента подавлять стимулированный основным фактором роста фибробластов ангиогенез *in vitro*. Полученные результаты указывают на возможность использования синтезированных нами протеолитически неактивных рекомбинантных конструкций урокиназы для регуляции миграции эндотелиальных клеток и подавления неоангиогенеза.

Таким образом, многочисленные исследования показали, что урокиназа, являясь мультидоменным многофункциональным протеином, регулирует клеточную адгезию, миграцию и пролиферацию благодаря своей специфической протеолитической активности, образованию плазмина, расщеплению внеклеточного матрикса, связыванию с рецепторами, взаимодействиям ее доменов друг с другом, с протеинами матрикса и интегринами, а также активации сложной внутриклеточной сигнализации. Многие эффекты урокиназы могут быть обусловлены ее ядерной транслокацией, взаимодействием с факторами транскрипции, и ее влиянием на экспрессию генов. Все эти свойства урокиназы определяют ее ключевое значение в процессах роста и ремоделирования сосудов. Учитывая роль урокиназы в сосудистом ремоделировании, препараты, направленные на ингибирование урокиназы, при локальном использовании могут предотвращать рестенозирование после баллонной ангиопластики. Известно, что атеросклеротические бляшки имеют систему кровоснабжения, а экспериментальное подавление кровоснабжения атеросклеротических бляшек может приводить к уменьшению их размеров в 3–4 раза. Таким

образом, подавление ангиогенеза, индуцируемого урокиназой, можно рассматривать как возможный способ лечения атеросклероза и злокачественных новообразований. В то же время локальная генная терапия с использованием конструкций урокиназы, в том числе ее мутантных форм, чрезвычайно перспективна для стимуляции ангиогенеза при ишемических заболеваниях, учитывая отсутствие побочных эффектов, которыми обладают факторы роста при их терапевтическом использовании. Мультидоменная структура урокиназы и ее ключевая регуляторная роль в сосудистой стенке предоставляют уникальные возможности как для исследования механизмов функционирования сосудистой стенки, так и для разработки новейших терапевтических подходов для практического использования урокиназы и ее фрагментов в медицинской практике для лечения различных патологий.

РОЛЬ МУЛЬТИДОМЕННОЙ СТРУКТУРЫ УРОКИНАЗИ В РЕГУЛЯЦИИ РОСТУ ТА РЕМОДЕЛЮВАННЯ СУДИН

В. А. Ткачук^{1,2}, О. С. Плеханова¹,
И. Б. Белоглазова¹, Е. В. Парфенова¹

¹ФГБУ Російський кардіологічний науково-виробничий комплекс МОЗ РФ, Москва, Росія;

²Факультет фундаментальної медицини МДУ ім. М. В. Ломоносова, Москва, Росія;
e-mail: plekhanova@mail.ru

Активатор плазміногену урокіназного типу, або урокіназа (uPA) — багатофункціональний протеїн, що грає особливу регуляторну роль у судинній стінці і виявляє здатність запускати протеолітичні та сигнальні каскади. У статті підсумовано одержані авторами результати і дані літератури, що стосуються ролі урокінази в ремоделюванні кровонесних судин і ангиогенезі. Насьогодні урокіназу можна розглядати як перспективну мішень для впливів, спрямованих на профілактику рестенозів, запобігання негативного ремоделювання артерій, стимуляцію росту судин у разі ішемічних захворювань і пригнічення ангиогенезу за онкологічних захворювань.

Ключові слова: урокіназа, міграція, проліферація, ремоделювання артерій, ангиогенез.

ROLE OF MULTIDOMAIN STRUCTURE OF UROKINASE IN REGULATION OF GROWTH AND REMODELING OF VESSELS

V. A. Tkachuk^{1,2}, O. S. Plekhanova¹,
I. B. Beloglazova¹, E. V. Parfenova¹

¹Russian Cardiologic Research-Production Complex,
RF Ministry of Public Health, Moscow, Russia;

²Faculty of Fundamental Medicine,
M.V. Lomonosov Moscow
State University, Russia;
e-mail: plekhanova@mail.ru

Urokinase type plasminogen activator, or urokinase (uPA), is a multifunctional protein which plays special regulatory role in the vascular wall and can actuate the proteolytic and signal cascades. The authors' results and literature data concerning the role of urokinase in remodeling blood vessels and angiogenesis are summarized in the paper. At the present stage urokinase may be considered as a promising target for the effects directed to prophylaxis of restenoses, to preventing of negative remodeling of arteries, stimulation of vessels growth under the ischemic diseases and suppression of angiogenesis under oncologic diseases.

