

# Поиск белковых биомаркеров при атеросклерозе с помощью протеомных технологий как перспективное направление науки

DOI: 10.34687/2219-8202.JAD.2020.02.0002

© Р. А. Жетишева<sup>1</sup>, М. А. Ковалева<sup>2</sup>, И. А. Каменихина<sup>2</sup>, Л. И. Ковалев<sup>2</sup>, В. Г. Наумов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России, г. Москва

<sup>2</sup> Институт биохимии им. А. Н. Баха ФИЦ биотехнологии РАН, г. Москва

Для цитирования: Жетишева Радима Анатольевна, Ковалева Марина Анатольевна, Каменихина Инна Анатольевна, Ковалев Леонид Иванович, Наумов Владимир Геннадьевич. Поиск белковых биомаркеров при атеросклерозе с помощью протеомных технологий как перспективное направление науки. *Атеросклероз и дислипидемии*. 2020; 2(39): 12-19.

DOI: 10.34687/2219-8202.JAD.2020.02.0002

## Абстракт

В обзоре представлен анализ литературных данных о роли протеомики в патогенезе атеросклероза и о потенциальных биомаркерах заболеваний, с ним ассоциированных. Атеросклероз является основной причиной сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) во всем мире. Изучение молекулярных механизмов развития и прогрессирования атеросклероза с выявлением его биомаркеров – перспективное направление клинической медицины. С этой целью используют протеомный анализ биологических жидкостей и атеросклеротической ткани.

**Заключение.** Современные протеомные технологии позволяют понять молекулярные механизмы патогенеза атеросклероза, дают возможность выявить новые диагностические и прогностические биомаркеры развития и прогрессирования атеросклероза, что может быть использовано в разработке принципиально новых методов профилактики и лечения ССЗ.

**Ключевые слова:** атеросклероз, патогенез атеросклероза, протеомика, белки, протеомные технологии, масс-спектрометрия, двумерный электрофорез.

## The protein biomarkers search in atherosclerosis using proteomic technologies – as a promising area of science

R. A. Zhetisheva<sup>1</sup>, M. A. Kovaleva<sup>2</sup>, I. A. Kamenihina<sup>2</sup>, L. I. Kovalev<sup>2</sup>, V. G. Naumov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Federal State Budgetary Organisation National Medical Research Center of Cardiology of Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia.

## Abstract

The review presents the analysis current data on the role of proteomics in the pathogenesis of atherosclerosis and potential biomarkers of diseases associated with it. Atherosclerosis is the leading cause of cardiovascular disease (CVD) worldwide. The study of molecular mechanisms of the development and progression of atherosclerosis with the identification of its biomarkers is a promising area of clinical medicine. For this purpose, proteomic analysis of biological fluids and atherosclerotic tissue is used.

**Conclusion:** modern proteomic technologies make it possible to understand the molecular mechanisms of the pathogenesis of atherosclerosis and to identify new diagnostic and prognostic biomarkers for the development and progression of atherosclerosis, which can be used in the elaboration of fundamentally new methods for the prevention and treatment of CVD.

**Keywords:** atherosclerosis, pathogenesis of atherosclerosis, proteomics, proteins, proteomic technologies, mass spectrometry, two-dimensional electrophoresis.

Несмотря на заметные успехи в медицине за последние несколько десятилетий, сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) по-прежнему являются основной причиной заболеваемости и смертности во всем мире. Примерно одна треть всех смертей в мире связана с ишемической болезнью сердца (ИБС). Атеросклероз является основной причиной сердечно-сосудистой патологии и может быть охарактеризован как воспалительное заболевание, связанное с определенными факторами риска, такими как дислипидемия, гипертония и курение [1]. Свидетельства наличия воспалительного процесса при атеросклеротических поражениях были отмечены в самых ранних гистологических наблюдениях; показано, что воспаление играет ключевую роль в патогенезе атеросклероза [2, 3]. Макрофаги, поглощающие окисленный ЛПНП, выделяют ряд провоспалительных веществ, цитокинов и факторы роста. Среди многих вовлеченных молекул основными являются: хемотаксический белок моноцитов (MCP)-1; молекула межклеточной адгезии (ICAM)-1; макрофагальные и гранулоцитарно-макрофагальные колониестимулирующие факторы; лиганд CD40; интерлейкин (IL) – 1, IL-3, IL-6, IL-8 и IL-18; фактор некроза опухоли альфа [4, 5]. Доказательства, подтверждающие важность воспаления в патогенезе атеросклероза, получены из наблюдения, что маркеры повышенного или пониженного системного воспаления связаны с риском развития атеросклероза. Так, результаты исследования CANTOS показали, что ингибирование бета-интерлейкина-1 с помощью канакиумаба существенно снижает воспалительные биомаркеры – С-реактивный белок и IL-6 без изменения атерогенных липидов у пациентов с предшествующим инфарктом миокарда. При этом риск сердечно-сосудистой смерти, нефатального инфаркта миокарда и нефатального инсульта снизился на 15 процентов ( $p = 0,021$ ) при подкожной инъекции канакиумаба по 150 мг каждые три месяца [6].

