

В.Ю. Гарбузова, О.В. Атаман

Матриксний Gla-протеїн та його роль у кальцифікації судинної стінки

У роботі представлено будову матриксного Gla-протеїну (MGP), його хімічні характеристики, регуляцію синтезу та посттрансляційні перетворення, інформацію про структуру гена MGP та найпоширеніші однонуклеотидні його поліморфізми. Серед факторів, що регулюють експресію та активність MGP, названо вітамін D, ретиноеву кислоту, позаклітинні іони кальцію, цитокіни та деякі гормони. Підкреслено, що MGP є важливим природним інгібітором кальцифікації м'яких тканин. Такі властивості цього білка пов'язують з наявністю в його молекулі залишків γ -карбоксиглутамінової кислоти. Описано чотири можливі механізми антикальциногенної дії MGP: зв'язування з іонами кальцію та кристалами гідроксипатиту; зв'язування з компонентами позаклітинного матриксу; взаємодія з кістковим морфогенетичним протеїном (BMP-2) і усунення впливу останнього; участь у регуляції апоптозу. Підкреслено, що вивчення алельних варіантів гена MGP має важливе значення у зв'язку з можливою їх асоціацією з розвитком серцево-судинних та інших хвороб.

Ключові слова: судинна стінка, кальцифікація, поліморфізм генів, матриксний Gla-протеїн.

Матриксний Gla-протеїн (MGP) є представником групи залежних від вітаміну К білків, що містять залишки γ -карбоксиглутамінової кислоти (Gla). До цієї групи належать білки, що беруть участь у коагуляції крові: протромбін, фактори VII, IX і X, протеїни C, S і Z. Подібним до MGP є кістковий Gla-протеїн (BGP), відомий також під назвою остеокальцин.

Уперше білок, названий MGP, було виділено в 1983 р. у лабораторії Price [51] з екстрактів демінералізованого матриксу кісток биків. Таке екстрагування здійснювали розчинами сечовини з додаванням хлориду кальцію. MGP відрізнявся від відкритого раніше BGP, хоча мав з ним дуже багато схожих рис, що свідчило про спільне еволюційне походження цих двох матриксних протеїнів. Згодом було визначено первинну структуру MGP, основні хімічні характеристики, локалізацію гена MGP та його будову [6, 53].

На відміну від BGP, який синтезується виключно в тканинах кісток і зубів (струк-

турах з фізіологічною мінералізацією), MGP утворюється в м'яких тканинах зокрема в хрящах, серці, нирках, легенях, стінках кровоносних судин тощо [15, 44]. У кожній з цих тканин експресію MGP виявляли лише в окремих, специфічних для цього органа типах клітин [15]. Здатність до синтезу MGP мають остеобласти, хондроцити, гладеньком'язові клітини (ГМК) судин, пневмоцити, клітини ниркового епітелію, фібробласти, макрофаги [8, 13, 15, 18, 44, 56, 68].

У тканинах серця та легень щурів вміст мРНК MGP у 10 разів, а в тканинах нирок – у 5 разів вищий, ніж у кістках. Натомість вміст самого MGP у цих тканинах у 40–500 разів нижчий, якщо порівнювати з кістками [15]. Мала кількість MGP на тлі високої експресії його гена наводить на думку, що цей білок навряд чи діє винятково через накопичення в позаклітинному матриксі. Очевидно, що MGP акумулюється тільки в місцях кальцифікації, а більша його частина,

що синтезована в м'яких тканинах, надходить у плазму крові, де концентрація MGP становить від 0,3 до 1 мкг/мл залежно від виду тварин [44].

Біохімія MGP

Молекула MGP людини (молекулярна маса 10 кДа) складається з 84 амінокислотних залишків, 5 з яких представлено Gla [44]. З кісток щурів виділено дві форми MGP, що мають 79 і 83 залишки, тобто в них бракує відповідно 5 і 1 амінокислот від С-кінця білкової молекули [6, 51]. На відміну від усіх відомих нині вітамін-К-залежних білків, MGP не має форми пропептиду [6]. Хоча MGP містить значний відсоток гідрофільних амінокислотних залишків, він майже не розчинний у воді, а тому його транспорт плазмою крові може відбуватися тільки в комплексі з іншими водорозчинними білками.

Щойно синтезована молекула MGP складається із 103 амінокислотних залишків (84 – це зрілий білок та 19 – трансмембранний сигнальний пептид) і містить, починаючи з N-кінця, три функціональні ділянки: трансмембранний сигнальний пептид; імовірний сайт, що його розпізнає γ -карбоксилаза; домен, що містить залишки Gla [6].

Утворений у клітинах MGP зазнає посттрансляційної модифікації, яка полягає в карбоксилюванні п'яти залишків глутамінової кислоти (Glu) з утворенням Gla. Зазначена реакція каталізується ферментом γ -глутамілкарбоксилазою (GGCX) і є спряженою з окисненням відновленої форми вітаміну К (гідрохінону) в 2,3-епоксид вітаміну К. Таким чином, без окиснення вітаміну К не може відбуватися карбоксилювання Glu-залишків молекули MGP. У свою чергу достатня кількість цього вітаміну для реакції карбоксилювання MGP залежить від стану зворотної реакції його відновлення, яка здійснюється за допомогою вітамін-К-епоксидредуктазного комплексу.

Крім γ -карбоксилювання, MGP може зазнавати й інших посттрансляційних модифікацій, зокрема, специфічного протеолітичного розщеплення в С-термінальній ділянці молекули [19, 59] і фосфорилування трьох серинових залишків у N-кінцевому хвості [46].

Після наведених вище реакцій MGP накопичується у структурах апарата Гольджі та секретується в позаклітинний простір, де і виконує свої функції.

Ген MGP і його поліморфізм

Ген MGP у людини представлено однією копією, яка міститься в короткому плечі 12-ї хромосоми (12p12.3-13.1) [6]. У ньому закодовано 84 амінокислотні залишки зрілого білка і 19 залишків трансмембранного сигнального пептиду. Довжина гена – 3900 нуклеотидів, він складається з 4 екзонів, розділених трьома великими проміжними послідовностями (інтронами), на які припадає більше ніж 80 % загальної довжини гена [6] (рис. 1). Кожна з трьох функціональних ділянок білка – трансмембранний сигнальний пептид, сайт розпізнавання γ -карбоксилази і домен, що містить залишки Gla, – кодується окремим екзоном гена MGP. Четвертий екзон кодує ділянку білка, що складається з 11 амінокислотних залишків і лежить між трансмембранним сигнальним пептидом і сайтом розпізнавання γ -карбоксилази. Функція цієї ділянки MGP поки що невідома.