Key words: urokinase, migration, proliferation, remodeling of arteries, angiogenesis.

- Astrup T., Sterndorff I. // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1952. – **81**, N 3. – P. 675–678.
- Kaulla K. // J. Lab. Clin. Med. – 1954. – **44**. – P. 944–946.
- Ploug J., Kjeldgaard N. // Arch. Biochem. Biophys. – 1956. – **62**, N 2. – P. 500–511.
- Schultz R., Von Kaulla Kn. // Biochem. J. – 1958. – **68**, N 2. – P. 218–221.
- Парфенова Е. В., Плеханова О. С., Ткачук В. А. // Биохимия. – 2002. – **67**, № 1. – С. 119–134.
- Clowes A. W., Clowes M. M., Au Y. P. et al. // Circ. Res. – 1990. – **67**. – P. 61–67.
- Tkachuk V., Stepanova V., Little P. J. et al. // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. – 1996. – **23**. – P. 759–765.
- Lijnen H. R., Van Hoef B., Nelles L. et al. // J. Biol. Chem. . – 1990. – **265**. – P. 5232–5236.
- Kuzuya M., Iguchi A. // J. Atheroscler. Thromb. – 2003. – **10**. – P. 275–282.
- Kline T. P., Brown F. K., Brown S. C. et al. // Biochemistry. – 1990. – **29**. – P. 7805–7813.
- Mukhina S., Stepanova V., Traktouev D. et al. // J. Biol. Chem. – 2000. – **275**. – P. 16450–16458.
- Stephens R. W., Bokman A. M., Myohanen H. T. et al. // Biochemistry. – 1992. – **31**. – P. 7572–7579.
- Mimuro J., Kaneko M., Murakami T. et al. // Biochem. Biophys. Acta. – 1992. – **1160**. – P. 325–334.
- Kwak S. H., Mitra S., Bdeir K. et al. // J. Leukoc. Biol. – 2005. – **78**. – P. 937–945.
- Pluskota E., Soloviev D. A., Bdeir K. et al. // J. Biol. Chem. – 2004. – **279**. – P. 18063–18072.
- Bdeir K., Kuo A., Sachais B. S. et al. // Blood. – 2003. – **15**. – P. 3600–3608.
- McLean J. W., Tomlinson J. E., Kuang W.-J. et al. // Nature. – 1987. – **230**. – P. 132–137.
- Appella E., Robinson E. A., Ullrich S. J. // J. Biol. Chem. – 1987. – **262**. – P. 4437–4440.
- Vassalli J. D., Vaccino D., Belin D. // J. Cell Biol. – 1985. – **100**. – P. 86–92.
- Barinka C., Parry G., Callahan J. et al. // J. Mol. Biol. – 2006. – **363**. – P. 482–495.
- Magdolen V., Rettenberger P., Koppitz M. et al. // Eur. J. Biochem. – 1996. – **237**. – P. 743–751.
- Белоглазова И. Б., Бибилашвили Р. Ш., Гурский Я. Г. и др. // Биохимия. – 2013. – **78**, № 5. – С. 575–591.
- Степанова В. В., Белоглазова И. Б., Гурский Я. Г. и др. // Биохимия. – 2008. – **73**. – С. 311–321.
- Kjaergaard M., Hansen L. V., Jacobsen B. et al. // Front. Biosci. – 2008. – **13**. – P. 5441–5461.
- Xu X., Gerdsvoll H., Yuan C. et al. // J. Mol. Biol. – 2012. – **416**, N 5. – P. 629–641.
- Cubellis M. V., Nolli M. L., Cassani G. et al. // J. Biol. Chem. – 1986. – **261**. – P. 15819–15822.
- Poliakov A., Tkachuk V., Ovchinnikova T. et al. // Biochem. J. – 2001. – **355**. – P. 639–645.
- Sitrin R. G., Pan P. M., Harper H. A. et al. // J. Immunol. – 2000. – **165**. – P. 3341–3349.
- Ghosh S., Brown R., Jones J. C. et al. // J. Biol. Chem. – 2000. – **275**. – P. 23869–23876.
- May A. E., Kanse S. M., Lund L. R. et al. // J. Exp. Med. – 1998. – **188**. – P. 1029–1037.
- Парфенова Е. В., Плеханова О. С., Меньшиков М. Ю. и др. // Рос. физиол. журн. – 2009. – **95**, № 5. – С. 442–464.
- Stepanova V., Lebedeva T., Kuo A. et al. // Blood. – 2008. – **112**. – P. 100–110.
- Conese M., Nykjaer A., Petersen C. M. // J. Cell Biol. – 1995. – **131**. – P. 1609–1622.
- Nykjaer A., Conese M., Christensen E. I. // EMBO J. – 1997. – **16**. – P. 2610–2620.
- Gotthardt M., Trommsdorff M., Nevitt M. F. // J. Biol. Chem. – 2000. – **275**. – P. 25616–25624.