Высокий уровень холестерина ЛПНП является одним из важнейших факторов риска развития атеросклероза [7]. Холестерин аккумулируется в пенистых клетках и в липидном ядре атеросклеротической бляшки. Окисленный ЛПНП способствует поглощению макрофагами холестерина с помощью фагоцитарных рецепторов, таких как CD36, также называемый фагоцитарным рецептором В. Поглощение макрофагами ЛПНП может первоначально быть адаптивным ответом, который предотвращает повреждение эндотелия липопротеинами низкой плотности, однако далее накопление холестерина в пенистых клетках приводит к митохондриальной дисфункции, апоптозу и некрозу с последующим высвобождением клеточных протеаз, воспалительных цитокинов и протромботических молекул. Неоднократно продемонстрировано, что уменьшение уровня ЛПНП может снизить частоту сердечно-сосуди-

стых событий и связано с лучшим клиническим исходом [8, 9]. ЛПВП, напротив, обладают антиатерогенными свойствами, заключающимися в обратном транспорте холестерина, поддержании эндотелиальной функции и антитромбогенном эффекте. Существует обратная связь между уровнем ЛПВП в плазме крови и риском развития ССЗ. Тем не менее не было зарегистрировано снижения частоты ССЗ вследствие повышения уровня ЛПВП. Также не было выявлено снижения риска развития инфаркта миокарда при повышении уровня ЛПВП в плазме с помощью некоторых генетических механизмов [10]. Таким образом, ЛПВП могут служить биомаркером риска атеросклероза, но пока нет доказательств того, что это модифицируемый фактор риска.

Достижения последних лет в области геномики, протеомики, метаболомики произвели революцию в поиске многочисленных предполагаемых маркеров, которые могут быть информативными в отношении различных стадий атеросклероза [11]. Поиск биомаркеров ССЗ является перспективным научным направлением в медицине, имеющим значение в скрининге, диагностике, прогнозе и контроле эффективности проводимой терапии при патологии ССЗ. Биомаркерами считаются определенные молекулы, белки или ферменты в плазме крови, которые имеют независимую диагностическую или прогностическую ценность, отражая основное заболевание или состояние [12]. Биомаркером является биологический параметр, который можно определить и измерить и который может служить показателем состояния здоровья и физиологии [13, 14]. При ССЗ биомаркеры можно разделить на установленные (тропонин), потенциально устаревшие (изоформы КФК-МВ, миоглобин и креатинкиназа), исследующиеся (С-реактивный белок, натрийуретический пептид В-типа) и новые (лиганд sCD40, миелопероксидаза, модифицированный ишемией альбумин, связанный с беременностью белок плазмы А, холин, плацентарный фактор роста, цистатин С, белок, связывающий жирные кислоты, и т.д.) [15, 16].

Среди всех возможных технологий поиска новых биомаркеров заболеваний протеомные являются наиболее перспективными. Протеомика – исследование структуры и функции белков, включающее в себя быстро развивающуюся клиническую протеомику, которая направлена на идентификацию белков, участвующих в патогенезе различных заболеваний, изучение их экспрессии и состава. 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 [17].

Скрининговые тесты на основе протеомных методов дают возможность сравнить белки, экспрессируемые в крови, образце ткани или клетках с белковыми паттернами у пациентов

с установленным конкретным заболеванием. Особое значение приобретают протеомные технологии при изучении патогенеза атеросклероза.

С появлением новых протеомных методов разделения белков с помощью двумерного электрофореза 2DE и их идентификации с помощью масс-спектрометрии (МС) стала возможна оценка тысяч белков одновременно. Протеомные технологии позволяют сравнивать экспрессию большого количества белков из различных биологических образцов, в том числе из жидкостей, тканей и клеток [18, 19]. Первые экспериментальные работы с электрофорезом проводились в 1930-40 гг. В 1948 году нобелевским лауреатом стал Арне Тисселиус за открытие комплекса белков в сыворотке крови с помощью электрофореза и адсорбционного анализа. Дальнейшее развитие и применение этого метода разделения белков произошло в 1955 году. Оливер Смитис разработал зональный электрофорез в крахмальном геле, впоследствии тоже ставший нобелевским лауреатом. Метод совершенствовался, и в 1959 году был предложен метод электрофореза белков в полиакриламидном геле (ПААГ). В 1970 году Лэммли значительно усовершенствовал электрофорез в ПААГ, разделив 28 белковых компонентов бактериофага T4. В 1975 году появился двумерный (2DE) электрофорез. Метод нашёл широкое применение в биологических исследованиях, а с появлением идентификации белков методом масс-спектрометрии стало возможно оценивать тысячи белков. МС – это физический метод измерения отношения массы заряженных частиц материи (ионов) к их заряду и определения количества ионов с определенным отношением массы к заряду. История МС ведется с начала XX века с создания Дж. Дж. Томсоном первого масс-спектрометра и получения им масс-спектров молекул кислорода, азота, угарного газа, углекислого газа и фосгена. Признанием важности МС для развития современной науки стало присуждение в 2002 г. Нобелевской премии создателям методов электроспрея и MALDI (матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация) Джону Фенну и Коичи Танаке [20–23].

