

УДК 612.821

ОТРАЖЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ СЕРДЕЧНОГО РИТМА В ПРОТЕОМЕ МОЧИ ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ МОЛОДЫХ МУЖЧИН

© 2020 г. В. Б. Русанов^{1,*}, Л. Х. Пастушкова¹, А. Г. Гончарова¹,
А. Г. Черникова¹, А. М. Носовский¹, О. В. Сайк², Д. Н. Каширина¹,
А. Г. Бржзовский¹, А. С. Кононихин^{1,3}, А. Г. Любишева^{1,4}, И. М. Ларина¹

¹ФГБУН ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

²Учреждение СО РАН Институт цитологии и генетики РАН, Новосибирск, Россия

³Сколковский институт науки и технологий, Сколково, Россия

⁴ФГАОУ Первый московский государственный университет
имени И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия

*E-mail: vasilyrusanov@gmail.com

Поступила в редакцию 06.03.2019 г.

После доработки 30.09.2019 г.

Принята к публикации 04.12.2019 г.

У практически здоровых мужчин (возраст 28 ± 4 лет, рост 174 ± 1 см, вес 67.9 ± 1.5 кг) проведен хро-мато-масс-спектрометрический анализ мочи и анализ вариабельности сердечного ритма. На основе математического и биоинформационного анализа из общей совокупности выделены белки, ассоциированные с состоянием сердечно-сосудистой системы и вегетативной регуляцией ритма сердца (серотрансферрин, тирозинкиназный рецептор UFO, простатическая кислая фосфатаза, секретир-уемый и трансмембранный белок 1, молекула клеточной адгезии 4, галектин-3-связывающий белок, константный домен тяжелой цепи иммуноглобулина А, белок ассоциированный с ремоде-лированием матрикса 8, биотинидаза). Впервые выстроены ассоциативные связи между белками — маркерами процесса вегетативной регуляции сердечного ритма. На основе протеомики представле-ны новые данные отражающие особенности физиологической регуляции сердечного ритма в про-теоме мочи практически здоровых молодых мужчин.

Ключевые слова: протеом мочи, вегетативная регуляция сердечного ритма, физиология сердечного ритма, практически здоровые мужчины.

DOI: 10.31857/S0131164620020150

Молекулярный уровень физиологической ре-гуляции сердечного ритма отражает интегрирую-щие эффекты многоуровневой иерархически ор-ганизованной системы управления функциями организма. Изучение белков-маркеров, ассоции-рованных с ними путей передачи сигналов и их мишеней, дает новое понимание базовых фунда-ментальных процессов и закладывает основу для новых терапевтических возможностей профилак-тики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний. В связи с этим, протеомные исследования, выполненные с использованием данных практи-чески здоровых лиц молодого возраста в однород-ной, по особенностям физиологической регуля-ции сердечного ритма группе, являются уникаль-ной моделью исследования физиологических белковых путей регуляции. Поскольку автоном-ные и гуморальные регуляторные механизмы имеют определяющее значение в поддержании

функционального состояния организма в про-цессе физиологической адаптации, представля-ется важным выяснить, каким образом вегетатив-ная регуляция ритма сердца может находить свое отражение в протеомном составе биологических жидкостей организма, мочи в частности.

Актуальность поиска протеомных маркеров нормальной физиологической регуляции ритма сердца определяется “омоложением” сроков воз-никновения сердечно-сосудистых заболеваний и необходимостью поиска неинвазивных маркеров донозологической диагностики состояния сер-дечно-сосудистой системы у лиц трудоспособно-го возраста.

МЕТОДИКА

Поиск протеомных маркеров вегетативной ре-гуляции сердечного ритма выполняли у 13 муж-

чин (возраст 28 ± 4 лет, рост 174 ± 1.0 см, вес 67.9 ± 1.5 кг; $M \pm m$) — здоровых добровольцев, прошедших полное клиническое обследование. Регистрацию электрокардиограммы (ЭКГ) осуществляли перед взятием проб мочи в положении сидя, в покое после 15-минутного отдыха. Анализ variability сердечного ритма (ВСР) проводили по 5-минутным участкам записи ЭКГ. Исследование ВСР и расчет показателей для оценки состояния механизмов регуляции кровообращения осуществляли на основе рекомендаций, разработанных Европейским кардиологическим и Северо-Американским электрофизиологическим Обществами, а также Российскими рекомендациями анализа ВСР [1, 2]. Для регистрации использовали прибор “Карди-2” (ООО “Медицинские компьютерные системы”, Россия). Для обработки полученного массива длительностей кардиоинтервалов использовали программное обеспечение “Иским-6” (ООО “Институт внедрения новых медицинских технологий “Рамена”, Россия).

Вычисляли значения показателей, характеризующие вегетативную регуляцию сердечного ритма:

HR (уд./мин) — частота сердечных сокращений, отражает средний уровень функционирования системы кровообращения.

MxDMn (мс) — разность между максимальным и минимальным значениями кардиоинтервалов, отражает максимальную амплитуду регуляторных влияний.

RMSSD (мс) — квадратный корень из среднего значения суммы квадратов разностей между соседними кардиоинтервалами.

pNN50 (%) — число пар кардиоинтервалов с разностью более 50 мс, в % к общему числу кардиоинтервалов в массиве, показатель степени преобладания парасимпатического звена регуляции над симпатическим.

SDNN (мс) — стандартное отклонение полного массива кардиоинтервалов, суммарный эффект действия регуляторных систем.

CV (%) — коэффициент вариации последовательности кардиоинтервалов, нормированный показатель суммарного эффекта регуляции.

