

Гладкомышечный трансгелин и его роль в атеросклеротическом процессе

DOI: 10.34687/2219-8202.JAD.2019.04.0002

© Радима Анатольевна Жетишева¹, Марина Анатольевна Ковалева², Инна Анатольевна Каменихина², Марьяна Хабасовна Шогенова¹, Леонид Иванович Ковалев², Владимир Геннадьевич Наумов¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» МЗ РФ, Москва

² Институт биохимии им. А. Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

Для цитирования: Жетишева РА, Ковалева МА, Каменихина ИА, Шогенова МХ, Ковалев ЛИ, Наумов ВГ. Атеросклероз и дислипидемии. Гладкомышечный трансгелин и его роль в атеросклеротическом процессе. 2019;4(37):18-26.

DOI: 10.34687/2219-8202.JAD.2019.04.0002

Абстракт

Цель. Изучить изменения гладкомышечного трансгелина с помощью протеомных технологий при атеросклеротическом поражении грудного отдела аорты.

Материал и методы. Материалом исследования являлись аутопсийные образцы аорты (грудной отдел), полученные в течение 1 суток после смерти (n=22). Для выявления аутоантигенов использовали сыворотки крови больных мужчин с начальным и распространенным атеросклерозом (n=27). Для изучения белков применяли двумерный электрофорез по О'Фарреллу, модификации NEPHGE, IEF, времяпролетную и тандемную MALDI-TOF-масс-спектрометрию.

Результаты. При изучении аутопсийных тканей в ряду нормальная ткань – липидное пятно/полоса – липофиброзная бляшка было выявлено увеличение содержания фракции белка трансгелина, кодируемого геном TAGLN, в зависимости от усугубления атеросклеротического процесса от отсутствия или следового количества в образцах без атеросклероза до выявления разных изоформ при стадии фиброзной бляшки. Более того, выявлялись фрагменты TAGLN, частично окисленные, что характерно для многих белков при атерогенезе, но впервые выявлено для трансгелина.

При иммуноблоттинге сыворотки крови больных с выраженным атеросклерозом показали реакцию на трансгелин как аутоантиген, а реакция сывороток крови в группе с начальным атеросклерозом отсутствовала. Кроме того, была выявлена достоверная взаимосвязь между реакцией сывороток на трансгелин и уровнем моно-СРБ в группе с выраженным атеросклерозом.

Выводы. Полученные результаты показали, что гладкомышечный трансгелин, возможно, участвует в патогенезе атеросклероза и его прогрессировании. В сыворотках крови некоторых пациентов с выраженным атеросклерозом выявлено наличие аутоантител к гладкомышечному трансгелину, а взаимосвязь с моно-СРБ может свидетельствовать о вовлечении как воспалительного, так и иммунного ответа в патогенезе атеросклероза.

Ключевые слова: атеросклероз, протеомные исследования, гладкомышечный трансгелин, иммуноблоттинг.

Smooth muscle transgelin and its role the atherosclerotic process

R. A. Zhetisheva¹, M. A. Kovaleva², I. A. Kamenihina², M. K. Shogenova¹, L. I. Kovalev², V. G. Naumov¹

¹ Federal State Budgetary Organisation National Medical Research Center of Cardiology of Ministry of Health of the Russian Federation

² Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Abstract

Aim. To study the changes in smooth muscle transgelin in atherosclerotic lesions of thoracic aorta using proteomic technologies.

Materials and methods. The study material was autopsy samples of thoracic aorta obtained within 1 day after death ($n = 22$). To identify autoantigens, the blood serum of men with initial and advanced atherosclerosis was used ($n = 27$). To study proteins, O'Farrell two-dimensional electrophoresis, NEPHGE, IEF modifications, time-of-flight and tandem MALDI-TOF mass spectrometry were used.

Results. When studying autopsy tissues in the series normal tissue-lipid stain/strip – lipofibrotic plaque, an increase of the transgelin protein fraction encoded by the TAGLN gene was revealed, depending on the aggravation of the atherosclerotic process from the absence or trace amount in samples without atherosclerosis to the detection of various isoforms at the fibrotic stage plaque. Moreover, partially oxidized TAGLN fragments were detected, which is characteristic of many proteins during atherogenesis, but was first detected for transgelin.

In immunoblotting the blood serum of patients with severe atherosclerosis gave a reaction to transgelin as an autoantigen, and there was no reaction of blood serum in the group with initial atherosclerosis. In addition, a significant correlation was found between the serum response to transgelin and the level of mono-CRP in the group with severe atherosclerosis.

Conclusions. The results showed that smooth muscle transgelin is possibly a component of the pathogenesis of atherosclerosis and its progression. The presence of autoantibodies to smooth muscle transgelin was detected in the blood serum of some patients with severe atherosclerosis, and its association with mono-CRP may indicate the involvement of both an inflammatory and immune response in the pathogenesis of atherosclerosis.

Keywords: atherosclerosis, proteomic study, smooth muscle transgelin, immunoblotting.