В настоящее время можно применять дифференциальный протеомный подход к различным биологическим образцам, включая клетки, ткани или биологические жидкости. В контексте открытия биомаркеров биологические жидкости, такие как плазма или моча, представляют собой наиболее логичные биоматериалы для исследования вследствие их легкой доступности. Однако анализ плазмы крови является наиболее сложным вследствие содержания в ней огромного количества разных белков [24].

В настоящее время существует довольно ограниченное число биомаркеров заболеваний, ассоциированных с атеросклерозом, используемых в рутинной клинической практике [25, 26]. При

атеросклерозе из атеросклеротических бляшек (АБ) белки в ограниченных количествах диффундируют в плазму крови, где их обнаружение и последующая идентификация затруднительна, так как они маскируются большим количеством основных белков плазмы, таких как альбумин и иммуноглобулины. Новые технологии «истощения» обильных основных белков плазмы, совместимые с протеомным анализом, облегчают задачу обнаружения биомаркеров, отражающих сосудистые заболевания [27, 28]. Другой подход заключается в анализе клеток/ткани сосудистой стенки при атеросклеротическом поражении в сравнении со здоровыми клетками/тканью с целью изучения секретируемых ими белков.

Для лучшего понимания патогенеза атеросклероза необходимо идентифицировать и охарактеризовать экспрессируемые на разных стадиях атерогенеза белки в сосудистой стенке и АБ. Фактически многие белки (факторы роста, липидассоциированные белки, мембранные рецепторы, тканевые ферменты и т.д.) вовлечены в сложный процесс атерогенеза. Таким образом, профиль экспрессируемых белков из образцов атеросклеротической ткани может показать «молекулярный снимок» функционального и морфологического состояния АБ. С этой целью можно использовать несколько экспериментальных подходов: 1) определение всех экспрессируемых белков в ткани и их анализ с помощью 2DE [29, 30]; 2) фокусировка на определенной группе белков с использованием специфических антител [31]; 3) изучение протеомного состава сосудистой стенки и АБ с использованием прямой тканевой протеомики – метода, который позволяет идентифицировать белки непосредственно в фиксированных в парафине образцах ткани с помощью формалина [32]; 4) применение МС с получением пептидных профилей и двумерных карт белков из образцов тонкой замороженной ткани [33]; 5) фокусирование внимания на субпротеомах (интима, внеклеточные белки и протеогликаны, ассоциированные с неоваскуляризацией белки и т.д.) [34]; 6) изучение белков, экспрессируемых в относительно чистых клеточных популяциях, полученных из атеросклеротических тканей с использованием лазерной микродиссекции [35].

Большинство работ по изучению белкового состава сыворотки крови, мочи, пораженных атеросклеротических очагов *ex vivo* выполнено на животных моделях [36, 37]. В этих работах показана роль апополипротеина Е (АпоЕ). С использованием модели мышей с дефицитом АпоЕ изменения белка, проанализированные на различных стадиях атерогенеза, были изучены с помощью 2DE и МС, при этом выявлено 79 белков, измененных на разных стадиях атерогенеза. Аналогично в модели коронарного атеросклероза, вызванного диетой с высоким содержанием холестерина, у крыс было выявлено 46 измененных

белков в сравнении с контрольной группой, в том числе редокс-ферменты, HSP-27, белок, ингибирующий кальций-кальмодулин-киназу II, и фруктозо-бифосфат-альдолаза [38, 39].

Ряд исследований продемонстрировал, что большое количество белков вовлечено в патогенез атеросклероза [40]. Поэтапный патогенез атеросклероза, приводящий в конечном счете к разрыву АБ, включает в себя ключевые внутриклеточные и внеклеточные белковые сигнальные механизмы. Создаются протеомные базы данных в норме. При этом большое внимание уделяется протеому исследованию гладкомышечных клеток сосудистой стенки. Так, методом 2DE выделены белки у человека в норме в большой подкожной вене [41] и во внутренней артерии молочной железы [42]. В основной культуре гладкомышечных клеток из внутренней артерии молочной железы выявлено 83 внутриклеточных и 18 секретируемых различных белков. Эти результаты помогают понять механизмы нормального регулирования дифференциации гладкомышечных клеток сосудистой стенки, и следующим шагом является сравнение экспрессии белков в норме и при различных патологиях. В исследовании, проведенном Жетишевой Р.А. и соавт. с помощью протеомных технологий подтверждена миграция гладкомышечных клеток из медиального слоя в интиму и их локализация в области липофиброзных бляшек при атеросклерозе. Специфическими биомаркерами миграции оказались белки кальпонин и трансгелин [43].

Одно из первых исследований ткани на предмет патологической экспрессии белков *in vivo* проведено в 1986 году с использованием 2DE, при этом сравнивалась экспрессия белка в участках с атеросклеротическим поражением интимы аорты и в норме. В небольшой когорте пациентов исследователи выявили повышенную экспрессию белков плазмы: альбумина, альфа-1-антитрипсина, трансферрина и АпоА-1 [44].