Mo (мс) — мода, наиболее часто встречающееся значения кардиоинтервала, наиболее вероятный уровень функционирования сердечно-сосудистой системы.

AMo (%) — амплитуда моды, соответствует максимальному значению функции распределения длительности кардиоинтервалов, условный показатель активности симпатического звена регуляции.

CC1 (y. e.) — значение первого коэффициента автокорреляционной функции, показатель, ха-

рактеризующий преобладание автономного или центрального контура регуляции.

SI (y. e.) — стресс индекс, индекс напряжения регуляторных систем, характеризует степень преобладания активности центральных механизмов регуляции над автономными.

Power HF (%) — мощность спектра высокочастотного компонента ВСР от суммарной мощности колебаний, относительный уровень активности парасимпатического звена регуляции.

Power LF (%) — мощность спектра низкочастотного компонента ВСР от суммарной мощности колебаний, относительный уровень активности подкоркового вазомоторного центра.

Power VLF (%) — мощность спектра очень низкочастотного компонента ВСР от суммарной мощности колебаний, относительный уровень активности симпатического звена регуляции.

LF/HF (y. e.) — соотношение мощности высокочастотных и низкочастотных волн спектра, показатель, характеризующий баланс симпатических и парасимпатических влияний и относительную активность подкоркового симпатического центра.

IC (y. e.) — индекс централизации, отражает степень централизации управления ритмом сердца и преобладание активности центрального контура регуляции над автономным.

ПАРС (y. e.) — показатель активности регуляторных систем, интегральный критерий успешности адаптации.

В соответствии с требованиями EuroKUP и HKUPP использовали стандартизированный протокол сбора мочи для анализа протеома. В соответствии с этим протоколом для протеомного анализа мочи использовали среднюю порцию второй утренней фракции (после завтрака) [3]. Образцы мочи подвергали пробоподготовке, состоящей из этапов восстановления, алкилирования, осаждения белка и протеолиза с использованием трипсина.

Для полуколичественного анализа полученной полипептидной смеси использовали методологию short-gun протеомики. Смесь разделяли при помощи жидкостной хроматографии с использованием прибора *Agilent 1100* (*Agilent Technologies Inc.*, США) в трех повторах и анализировали на гибридном масс-спектрометре *LTQ-FT Ultra* (*Thermo*, Германия), ионного циклотронного резонанса, совмещенном с линейной квадрупольной ионной ловушкой. Для хроматографии использовали колонку с обращенной фазой *Repro Sil-Pur C18* (диаметр частиц 3 мкм, диаметр пор 100 Å) (*Dr. Maisch GmbH*, Германия), изготовленную с использованием капилляра-эммитера *Pico-tip* (*New Objective Inc.*, США).

Таблица 1. Показатели ВСП, характеризующие вегетативную регуляцию ритма сердца у исследуемого контингента

Показатели	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль	Норматив
HR, уд./мин	81.0	69.0	88.0	56–83
MxDMn, мс	443.0	280.0	520.0	150–300
RMSSD, мс	57.5	38.0	63.9	35–65
pNN50, %	21.5	9.9	26.4	10–49
SDNN, мс	80.0	66.0	94.0	40–80
CV, %	9.8	8.6	10.9	4.5–7
Mo, мс	755.0	678.0	910.0	720–1080
Amo, %	38.5	30.1	48.2	30–50
SI, у. е.	62.0	38.0	119.0	50–200
Power HF, %	26.6	20.1	31.7	15–35
Power LF, %	51.9	48.0	57.3	15–25
Power VLF, %	21.3	7.6	31.5	15–45
LF/HF, у. е.	3.9	3.4	4.4	0.5–2
IC, у. е.	5.4	4.4	7.8	1–2
ПАРС, у. е.	6.0	5.0	6.0	1–5

Примечание: норматив представлен согласно методическим рекомендациям <https://www.medprof.org>.

Результаты масс-спектрометрического анализа смеси пептидов анализировали программой *Xcalibur* (*Thermo Electron*, Германия) в 2-х стадийном режиме. С помощью программы *Max Quant* проводили идентификацию белков по базе данных *Swiss Prot*. Дальнейшему анализу подвергали только белки, которые идентифицировали минимум по 2 пептидным фрагментам, причем один из них должен был быть уникальным для данного белка.

Для статистического анализа применяли метод главных компонент [4], а для определения молекулярных функций и биологических процессов с участием выявленных белков использовали программный пакет *Perseus*. Реконструкцию ассоциативных генных сетей осуществляли программой *AND System*.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В норме сердечный ритм является результатом влияний различных регуляторных механизмов на ритмическую активность синусового узла, гуморальных и рефлекторных воздействий, т.е. комплекса надсистем, работающих взаимосвязанно и согласованно [5–7]. Поскольку показатели ВСП отражают состояние механизмов регуляции и так же, как и белки протеома мочи, генетические свойства организма и внешние влияния на него, то и молекулярный уровень физиологической регуляции сердечного ритма отражается в протеоме жидкостей тела, в нашем исследовании – в протеоме мочи. После хромато-масс-спектрометри-

ческого анализа всех образцов мочи 13 молодых здоровых добровольцев было идентифицировано 256 различных белков (по номенклатуре *Uni Prot KB*).

Экспериментальная группа являлась однородной не только по формальным признакам (пол, возраст, антропометрические и медицинские критерии), но и по особенностям физиологической регуляции сердечного ритма. Это иллюстрируется значениями показателей ВСП и их разбросом (табл. 1). По сравнению с известными нормативами (<https://www.medprof.org>), диапазон значений показателей, характеризовал высокий уровень активности обоих отделов вегетативной нервной системы. Как видно из табл. 1, в экспериментальной группе, повышен уровень как симпатической (HR, LF, LF/HF) так и парасимпатической активности (RMSSD, pNN50) при сниженном уровне нейро-гуморальной регуляции (VLF). Высокий уровень ВСП (MxDMn, SDNN, CV) характеризует высокий энергетический ресурс организма, что, связано с особенностями вегетативной регуляции, характерными для практически здоровых лиц молодого возраста [8–11].