В настоящее время особое внимание уделяется протеомному исследованию атеросклероза. Изучается белковый состав сыворотки не только крови, мочи, но и тканей, пораженных атеросклеротическим процессом. Большинство таких работ выполнено на животных моделях [1, 2]. Термин «протеомика» был предложен Марком Уилкинсом в 1994 году, объектом изучения протеомики являются белки, которые экспрессируются в данной клетке, ткани или организме в данный момент времени [3]. В последнее время появились публикации, где отмечена роль гладкомышечного трансгелина 1 в развитии патологии сосудов у животных и человека [4–6]. К примеру, у мышей с дефицитом ApoE с гиперхолестеринемией генетическая абляция SM22-альфа приводила к увеличению площади атеросклеротического поражения и увеличению доли пролиферирующих гладкомышечных клеток в атеросклеротических бляшках. Эти результаты идентифицируют роль SM22-альфа в регуляции фенотипа гладкомышечных клеток в процессе атерогенеза [7]. Миграция и пролиферация гладкомышечных клеток в области липофиброзных бляшек под воздействием различных факторов являются важными морфологическими признаками развивающегося атеросклероза [8–12], и трансгелин 1 может стать удобным маркером исследования механизмов этого процесса.

Трансгелин, кодируемый геном *TAGLN*, белок 22KD из семейства кальпонинов, также известный как SM22 α , WS3–10 или p27, исключительно и в избытке экспрессируется в цитоскелете клеток гладких мышц как самый ранний маркер их дифференцировки. Исследования выявили

регулирующие функции трансгелина, в том числе активную перестройку цитоскелета, фенотипическую модуляцию клеток гладких мышц сосудов, их пролиферацию, миграцию клеток и подавление опухоли [7, 13–15]. Данные литературы свидетельствуют о том, что трансгелин действует как супрессор опухолей. Его экспрессия теряется при раке простаты, молочной железы и толстой кишки [16]. Трансгелины являются представителями семейства актин-связывающих белков. Они играют важную роль в формировании цитоскелетных актиновых микрофиламентов, вовлечены в обеспечение ряда клеточных функций, и их количество меняется при ряде патологических процессов, в частности при канцерогенезе [17–19]. Функция этих белков до настоящего времени неясна. Картированы три гена трансгелинов, преобладающая экспрессия которых выявлена в разных видах тканей. Трансгелин 1 охарактеризован как гладкомышечный белок (база данных UniProt, запись Q01995), трансгелин 2 (UniProt, P37802) – как белок придатка яичка и трансгелин 3 (UniProt, Q9U115) – как нейрон-специфичный. Проведенные исследования также показали возможную роль трансгелина в гипоксической легочной гипертензии и ремоделировании легочных сосудов при гипоксии и врожденных пороках сердца [15, 20, 21].

Цель

Изучить изменения гладкомышечного трансгелина с помощью протеомных технологий при атеросклеротическом поражении грудного отдела аорты.

Материалы и методы

Биоматериалом исследования являлись аутопсийные образцы аорты (грудной отдел), полученные в течение 24 часов после смерти ($n = 22$). Белки исследовали в образцах тканей без атеросклеротического процесса, на стадии липидного пятна и полосы, а также на стадии атеросклеротической бляшки у 15 мужчин и 7 женщин, средний возраст которых составил $64,8 \pm 9,5$ лет. В 81,9% случаев смерть наступила от сердечно-сосудистых заболеваний, в 18,2% – по другим причинам. Образцы слоев аорты получали, как описано ранее [22].

Для выявления аутоантигенов использовали образцы сыворотки крови больных с распространенным атеросклерозом ($n = 27$). В исследование были включены мужчины с начальными признаками атеросклероза и с распространенным выраженным атеросклерозом. Для первой группы ($n = 7$) отбирали больных с начальным атеросклерозом магистральных артерий, в том числе и коронарных, основываясь на данных, полученных при коронарографии и дуплексном сканировании брахиоцефальных артерий. Критериями включения в группу являлись неровности контуров и стенозы не более 30%. Для второй группы ($n = 20$) отбирали больных с распространенным атеросклерозом магистральных артерий, в том числе и коронарных артерий. Критериями включения являлись стенозы 60% и более. Средний возраст первой группы $54,6 \pm 13,7$ лет, второй – $58,5 \pm 8,1$ лет. Индекс массы тела (ИМТ) для первой группы составил $29,6 \pm 2,9$ кг/м², а для второй группы $28,5 \pm 4,3$ кг/м². Клиническая характеристика групп представлена в табл. 1.

Как видно из табл. 1, перенесенный ИМ ($p < 0,03$), также как и прием статинов ($p < 0,01$), достоверно чаще в группе больных с выраженным атеросклерозом.

Из табл. 2 следует, что группы достоверно различались по уровню ХС-ЛПНП (холестерин липопротеидов низкой плотности) ($p < 0,04$).

Образцы крови получали утром натощак перед коронарографией, центрифугировали в течение 5 мин при 1500 об/мин. Сыворотку аликвотировали и замораживали в пластиковых пробирках-эппендорфах при -70°C до проведения соответствующих исследований. В качестве антигенов использовали белковые экстракты аутопсийных образцов грудного отдела аорты из вышеуказанных.