Подібна чотирьохекзонна організація характерна і для VGP. Вона істотним чином відрізняється від двоекзонної організації генів, які кодують відповідні ділянки в інших відомих сьогодні вітамін-К-залежних білках.

Аналіз промоторної частини гена MGP показав, що поряд з типовими TATA і CAT-боксами, вона містить регуляторні послідовності, гомологічні раніше ідентифікованим елементам, що відповідають на дію гормонів і транскрипційних факторів.

Зокрема, окреслено дві ділянки промотору, що містять можливі сайти зв'язування рецепторів ретиноевої кислоти і вітаміну D [6].

Нині описано понад 120 видів поліморфізму поодиноких нуклеотидів (SNP) у гені MGP людини. З них найкраще досліджено, з огляду їхньої асоціації з різними хворобами, три види: T⁻¹³⁸→C (rs 1800802); G⁻⁷→A (rs 1800801); Thr₈₃→Ala (rs 4236) (див. рис. 1).

Поліморфізм T⁻¹³⁸→C стосується промоторної частини гена – ділянки, яка утворює комплекси з ядерними білками і сприймає їх регуляторні впливи; G⁻⁷→A локалізований у початковому відрізку промотору, з якого стартує власне процес транскрипції; Thr₈₃→Ala – у четвертому екзоні, що кодує Gla-місткий домен. Останній варіант SNP зумовлює заміну треоніну на аланін у передостанньому 83-му залишку молекули MGP.

Питання про те, як різні види поліморфізму гена MGP впливають на його експресію та здатність сприймати різні регуляторні впливи, перебуває сьогодні у центрі уваги дослідників. Як один з підходів до його розв'язання використовують введення в культивовані клітини генетичних конструкцій, що містять “нормальний” і “патологічний” варіанти промотору MGP та ген люциферази (люциферазний тест).

Перше таке дослідження було проведено Herrmann та співавт. [20]. Автори

показали, що поліморфізм G⁻⁷→A не впливає на промоторну активність гена MGP, тоді, як активність промотору з мінорним алелем -138C (патологічний варіант) при порівнянні з -138T (нормальним варіантом) була менша на 20 % у ГМК судин щура і на 50 % у культивованих фібробластах людини.

Зовсім інші дані було отримано у дослідженні Farzaneh та співавт. [10]. Автори встановили, що промотори з поліморфізмами G⁻⁷→A і T⁻¹³⁸→C істотно змінюють транскрипційну активність гена MGP у судинних ГМК щурів *in vitro*. Так, варіант промотору з мінорним алелем -7A виявляв активність у 1,5 раза вищу, ніж -7G, а варіант -138C був у 4 рази активніший від -138T.

Аналіз промотору гена MGP показав, що поліморфізм T⁻¹³⁸→C стосується ділянки, яка є критичною для процесів транскрипції в судинних ГМК. Саме тут, у позиції між -142 і -136, розташований елемент, що може зв'язувати активаційний протеїн-1 (AP-1). Встановлено, що при поліморфізмі T⁻¹³⁸→C змінюється зв'язування цієї ділянки промотору з комплексом AP-1. Варіант промотору з алелем -138T добре зв'язує комплекси AP-1, до складу яких входять c-Jun, JunB, Fra-1 і Fra-2, і активується форболовими сполуками, тим часом здатність до зв'язування AP-1 і наступної активації у промоторі з алелем -138C є дуже низькою [10].

Наведене вище підтверджує Kobayashi

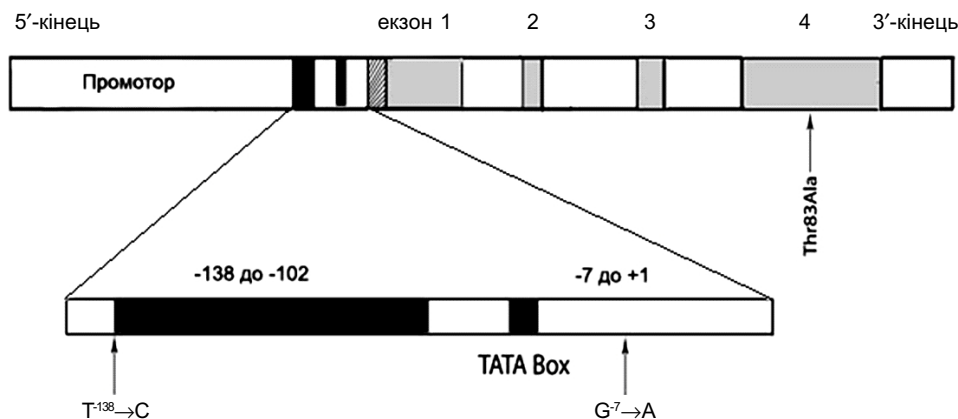


Рис. 1. Структура гена MGP і локалізація трьох його однонуклеотидних поліморфізмів

та співавт. [25], які встановили, що варіант промотору -138Т, на відміну від -138С, здатний утворювати комплекси з ядерними білками (AP-1). Проте, що стосується активності цих варіантів, то японські дослідники прийшли до зовсім інших, ніж Farzaneh та співавт., висновків: при введенні промоторів гена MGP в культивовані клітини раку молочної залози людини активність промотору з алелем -138Т була набагато вищою порівняно з алелем -138С.

Таким чином, неоднозначні результати щодо впливу різних видів поліморфізму гена MGP на його транскрипційну активність свідчать про складність проблеми і зумовлюють необхідність продовжувати дослідження в цьому напрямі.

Регуляція експресії й активності MGP

Об'єктами регуляції можуть бути експресія гена MGP і процеси посттрансляційної модифікації білка.

Як уже зазначалося, промотор гена MGP містить ділянки, що можуть сприймати різні регуляторні впливи. До таких, зокрема, відносять сайти можливого зв'язування з рецепторами вітаміну D і ретиноевої кислоти [6].

Серед вивчених *in vitro* факторів на експресію гена MGP впливають: вітамін D, ретиноева кислота, позаклітинні іони кальцію і деякі цитокіни та гормони [52].

Вітамін D. Показано, що вітамін D₃ збільшує синтез мРНК MGP в остеокластах людини, а також у хондроцитах, остеобластах і клітинах остеосаркоми щурів [13,14,38]. Він не впливає на експресію гена MGP у фібробластах, хондроцитах та остеобластах людини. У фізіологічних концентраціях вітамін D₃ посилює транскрипцію гена MGP в судинних ГМК [12].