Для понимания того, как формируются физиологические реакции, была сделана попытка перебросить концептуальные и функциональные мостики “от белков к клеткам, далее к органам, и системам организма” [12], поэтому был проведен корреляционный анализ данных хромато-масс-спектрометрического анализа протеома мочи и показателей ВСП.

С помощью программы *Statistica 10*. Из общего списка было выявлено 9 белков, отражающих регуляторные влияния на ритм сердца и достоверно

Таблица 2. Корреляционные взаимоотношения между белками протеома мочи и показателями вегетативной регуляции сердечного ритма у исследуемого контингента

Показатели	RMSSD	CCI	Mo	AMo	LF/HF	CV	ПАРС
<i>TRFE</i>	0.7	—	—	—	—	—	—
<i>AXL</i>	—	—	—	—	—	0.7	—
<i>SECTM1</i>	—	—	0.7	—	—	—	—
<i>ACPP</i>	—	–0.7	—	—	—	—	—
<i>MXRA8</i>	—	—	—	0.7	—	—	—
<i>CADM4</i>	—	—	—	—	0.8	—	—
<i>IGHA1</i>	—	—	—	—	—	—	0.8
<i>LGALS3BP</i>	—	—	—	—	—	—	0.8
<i>BTB</i>	—	—	—	—	—	—	0.7

связанных ($p < 0.05$) с некоторыми показателями ВСП (табл. 2). Среди этих показателей: RMSSD — показатель активности парасимпатического звена вегетативной регуляции; CCI — показатель, характеризующий преобладание автономного или центрального контура регуляции; Mo — условный показатель активности симпатического звена регуляции; LF/HF — показатель, характеризующий баланс симпатических и парасимпатических влияний; CV — нормированный показатель суммарного эффекта регуляции; ПАРС — показатель активности регуляторных систем.

Следуя поисково-теоретическому направлению исследования, было целесообразно привести краткую аннотацию этих белков. Описывая их применительно к процессу регуляции сердечного ритма у практически здоровых молодых мужчин, мы остановились на ключевых моментах, отражающих процессы, модулирующие влияние регуляторных механизмов на ритм сердца.

К белкам, коррелирующим с показателями, отражающими преимущественно парасимпатическую вегетативную регуляцию, среди выявленной когорты протеинов, относятся: серотрансферрин, тирозинкиназный рецептор UFO, простатическая кислая фосфатаза, секретируемый и трансмембранный белок 1.

Серотрансферрин (кодированный геном *TRFE*) — гликопротеин плазмы крови, синтезируется в печени. Изучение метаболизма серотрансферрина важно при изучении патогенеза сосудистых заболеваний [13]. Отмечена связь повреждения эндотелия с нарушением реологических свойств крови и серотрансферрином [14]. Серотрансферрин, α -цепь фибриногена, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, сывороточный альбумин, трансгелин-2, кальпонин-2/LIM и домен белка 1 SH3 и хорионический гонадотропин человека тромбозитарного генеза — достоверно более экспрессированы у здоровых детей по сравнению со взрослыми [15]. Полученные нами данные об участии серотрансферрина в регуляции сердечного ритма

дают новое понимание возрастной физиологии сердца и сосудов, реологии крови и ассоциированным с тромбоцитарным звеном состоянием сердечно-сосудистой системы здоровых людей.

Тирозинкиназный рецептор UFO (кодированный геном *AXL*) экспрессируется в основном в эндотелии, и, вместе с Tyro-3 и Mer, составляет семейство TAM — тирозинкиназных рецепторов. UFO преобразует сигналы, поступающие от внеклеточного матрикса в цитоплазму, путем связывания фактора роста Gas6, и, таким образом, регулирует многие физиологические процессы. Путь Gas6/Axl регуляцией сигнального пути PI3K/Akt/mTOR изменяет процессы пролиферации, миграции, инвазии и образованию трубок эндотелиальных клеток [16]. Передача сигналов Gas6/Axl необходима для задержки процесса клеточного старения, регулируемого сигнальным путем PI3K/Akt/FoxO [17]. Показано, что сигнализация Gas6/UFO играет важную роль в выживании эндотелиальных клеток при ацидозе [18]. Данный рецептор принимает участие в регуляции ангиогенеза. Установлена потенциальная роль системы Gas6-Axl в патофизиологии ремоделирования левого желудочка, что свидетельствует об участии данного белка в регуляции ВСП [19]. Axl стимулирует передачу сигналов STAT1 (член семейства транскрипционных факторов преобразователей сигналов и активаторов транскрипции) посредством ингибирования SOCS1 (супрессоры цитокиновой сигнализации) в активированных гладкомышечных клетках при ремоделировании венозного трансплантата [20]. Также как *M. Battle et al.*, мы полагаем, что sAXL может участвовать в новом молекулярном пути, вовлеченном в ремоделирование миокарда, независимо от BNP [21].