В 2004 году введено исследование, в котором сравнивали экспрессию белков у пациентов с острым коронарным синдромом (ОКС) с контрольной здоровой группой. Обнаружено изменение следующих белков плазмы у пациентов с ОКС: альфа-1-антитрипсин, иммуноглобулин-γ, аполипопротеин-а-1 и цепи фибриногена-γ, а уменьшение концентрации некоторых изоформ альфа-1-антитрипсина и аполипопротеина А-1 и повышение уровня тяжелых цепей фибриногена и гамма-иммуноглобулина наблюдается в плазме крови пациентов с ОКС [45]. Успех этой пилотной работы позволил провести более крупное исследование, в котором приняли участие 53 пациента с ИБС с соответствующей контрольной группой здоровых лиц. При проведении тандемной МС было выявлено 95 белков, различно экспрессируемых по группам [46].

При использовании прямой тканевой протеомики в 35 образцах атеросклеротически

измененных коронарных артерий человека было идентифицировано более 800 белков, включая белки экстрацеллюлярного матрикса, липидсвязывающие белки, провоспалительные белки и др. [32].

Вызывают большой интерес результаты работы, в которой показано, что у пациентов с АБ в сонных артериях выявлено 202 различных белка в полученном супернатанте, тогда как в случае сонных артерий, не пораженных атеросклерозом, в супернатанте было обнаружено лишь 42 белка [47]. Используя наборы антител, идентифицировали новые белки, связанные с развитием нестабильных бляшек в каротидных артериях. Сравнили экспрессию белка в образцах, полученных при каротидной эндартерэктомии, гистологически разделенных на стабильные и нестабильные АБ. Согласно авторам, модуляция этих новых клеточных сигнальных белков может быть использована при ангиогенезе и апоптозе с целью предупреждения образования нестабильных бляшек [31]. Проведен протеомный анализ стабильных АБ в сравнении с атеротромботическими бляшками. В атеротромботических бляшках идентифицирован 71 белок, отличный от белков стабильной бляшки. Наиболее показательной была разница в экспрессии альфа-1-антитрипсина. Так, в стабильной бляшке выявлено 6 изоформ альфа-1-антитрипсина, в то время как в атеротромботической – только одна [29]. При протеомном анализе очагов атеросклеротических поражений выявлено, что при увеличенном содержании в атероме остеопонтин повышается риск развития острых сердечно-сосудистых событий [48,49].

В 2009 году, используя методы 2DE и время-пролетной МС, было обнаружено, что высокие уровни плазменного гаптоглобина и амилоида А в сыворотке крови связаны с атеротромботическим типом инсульта [50].

Результаты исследования, опубликованного в 2011 году в журнале «Молекулярная и клеточная протеомика», показали изменение 13 белков, участвующих в миграции эндотелиальных гладкомышечных клеток, построении внеклеточного матрикса, коагуляции, апоптозе, в том числе: ферритин LC, ANXAA4, MRLC, виментин, которые потенциально могут быть новыми биомаркерами атеросклероза [51].

В исследовании протеомного состава циркулирующих моноцитов крови у пациентов с ОКС с использованием 2DE и МС, проведенного Barderas M.G. et al. в 2007 году, было обнаружено 17 протеинов с нарушенной экспрессией по сравнению с группой пациентов со стабильной ИБС, в том числе зарегистрировано снижение антиатерогенных протеинов, таких как параоксаназа-1 и HSP70, а также противовоспалительных протеинов – протеиндисульфидизомераза. В то же время зафиксирована повышенная экспрессия проатерогенных белков: катепсина Д и энлазы-1,

участвующих в трансформации макрофагов в пенистые клетки. Проведено несколько исследований, целью которых было выявить маркеры воспаления в плазме крови, обладающие предикторной ценностью в отношении возможного развития ОКС. Однако ни один из них не был принят единогласно клиницистами вследствие отсутствия достаточного количества исследований, подтверждающих их прогностическую ценность [52, 53].

Наиболее широко изученным потенциальным биомаркером на сегодняшний день является С-реактивный белок (СРБ) [54, 55]. Сывороточный ультрачувствительный С-реактивный белок (hsCRP) является одним из важнейших маркеров воспаления, имеющих прямую корреляцию с повышенным риском развития атеросклеротических сердечно-сосудистых заболеваний независимо от уровня холестерина [56]. Другие потенциально прогностически ценные белки: CD40L, хемоаттрактантный белок-1 моноцитов (MCP-1), молекулы адгезии, миелопероксидаза и несколько интерлейкинов. Тем не менее ни один из них не был внедрен в рутинную клиническую практику, и в большинстве случаев коммерчески доступных стандартизированных анализов нет. Одним из ограничений исследований биомаркеров является то, что до настоящего времени каждое исследование может анализировать данные тысяч пациентов, но фокусируется только на небольшом количестве белков. Новые протеомные подходы могут предоставить возможность исследовать сотни белков одновременно и выявлять новые непредвиденные биомаркеры.