36. Binder B. R., Mihaly J., Prager G. W. // *Thromb. Haemost.* – 2007. – **97**, N 3. – P. 336–342.
37. Resnati M., Guttinger M., Valcamonica S. et al. // *EMBO J.* – 1996. – **15**. – P. 1572–1582.
38. Goretzki L., Mueller B. M. // *Biochem. J.* – 1998. – **336**, Pt2. – P. 381–386.
39. Goncharova E. A., Vorotnikov A. V., Gracheva E. O. et al. // *Biol. Chem.* – 2002. – **383**. – P. 115–126.
40. Tang H., Kerins D. M., Hao Q. et al. // *J. Biol. Chem.* – 1998. – **273**. – P. 18268–18272.
41. Tarui T., Andronicos N., Czekay R. P. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2003. – **278**, N 32. – P. 29863–29872.
42. Reinartz J., Schafer B., Batrla R. et al. // *Exp. Cell Res.* – 1995. – **220**. – P. 274–282.
43. Wei Y., Lukashev M., Simon D. I. et al. // *Science.* – 1996. – **273**. – P. 1551–1555.
44. Xue W., Mizukami I., Todd R. F. 3rd. et al. // *Cancer Res.* – 1997. – **57**. – P. 1682–1689.
45. Yebra M., Goretzki L., Pfeifer M. et al. // *Exp. Cell Res.* – 1999. – **250**. – P. 231–240.
46. Nguyen D. H., Catling A. D., Webb D. J et al. // *J. Cell Biol.* – 1999. – **146**. – P. 149–164.
47. Wei Y., Eble J. A., Wang Z. et al. // *Mol. Biol. Cell.* – 2001. – **12**. – P. 2975–2986.
48. Zhang F., Tom C. C., Kugler M. C. et al. // *J. Cell Biol.* – 2003. – **163**. – P. 177–188.
49. Ragno P. // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2006. – **63**. – P. 1028–1037.
50. Bohuslav J., Horejsi V., Hansmann C. et al. // *J. Exp. Med.* – 1995. – **181**. – P. 1381–1390.
51. Simon D. I., Wei Y., Zhang L. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2000. – **275**. – P. 10228–10234.
52. Dumler I., Stepanova V., Jerke U. // *Curr. Biol.* – 1999. – **9**. – P. 1468–1476.
53. Behrendt N. // *Biol Chem.* – 2004. – **385**, N 2. – P. 103–136.
54. Gerdsvoll H., Gilquin B., Le Du. M. H. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2006. – **281**, N 28. – P. 19260–19272.
55. Stepanova V., Bobik A., Bibilashvily R. et al. // *FEBS Lett.* – 1997. – **414**, N 2. – P. 471–474.
56. Poliakov A. A., Mukhina S. A., Traktouev D. O. et al. // *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* – 1999. – **19**, N 6. – P. 939–951.
57. Lillis A. P., Mikhailenko I., Strickland D. K. // *J. Thromb. Haemost.* – 2005. – **3**, N 8. – P. 1884–1893.
58. Kapustin A., Stepanova V., Aniol N. et al. // *Biochem. J.* – 2012. – **443**, N 2. – P. 491–503.