Секретируемый и трансмембранный белок 1 (кодированный геном *SECTM1*) — является молекулой суперсемейства иммуноглобулинов, экспрессируемой на Т-, NK-клетках и пре-В-лимфоцитах. Предыдущие исследования продемонстрировали роль CD7 в активации Т- и NK-клеток и

продукции цитокинов. Недавно секретируемый эпителиальными клетками белок SECTM1, был идентифицирован как лиганд CD7 [22]. SECTM1 экспрессируется в эндотелиальных клетках костного мозга человека, и его экспрессия может повышаться с помощью IFN- γ . Клетки KG1a демонстрировали высокие уровни экспрессии CD7 и фактора транскрипции ETS-1, позволяя конститутивную передачу сигналов через путь PI3K/Atk для стимуляции экспрессии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), тогда как клетки KG1 с низкой экспрессией CD7 и ETS-1 демонстрировали низкую экспрессию GM-CSF. На клетках KG1a экспрессия GM-CSF может отрицательно регулироваться ингибиторами PI3K или рекомбинантным SECTM1-Fc. Сверхэкспрессия CD7 в клетках KG1 была недостаточной для стимуляции экспрессии GM-CSF, тогда как сайленсинг CD7 или ETS-1 приводил к снижению уровней экспрессии GM-CSF. Способные к дифференцировке клетки KG1a, сверхэкспрессирующие протеинкиназу C β 2 (PKC β 2), иллюстрировали полную потерю CD7, но сохраняли нормальные уровни экспрессии как ETS-1, так и GM-CSF. Эти данные добавляют дополнительную информацию к ранее описанной аутокринной и паракринной передаче сигналов [23, 24].

Простатическая кислая фосфатаза (кодируемая геном *ACP*) — неспецифическая тирозинфосфатаза катализирует гидролиз сложных эфиров фосфорной кислоты и органических соединений. Этот лизосомальный фермент содержится практически во всех тканях. Самая высокая концентрация отмечается в предстательной железе (простатическая фракция), в печени, селезенке, эритроцитах (внелизосомальная локализация), тромбоцитах, костном мозге. Высокая активность кислой фосфатазы отмечается в макрофагах и остеокластах [25]. Применительно к задачам данного исследования и выявленной корреляции с парасимпатической регуляцией сердечного ритма важно, что ACP генерирует аденозин из AMP, который действует как анальгетик и опосредовано влияет на парасимпатическую активность.

Среди белков, коррелирующих преимущественно с показателями, отражающими симпатическую вегетативную регуляцию, в нашем исследовании выделены: молекулы клеточной адгезии 4, галектин-3-связывающий белок, константный домен тяжелой цепи иммуноглобулина A, белок ассоциированный с ремоделированием матрикса 8, биотинидаза.

Молекула клеточной адгезии 4 (кодируемая геном *CADM4*) — относится к мембранным белкам. Cadms или Necls представляют собой нектины и нектиноподобные молекулы, являются Ca^{2+} -за-

висимыми молекулами адгезии клеток суперсемейства иммуноглобулинов, экспрессирующиеся в большинстве типов клеток. Нектины опосредуют не только гомотипическую, но и гетеротипическую клеточную адгезию, в отличие от классических кадгеринов, которые участвуют только в гомофильной адгезии. Участие Necls в органогенезе органов чувств: глаза, внутреннего уха, и коры головного мозга, а также в различных процессах развития, включая образование синапсов, аксонов и миелинизацию, помогает понять связующую роль молекул клеточной адгезии в реализации передачи нервного импульса и особенностей его эффекта [26]. Указана роль этого белка в формировании структур сердца [27].

Галектин-3-связывающий белок (кодируемый геном *LGALS3BP*) является секретируемым белком, который может стимулировать межклеточную адгезию, а также регулировать межклеточную провоспалительную передачу сигналов, в том числе в макрофагах, происходящих из моноцитов человека [28–30]. Уровни Gal-3BP независимо связаны с маркерами метаболического и воспалительного ответа. Экспрессирующие галектин-3-связывающий белок субклеточные микровезикулы вовлечены в передачу информации от клетки к клетке и осуществляют регуляцию иммунитета, тромбоза и коагуляции, фокусируясь на выделенных участках клеточной мембраны (размером от 200 до 1000 нм), обычно называемых микрочастицами (MP). Число и, в частности, состав MP, по-видимому, отражают состояние их родительских клеток. Поэтому MP могут иметь большой потенциал в качестве клинических биомаркеров исследуемых протеомикой. Этот белок может выступать в качестве маркера “патогенных” субклеточных микровезикул [31]. С другой стороны, он связан с “жесткостью” сосудов, так как высоко экспрессируется в атеросклеротических бляшках [32] и опосредованно влияет на сердечный ритм.

Константный домен тяжелой цепи иммуноглобулина A (кодируемый геном *IGHA1*) — является мембраносвязанным или секретируемым гликопротеином, продуцируемым В-лимфоцитами. Доказана связь IGHA1 с наличием основных факторов, определяющих “жесткость и эластичность” сосудистой стенки и хроническими сосудистыми заболеваниями. Белками, ассоциированными с атеросклерозом, являются: константный домен тяжелой цепи иммуноглобулина A (IGHA1), сывороточный амилоид A1 (SAA), и четыре белка каскада комплемента: фактор комплемента B (CFAB), комплемент C2 (CO2), комплемент C3 (CO3) и комплемент C1s субкомпонент (C1S), которые могут рассматриваться в качестве биомаркеров риска сердечно-сосудистых заболеваний [33]. Эти же белки вошли в число 43 белков, идентифицированных при хронической це-

реберальной ишемии [34]. Константный домен тяжелой цепи иммуноглобулина А и еще семь белков идентифицированы и коррелируют с наличием диабетической ангиопатии, застойной сердечной недостаточностью, гипертонией, тяжестью, длительностью существования язвенного процесса при хронической венозной недостаточности и возрастом пациента [35]. Данные работы и наши исследования позволяют предположить, что константный домен тяжелой цепи иммуноглобулина А может являться основным белком, влияющим на жесткость и эластичность артерий, вен и сердечной мышцы, опосредуя особенности сердечного сокращения в соответствии с ригидностью сосудистой стенки.