Поиск биомаркеров различных заболеваний, в том числе новых биомаркеров коронарного атеросклероза и ССЗ, является перспективным направлением современной медицинской диагностики. В клинической практике используются различные биомаркеры, но многие из них не полностью соответствуют современным требованиям. В клинической биохимии протеомный анализ применяется для выявления типа патологического процесса (воспаление, дегенерация, рост опухоли). При различных заболеваниях синтезируются «нетипичные» белки, а синтез «нормальных» белков приостанавливается. Особое внимание обращается на белки острой фазы и белки системы комплемента. Было показано, что снижение уровня церулоплазмينا является неблагоприятным прогностическим

фактором у пациентов с ИБС и сердечной недостаточностью [57, 58]. В исследовании, проведенном в 2016 году Е. М. Stakhneva, I. A. Meshcheryakova et al. изменения в белках сыворотки крови оценивали у мужчин с ИБС. Белки разделяли с помощью 2DE, белковые фракции были идентифицированы по их пептидному «отпечатку» методом MALDI. В сыворотках крови больных с ИБС уровень С4-комплемента был повышен, в то время как уровень церулоплазмينا снижен, что характерно для сердечной недостаточности и ИБС [59].

Известно, что геном человека содержит не менее 30 000 генов, которые кодируют более миллиона белков. Белки участвуют во всех клеточных функциях, контролируют каждый регулирующий механизм. Идентификация конкретных белков может дать четкое понимание патогенеза заболевания [52, 60, 61].

В 2001 г. была основана HUPO (Human Proteome Organization) – международная организация, которая объединяет и направляет усилия ученых. Основные направления исследований: протеом человека, протеомика мозга, протеомика стволовых клеток, изучение антител, определение биомаркеров заболеваний и т. д. В сентябре 2010 года стартовал международный проект «Протеом человека», который стал продолжением проекта «Геном человека». Этот проект значительно более масштабен, чем «Геном человека». Геном человека состоит из порядка 20 тыс. генов, а количество белков в организме человека за счёт наличия различных белковых протеоформ превышает 2 млн, а также в отличие от генома протеом непрерывно меняется в зависимости от влияния внутриклеточных и внешних факторов и, по сути, представляет собой фиксированную во времени совокупность белков в конкретном биологическом объекте и в определённой ситуации. Первоочередной задачей проекта является составление протеомных карт основных белков [62–64]. Полученные результаты в этой области могут в корне поменять представления о патогенезе различных заболеваний, что может быть полезно в вопросах ранней диагностики и разработки новых групп лекарственных препаратов.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии возможных конфликтов интересов.

## Список литературы

1. Kobiyama K, Ley K. Atherosclerosis. *Circ Res*. 2018; 123 (10): 1118–1120. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313816.
2. Taleb S. Inflammation in atherosclerosis. *Arch Cardiovasc Dis*. 2016; 109 (12): 708–715. doi: 10.1016/j.acvd.2016.04.002.
3. Moriya J. Critical roles of inflammation in atherosclerosis. *J Cardiol*. 2019 Jan;73(1):22–7. doi: 10.1016/j.jjcc.2018.05.010.
4. Fatkullina AR, Peshkova IO, Koltsova EK. The Role of Cytokines in the Development of Atherosclerosis. *Biochemistry (Mosc)*. 2016; 81 (11): 1358–1370.
5. Wolf D, Ley K. Immunity and Inflammation in Atherosclerosis. *Circ Res*. 2019; 124 (2): 315–327. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313591.
6. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, Fonseca F, Nicolau J, Koenig W, Anker SD, Kastelein JJP, Cornel JH, Pais P, Pella D, Genest J, Cifkova R, Lorenzatti A, Forster T, Kobalava Z, Vida-Simiti L, Flather M, Shimokawa H, Ogawa H, Dellborg M, Rossi PRF, Troquay RPT, Libby P, Glynn RJ; CANTOS Trial Group. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med*. 2017; 377: 1119–1131.