59. Budatha M., Roshanravan S., Zheng Q. et al. // *J. Clin. Invest.* – 2011. – **121**, N 5. – P. 2048–2059.
60. Wan W., Yanagisawa H., Gleason R. L. Jr. // *Ann. Biomed. Eng.* – 2010. – **38**, N 12. – P. 3605–3617.
61. Schluterman M. K., Chapman S. L., Korpany G. et al. // *Dis. Model. Mech.* – 2010. – **3**, N 5–6. – P. 333–342.
62. Yanagisawa H., Schluterman M. K., Brecken R. A. // *J. Cell. Commun. Signal.* – 2009. – **3**, N 3–4. – P. 337–347.
63. Tarui T., Akakura N., Majumdar M. et al. // *Thromb. Haemost.* – 2006. – **95**, N 3. – P. 524–534.
64. Carriero M. V., Franco P., Votta G. et al. // *Curr. Drug Targets.* – 2011. – **12**, N 12. – P. 1761–1771.
65. Takada Y. // *J. Biomed. Biotechnol.* – 2012. – P. 136302.
66. Stephens R. W., Pöllänen J., Tapiovaara H. et al. // *J. Cell Biol.* – 1989. – **108**. – P. 1987–1995.
67. Félez J. // *Fibrinolysis Proteolysis.* – 1998. – **12**. – P. 183–189.
68. Chapman H. A. // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 1997. – **9**. – P. 714–724.
69. Lijnen H. R., Maquoi E., Hansen L. B. et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2002. – **22**. – P. 374–379.
70. Меньшиков М. Ю., Елизарова Е. П., Кудряшова Е. А. и др. // *Биохимия.* – 2001. – **66**, № 9. – С. 954–959.
71. Menshikov M., Elizarova E., Plakida K. et al. // *Biochem. J.* – 2002. – **367**. – P. 833–839.
72. Menshikov M., Torosyan N., Elizarova E. et al. // *J. Vasc. Res.* – 2006. – **43**, N 5. – P. 482–490.
73. Naldini L., Tamagnone L., Vigna E. et al. // *EMBO J.* – 1992. – **11**. – P. 4825–4833.
74. Plouët J., Moro F., Bertagnolli S. et al. // *J. Biol. Chem.* – 1997. – **272**. – P. 13390–13396.
75. Sato Y., Rifkin D. B. // *J. Cell Biol.* – 1989. – **109**. – P. 309–315.
76. Pendurthi U. R., Tran T. T., Post M. et al. // *Cancer Res.* – 2005. – **65**. – P. 9705–9711.
77. Odekon L. E., Sato Y., Rifkin D. B. // *J. Cell Physiol.* – 1992. – **150**. – P. 258–263.
78. Okada S. S., Grobmyer S. R., Barnathan E. S. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 1996. – **16**. – P. 1269–1276.
79. Busso N., Masur S.K., Lazega D. // *J. Cell Biol.* – 1994. – **126**. – P. 259–270.
80. Resnati M., Pallavicini I., Wang J. M. et al. // *PNAS* – 2002. – **99**. – P. 1359–1364.
81. Kiyon J., Kiyon R., Haller H. et al. // *EMBO J.* – 2005. – **24**. – P. 1787–1797.
82. Jo M., Thomas K. S., O'Donnell D. M. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2003. – **278**. – P. 1642–1646.