Экстракцию белков из тканей, последующее фракционирование белков двумерным электрофорезом в ПААГ (полиакриламидном геле) по О'Фарреллу, окрашивание белковых фракций кумасси голубым R-250 (CBV R-250)/азотнокислым серебром и времяпролетную масс-спектрометрическую идентификацию проводили, как описано ранее [19]. Масс-спектрометрическая идентификация проводилась на базе Центра коллективного пользования «Промышленные биотехнологии» ФИЦ

Биотехнологии РАН. Выбранные белковые фракции для идентификации вырезали из гелевых пластин, полученных методом двумерного электрофореза. Фрагменты геля с белком (пятном) измельчали, содержащийся белок гидролизовался трипсином, и проводилась экстракция триптических пептидов для идентификации с помощью времяпролетной масс-спектрометрии на матрице (MALDI-TOF) в соответствии с ранее опубликованными протоколами и модификациями [124, 125]. Масс-спектры получали на MALDI-TOF-масс-спектрометре ReflexIII и Ultraflex (Bruker, США) с УФ-лазером (336 нм) в режиме положительных ионов в диапазоне масс 500–8000 Да и калибровали их. При MS/MS-анализе масс-спектры фрагментов регистрировали на MALDI-TOF-масс-спектрометре Bruker Ultraflex в тандемном (TOF-TOF) режиме при детекции положительных ионов. Фрагментация ионов индуцировалась подачей гелия в область начального участка траектории свободного дрейфа ионов (давление инертного газа 2×10^{-7} Па). Погрешность измерения масс-фрагментов не более 0,01%. На масс-спектре присутствовали только сигналы С-концевых фрагментов пептидов, претерпевших разрыв по пептидной связи (γ -ионы). Идентификацию белков проводили с использованием программы Mascot, опция Peptide Fingerprint (MatrixScience, США), с точностью определения массы MH^+ , равной 0,01%, и по базам данных Национального центра биотехнологической информации США (NCBI). Названия идентифицированных белков в таблицах идентификации приводятся в оригинале, на английском языке, для удобства последующей работы с базами данных NCBI и UniProt.

Для выявления аутоантигенов среди белков аорты в крови больных с распространенным атеросклерозом использовали «сэндвич»-модификацию иммуноблотинга. Белки ткани аорты фракционировали двумерным электрофорезом, переносили с гелей электроблоттингом на нитроцеллюлозные фильтры, которые обрабатывали препаратами сывороток крови (в качестве «первых антител») больных в разведении 1:30, а затем – пероксидазным конъюгатом кроличьих антител («вторые антитела») против суммарных иммуноглобулинов человека («ИМТЕК», РФ). Для регистрации результатов фильтры инкубировали в 5 мМ растворе 4-хлор-1-нафтола, 6% этанола и 0,25% перекиси водорода. Белковые фракции, прореагировавшие как аутоантигены, вырезали из окрашенной двумерной электрофореграммы-реплики, использованной для электропереноса, и проводили масс-спектрометрическую идентификацию, как описано ранее [22]. Денситометрия фрагментов двумерных электрофореграмм проводилась после сканирования (Epson Expression 1680 scanner). Полученные цифровые изображения редактировали в графическом редакторе и обсчитывали количественное содержание белков с помощью пакета программ ImageMaster 2D Platinum версии 7 (GE Healthcare,

**Таблица 1.** Клиническая характеристика больных с начальным и выраженным атеросклерозом

Показатель (%)	1 группа	2 группа	P
Отягощенный анамнез	42,9	40	0,9
Курение	85,7	75	0,4
АГ	85,7	90	0,8
ИМ	0	45	0,03
ОНМК	0	5	0,5
НРС	42,9	40	0,9
СД	28,6	20	0,6
Прием статинов	71,4	100	0,01

Примечание: P – достоверность различий между группами. АГ – артериальная гипертензия, ИМ – инфаркт миокарда, ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения, НРС – нарушение ритма сердца, СД – сахарный диабет.

Таблица 2. Показатели липидного спектра у больных с начальным и выраженным атеросклерозом

Показатель (%)	1 группа	2 группа	P
Общий холестерин, ммоль/л	5,9 ± 1,1	5,1 ± 1,3	0,08
Холестерин липопротеидов низкой плотности, ммоль/л	4,0 ± 0,9	3,1 ± 1,1	0,04
Холестерин липопротеидов высокой плотности, ммоль/л	0,95 ± 0,13	1,5 ± 1,1	0,6
Триглицериды, ммоль/л	2,1 ± 0,7	2,1 ± 1,3	0,5

Примечание: P – достоверность различий между группами. АГ – артериальная гипертензия, ИМ – инфаркт миокарда, ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения, НРС – нарушение ритма сердца, СД – сахарный диабет.

Швейцария). Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием пакетов программ: Statistica 6.1 (непараметрические критерии); BIOSTAT, MS Office Excel 2003.