Ретиноева кислота. Посилює утворення мРНК MGP у культивованих клітинах людини: фібробластах, хондроцитах, остеобластах; у клітинах остеосаркоми та в пневмоцитах II типу у щурів [8, 56]. Проте

вона зменшує експресію гена MGP у культивованих клітинах нирок і ГМК судин у щурів, а також у клітинах раку молочної залози людини [12, 24]. Таким чином, ретиноева кислота по-різному впливає на експресію MGP у різних типах клітин одного й того самого виду організмів.

Позаклітинні іони кальцію. При моделюванні гіперкальціємії у щурів вміст MGP у плазмі крові стрімко збільшується. Одне із запропонованих пояснень цього полягає в тому, що судинні ГМК можуть "відчувати" зміни концентрації позаклітинних іонів кальцію через кальційсенсорний механізм, пов'язаний з чутливими до кальцію рецепторами. У відповідь на сигнал ГМК збільшують експресію гена MGP [11]. Вважають, що таке збільшення при підвищенні концентрації іонізованого кальцію в тканинах є реакцією, яка запобігає розвитку патологічної кальцифікації м'яких тканин [52]. Таким чином, позаклітинний кальцій є не тільки потенційним індуктором утворення кальцієвих кристалів [58, 82], але й сигналом, що регулює кальцифікацію через стимуляцію синтезу MGP.

Цитокіни та деякі гормони. У культурі хондроцитів інсуліноподібний фактор росту 1, відомий як стимулятор диференціювання цих клітин, зумовлює зменшення синтезу мРНК MGP [72]. Натомість інгібітор диференціювання хондроцитів фактор росту фібробластів 2 посилює експресію гена MGP. На підставі цього припускають, що зазначені фактори росту змінюють диференціювання хондроцитів через вплив на MGP.

Є повідомлення про те, що трансформуючий фактор росту-β (TGF-β) збільшує синтез мРНК MGP у легеневих клітинах ембріонів [84]. Проте у дослідах з введенням штучних конструкцій промотору MGP всередину культивованих судинних ГМК щурів показано, що TGF-β пригнічує транскрипцію гена MGP [21]. EGF (епідермальний фактор росту) значно послаблює

експресію MGP у культурі клітин нирок щурів [7].

Трийодтиронін посилює транскрипцію гена MGP у судинних ГМК щурів і людини [61]. Є повідомлення про те, що в щурів з гіпотиреозом вміст мРНК MGP зменшується і на цьому тлі збільшується відкладання кальцію в аорті [61].

Таким чином, багато факторів може впливати на експресію MGP, щоправда з різними ефектами на різні типи клітин. Слід, однак, зауважити, що збільшення експресії MGP найчастіше відбувається у місцях кальцифікації тканин [55, 63, 65]. У такому разі посилення синтезу MGP може бути спробою клітин відповісти на кальцифікацію способом, що інгібує цей процес. Іншими словами, експресія MGP є залежною від подій, що розвиваються в тканинах [52].

На рівні посттрансляційної модифікації основним об'єктом регуляції MGP є γ -карбоксілювання залишків Glu. Цей процес залежить від доступності відновленої форми вітаміну К (KH_2), яка у свою чергу визначається балансом між його надходженням у клітини та використанням з одного боку, та інтенсивністю відновлення окисненої форми вітаміну К (КО) – з другого.

Крім цілком зрозумілого гіповітамінозу К, зменшення необхідного пулу цього вітаміну в клітинах може бути зумовлено значним збільшенням потреб у γ -карбоксілюванні. Так, висунуто гіпотезу, відповідно до якої основні токсичні ефекти високих доз вітаміну D, у тому числі ектопічна кальцифікація паренхіматозних органів і артеріальних судин, зумовлені нестачею вітаміну К, яка настає внаслідок значного посилення синтезу білків, що потребують γ -карбоксілювання [31]. У цих умовах наявного вітаміну К недостатньо, і значна кількість новоутворених білків, у тому числі MGP, не може перейти в Gla-форму, а, отже, набути необхідної функціональної активності. Таким чином, будь-яке посилення експресії MGP вимагає збільшення

доступності відновленої форми вітаміну К, що діє як кофактор γ -карбоксілювання.

Форма, у якій вітамін К міститься в продуктах харчування є неактивною і потребує відновлення до KH_2 системою вітамін-К-епоксидредуктази. Процес окиснення KH_2 супроводжується додаванням карбоксильної групи до залишків Glu в молекулах MGP (утворюється Gla), і окиснений у цій реакції вітамін К (КО) може знову бути відновлений у циклі вітамін-К-епоксидредуктази.

Діяльність циклу вітамін-К-епоксидредуктази порушується під впливом деяких екзогенних та ендогенних факторів. До перших відносять деривати кумарину, що здатні його блокувати. Таким, зокрема, є варфарин [43, 52].

За останніми даними, в клітинах організму існує ендогенний інгібітор γ -карбоксілази, названий калюменіном [78]. Калюменін є білком, який може зв'язувати кальцій. Його вперше ідентифікували в тканинах серця мишей і виявили в ендоплазматичному ретикулумі та апараті Гольджі клітин [80]. Важливим є те, що він зв'язується з вітамін-К-епоксидредуктазою і зменшує його активність, а, отже, зумовлює менш ефективну діяльність вітамін К-залежної системи γ -карбоксілювання [78]. Припускають, що калюменін перешкоджає зв'язуванню варфарину з вітамін-К-епоксидредуктазою. Слід зазначити, що цей білок є продуктом секреції активованих тромбоцитів і його виявляють у місцях атеросклеротичних уражень у людини [9]. Калюменін, таким чином, може бути важливим фактором, що зумовлює накопичення недокарбоксілюваного (тобто неактивного) MGP в атеросклеротичних бляшках.