Белок ассоциированный с ремоделированием матрикса 8 (кодируемый геном *MXRA8*) — этот белок путем посредников связан с белками клеточной адгезии, в том числе, обеспечивая нормальную проницаемость на тканевом уровне [36]. *MXRA8* неразрывно связан с нормальной функцией гематоэнцефалического барьера и может рассматриваться как маркер целостности гематоэнцефалического и тканевого барьера [37].

Биотинидаза (кодируемая геном *BTD*) — это фермент, участвующий в обмене биотина, являющегося кофактором синтеза жирных кислот, катаболизма аминокислот и глюконеогенеза [38, 39]. Он обеспечивает каталитическое высвобождение биотина из биотина. Биотин функционирует как коэнзим для 4 карбоксилаз [39, 40]. Биотин накапливается в необычно больших количествах в клетках артериальных хеморецепторов, сонной артерии (СА) и мозгового вещества надпочечников (АМ). При дефиците биотина он быстро исчезает из крови и других тканей (включая АМ), оставаясь при относительно высоком уровне в СА. По сравнению с другими периферическими нервными тканями клетки СА содержат высокие уровни *SLC5a6*, переносчика биотина, и *SLC19a3*, переносчика тиамин, регулируемого биотином.

Таким образом, биотин играет важную роль в гомеостазе допаминергической передачи, модулирующей транспорт и хранение допамина в небольших секреторных гранулах в клетках [41]. Избирательная локализация больших концентраций биотина в артериальных хеморецепторах и сохранение его артериального депо при общем дефиците свидетельствует о эволюционно закрепившейся физиологической роли биотина как жизненно важного вещества, необходимого для нормального функционирования сердечно-сосудистой системы.

Продолжая биоинформационный этап анализа вышеописанных белков, из *Gene Ontology* был извлечен список протеинов, вовлеченных в процесс регуляции сердечного ритма. С помощью программы для автоматической экстракции дан-

ных *AND System* был выполнен поиск молекулярно-генетических взаимосвязей. Таким путем были обнаружены взаимодействия этих белков канонических процессов регуляции сердечного ритма через различных молекулярных посредников. Можно отметить, что прямых связей этих 9 белков с процессом регуляции сердечного ритма установить не удалось.

Оказалось, что белки, кодируемые генами *TRFE_HUMAN*, *ACPP_HUMAN*, *UFO_HUMAN*, *SCTM1_HUMAN*, связаны и взаимодействуют с белками, участвующими парасимпатической регуляцией, через 294 белка-посредника. Белки, кодируемые генами *BTD_HUMAN*, *LG3BP_HUMAN*, *CADM4_HUMAN*, *MXRA8_HUMAN*, *IGHA1_HUMAN*, связаны и с симпатической регуляцией, через 144 посредника. Определен список этих белков-посредников, а также сверхпредставленные биологические процессы (*Gene Ontology*), найденные с помощью сервиса *DAVID*. Таким образом, были выделены 54 достоверных биологических процесса со статистической значимостью $p\text{-value} < 0.01$ с поправкой на множественное сравнение *FDR*.

На рис. 1 вычленен один из вариантов такой связи между тирозинкиназным рецептором *UFO* и 8 белками, участвующими в процессе регуляции сердечного ритма (табл. 3) через 7 белков-посредников.

Математический и биоинформационный анализ позволил выделить из совокупности белков, ассоциированных с состоянием сердечно-сосудистой системы, которые коррелируют с ВСР, и отражают его регуляцию. Именно эта комбинация явилась предметом исследования, в том числе, применительно к поиску новых мишеней терапевтического воздействия с учетом белков-посредников данного процесса. В данном исследовании установлена достоверная связь 9 белков (серотрансферрин, тирозинкиназный рецептор *UFO*, простатическая кислая фосфатаза, секретруемый и трансмембранный белок 1, молекулы клеточной адгезии 4, галектин-3-связывающий белок, константный домен тяжелой цепи иммуноглобулина А, белок ассоциированный с ремоделированием матрикса 8, биотинидаза) с процессами, влияющими на вегетативную регуляцию ритма сердца у практически здоровых лиц в возрасте 20–30 лет. Очевидно, описанная комбинация из 9 белков обеспечивает физиологический баланс между симпатическими и парасимпатическими влияниями на сердечный ритм у молодых и здоровых обследованных.

Таким образом, эти белки можно охарактеризовать как ключевые протеомные маркеры метаболического контура регуляции ритма сердца. Поскольку в анализируемой выборке молодых здоровых добровольцев отсутствуют признаки