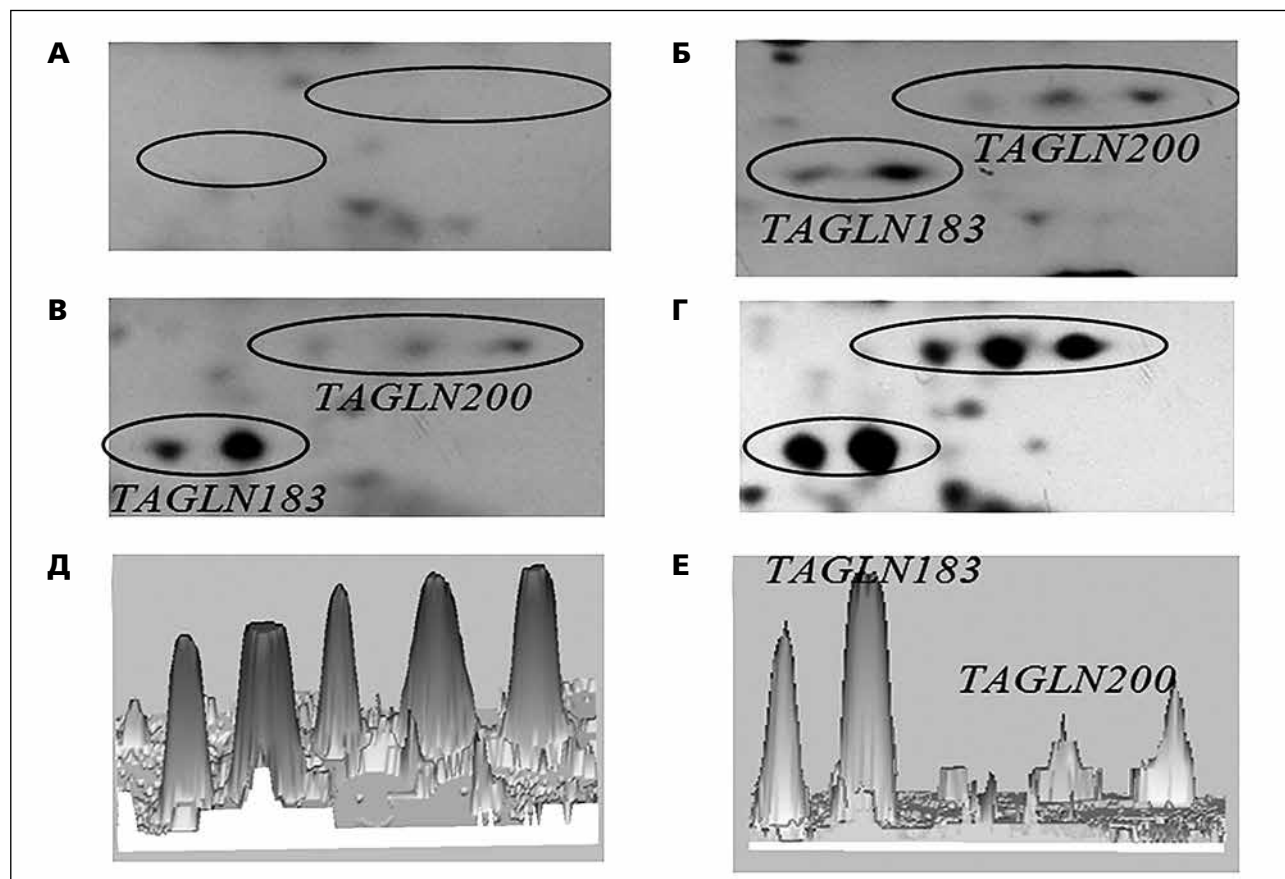
Исследование одобрено независимым этическим комитетом ФГБУ «Российский кардиологический научно-практический комплекс» Минздрава России, протокол № 191 от 25.11.2013 г. Согласие на участие в исследовании подписано.

Результаты

В норме в ткани медиального слоя аорты содержатся продукты двух транскрипционных вариантов гена *TAGLN* (гладкомышечного трансгелина, трансгелина 1), обеспечивающих синтез одного и того же белка из 200 или 183 а.о. (аминокислотных

остатков), которые выявляются на двумерных электрофореграммах как 14 электрофоретических фракций гладкомышечного трансгелина, различающихся по молекулярной массе и изоэлектрической точке. Пять из них являются белком в 200 а.о., а 9 – 183 а.о. [26]. По результатам компьютерной денситометрии 5 фракций (3 в 200 а.о. и 2 в 183 а.о., рис. 1) содержат 90% суммарного количества трансгелина 1 в медиальном слое аорты. Их количественное соотношение (200/183) стабильно в ткани медиального слоя и составляет 1,0/0,7.

Во всех случаях количество *TAGLN* в интиме было меньше, чем в параллельных образцах медиального слоя. Более того, в тех случаях, где в интиме наблюдалось накопление гладкомышечных клеток, существенно менялось и соотношение количества

Рис. 1. Фрагменты зон трансгелинов изоэлектрофореграмм белков интимы

Примечание: А – зона ткани интимы в норме, Б – с увеличением количества фракций TAGLN в интиме нормы, В – TAGLN в интиме в зоне липофиброзных бляшек, Г – изменение содержания вариантов TAGLN в интиме в зоне липофиброзных бляшек (фракции TAGLN обозначены овалами), Д, Е – трехмерные модели результатов компьютерной денситометрии двух максимально различающихся случаев по пропорции TAGLN 200/183.

разных вариантов трансгелина. Преобладающей формой становились фракции TAGLN 183, особенно в области липофиброзных бляшек (рис. 1 Г). Их пропорция (200/183) доходила до 1,0/2,8, то есть количество более короткого варианта увеличилось в 4 раза.