Механізми антикальциногенної дії MGP

Вивчення процесів кальцифікації у мишей з дефіцитом MGP показало, що для попередження мінералізації артеріальної стінки має значення походження MGP. Викорис-

товуючи методику введення гена MGP у гепатоцити, остеобласти та судинні ГМК за допомогою специфічних для цих клітин векторів, Murshed та співавт. [35] встановили, що відновлення синтезу MGP у печінці і, як результат, поява цього білка у достатній кількості в крові не мають жодного впливу на кальцифікацію артерій – вираженість її залишалася такою самою, як і в мишей з дефіцитом MGP. Натомість, тільки відновлення експресії MGP у ГМК судин запобігало розвитку медіакальцинозу. MGP печінкового походження не впливав і на мінералізацію кісток: цей процес гальмувався тільки за умов відновлення синтезу MGP остеобlastами. На підставі одержаних результатів автори дійшли висновку, що антикальциногенна дія MGP *in vivo* не має системного характеру – вона залежить від місця утворення цього білка. Що стосується умов *in vitro*, то походження MGP не має значення для його інгібіторних ефектів. Так, утворений у печінці MGP пригнічував спонтанну кальцифікацію судинних ГМК у культурі клітин [52].

Описані вище спостереження свідчать про те, що циркулюючий MGP або не захоплюється судинною стінкою, або його потрапляння у кров та (чи) перенесення кров'ю робить цей білок неактивним – можливо, через зв'язування з іншими компонентами сироватки, або активність MGP залежить від взаємодії з компонентами матриксу судинної стінки, що їх синтезують і вивільнюють ГМК [52]. Крім того, MGP може діяти і перебуваючи не в позаклітинному матриксі, а всередині судинних ГМК. На думку про це наводить той факт, що MGP виявлено всередині хондроцитів *in vivo* [29], а також у судинних ГМК людини, у яких посилену експресію MGP індукували за допомогою аденовірусу [77]. При використанні MGP-специфічних антитіл значні кількості ендogenous MGP виявляли і всередині судинних ГМК у

культурі клітин людини [52]. Оскільки Gla-залишки можуть зв'язувати іони кальцію, цілком імовірно, що MGP міг би відігравати важливу роль і в підтриманні внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу [52].

Антикальциногенні властивості MGP визначаються його Gla-залишками. Доказом цього є той факт, що декарбоксілюваний MGP, у якому замість Gla міститься Glu, втрачає свою активність. Про це свідчить і низка імуногістохімічних досліджень з використанням конформаційно специфічних антитіл до MGP [44, 63, 73]. Так, було показано, що в кальцифікованих судинах старих щурів [73], так само як і в уражених артеріях щурів, що отримували варфарин з високими дозами вітаміну D [50], міститься погано карбоксілюваний (недокарбоксілюваний) MGP. Schurgers та співавт. [63], вивчаючи артерії людей, встановили, що в неуразених судинах MGP можна виявити тільки в карбоксілюваній формі і навколо еластичних структур. Що стосується артерій з кальцифікованими атеросклеротичними бляшками і тих, що уражені артеріосклерозом Менкеберга, то MGP завжди був недокарбоксілюваним і містився довкола осередків кальцифікації. На підставі цих даних було зроблено висновок, що порушення γ -карбоксілювання MGP, так само як і пригнічення його синтезу, може бути одним з механізмів кальцифікації судин.

Нині вивчають чотири можливі механізми, за допомогою яких MGP інгібує кальцифікацію судин: зв'язування з іонами кальцію та кристалами гідроксіапатиту; зв'язування з компонентами позаклітинного матриксу; взаємодія з кістковим морфогенетичним протеїном (BMP-2) і усунення ефектів останнього; участь у регуляції апоптозу.

Зв'язування іонів кальцію та кристалів гідроксіапатиту. Одна з перших гіпотез щодо антикальциногенної дії MGP ґрунтувалася на здатності Gla-залишків зв'язува-

тися з іонами кальцію та утворювати разом із залишками аргініну комплекси з гідроксіапатитом [2] (рис. 2). Зв'язування надлишку іонів кальцію в м'яких тканинах має забезпечувати їх виведення з позаклітинного матриксу у кров [17], а взаємодія з малими кристалами інгібує подальший ріст останніх [48, 60]. Така думка підтримується тим, що мРНК MGP виявляють у багатьох тканинах, але сам білок накопичується тільки в місцях кальцифікації і є в плазмі крові. Вважають, що зв'язування з іонами кальцію викликає конформаційні зміни в молекулах MGP та інших вітамін-К-залежних білків, роблячи їх активними [52].

Виявлено, що MGP є компонентом сироваткового комплексу, до складу якого входять також гідроксіапатит, фетуїн та інші білки [48]. Цей комплекс виявляли в крові шурів, що отримували один з препаратів бісфосфонатів етидронат. У цьому дослідженні показано, що в контрольних тварин (у яких гідроксіапатитного комплексу нема) значна частина MGP циркулює як компонент сироватки з молекулярною масою понад 300 кДа і тільки невелика кількість MGP входить до складу білкового комплексу з молекулярною масою меншою ніж 300 кДа. Оскільки молекулярна маса самого MGP становить лише 10 кДа, це дає підстави думати, що основна частина MGP перебуває в крові або в агрегованій формі, або зв'язана з шаперонами більшої молекулярної маси.

Відносно мало досліджень проводилося з MGP як білком. Це пояснюється тим, що його чиста форма погано розчинна і він агрегує при нейтральних значеннях рН. MGP розчинний у фізіологічних буферах тільки в дуже низьких концентраціях [37]. Це може означати, що при накопиченні MGP його молекули зв'язуються одна з одною і більше не можуть вільно переміщуватися в тканині, аж поки не зійдуться з шапероном, який попереджає агрегацію/преципітацію MGP. На сьогодні механізми,

які здійснюють транспорт MGP з клітин і тканин, а також фактори, які підтримують розчинність MGP, невідомі [52].

Зв'язування з компонентами позаклітинного матриксу. Еластин є одним з компонентів позаклітинного матриксу, з яким може зв'язуватися MGP. За допомогою імуногістологічних методів показано, що в нормальних артеріях людини молекули повністю карбоксильованого MGP містяться поблизу еластичних волокон [63]. Локалізація MGP у цих місцях може бути механізмом, що попереджає кальцифікацію, оскільки еластин є важливим субстратом для ініціювання утворення кальцієвих кристалів [42]. Еластичні волокна складаються з еластинового ядра, оточеного мікрофібрилами. Порушення структури останніх може посилювати кальцифікацію. Основним білковим компонентом мікрофібрил є фібрилін-1, дефектний ген якого зумовлює появу продукту, що утворюється в клітинах при синдромі Марфана [40]. У мишей, у яких зменшена експресія гена фібриліну-1, першою патологічною ознакою, що її виявляють, є медіакальциноз аорти [41]. Таким чином, фібрилін-1 має дуже важливе значення для запобігання кальцифікації середньої обо-