83. Roztocil E., Nicholl S. M., Davies M. G. // *J. Surg. Res.* – 2007. – **141**. – P. 83–90.
84. Ossowski L., Aguirre Ghiso J., Liu D. et al. // *Medicina (B Aires)*. – 1999. – **59**. – P. 547–552.
85. Dumler I., Weis A., Mayboroda O.A. et al. // *J. Biol. Chem.* – 1998. – **273**. – P. 315–321.
86. Koshelnick Y., Ehart M., Hufnagl P. et al. // *J. Biol. Chem.* – 1997. – **272**. – P. 28563–28567.
87. Frame M. C., Fincham V. J., Carragher N. O. et al. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2002. – **3**. – P. 233–245.
88. Parsons J. T., Martin K. H., Slack J. K. et al. // *Oncogene* – 2000. – **19**. – P. 5606–5613.
89. Slack J. K., Adams R. B., Rovin J. D. et al. // *Oncogene* – 2001. – **20**. – P. 1152–1163.
90. Fazjoli F., Resnati M., Sidenius N. et al. // *EMBO J.* – 1997. – **16**. – P. 7279–7286.
91. Kjølner L., Hall A. // *J. Cell Biol.* – 2001. – **152**. – P. 1145–1157.
92. Willnow T. E., Nykjaer A., Herz J. // *Nat. Cell Biol.* – 1999. – **1**. – P. 157–162.
93. Ma Z., Thomas K.S., Webb D. J. et al. // *J. Cell Biol.* – 2002. – **159**. – P. 1061–1070.
94. Bajou K., Masson V., Gerard R. D. et al. // *J. Cell Biol.* – 2001. – **152**. – P. 777–784.
95. Alexander R. A., Prager G. W., Mihaly-Bison J. et al. // *Cardiovasc. Res.* – 2012. – **94**, N 1. – P. 125–135.
96. Kirchheimer J. C., Wojta J., Christ G. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1989. – **86**. – P. 5424–5428.
97. Kirchheimer J. C., Wojta J., Christ G. et al. // *Carcinogenesis*. – 1988. – **9**. – P. 2121–2123.
98. Aguirre-Ghiso J. A., Liu D., Mignatti A. et al. // *Mol. Biol. Cell.* – 2001. – **12**. – P. 863–879.
99. Gyetko M. R., Sud S., Chen G. H. et al. // *J. Immunol.* – 2002. – **168**. – P. 801–809.
100. Rabbani S. A., Desjardins J., Bell A. W. et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1990. – **173**. – P. 1058–1064.
101. Koopman J. L., Slomp J., Anton C. W. et al. // *J. Biol. Chem.* – 1998. – **273**. – P. 33267–33272.
102. Arens N., Gandhari M., Bleyl U. et al. // *Int. J. Oncol.* – 2005. – **26**. – P. 113–119.
103. Gandhari M., Arens N., Majety M. et al. // *Int. J. Oncol.* – 2006. – **28**. – P. 1463–1470.
104. Rabbani S. A., Mazar A. P., Bernier S. M. et al. // *J. Biol. Chem.* – 1992. – **267**. – P. 14151–14156.
105. Kanse S. M., Benzakour O., Kanthou C. et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 1997. – **17**. – P. 2848–2854.