7. Khosravi M, Hosseini-Fard R, Najafi M. Circulating low density lipoprotein (LDL). *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2018; 35 (2): 20180024. doi: 10.1515/bmbci-2018-0024.
8. Silverman MG, Ference BA, Im K, Wiviott SD, Giugliano RP, Grundy SM, Braunwald E, Sabatine MS. Association Between Lowering LDL-C and Cardiovascular Risk Reduction Among Different Therapeutic Interventions: A Systematic Review and Meta-analysis. 2016; 316 (12): 1289–1297. DOI: 10.1001/jama.2016.13985.
9. Sabatine MS, Giugliano RP, Keech AC, Honarpour N, Wiviott SD, Murphy SA, Kuder JF, Wang H, Liu T, Wasserman SM, Sever PS, Pedersen TR. Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease. *N Engl J Med*. 2017; 376: 1713–1722. DOI: 10.1056/NEJMoa1615664.
10. Gordon SM, Chung JH, Playford MP, Dey AK, Sviridov D, Seifuddin F, Chen YC, Pirooznia M, Chen MY, Mehta NN, Remaley AT. High density lipoprotein proteome is associated with cardiovascular risk factors and atherosclerosis burden as evaluated by coronary CT angiography. *Atherosclerosis*. 2018; 278: 278–285. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.09.032.
11. Mourino-Alvarez L, Baldan-Martin M, Rincon R, Martin-Rojas T, Corbacho-Alonso N, Sastre-Oliva T, Barderas MG. Recent advances and clinical insights into the use of proteomics in the study of atherosclerosis. *Expert Rev Proteomics*. 2017 2017; 14 (8): 701–713. doi: 10.1080/14789450.2017.13539
12. Rosado M, Silva R, G Bexiga M, G Jones J, Manadas B, Anjo S. Advances in biomarker detection: Alternative approaches for blood-based biomarker detection. *Adv Clin Chem*. 2019; 92: 141–199. doi: 10.1016/bs.acc.2019.04.003.
13. Antoranz A, Sakellaropoulos T, Saez-Rodriguez J, Alexopoulos LG. Mechanism-based biomarker discovery. *Drug Discov Today*. 2017; 22 (8): 1209–1215. doi: 10.1016/j.drudis.2017.04.013.
14. Huang Y, Gulshan K, Nguyen T, Wu Y. Biomarkers of Cardiovascular Disease. *Dis Markers*. 2017; 2017: 8208609. doi: 10.1155/2017/8208609.
15. Jaffe AS, Babuin L, Apple FS. Biomarkers in acute cardiac disease: the present and the future. *J Am Coll Cardiol*. 2006; 48: 1–11. DOI: 10.1016/j.jacc.2006.02.056.
16. Balogh E, Pusztai A, Hamar A. Autoimmune and angiogenic biomarkers in autoimmune atherosclerosis. *Clin Immunol*. 2019; 199: 47–51. 10.1016/j.clim.2018.12.011.
17. Aslam B, Basit M, Nisar MA. Proteomics: Technologies and Their Applications. *J Chromatogr Sci*. 2017; 55 (2): 182–196. doi: 10.1093/chromsci/bmw167.
18. Tunon J, Martin-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Lorenzo O, Lopez JA, Egido J. Proteomic strategies in the search of new biomarkers in atherothrombosis. *J Am Coll Cardiol*. 2010; 55: 2009–2016. DOI: 10.1016/j.jacc.2010.01.036.
19. Li X, Wang W, Chen J. Recent progress in mass spectrometry proteomics for biomedical research. *Sci China Life Sci*. 2017; 60 (10): 1093–1113. doi: 10.1007/s11427-017-9175-2.
20. Tiselius A. A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. *Faraday Society*. 1937; 33: 524–531.
21. Bier M. *Electrophoresis: Theory, Methods and Applications*. Academic Press. 1964; 3: 225–563.
22. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227 (5259): 680–685.
23. Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T. Protein and Polymer Analyses up to m/z 100,000 by Laser Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 1988; 2: 151.
24. Geyer PE, Kulak NA, Picbler G, Holdt LM, Teupser D, Mann M. Plasma proteome profiling to assess human health and disease. *Cell Syst*. 2016; 2 (3): 185–195. doi: 10.1016/j.cels.2016.02.015.
25. Ahmad N, Thomas GN, Chan C, Gill P. Ethnic differences in lower limb revascularisation and amputation rates. Implications for the aetiopathology of atherosclerosis? *Atherosclerosis*. 2014; 233: 503–507. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.12.039.