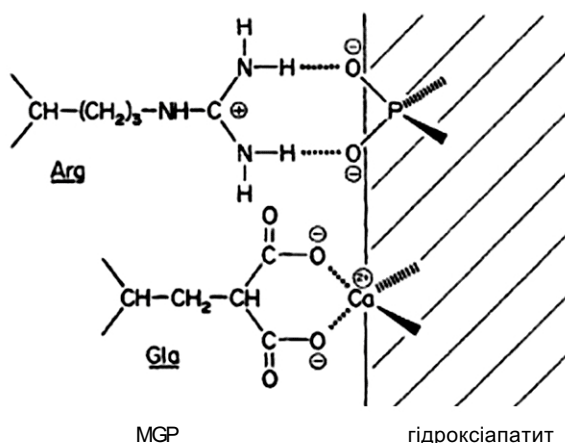


Рис. 2. Утворення комплексів між бічними ланцюгами аргініну (Arg) та γ -карбоксиглутамінової кислоти (Glu) молекул MGP і поверхневими залишками фосфату та кальцієвих кристалів гідроксіапатиту

лонки артерій. Розкриття точних механізмів взаємодії MGP з компонентами еластичних волокон без сумніву поліпшить наше розуміння того, як MGP виконує свої функції.

Ще одним компонентом позаклітинного матриксу, з яким може зв'язуватися MGP, є глікопротеїн вітронектин [37]. На відміну від зв'язування MGP з BMP-2, взаємодія з вітронектином не є кальційзалежною, вона відбувається на рівні C-термінальної ділянки молекули MGP, а тому не залежить від стану карбоксилювання MGP. Яке значення має зв'язування MGP з вітронектином у судинній стінці, ще не відомо, але є припущення, що така взаємодія може змінювати ефекти MGP щодо активності BMP-2.

Взаємодія з кістковим морфогенетичним протеїном (BMP-2). Відомо, що MGP має відношення до процесів диференціювання судинних ГМК і цей вплив здійснюється через взаємодію з BMP-2. Так, артерії, що зазнають кальцифікації в MGP-дефіцитних мишей, містять у медії подібні до хондроцитів клітини, а не типові судинні ГМК, і в них посилена експресія остеобластспецифічного транскрипційного фактора *cbfa1/Runx2* [71]; показано, що MGP зв'язується з BMP-2 і пригнічує ефекти останнього на диференціювання мультипотентних мезенхімних клітин і стовбурових клітин червоного кісткового мозку [3, 83]; посилення експресії MGP в хондроцитах затримує їх дозрівання [81]; у кальцифікованих судинах людини менше синтезується мРНК MGP, зате посилена експресія як хрящових, так і кісткових маркерів, таких, як колаген II типу і остеокальцин відповідно [66, 75].

З наведених спостережень випливає, що MGP необхідний судинним ГМК для того, щоб підтримувати їхній контрактильний фенотип і попереджати їх диференціювання у напрямі клітин, причетних до хондро/остеогенезу. За відсутності MGP ГМК

судин втягуються в різні шляхи мезенхімного диференціювання і можуть перетворюватися в клітини, подібні до хондроцитів чи остеобластів, та продукувати матрикс, який сприяє відкладанню солей кальцію у вигляді кристалів гідроксиапатиту.

Дані про те, що MGP зв'язується з BMP-2 і припиняє його функціональні ефекти, значно розширюють наші уявлення про механізми функціонування MGP. BMP-2 є дуже важливим фактором морфогенезу в кістках [57, 76], але, крім того, він здатний індукувати експресію низки остеогенних генів в судинних ГМК [22]. BMP-2 знаходять у клітинах, що містяться в ділянках атеросклеротичних уражень [4], його експресія може бути індукована оксидативним стресом, запаленням і гіперглікемією [16,39,74]. Отже, слід думати, що антагонізм MGP відносно BMP-2 має бути чинником, що попереджає чи зменшує остеогенні ефекти BMP-2 в судинній стінці. Показано, що зв'язування MGP з BMP-2 залежить від іонів кальцію і в ньому бере участь Gla-домен молекули MGP [73, 79]. Звідси випливає, що недокарбоксильовані форми MGP не можуть бути достатньо ефективними в інгібуванні ефектів BMP-2.

Участь у регуляції апоптозу. Апоптоз є важливим механізмом, що ініціює кальцифікацію судин [53,54]. Так, він передує кальцифікації багатоклітинних вузлів судинних ГМК у культурі клітин [53]. Апоптотичні тілця, що утворюються із судинних ГМК, можуть відігравати роль центрів формування кальцієвих кристалів, їх виявляють як у місцях атеросклеротичних уражень, так і при склерозі Менкеберга [62]. Вузли судинних ГМК *in vitro* містять відносно велику кількість клітин у стані апоптозу та апоптотичних тілець. Експресія MGP є найбільшою, коли апоптотичний індекс у цих вузлах сягає свого максимуму [53]. Це вказує на можливий зв'язок між MGP і апоптозом.

Крім того, MGP було виявлено в апоптотичних тільцях і матриксних везикулах, що утворюються судинними ГМК *in vivo*. Можливо, він наявний у цих везикулах для того, щоб обмежувати їхню здатність до кальцифікації [58].

Дані деяких досліджень дають підстави думати, що експресія MGP посилюється у відповідь на апоптоз. Так, утворення мРНК MGP збільшувалося, коли апоптоз індукували в клітинах гліоми чи у вентральних епітеліальних клітинах простати щурів [1, 5]. У культивованих хондроцитах мишей посилена чи послаблена експресія MGP на чітко визначених стадіях дозрівання супроводжується апоптозом [36]. Крім того, добре відомо, що позаклітинний матрикс і його конститутивні білки впливають на виживання клітин [32]. Відомості про те, що BMP-2 індукуює апоптоз у судинних ГМК, а MGP є антагоністом BMP-2, добре узгоджуються з поглядами на нього як на важливий антиапоптотичний фактор. Проте відкритим залишається питання чи дійсно високі рівні експресії MGP конче необхідні для захисту судинних ГМК від апоптозу.

MGP і кальцифікація судинної стінки

Наявність Gla-вмісних білків у судинній стінці було вперше показано Lian та співавт. [28], які виділили амінокислоту Gla з лужних гідролізатів кальцифікованих атероматозних бляшок аорти людини. У гідролізатах неуразених судин і в неускладнених кальцинозом атеросклеротичних бляшках Gla не виявляли, що дало підстави для висновку про тісний зв'язок між Gla-вмісними білками та процесами ектопічної кальцифікації.