106. Khwaja A., Rodriguez-Viciano P., Wennstrom S. et al. // *EMBO J.* – 1997. – **16**. – P. 2783–2793.
107. Gutierrez L. S., Schulman A., Brito-Robinson T. et al. // *Cancer Res.* – 2000. – **60**. – P. 5839–5847.
108. Ma Z., Webb D. J., Jo M., Gonias S. L. // *J. Cell Sci.* – 2001. – **114**. – P. 3387–3396.
109. Bonni A., Brunet A., West A. E. et al. // *Science*. – 1999. – **286**. – P. 1358–1362.
110. Wick W., Wagner S., Kerkau S. et al. // *FEBS Lett.* – 1998. – **440**. – P. 419–424.
111. Barnhart B. C., Legembre P., Pietras E. et al. // *EMBO J.* – 2004. – **23**. – P. 3175–3185.
112. Alfano D., Iaccarino I., Stoppelli M. P. // *J. Biol. Chem.* – 2006. – **281**. – P. 17758–17767.
113. Almholt K., Lund L. R., Rygaard J. et al. // *Int. J. Cancer*. – 2005. – **113**. – P. 525–532.
114. Stepanova V., Mukhina S., Köhler E. et al. // *Mol. Cell Biochem.* – 1999. – **195**, N 1–2. – P. 199–206.
115. Menshikov M., Plekhanova O., Cai H. et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2006. – **26**. – P. 801–807.
116. Nichols W. W. // *Am. J. Hypertens.* – 2005. – **18**, N 1, Pt2. – P. 3S–10S.
117. Bhoday J., de Silva S., Xu Q. // *Curr. Vasc. Pharmacol.* – 2006. – **4**. – P. 269–275.
118. Парфенова Е. В., Ткачук В. А. // *Вопросы мед. химии*. – 2000. – **46**, № 3. – С. 293–310.
119. Strauss B. H., Lau H. K., Bowman K. A. et al. // *Circulation*. – 1999. – **100**, N 15. – P. 1616–1622.
120. Ткачук В. А., Библашвили Р.Ш., Плеханова О. С. и др. / Сб. трудов к 80-летию академика Е. И. Чазова. «Сердечно-сосудистая патология. Современное состояние проблемы». – М.: Медиа-Медика, 2009. – 364 с.
121. Krasnikova T. L., Parfyonova Y. V., Alekseeva I. A. et al. // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 1999. – **26**, N 4. – P. 354–357.
122. Соломатина М. А., Плеханова О. С., Ильинская О. П. и др. // *Цитология*. – 2004. – **46**, № 4. – С.352–360.
123. Falkenberg M., Tom C., DeYoung M. B. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – **99**, N 16. – P. 10665–10670.
124. Kienast J., Padry T., Steins M. et al. // *Thromb. Haemost.* – 1998. – **79**, N 3. – P. 579–586.
125. Cozen A. E., Moriwaki H., Kremen M. et al. // *Circulation*. – 2004. – **109**, N 17. – P. 2129–2135.
126. Saksela O., Rifkin D. B. // *J Cell Biol.* – 1990. – **110**, N 3. – P. 767–775.
127. Hildenbrand R., Jansen C., Wolf G. et al. // *Lab. Invest.* – 1998. – **78**, N 1. – P. 59–71.
128. Ikeda U. // *Curr. Vasc. Pharmacol.* – 2003. – **1**, N 1. – P. 65–70.