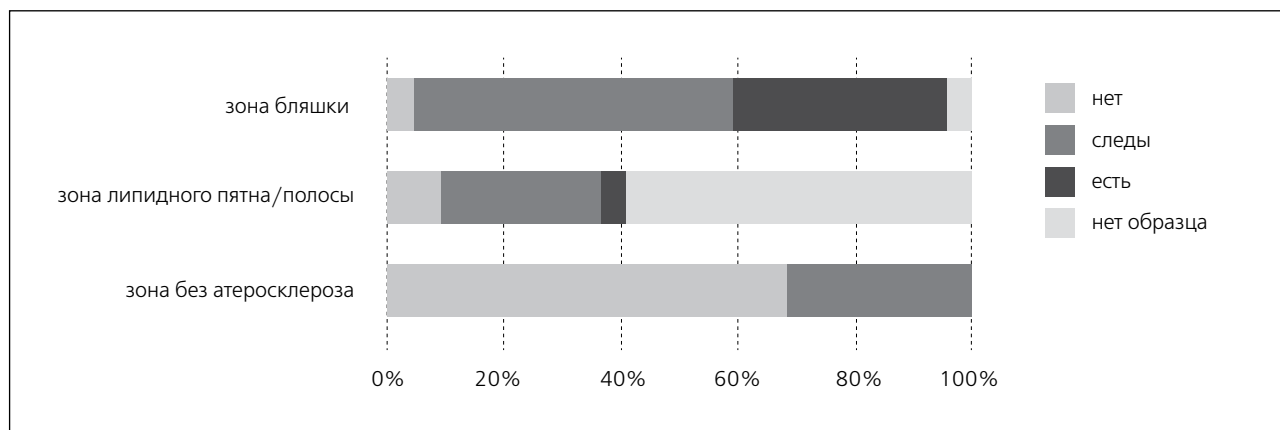
При изучении аутопсийных образцов в ряду нормальной ткани без атеросклероза – липидное пятно/полоса – атеросклеротическая бляшка было выявлено увеличение содержания фракции трансгелина в зависимости от усугубления атеросклеротического процесса. На рис. 2 представлены полученные данные. В образцах без атеросклероза фракции трансгелина не выявлялись в 68,2% случаев, а в 31,8% – обнаруживались в следовом количестве. При стадии липидное пятно/полоса четкое выявление белка регистрировалось в 4,5% случаев, а в области атеросклеротической бляшки количество изоформ увеличивалось еще больше и выявлялось в 36,4% случаев. Более того, обнаружены атипичные фракции TAGLN, некоторые были частично окисленные, что впервые выявлено для трансгелина.

Была отмечена серия кислородных пиков к пептиду m/z 2052 Да (m – масса иона, z – заряд иона,

Да – Дальтон). Спектры его фрагментации (рис. 4) и полученные результаты поиска подтверждают наличие такой модификации. Однако построить на всех спектрах фрагментации аминокислотную последовательность этого пептида с учетом окисления (программное обеспечение позволяет учесть только окисление цистеина) не удастся, что подразумевает окисление других аминокислотных остатков трансгелина и показывает необходимость разработки нового алгоритма поиска по результатам тандемной масс-спектрометрии в программе Mascot, учитывающей произвольное окисление а. о.

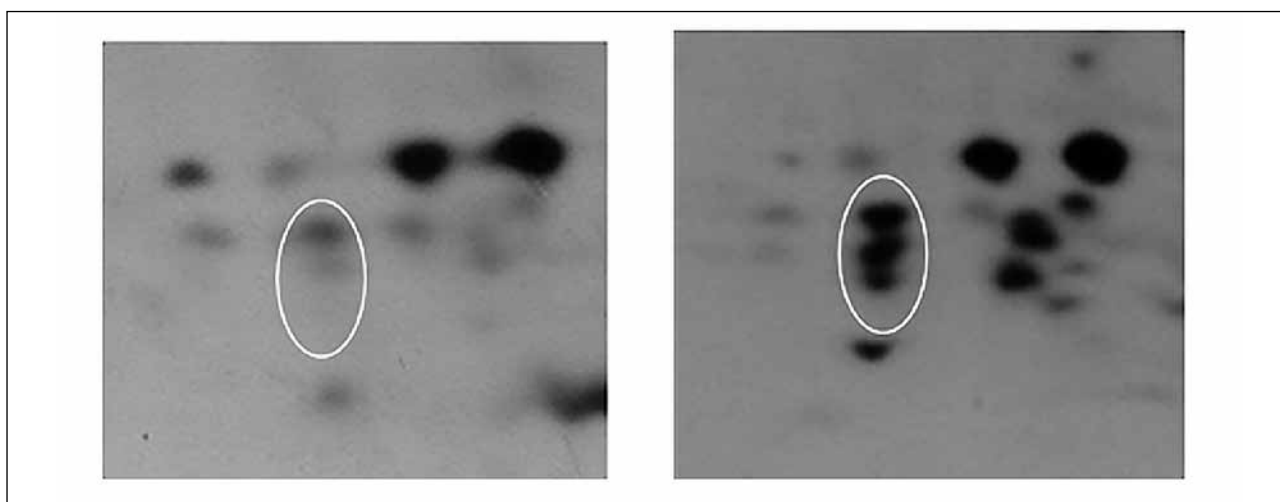
При проведении иммуноблотинга сыворотки крови больных с начальным атеросклерозом не показали иммунный ответ на трансгелин. Сыворотки крови больных с выраженным атеросклерозом более чем в 30% случаев был выявлен и положительный иммунный ответ на фракции трансгелина. На рис. 5 представлены примеры электрофореграмм с положительной иммунной реакцией на трансгелин сывороток крови.

Следует отметить, что обнаружена прямая корреляция между реакцией сывороток крови на трансгелин и уровнем моно-СРБ ($r=0,57$, $p<0,05$).