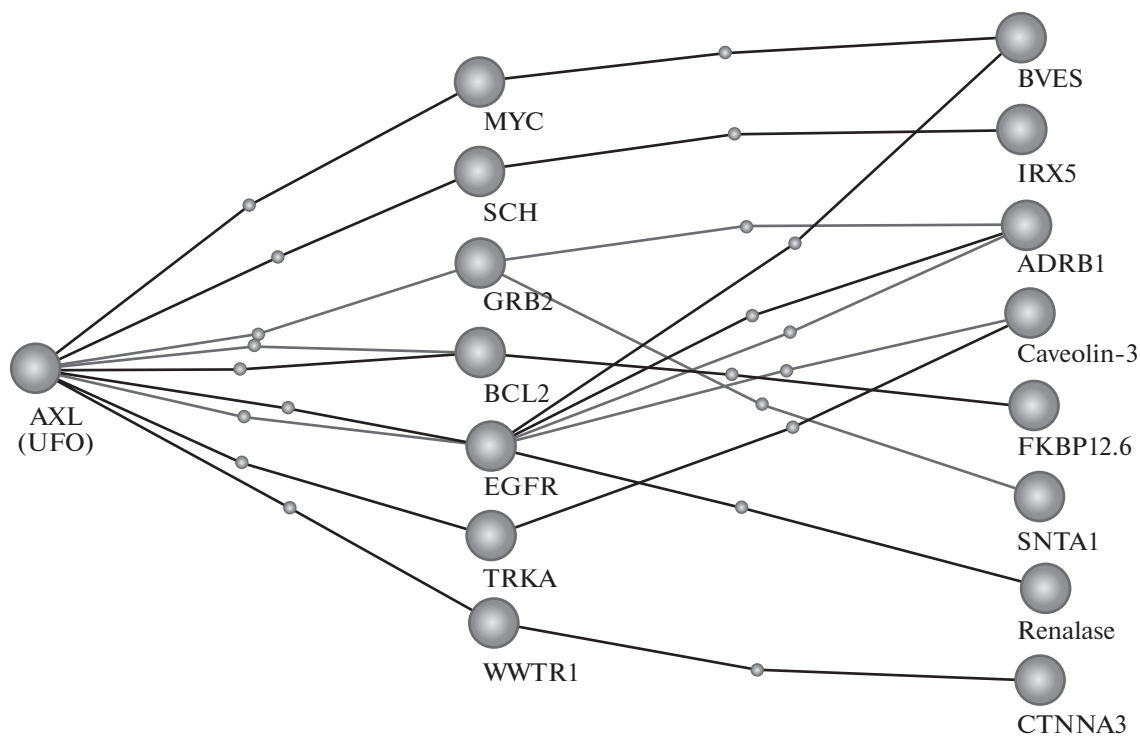


Рис. 1. Связи между тирозинкиназным рецептором UFO и белками, участвующими в процессе регуляции сердечного ритма, найденные с помощью сервиса *Gene Ontology*.

ригидности сосудов, нет гипертрофии сердечной мышцы сердечной недостаточности, не отмечены клинические и биохимические проявления атеросклеротического изменения сердца и сосудов (что подтверждено заключением о состоянии здоровья испытуемых – добровольцев) и свидетельствует о значении этих белков для нормаль-

ной физиологической регуляции сердечного ритма.

Сложность событий сердечно-сосудистой регуляции делает любой отдельный маркер низко-специфичным, и большинство применяемых в настоящее время маркеров не могут предсказать

Таблица 3. Связь между тирозинкиназным рецептором UFO и белками, участвующими в процессе регуляции сердечного ритма, найденные с помощью сервиса *Gene Ontology*

AXL (UFO)	Белки-посредники	Белки процесса регуляции сердечного ритма
	MYC – proto-oncogene c-мис	BVES – blood vessel epicardial substance
	SCH – neurofibromin 2	IRX5 – iroquois homeobox 5
	GRB2 – growth factor receptor bound protein 2	ADRB1 – adrenoreceptor beta 1
		SNTA1 – syntrophin alpha 1
	BCL2 – BCL 2 apoptosis regulator	FKBP-12.6 – FKBP prolyl isomerase 1B
	EGFR – epidermal growth factor receptor	ADRB1 – adrenoreceptor beta 1
		Caveolin-3
		Renalase
		BVES – blood vessel epicardial substance
	TRKA – tropomiosin receptor kinase 2	Caveolin-3
	WWTR1 – WW domain containing transcription regulator 1	CTNNA3 – catenin alpha 3

ранний доклинический риск. Описанные нами биомаркеры физиологической регуляции сердечного ритма потенциально способны заполнить этот пробел. С другой стороны особенностью работы является относительно небольшое число в выборке практически здоровых молодых людей и до ввода совокупности этих протеомных маркеров в клиническую практику должны последовать дальнейшие исследования (такие как исследования более широких когорт). Степень корреляций, обнаруженных в этом исследовании повышает вероятность того, что требуемые более крупные многоцентровые когорты для дальнейшего подтверждения их потенциального использования в стратификации риска сердечно-сосудистых заболеваний могут подтвердить наши данные. Вероятно, дальнейшие исследования потребуются для уточнения — являются ли комбинации указанных белков маркерами риска более чувствительными и специфическими, чем традиционно используемые с этой целью, отражающие факторы риска повреждения сердца и сосудов. Роль этих белков может быть различной в первичной и вторичной профилактике [42].

ВЫВОДЫ

1. Математический и биоинформационный анализ позволил выделить совокупность белков, ассоциированных с состоянием сердечно-сосудистой системы и функцией сердечного ритма. Именно эта комбинация (панель) явилась предметом исследования и описана применительно к поиску новых мишеней терапевтического воздействия с учетом белков-посредников данного процесса.

2. Установлена достоверная связь 9 белков с процессами вегетативной регуляции сердечного ритма у практически здоровых лиц в возрасте 20—30 лет. Описанная комбинация обеспечивает баланс между симпатическими и парасимпатическими влияниями на сердечный ритм у молодых и здоровых обследованных.

3. При анализе полученных данных показано, что сопряженными процессами, в которых участвуют вышеописанные белки, являются: клеточная адгезия, тканевая проницаемость, передача нервного импульса, допаминэргический путь, аутокринная и паракринная передача сигнала, жесткость и эластичность сосудистой стенки.

Этические нормы. Все исследования проведены в соответствии с принципами биомедицинской этики, сформулированными в Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующих обновлениях, и одобрены комиссией по биомедицинской этике Института медико-биологических проблем РАН (Москва).

Информированное согласие. Каждый участник исследования представил добровольное письменное информированное согласие, подписанное им после разъяснения ему потенциальных рисков и преимуществ, а также характера предстоящего исследования.