Levy та співавт. [27] за допомогою ЕДТА-екстракції виділили з атеросклеротично змінених артерій білкову фракцію, що містить Gla. Малий вміст білків цієї фракції був характерний для жирових смужок і фіброзних бляшок, проте в кальцифікованих бляшках кількість їх була

значною. Автори вважали, що вони відкрили унікальний Gla-білок, який назвали атерокальцином (молекулярна маса 80 кДа, 19 Gla-залишків на 1000 амінокислот). Але згодом самі ж автори повідомили, що атерокальцин – це артефакт, зумовлений забрудненням препаратів судин білками сироватки крові [26].

Після відкриття MGP було доведено, що у стінках кровоносних судин Gla-вмісні білки представлено саме цим протеїном [68]. В артеріальній стінці MGP синтезується ГМК медії та інтими, а в місцях атеросклеротичних уражень – і макрофагами [67]. За допомогою моноклональних антитіл було показано, що в стінці нормальних артерій людини MGP асоційований з ГМК та еластичними мембранами в медії і з позаклітинним матриксом в адвентиції [70]. Було встановлено, що MGP має відношення до різних видів кальцифікації артеріальних судин.

MGP і атеросклероз. Кальцифікація атероматозних бляшок є одним з процесів, що завершує розвиток дегенеративних змін в інтимі [2, 4, 23]. Вивчення накопичення та експресії MGP у таких бляшках людини показало, що молекули цього білка мають тісний просторовий зв'язок з місцями відкладання гідроксіапатиту: їх виявляли на межі з осередками кальцифікації [67, 70]. Проте експресія гена MGP (утворення відповідної мРНК) у ГМК атероматозних бляшок була нижчою, якщо порівнювати з ГМК нормальних судин, які конститутивно експресують цей білок. Водночас у бляшках ГМК починали утворюватися протеїни, що мають відношення до процесів остео/хондрогенезу (остеокальцин, кістковий сіалопротеїн, лужна фосфатаза), і в нормі в артеріальній стінці не синтезуються. Ці спостереження дали підстави думати, що мінералізація структур судинної стінки може бути результатом порушення балансу між прокальциногенними (остео/хондрогенними) і антикальциногенними чинни-

ками. До останніх було віднесено MGP [67].

MGP і артерioskлероз Менкеберга. Тісний просторовий зв'язок MGP з осередками кальцифікації було виявлено і при вивченні артерій ампутованих кінцівок у хворих на цукровий діабет. Відкладання солей кальцію у середню оболонку таких артерій (артерioskлероз Менкеберга) супроводжувалося, як і при атеросклерозі, зменшенням експресії гена MGP у ГМК судин [66, 67]. На тлі таких змін ГМК починали експресувати остеогенні білки. При артерioskлерозі Менкеберга зникає тісний зв'язок MGP з еластичними мембранами в місцях кальцифікації судинної стінки, натомість і в людей і в щурів значну кількість MGP виявляли в позаклітинному матриксі медії на межі з осередками мінералізації [70].

MGP і кальцифікація ГМК судин in vitro. При культивуванні судинні ГМК втрачають ознаки свого контрактильного фенотипу і набувають рис модифікованих (міграція, проліферація, синтез компонентів сполучної тканини), характерних для ГМК атеросклеротичних бляшок. З часом судинні ГМК in vitro утворюють багатоклітинні вузли, які через 30 діб спонтанно кальцифікуються. З моменту появи перших ознак цього процесу в ГМК збільшується експресія гена MGP і деяких остеогенних білків (остекальцину, кісткового сіалопротеїну) [55, 64, 67]. З другого боку, є дані про те, що при моделюванні кальцифікації судинних ГМК біків експресія MGP у цих клітинах, навпаки, зменшується [33]. Вона повертається до вихідного рівня, якщо процес мінералізації інгібувати за допомогою бісфосфонатів.

Таким чином, на підставі того, що експресія MGP в процесі кальцифікації може як зменшуватися, так і зростати, було зроблено припущення про два можливі варіанти розвитку подій. Перший з них полягає в тому, що чинники, які пригнічують

експресію гена MGP, можуть сприяти розвитку мінералізації судинної стінки. Другий – у разі ініціювання кальцифікації іншими механізмами може посилюватися експресія адаптивних білків, які обмежують цей процес. До таких білків автори віднесли MGP [66].

Докази того, що MGP є важливим природним інгібітором кальцифікації in vivo було отримано в трьох групах досліджень, а саме при вивченні генетично нокаутуваних мишей; при експериментальному відтворенні варфаринової моделі уражень судин; при виявленні причин синдрому Кейтеля у людей.

Миші з дефіцитом MGP. Використовуючи методику генетичного нокауту, Luo та співавт. [30] вивели лінію мишей, позбавлених гена MGP – MGP(-/-)-миші. Через два тижні після народження у таких тварин значно збільшувалася частота серцевих скорочень, вони відставали в рості, якщо порівнювати з нормальними мишами відповідного віку. Протягом двох місяців від народження “генетично нокаутовані” миші помирали через кровотечі, спричинені розривом грудної або черевної аорти. При вивченні кровоносних судин (фарбування макропрепаратів алізарином червоним і гістологічних препаратів методом фон Косса) виявляли сильно виражену кальцифікацію аорти та її гілок. Солі кальцію відкладалися у всіх артеріях еластичного та м'язового типу, але не в артеріолах, капілярах чи венах. Перші ознаки кальцифікації артерій з'являлися через два тижні від народження тварин. Мінералізації насамперед зазнавали еластичні мембрани медії аортальної стінки. За цією ознакою ураження артерій у “генетично нокаутуваних” мишей були характерні для артерioskлерозу Менкеберга у людей (медіакальциноз). Крім того, у таких тварин виявляли кальцифікацію вінцевих артерій серця та аортальних клапанів, але не міокарда. В уражених артеріях не було

жодних проявів атеросклерозу: ні жирових смужок, ні атероматозних бляшок. У стінках судин можна було знайти клітини з властивостями хондроцитів. Вони продукували позаклітинний матрикс, за складом схожий до хрящової тканини (тип II колагену, протеоглікани). Поблизу таких хондроцитів виявляли матриксні везикули, з яких, як вважають, починається кальцифікація.