Рис. 2. Выявление белковых фракций трансгелина в зависимости от стадии атеросклероза**Таблица 3.** Результаты идентификации методом масс-спектрометрии фракций фрагментов гладкомышечного трансгелина

№	Название белка	Номер в NCBI protein	S/M**	C*	M _w /pI эксп.	M _w /pI теорет.
1	Transgelin (фрагмент 5–155)	48255905	328/26	62	18,3/7,40	22,6/8,87
2	Transgelin (фрагмент 5–155)	48255905	256/23	62	18,1/7,60	22,6/8,87
3	Transgelin (фрагмент 21–155)	48255905	232/21	58	17,8/7,50	22,6/8,87

Примечание: * Coverage – % покрытия полной аминокислотной последовательности белка выявленными пептидами.
 ** S/M – традиционные показатели идентификации, принятые в англоязычной литературе: Score – показатель соответствия, или «счет очков», Match peptides – количество совпавших пептидов, M_w – молекулярная масса, pI – изоэлектрическая точка.

Рис. 3. Фрагменты двумерных электрофореграмм зоны накопления фракций трансгелина

Примечание: слева – норма, справа – липофиброзная бляшка. Овалами выделена зона нахождения трех N-концевых фрагментов трансгелина.

Рис. 4. Вверху – спектр фрагментации иона m/z 2052 Да, иллюстрирующий наличие окисленных пиков, внизу – фрагмент итогового результата биоинформационного анализа «пептидного фингерпринта», полученного для верхней фракции фрагмента трансгелина с помощью программы Mascot

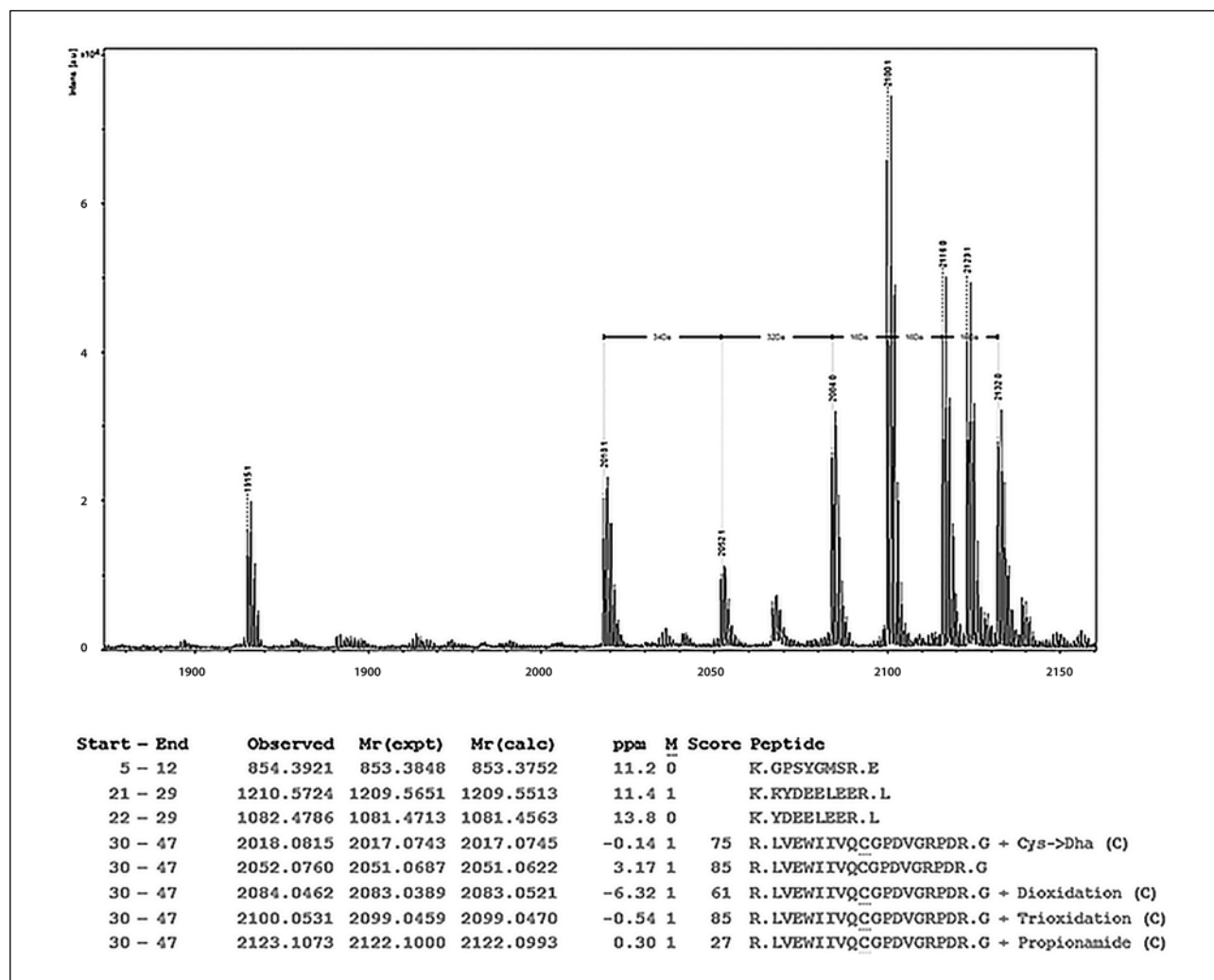
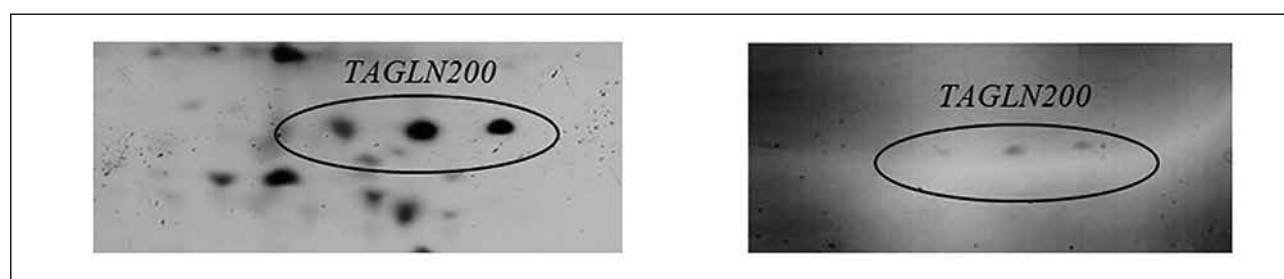