Финансирование работы. Работа выполнена в рамках базовых тем РАН 64.1 и 65.3. на 2013—2020 гг. Хромато-масс-спектрометрический анализ выполнен при поддержке РФФИ (грант № 18-34-00524).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology // *Circulation*. 1996. V. 93. № 5. P. 1043.
2. Баевский Р.М., Иванов Г.Г., Чирейкин Л.В. и др. Анализ variability сердечного ритма при использовании различных электрокардиографических систем (методические рекомендации) // *Вестник аритмологии*. 2001. № 24. С. 65.
3. Nkuiyia-Kenfack E., Koeck T., Mischak H. et al. Proteome analysis in the assessment of ageing // *Ageing Res Rev*. 2014. V. 18. P. 74.
4. Nosovsky A., Vassilieva G., Kaminskaya E. Application of multidimensional projections in the practice of medical and biological research // *Norwegian J. Development of the International Science*. 2018. № 15. P. 9.
5. Киселёв А.Р., Гриднев В.И. Колебательные процессы в вегетативной регуляции сердечно-сосудистой системы // *Саратовский научно-медицинский журн*. 2011. Т. 7. № 1. С. 34.
6. Mialani A. Principles of cardiovascular neural regulation in health and disease. Norwell: Kluwer Academic Publishers, 2000. P. 222.
7. Shankar V. Age-related changes in the parasympathetic control of the heart // *International J. Scientific and Research Publications*. 2012. V. 2. № 2. P. 1.
8. Hester R.L., Iliescu R., Summers R., Coleman T.G. Systems biology and integrative physiological modelling // *J. Physiol*. 2011. V. 589(Pt 5). P. 1053.
9. Golizeh M., Lee K., Ilchenko S. et al. Increased sero-transferrin and ceruloplasmin turnover in diet-controlled patients with type 2 diabetes // *Free Radic. Biol. Med*. 2017. V. 113. P. 461.
10. Fukusaki C., Kawakubo K., Yamamoto Y. Assessment of the primary effect of aging on heart rate variability in humans // *Clinical Autonomic Research*. 2000. V. 10. № 3. P. 123.
11. Ferrari A.U., Radaelli A., Centova V. Invited review: aging and the cardiovascular system // *J. Appl. Physiol*. 2003. V. 95. № 6. P. 2591.
12. Панкова Н.Б. Функциональное развитие вегетативной регуляции сердечно-сосудистой системы человека в онтогенезе // *Российский физиологи-*