У MGP-дефіцитних мишей істотних змін зазнавав і скелет. Патологічна кальцифікація хрящових пластинок росту в кістках призводила до появи ознак низького зросту, остеопенії і переломів кісток. Поєднані ураження артерій і скелета у таких мишей нагадували фенотип рідкісної хвороби у людини – синдрому Синглетона–Мертена [69], що характеризується кальцифікацією артерій без атеросклерозу, низьким зростом, остеопенією кінцівок і смертю на першому десятилітті життя.

Пізніше було показано, що відновлення утворення MGP клітинами судинної стінки у MGP(-/-)-мишей попереджає кальцифікацію артерій [35]. У цих дослідженнях (з використанням методики мутагенезу *in vivo*) встановлено, що антикальциногенна активність MGP залежить від 4 з 5 Gla-залишків.

Варфаринова модель кальцифікації судин у щурів. Синтетичне похідне дикумаролу варфарин – є антикоагулянтом непрямой дії. Ще з 50-х років минулого століття цей препарат використовується в клініці як ефективний засіб запобігання тромбоутворенню. Антикоагулянтна дія варфарину ґрунтується на інгібуванні вітамін-К-епоксидредуктази – ферменту, який перетворює окиснену форму вітаміну К у відновлену, після того як відбудеться карбоксилювання залишків Glu в молекулах протромбіну та інших факторах зсідання крові. Таким чином, під впливом варфарину зменшується пул відновленого вітаміну К, а, отже, і утворення карбоксилюваних, функціонально активних факторів коагуляції крові. Іншими словами, варфарин виступає антагоністом вітаміну К: його антикоа-

гулянтну дію можна звести нанівець введенням ззовні препаратів відновленого вітаміну К [21].

Антагоністичні взаємовідносини варфарину та вітаміну К мають свої особливості в печінці та позапечінкових органах і тканинах. З'ясувалося, що можна підібрати такі дози відновленого вітаміну К, які повністю припиняють антикоагулянтну дію варфарину, але не впливають на його ефекти в інших, крім печінки, органах і тканинах, зокрема в кістках і стінках кровоносних судин [45]. Це дає змогу тривалий час вводити тваринам варфарин разом з вітаміном К, завдяки чому вдається запобігти спонтанних кровотеч при збереженні впливу варфарину на карбоксилювання білків, у тому числі MGP, у позапечінкових тканинах [47, 50].

Price та співавт. [43], показали, що при введенні щурам високих доз варфарину разом з препаратами вітаміну К розвивається кальцифікація еластичних мембран в медії великих артерій і в тканинах аортальних клапанів. Перші ознаки кальцифікації аорти виявляли через 2 тиж від початку експерименту, а вже через 5 тиж відкладання солей кальцію були настільки значними, що їх можна було бачити на рентгенівських знімках і просто оком. За всіма ознаками ураження судин, що їх спостерігали у “варфаринових” щурів, були дуже схожими на зміни артерій у мишей з дефіцитом MGP. Це дало підставу думати, що індукована варфарином кальцифікація є наслідком порушення γ -карбоксилювання MGP і вимиканням у такий спосіб його антикальциногенних функцій.

Порушення основної посттрансляційної модифікації MGP призводить до підвищення експресії та вмісту гена MGP (некарбоксилюваного) у кальцифікованих артеріях [43]. Водночас зменшується його концентрація у сироватці крові.

Розвиток індукованих варфарином уражень артерій залежить від віку тварин. Ознаки медіакальцинозу аорти легко

виникають у молодих 20- і 42-добових (меншою мірою) щурів, і зовсім не розвиваються у 10-місячних щурів [44]. При цьому має значення не сам вік тварин, а процес їх росту. Якщо уповільнити ріст щурів переведенням на раціон з недостатнім вмістом білків, то розвиток кальцифікації артерій уповільнюється.

Введення щурам варфарину разом з високими дозами вітаміну D значно посилює кальциногенний ефект кожного з цих чинників: кальцифікація артерій у таких тварин настає значно раніше і є більш вираженою, якщо порівнювати з окремою дією варфарину і вітаміну D [44].

Кальциногенний вплив варфарину виявляє себе і в культурі судинних ГМК людини [67]. Під впливом цього препарату значно прискорюється спонтанна кальцифікація багатоклітинних вузлів.

Синдром Кейтеля у людей. Рідкісна аутосомно-рецесивна хвороба – синдром Кейтеля – характеризується патологічною кальцифікацією хрящів; периферичним стенозом легеневої артерії і гіпоплазією середньої зони обличчя. У таких хворих розвивається виражена кальцифікація кровоносних судин. Встановлено, що хвороба пов'язана з хромосомою 12 – саме з тим її локусом, де знаходиться ген MGP (12p12.3-13.1) [34]. Три мутації гена MGP (с.69delG; IVS1-2A→G; с.113T→A) призводять або до вкорочення молекули MGP, або до якісних її змін, унаслідок чого вона втрачає свою функціональну активність. Виявлений зв'язок між такими дефектами MGP і розвитком кальцифікації судин може свідчити про те, що цей білок є важливим антикальциногенним фактором і в організмі людини. Проте, на відміну від мишей з