Рис. 5. Выявление аутоантигенов в ткани аорты



Примечание: слева – фрагмент двумерной электрофореграммы реплики белков аорты после электропереноса белков на нитроцеллюлозную мембрану, справа – иммуноблотинг с сывороткой крови больных. Овалами показаны фракции, давшие иммунный ответ фракции трансгелинов.

Не было выявлено достоверных корреляций между реакцией сывороток крови на трансгелин и уровнем СРБ, интерлейкина-6, холестерина, ХС-ЛПВП, ХС-ЛПНП, триглицеридов в крови.

Обсуждения

Данная работа является пилотной, однако полученные результаты показали, что гладкомышечный



трансгелин подвержен изменениям при атеросклеротическом процессе. Выявленные маркеры изменения цитоархитектоники гладкомышечных клеток в интиме и появление атипичных фрагментов окисленных изоформ гладкомышечного трансгелина могут сопровождаться развитием аутоиммунного ответа, что можно рассматривать как один из механизмов прогрессирования атеросклероза. Нарушение пропорции содержания в интиме разных транскрипционных вариантов трансгелина (мажорного актин-связывающего белка гладкой мышцы) явно отражает присутствие в зоне липофиброзных бляшек существенной части гладкомышечных клеток с измененной цитоархитектоникой, что может быть связано с изменением механизма пролиферации и образованием атипичных вариантов гладкомышечных клеток. Ранее было показано, что в липофиброзных бляшках обнаружены [5] иммунокомпетентные клетки, продуцирующие антитела к трансгелину. Мы проверили возможную роль трансгелина как аутоантигена при атеросклеротическом поражении сосудов. По результатам двумерного вестерн-блоттинга с сыворотками крови, полученным от больных с разной степенью выраженности атеросклероза, был зарегистрирован иммунный ответ на трансгелин сывороток крови с выраженным атеросклерозом, что подтвердило участие трансгелина и в аутоиммунном процессе при атеросклерозе.

Выводы

Полученные результаты показали, что гладкомышечный трансгелин участвует в патогенезе атеросклероза или его прогрессировании. Его возможная роль реализуется через миграцию гладкомышечных клеток в область липофиброзных бляшек в интиме, образование атипичных гладкомышечных клеток с их ускоренным дальнейшим распадом с образованием окисленных фрагментов трансгелина и формированием аутоиммунного ответа, утяжеляющего течение заболевания. Не менее важна выявленная взаимосвязь между иммунными и воспалительными звеньями патогенеза атеросклероза. Обнаруженные изменения являются одним из этапов патогенеза или отражают особенности течения заболевания, что является поводом для дальнейших исследований. Не вызывает сомнений, что данный белок можно рассматривать как перспективный маркер.

Конфликт интересов

Конфликт интересов отсутствует.

Список литературы

1. Fuster JJ, Castillo AI, Zaragoza C, Ibanez B, Andres V. *Animal models of atherosclerosis. Prog Mol Biol Transl Sci* 2012;105:1–23. DOI: 10.1016/B978-0-12-394596-9.00001-9.
2. Zaragoza C, Gomez-Guerrero C, Martin-Ventura JL, Blanco-Colio L, Lavin B, Mallavia B. *Animal models of cardiovascular diseases. J Biomed Biotechnol*, 2011;497841. DOI: 10.1155/2011/497841. Epub 2011 Feb 16.
3. Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR. *Progress with gene-product mapping of the mollicutes: mycoplasma genitalium. Electrophoresis* 1995;7:1090–4.
4. Zeidan A, Sward K, Nordstrom I, Ekblad E. *Ablation of SM22alpha decreases contractility and actin contents of mouse vascular smooth muscle. FEBS Lett*. 2004;562:141–6. DOI: 10.1016/S0014-5793(04)00220-0.
5. Canducci F, Saita D, Foglieni C, Piscopiello MR, Chiesa R. *Cross-reacting antibacterial auto-antibodies are produced within coronary atherosclerotic plaques of acute coronary syndrome patients. PLoS ONE*, 2012;7(8):e42283. DOI: 10.1371/journal.pone.0042283.
6. Gérard N, Chanson-Rollé A, Rock E, Brachet P. *Proteomic analysis identifies cytoskeleton-interacting proteins as major downstream targets of altered folate status in the aorta of adult rat. Mol. Nutr. Food Res*. 2014;58:2307–19. DOI: 10.1002/mnfr.201400317. Epub 2014 Nov 2.
7. Feil S, Hofmann F, Feil R. *SM22alpha modulates vascular smooth muscle cell phenotype during atherogenesis. Circ Res*. 2004;94:863–865. DOI: 10.1161/01.RES.0000126417.38728.F6.
8. Kositsky GI. *The prevalence of cardiovascular disease and lifestyle. Preventive cardiology. M: Medicine*, 1987;512. Russian (Косицкий ГИ. Распространенность сердечно-сосудистых заболеваний и образ жизни. Превентивная кардиология. М: Медицина, 1987;512).
9. Vivanco F, Padial LR, Darde VM, de la Cuesta F, Alvarez-Llamas G, Diaz-Prieto N, Barderas MG. *Proteomic Biomarkers of Atherosclerosis. Biomarker Insights* 2008;3:101–13.
10. Mizuno Y, Jacob RF, Mason RP. *Inflammation and the development of atherosclerosis. J. Atheroscler. Thromb*. 2011; 18(5):351–8. DOI: 10.5551/jat.7591.