26. Tibaut M, Caprnda M, Kubatka P. Markers of Atherosclerosis: Part 1 - Serological Markers. *Heart Lung Circ.* 2019; 28 (5): 667-677. doi: 10.1016/j.blc.2018.06.1057.
27. Darde V.M., Barderas M.G., Vivanco F. Depletion of high-abundance proteins in plasma by immunoaffinity subtraction for two-dimensional difference gel electrophoresis analysis. *Methods Mol Biol.* 2007; 357: 351-364. DOI: 10.1385/1-59745-214-9:351.
28. Fu Q, Bovenkamp DE, Van Eyk JE. A rapid, economical, and reproducible method for human serum delipidation and albumin and IgG removal for proteomic analysis. *Methods Mol Biol.* 2007; 357: 365-371. DOI: 10.1385/1-59745-214-9:365.
29. Donners M, Verluyten MJ, Bouwman FG, Mariman E, Devrese B, et al. Proteomic analysis of differential protein expression in human atherosclerotic plaque progression. *J Pathol.* 2005; 206: 39-45. DOI: 10.1002/path.1749.
30. Naryzbny S. Inventory of proteoforms as a current challenge of proteomics: Some technical aspects. *J Proteomics.* 2019; 191: 22-28. doi: 10.1016/j.jprot.2018.05.008.
31. Slevin M, Elaslali AB, Turu M, Krupinski J, Badimon L, et al. Identification of differential protein expresiyn associated with development of unstable human carotid plaques. *Am J Pathol.* 2006; 168: 1004-1021. DOI: 10.2353/ajpath.2006.050471.
32. Lee R, Fischer R, Charles PD, Adlam D, Valli A, Di Gleria K, Kharbanda R.K., Choudbury R.P., Antoniadis C., Kessler B.M., Channon K.M. A novel workflow combining plaque imaging, plaque and plasma proteomics identifies biomarkers of human coronary atherosclerotic plaque disruption. *Clin Proteomics.* 2017; 14: 22. doi: 10.1186/s12014-017-9157-x.
33. Stoeckli M, Chaurand P, Hallaban DE, Caprioli RM. Imaging mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues. *Nat Med.* 2001; 7: 493-496. DOI: 10.1038/86573.
34. Talusan P, Bedri S, Yang S, Kattapuram T, Silva N, Roughley PJ, Stone JR. Analysis of intimal proteoglycans in atherosclerosis-prone and atherosclerosis-resistant human arteries by mass spectrometry. *Mol Cell Proteom.* 2005; 4: 1350-1357. DOI: 10.1074/mcp.M500088-MCP200.
35. Trogan E, Fisher EA. Laser capture microdissection for analysis of macrophage gene expression from atherosclerotic lesions. *Methods Mol Biol.* 2013; 1027: 123-135. DOI: 10.1007/978-1-60327-369-5\_5.
36. Emini Veseli B, Perrotta P, De Meyer GRA, Roth L, Van der Donckt C, Martinet W, De Meyer GRY. Animal models of atherosclerosis. *Eur J Pharmacol.* 2017; 816: 3-13. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.05.010.
37. Ob JG, Ishikawa K. Experimental Models of Cardiovascular Diseases: Overview. *Methods Mol Biol.* 2018; 1816: 3-14. doi: 10.1007/978-1-4939-8597-5\_1.
38. Mayr M, Chung YL, Mayr U, Yin X, Ly L, Troy H, Fredericks S, Hu Y, Griffiths JR, Xu Q. Proteomic and metabolomic analyses of atherosclerotic vessels from apolipoprotein E deficient mice reveal alterations in inflammation, oxidative stress, and energy metabolism. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol.* 2005; 25: 2135-2142. DOI: 10.1161/01.ATV.0000183928.25844.f6.
39. Almofti MR, Huang Z, Yang P, Rui Y. Proteomic analysis of rat aorta during atherosclerosis induced by high cholesterol diet and injection of vitamin D3. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006; 33: 305-309. DOI: 10.1111/j.1440-1681.2006.04366.x.
40. Gremmel T, Koppensteiner R, Kaider A, Eichelberger B, Mannhalter C, Panzer S. Impact of variables of the P-selectin - P-selectin glycoprotein ligand-1 axis on leukocyte-platelet interactions in cardiovascular disease. *Thromb Haemost.* 2015; 113 (4): 806-812. doi: 10.1160/TH14-08-0690.
41. McGregor E, Kempster L, Wait R, Welton SY, Gosling M, Dunn MJ, Power JT. Identification and mapping of human saphenous vein medial smooth muscle proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Proteomics.* 2001; 1: 1405-1414. DOI: 10.1002/1615-9861(200111)1:11<1405::AID-PROT1405>3.0.CO;2-H.
42. Dupont A, Corseaux D, Dekeyzer O, Drobecq H, Guibot AL, Susen S, Vincentelli A, Amouyel PH, Jude B, Pinet F. The proteome and secretome of human arterial smooth muscle cells. *Proteomics.* 2005; 5: 585-596. DOI: 10.1002/pmic.200400965.
43. Zhetisheva R, Kovaleva M, Kamenibina I, Isaykina T, Karpov A, Kovalev L, Naumov V. Comparative characteristics of the proteome of thoracic aorta intima and media in normal and atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis.* 2019; 287: E270. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2019.06.834.
44. Stastny J, Fosslien E, Robertson AL. Jr. Human aortic intima protein composition during initial stages of atherogenesis. *Atherosclerosis* 1986; 60: 131-139.
45. Mateos-Caceres PJ, Garcia-Mendez A, Lopez Farre A, Macaya C, Nunez A, Gomez J, Alonso-Ortiz S, Carrasco C, Burgos ME, Raimundo De Andrés, Juan J, Jerynimo G Farrü, Rico LA. Proteomic analysis of plasma from patients during an acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol .* 2004; 44: 1578-1583. DOI: 10.1016/j.jacc.2004.06.073.
46. Donabue MP, Rose K, Hochstrasser D, Vonderscher J, Grass P, Cibout SD, Nelson CL, Sinnaeve P, Goldschmidt-Clermont PJ, Granger CB. Discovery of proteins related to coronary artery disease using industrial-scale proteomics analysis of pooled plasma. *Am Heart J.* 2006; 152: 478-485. DOI: 10.1016/j.ahj.2006.03.007.