129. Nakatani M., Takeyama Y., Shibata M. et al. // Cardiovasc. Pathol. – 2003. – **12**, N 1. – P. 40–48.
130. Плеханова О. С., Соломатина М. А., Ратнер Е. И. и др. // Бюлл. эксп. биол. мед. – 2008. – **145**, № 1. – P. 15–20.
131. Khalil A. A., Hall J. C., Aziz F. A. et al. // ANZ. J. Surg. – 2006. – **76**, N 11. – P. 1010–1016.
132. Plekhanova O., Parfyonova Y., Bibilashvily R. et al. // Atherosclerosis. – 2001. – **159**. – P. 297–306.
133. Korshunov V. A., Solomatina M. A., Plekhanova O. S. et al. // J. Vasc. Res. – 2004. – **41**. – P. 481–490.
134. Plekhanova O. S., Parfyonova Y. V., Bibilashvily R. et al. // J. Hypertens. – 2000. – **18**. – P. 1065–1069.
135. Парфенова Е. В., Плеханова О. С., Калинина Н. И. и др. // Кардиология. – 2000. – **9**. – С. 69–77.
136. Плеханова О. С., Калинина Н. И., Вольнская Е. А. и др. // Рос. физиол. журн. – 2000. – **86**, № 1. – С. 18–27.
137. Carmeliet P., Moons L., Herbert J. M. // Circ. Res. – 1997. – **81**. – P. 829–839.
138. Kenagy R. D., Vergel S., Mattsson E. et al. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 1996. – **16**. – P. 1373–1382.
139. Carmeliet P., Moons L., Dewerchin M. // J. Cell Biol. – 1998. – **140**. – P. 233–245.
140. Parfyonova Y., Plekhanova O., Solomatina M. et al. // J. Vasc. Res. – 2004. – **41**. – P. 268–276.
141. Lansky A. J., Mintz G. S., Popma J. J. // J. Am. Coll. Cardiol. – 1998. – **32**. – P. 329–337.
142. Plekhanova O. S., Stepanova V. V., Ratner E. I. et al. // J. Vasc. Res. – 2006. – **43**. – P. 437–446.
143. Collen D. // Thromb. Haemost. – 1999. – **82**, N 2. – P. 259–270.
144. Lijnen H. R., Van Hoef B., Lupu F. et al. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 1998. – **18**, N 7. – P. 1035–1045.
145. Mason D. P., Kenagy R. D., Hasenstab D. et al. // Circ. Res. – 1999. – **85**, N 12. – P. 1179–1185.
146. Forough R., Lea H., Starcher B. et al. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 1998. – **18**, N 5. – P. 803–807.
147. Prescott M. F., Sawyer W. K., Von Linden-Reed J. et al. // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 1999. – **878**. – P. 179–190.
148. Keski-Oja J., Lohi J., Tuuttila A. et al. // Exp. Cell Res. – 1992. – **202**. – P. 471–476.
149. Плеханова О. С., Соломатина М. А., Меньшиков М. Ю. и др. // Кардиология. – 2006. – **46**, № 9. – С. 47–56.
150. Plekhanova O. S., Parfyonova Ye. V., Bashtrykov P. P. et al. // J. Vasc. Res. – 2008. – **46**, N 3. – P. 177–187.
151. Abe J., Berk B. C. // Trends Cardiovasc. Med. – 1998. – **8**. – P. 59–64.
152. Berk B. C. // Physiol. Rev. – 2001. – **81**. – P. 999–1030.
153. Sheehan A. L., Carrell S., Johnson B. et al. // Atherosclerosis. – 2011. – **216**, N 2. – P. 321–326.
154. Плеханова О. С., Меньшиков М. Ю., Баштрыков П. П. и др. // Бюлл. эксп. биол. мед. – 2006. – **142**, № 1. – С. 304–307.
155. Парфенова Е. В., Ткачук В. А. // Кардиол. вестник. – 2007. – **2**. – С. 5–15.
156. Lamalice L., Le Boeuf F., Huot J. // Circ. Res. – 2007. – **100**, N 6. – P. 782–794.
157. van Weel V., van Tongeren R. B., van Hinsbergh V. W. et al. // Ann. Vasc. Surg. – 2008. – **22**. – P. 582–597.
158. Gualandris A., Lopez C. T., Giunciuglio D. // Microvasc. Res. – 1997. – **53**. – P. 254–260.
159. Duffy M. J., Maguire T. M., McDermott E. W. et al. // J. Surg. Oncol. – 1999. – P. 130–135.
160. Arras M., Ito W.D., Scholz D. et al. // J. Clin. Invest. – 1998. – **101**. – P. 40–50.
161. Heil M., Ziegelhoeffer T., Pipp F. // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2002. – **283**. – P. H2411–H2419.
162. Deindl E., Ziegelhoeffer T., Kanse S. M. // FASEB J. – 2003. – **17**. – P. 1174–1176.
163. Basire A. // Thromb. Haemost. – 2006. – **95**, N 4. – P. 678–688.
164. Traktuev D. O., Tsokolaeva Z. I., Shevelev A. A. et al. // Mol. Ther. – 2007. – **15**, N 11. – P. 1939–1946.
165. Kroon M. // Am. J. Pathol. – 1999. – **154**, N 6. – P. 1731–1742.
166. Heymans S., Luttun A., Nuyens D. et al. // Nat. Med. – 1999. – **5**, N 10. – P. 1135–1142.
167. Ferrara N. // Endocr. Rev. – 2004. – **25**, N 4. – P. 581–611.
168. Colombo E. S., Menicucc G., McGuire P. G. et al. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2007. – **48**, N 4. – P. 1793–1800.
169. Парфенова Е. В., Цоколаева З. И., Трактюев Д. О. и др. // Мол. мед. – 2006. – **2**. – С. 10–23.
170. Franco P., Vocca I., Carriero M. V. et al. // J. Cell Sci. – 2006. – **119**, Pt 16. – P. 3424–3434.
171. Franco P., Carotenuto A., Marcozzi C. et al. // Chembiochem. – 2013. – **14**, N 7. – P. 882–889.
172. Kim K., Hong Y., Lee Y. et al. // Exp. Mol. Med. – 2003. – **35**, N 6. – P. 578–585.