11. Kim J, Jang SW, Park E, Ob M, Park S, Ko J. The role of heat shock protein 90 in migration and proliferation of vascular smooth muscle cells in the development of atherosclerosis. *J. Mol. Cell Cardiol.* 2014;72:157-67. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2014.03.008.
12. Hou J, Xue X, Li J. Vasostatin-2 inhibits cell proliferation and adhesion in vascular smooth muscle cells, which are associated with the progression of atherosclerosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2016;469(4):948-53. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.12.097.
13. Elsafadi M, Manikandan M, Dawud RA. Transgelin is a TGF β -inducible gene that regulates osteoblastic and adipogenic differentiation of human skeletal stem cells through actin cytoskeleton organization. *Cell Death Dis.* 2016;7(8):e2321. DOI: 10.1038/cddis.2016.196.
14. Assinder SJ, Stanton JA, Prasad PD. Transgelin: an actin-binding protein and tumour suppressor. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(3):482-6. DOI: 10.1016/j.biocel.2008.02.011.
15. Zhang R, Shi L, Zhou L, Zhang G, Wu X, Shao F, Ma G, Ying K. Transgelin as a therapeutic target to prevent hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2014;306(6):L574-L583. DOI: 10.1152/ajplung.00327.2013.
16. Assinder SJ, Stanton JA, Prasad PD. Transgelin: an actin-binding protein and tumour suppressor. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(3):482-6. DOI: 10.1016/j.biocel.2008.02.011.
17. Dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IM, Tsubakibara M, Berry DA. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol. Rev.* 2003; 83: 433-73. DOI: 10.1152/physrev.00026.2002.
18. Qi Y, Chiu JF, Wang L. Comparative proteomic analysis of esophageal squamous cell carcinoma. *Proteomics.* 2005;5: 2960-3271. DOI: 10.1002/pmic.200401175.
19. Prasad PD, Stanton JA, Assinder SJ. Expression of the actin-associated protein transgelin (SM22) is decreased in prostate cancer. *Cell Tissue Res.* 2010;339(2):337-47. DOI: 10.1007/s00441-009-0902-y.
20. Zhang R, Zhou L, Li Q. Up-regulation of two actin-associated proteins prompts pulmonary artery smooth muscle cell migration under hypoxia. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009;41(4):467-75. DOI: 10.1165/rcmb.2008-0333OC.
21. Huang L, Li L, Yang T, Li W, Song L, Meng X, Gu Q, Xiong C, He J. Transgelin as a potential target in the reversibility of pulmonary arterial hypertension secondary to congenital heart disease. *J Cell Mol Med.* 2018 Dec;22(12):6249-61. DOI: 10.1111/jcmm.13912.
22. Zhetisheva RA, Kovaleva MA, Galakhov IE, Kamenikhina IA, Novikova LA, Shogenova MH, Karpov AM, Kovalev LI, Naumov VG. Study of the protein composition of the intima and copper of the thoracic aorta of patients with coronary artery disease with atherosclerotic lesions by proteomic technologies. *Cardiological Bulletin.* 2015;(2):44-50. Russian (Жетишева РА, Ковалева МА, Галахов ИЕ, Каменихина ИА, Новикова ЛА, Шогенова МХ, Карпов АМ, Ковалев ЛИ, Наумов ВГ. Исследование белкового состава интимы и меди грудного отдела аорты больных ИБС при атеросклеротическом поражении протеомными технологиями. *Кардиологический вестник.* 2015;(2):44-50).
23. Shevchenko A, Wilm M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem.* 1996 Mar 1;68(5):850-8.
24. Govorun VM, Archakov AI. Proteomic technologies in modern biomedical science. *Biochemistry.* 2002;67(10):1341-1359. Russian (Говорун ВМ, Арчаков АИ. Протеомные технологии в современной биомедицинской науке. *Биохимия.* 2002;67(10):1341-1359).
25. Glantz S. Biomedical statistics. M: Publishing house Practice, 1999:459. Russian (Гланц С. Медико-биологическая статистика. М: Практика, 1999:459).
26. Kovaleva MA. Proteomic databases for the search of tissue-specific protein markers of muscle organs. Abstract. doct. diss. M, 2013:48. Russian (Ковалева МА. Протеомные базы данных для поиска тканеспецифичных белковых маркеров мышечных органов. Автореф. докт. дисс. М, 2013:48).