47. Duran MC, Mas S, Martin-Ventura JL, Meilbac O, Michel JB, Gallego-Delgado J, L6zaro A, Tucon J, Egido J, Vivanco F. Proteomic analysis of human vessels: application to atherosclerotic plaques. *Proteomics*. 2003; 3: 973-978. DOI: 10.1002/pmic.200300389.
48. de Kleijn DP, Moll FL, Hellings WE, Ozsarlak-Sozer G, de Bruin P, Doevendans PA, Vink A, Catanzariti LM, Schoneveld AH, Algra A, Daemen MJ, Biessen EA, de Jager W, Zhang H, de Vries JP, Falk E, Lim SK, van der Spek PJ, Sze SK, Pasterkamp G. Local atherosclerotic plaques are a source of prognostic biomarkers for adverse cardiovascular events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010; 30: 612-619. DOI: 10.1161/ATVBAHA.109.194944.
49. Ding Y, Chen J, Cui G. Pathophysiological role of osteopontin and angiotensin II in atherosclerosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016; 471 (1): 5-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.01.142.
50. Brea D, Sobrino T, Blanco M, Fraga M, Agulla J, Rodriguez-Y6chez M, Rodriguez-Gonz6lez R, P6rez de la Ossa N, Leira R, Forteza J, D6valos A, Castillo J. Usefulness of haptoglobin and serum amyloid A proteins as biomarkers for atherothrombotic ischemic stroke diagnosis confirmation. *Atherosclerosis*. 2009; 205: 561-567. DOI: 10.1161/ATVBAHA.109.194944.
51. de la Cuesta F, Alvarez-Llamas G, Maroto A.S. A proteomic focus on the alterations occurring at the human atherosclerotic coronary intima. *Mol Cell Proteomics*. 2011; 10 (4): M110.003517. DOI: 10.1074/mcp.M110.003517.
52. Zhu H, Han R, Duan DD. Novel Biomarkers and Treatments of Cardiac Diseases. *Biomed Res Int*. 2016; 2016: 1315627. doi: 10.1155/2016/1315627.
53. Barderas MG, Tuco'n J, Dard6 VM, De La Cuesta F, C Dur6n M, Jim6nez-N6cher JJ, Tarun N, Lypez-Bescys L, Egido J, Vivanco F. Circulating human monocytes in the acute coronary syndrome express a characteristic proteomic profile. *J Proteome Res*. 2007; 6: 876-886. DOI: 10.1021/pr0601990.
54. Stone PA, Kazil J. The relationships between serum C-reactive protein level and risk and progression of coronary and carotid atherosclerosis. *Semin Vasc Surg*. 2014; 27 (3-4): 138-142. doi: 10.1053/j.semvascsurg.2015.04.002.
55. Hou D, Liu J, Feng R, Gao Y, Wang Y, Wu J. The role of high-sensitivity C-reactive protein levels in functional outcomes in patients with large-artery atherosclerosis and small-artery occlusion. *Neurol Res*. 2017; 39 (11): 981-987. doi: 10.1080/01616412.2017.1358937.
56. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, Fonseca F, Nicolau J, Koenig W, Anker SD, Kastelein JJP, Cornel JH, Pais P, Pella D, Genest J, Cifkova R, Lorenzatti A, Forster T, Kobalava Z, Vida-Simiti L, Flather M, Shimokawa H, Ogawa H, Dellborg M, Rossi PRF, Troquay RPT, Libby P, Glynn RJ; CANTOS Trial Group. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl Med*. 2017; 377: 1119. DOI: 10.1056/NEJMoa1707914.
57. Cabassi A, Binno SM, Tedeschi S, Ruzicka V, Dancelli S, Rocco R, Vicini V, Coghi P, Regolisti G, Montanari A, Fiaccadori E, Govoni P, Piepoli M, de Champlain J. Low serum ferroxidase I activity is associated with mortality in heart failure and related to both peroxynitrite-induced cysteine oxidation and tyrosine nitration of ceruloplasmin. *Circ Res*. 2014; 114 (11): 1723-1732. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302849.
58. Cao DJ, Hill JA. Copper futures: ceruloplasmin and heart failure. *Circ Res*. 2014; 114 (11): 1678-1680. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.114.304091.
59. Stakhneva EM, Mesbcheryakova IA, Demidov EA, Starostin KV, Ragino YI, Peltek SE, Voevoda MI. Proteomic study of blood serum in coronar atherosclerosis. *Bull Exp Biol Med*. 2017; 162 (3): 343-345. doi: 10.1007/s10517-017-3611-7.
60. Wang XL, Fu A, Spiro C, Lee HC. Clinical application of proteomics approaches in vascular sciences. *Proteomics Clin Appl*. 2008; 2: 238-250. DOI: 10.1002/prca.200780005.
61. Mourino-Alvarez L, Baldan-Martin M, Rincon R, Martin-Rojas T, Corbacho-Alonso N, Sastre-Oliva T, Barderas MG. Recent advances and clinical insights into the use of proteomics in the study of atherosclerosis. *Expert Rev Proteomics*. 2017; 14 (8): 701-713. doi: 10.1080/14789450.2017.1353912.
62. Archakov A, Zgoda V, Kopylov A, Naryzhny S, Chernobrovkin A, Ponomarenko E, Lisitsa A. Chromosome-centric approach to overcoming bottlenecks in the Human Proteome Project. *Expert Rev Proteomics*. 2012; 9 (6): 667-676. doi: 10.1586/epr.12.54.
63. Дедов ИИ, Тюльпаков АН, Чехонин ВП, Баклаушев ВП, Арчаков АИ, Мошковский СА. Персонализированная медицина: современное состояние и перспективы. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2012; 67(12): 4-12/ Dedov II, Tyul'pakov AN, Chekhonin VP, Baklaushev VP, Archakov AI, Moshkovskij SA. Personalizirovannaya medicina: sovremennoe sostoyanie i perspektivy. *Vestnik Rossijskoj akademii medicinskih nauk*. 2012; 67(12): 4-12. (in Russian) DOI:10.15690/vramn.v67i12.474.
64. Ahmad MT, Zhang P, Dufresne C. The Human Eye Proteome Project: Updates on an Emerging Proteome. *Proteomics*. 2018; 18 (5-6): e1700394. doi: 10.1002/pmic.201700394.