- ческий журн. им. И.М. Сеченова. 2008. Т. 94. № 3. С. 267.
13. Нидеккер И.Г., Куприянова О.О. Количественный анализ сбалансированности нейрогенных влияний на ритм сердца // Физиология человека. 2010. Т. 36. № 2. С. 72.
 14. Орлов Ю.П., Лукач В.Н., Долгих В.Т. и др. Патогенетическая значимость нарушенного обмена железа в формировании микроциркуляторных расстройств при реперфузии. Экспериментальное исследование // Сибирский медицинский журн. 2012. № 5. С. 71.
 15. Cini C., Yip C., Attard C. et al. Differences in interesting platelet proteome and platelet releasate between healthy children and adults // J. Proteomics. 2015. V. 123. P. 78.
 16. Li X., Chen M., Lei X. et al. Luteolin inhibits angiogenesis by blocking Gas6/Axl signaling pathway // Int. J. Oncol. 2017. V. 51. № 2. P. 677.
 17. Jin C.W., Wang H., Chen Y.Q. et al. Gas6 delays senescence in vascular smooth muscle cells through the PI3K/Akt/FoxO signaling pathway // Cell Physiol. Biochem. 2015. V. 35. № 3. P. 1151.
 18. Gustafsson A., Matuszewska D., Johansson M. et al. Differential expression of Axl and Gas6 in renal cell carcinoma reflecting tumor advancement and survival // Clin. Cancer Res. 2009. V. 15. № 14. P. 4742.
 19. Caldentey G., García De Frutos P., Cristóbal H. et al. Serum levels of Growth Arrest-Specific 6 protein and soluble AXL in patients with ST-segment elevation myocardial infarction // Eur. Heart J. Acute Cardiovasc. Care. 2017.
<https://doi.org/10.1177/2048872617740833>
 20. Batchu S.N., Xia J., Ko K.A. et al. Axl modulates immune activation of smooth muscle cells in vein graft remodeling // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2015. V. 309. № 6. P. 1048.
 21. Batlle M., Recarte-Pelz P., Roig E. et al. AXL receptor tyrosine kinase is increased in patients with heart failure // Int. J. Cardiol. 2014. V. 73. № 3. P. 402.
 22. Lam G.K., Liao H.X., Xue Y. et al. Expression of the CD7 ligand K-12 in human thymic epithelial cells: regulation by IFN- γ // J. Clin. Immunol. 2005. V. 25. № 1. P. 41.
 23. Bade-Döding C., Göttmann W., Baigger A. et al. Autoocrine GM-CSF transcription in the leukemic progenitor cell line KG1a is mediated by the transcription factor ETS1 and is negatively regulated through SECTM1 mediated ligation of CD7 // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1840. № 3. P. 1004.
 24. Huyton T., Göttmann W., Bade-Döding C. et al. The T/NK cell co-stimulatory molecule SECTM1 is an IFN "early response gene" that is negatively regulated by LPS in human monocytic cells // Biochim. Biophys. Acta. 2011. V. 1810. № 12. P. 1294.
 25. Lim W., Bae H., Sohn J.Y. et al. Dietary cholesterol affects expression of prostatic acid phosphatase in reproductive organs of male rats // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2015. V. 456. № 1. P. 421.
 26. Lambert N.G., ElShelmani H., Singh M.K. et al. Risk factors and biomarkers of age-related macular degeneration // Prog. Retin. Eye Res. 2016. V. 54. P. 64.
 27. Zeng X.X., Yelon D. Cadm4 restricts the production of cardiac outflow tract progenitor cells // Cell Rep. 2014. V. 7. № 4. P. 951.
 28. DeRoo E.P., Wroblewski S.K., Shea E.M. et al. The role of galectin-3 and galectin-3-binding protein in venous thrombosis // Blood. 2015. V. 125. № 11. P. 1813.
 29. Gleissner C.A., Erbel C., Linden F. et al. Galectin-3 binding protein, coronary artery disease and cardiovascular mortality: Insights from the LURIC study // Atherosclerosis. 2017. V. 260. P. 121.
 30. Sun Y.X., Gao C.Y., Wang X.Q. et al. Serum quantitative proteomic analysis of patients with keshan disease based on iTRAQ labeling technique: A first term study // J. Trace Elem. Med. Biol. 2017. V. 44. P. 331.
 31. Nielsen C.T., Østergaard O., Rasmussen N.S. et al. A review of studies of the proteomes of circulating microparticles: key roles for galectin-3-binding protein-expressing microparticles in vascular diseases and systemic lupus erythematosus // Clin. Proteomics. 2017. V. 14. P. 11.
 32. Xie H., Chen L., Liu H. et al. Expression of Mac-2 binding protein in human carotid atheroma is associated with plaque instability and clinical manifestations // Biomed. Pharmacother. 2019. V. 110. P. 465.
 33. Gordon S.M., Chung J.H., Playford M.P. et al. High density lipoprotein proteome is associated with cardiovascular risk factors and atherosclerosis burden as evaluated by coronary CT angiography // Atherosclerosis. 2018. V. 278. P. 278.
 34. Кисриева Ю.С., Петушкова Н.А., Саменкова Н.Ф. и др. Сравнительный анализ протеома плазмы крови больных на ранней стадии хронической церебральной ишемии // Биомедицинская химия. 2016. Т. 62. № 5. С. 599.
 35. Cavassan N.R.V., Camargo C.C., de Pontes L.G. et al. Correlation between chronic venous ulcer exudate proteins and clinical profile: A cross-sectional study // J. Proteomics. 2019. V. 192. P. 280.
 36. Zhang R., Kim A.S., Fox J.M. et al. Mxra8 is a receptor for multiple arthritogenic alphaviruses // Nature. 2018. V. 557. № 7706. P. 570.
 37. Yonezawa T., Ohtsuka A., Yoshitaka T. et al. Limitrin, a novel immunoglobulin superfamily protein localized to glia limitans formed by astrocyte endfeet // Glia. 2003. V. 44. № 3. P. 190.
 38. Zhao M., Wu J., Li X., Gao Y. Urinary candidate biomarkers in an experimental autoimmune myocarditis rat model // J. Proteomics. 2018. V. 179. P. 71.
 39. Balfoussia E., Skenderi K., Tsironi M. et al. A proteomic study of plasma protein changes under extreme physical stress // J. Proteomics. 2014. V. 98. P. 1.
 40. Panossian A., Seo E.-J., Efferth T. Synergy assessments of plant extracts used in the treatment of stress and aging-related disorders // Synergy. 2018. V. 7. P. 39.
 41. Ortega-Sáenz P., Macías D., Levitsky K.L. et al. Selective accumulation of biotin in arterial chemoreceptors: requirement for carotid body exocytotic dopamine secretion // J. Physiol. 2016. V. 594. № 24. P. 7229.
 42. Von Zychlinski A., Kleffmann T. Dissecting the proteome of lipoproteins: New biomarkers for cardiovascular diseases? // Translational Proteomics. 2015. V. 7. P. 30.

Reflection of the Heart Rate Physiological Regulation Parameters in the Urinary Proteome of Practically Healthy Young Males

V. B. Rusanov^{a,*}, L. H. Pastushkova^a, A. G. Goncharova^a, A. G. Chernikova^a, A. M. Nosovsky^a,
O. V. Saik^b, D. N. Kashirina^a, A. G. Brzhozovskiy^a, A. S. Kononikhin^{a,c},
A. G. Lubisheva^{a,d}, I. M. Larina^a

^a*Institute of Biological Problems of the RAS, Moscow, Russia*

^b*Institute of Cytology and Genetics of the RAS, Novosibirsk, Russia*

^c*Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow region, Skolkovo, Russia*

^d*Sechenov First Moscow State Medical University Ministry of Health, Moscow, Russia*

*E-mail: vasilyrusanov@gmail.com

The urine chromatography-mass spectrometry and heart rate variability (HRV) analysis were performed in 13 practically healthy subjects (age: 28 ± 4 years; height: 174 ± 1 cm; weight: 67.9 ± 1.5 kg). We identified proteins associated with the cardiovascular system condition and heart rate autonomic regulation (serotransferrin, tyrosine kinase UFO receptor, prostatic acid phosphatase, secreted transmembrane protein 1, cell adhesion molecule 4, galectin-3 binding protein, heavy constant immunoglobulin alpha 1, matrix 8 remodeling associated protein, biotinidase) in the total protein aggregate basing on mathematical and bioinformatic analysis. This is the first study focused on the relationships between the markers of heart rhythm autonomic regulation. Proteomics data were used to describe the indicators of heart rate physiological regulation in the urine proteome of healthy young males.

Keywords: urinary proteome, heart rate autonomic regulation, heart rate variability physiology, practically healthy young males.