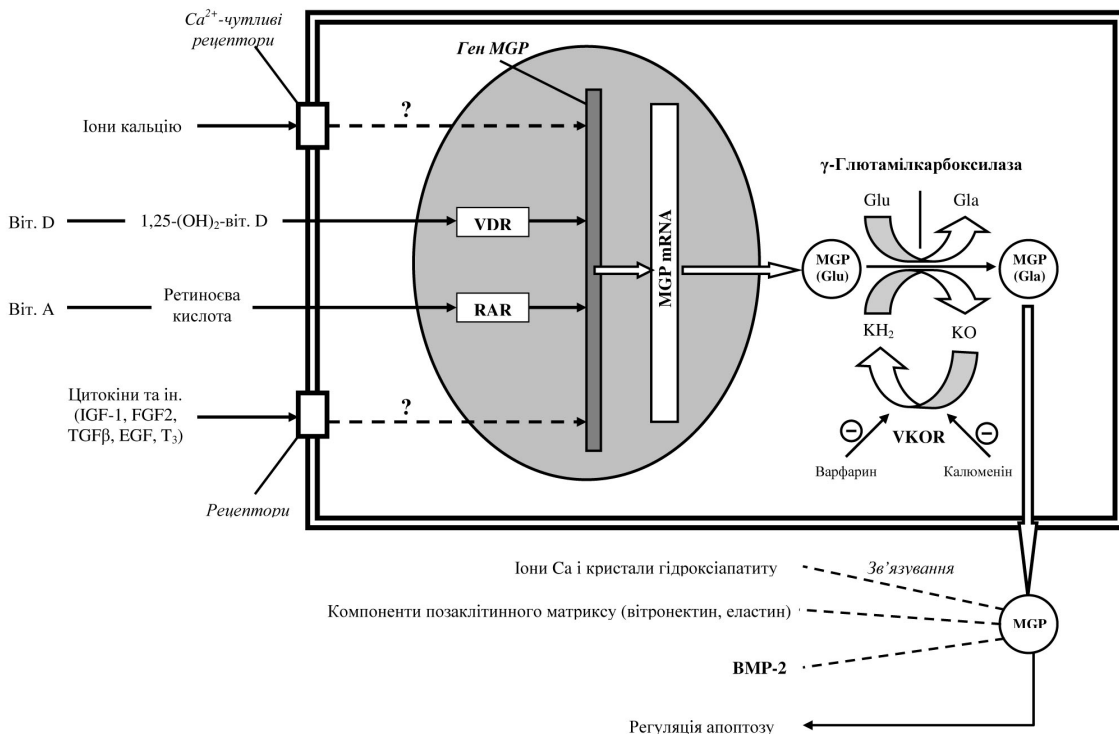


Рис.3. Схема, що ілюструє процеси, пов'язані з утворенням і функціонуванням матричного Gla-протеїну (MGP). VDR – рецептор вітаміну D; RAR – рецептор ретиноєвої кислоти; VKOR – вітамін-К-епоксидредуктаза; KH₂, KO – відновлена і окиснена форми вітаміну К відповідно; BMP-2 – морфогенетичний кістковий протеїн; MGP (Glu) – некарбоксильований MGP; MGP (Gla) – карбоксильований MGP

дефіцитом MGP, хворі на синдром Кейтеля доживають до зрілого віку. Це означає, що в людей існують й інші фактори, які функціонують як інгібітори кальцифікації судин. Крім того, якісно змінені молекули MGP, котрі продукуються у таких хворих, мабуть, можуть зберігати хоча б частину своїх антикальциногенних властивостей у судинній стінці [52].

Таким чином, на рис. 3 у вигляді схеми представлено основні складові процесу, що забезпечує функціонування MGP в тканинах організму, зокрема в стінках кровоносних судин. Такими складовими є: регуляція експресії гена MGP, яка здійснюється іонами кальцію, вітамінами D і A, цілою низкою цитокінів; експресія гена MGP, завдяки якій у клітинах синтезується цей білок; посттрансляційна модифікація молекул MGP, яка полягає в γ -карбоксилюванні Glu-залишків протеїну і потребує участі вітаміну K і ферментів, що його відновлюють; секреція MGP клітинами в позаклітинний простір; власне функціональні ефекти MGP, серед яких зв'язування з іонами кальцію та кристалами гідроксиапатиту; взаємодія з компонентами позаклітинного матриксу; зв'язування з BMP-2; участь у регуляції апоптозу. Загалом зазначені ефекти зумовлюють антикальциногенну дію MGP, що проявляється в інгібуванні мінералізації м'яких тканин в умовах, коли концентрація іонів кальцію і фосфатів у крові та міжклітинній рідині перевищує поріг, необхідний для осадження солей і початку кристалізації. У разі розладів наведених вище процесів порушуються функції MGP, аж до повного їх зникнення, що може спричинити кальцифікацію судинної стінки – важливого компонента як атеросклеротичних уражень, так і артеріосклерозу Менкеберга. Яке це має значення для дальшого розвитку подій, зокрема для виникнення тяжких ускладнень (інфарктів, інсультів, утворення аневризми та їх розриву), ще слід вивчати, досліджуючи зв'язок

MGP і різних варіантів його гена з хворобами людини.

В.Ю. Гарбузова, А.В. Атаман

МАТРИКСНЫЙ GLA-ПРОТЕИН И ЕГО РОЛЬ В КАЛЬЦИФИКАЦИИ СОСУДИСТОЙ СТЕНКИ

Представлены данные о строении матриксного Gla-протеина (MGP), его химических характеристиках, регуляции синтеза и посттрансляционных превращениях, информация о структуре гена MGP и самых распространенных его полиморфизмах. Среди факторов, которые регулируют экспрессию и активность MGP, названы витамин D, ретиноевую кислоту, внеклеточные ионы кальция, цитокины и некоторые гормоны. Подчеркнуто, что MGP является важным ингибитором кальцификации мягких тканей. Такие свойства этого белка связывают с наличием в его молекуле остатков γ -карбоксиглутаминовой кислоты. Описаны четыре возможные механизмы антикальциногенного действия MGP: связывание с ионами кальция и кристаллами гидроксиапатита; связывание с компонентами внеклеточного матрикса; взаимодействие с костным морфогенетическим протеином (BMP-2) и устранение эффектов последнего; участие в регуляции апоптоза. Показано, что изучение аллельных вариантов гена MGP имеет важное значение в связи с возможной их ассоциацией с развитием сердечно-сосудистых и других болезней. Ключевые слова: сосудистая стенка, кальцификация, полиморфизм генов, матриксный Gla-протеин.

V.Yu. Garbuzova, O.V. Ataman

MATRIX GLA-PROTEIN AND ITS ROLE IN VASCULAR CALCIFICATION

Data on the structure of matrix Gla-protein (MGP), its chemical characteristics, regulation of synthesis and post-translational modifications are described. The information on the structure of the MGP gene, its well distributed polymorphisms are presented. Factors that regulate expression and activity of MGP include vitamin D, retinoic acid, extracellular calcium ions, cytokines, and some hormones. It is emphasized that MGP is an important inhibitor of calcification of soft tissues. These properties of this protein are associated with the presence of residues of γ -carboxyglutamic acid of its molecule. Four possible mechanisms of anticalcinogenic action of MGP are described: binding with calcium ions and crystals of hydroxyapatite, binding to extracellular matrix components, interaction with bone morphogenetic protein (BMP-2) and elimination the effects of the latter, participation in the regulation of apoptosis. It is emphasized that the study of allelic variants of the MGP gene is important in the context of their possible association with the development of cardiovascular and other diseases.

Key words: vascular wall, calcification, gene polymorphisms, matrix Gla-protein.

Sumy State University

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Baudet C., Perret E., Delpech B., Kaghad M., Brachet P., Wion D., Caput D. Differentially expressed genes in C6.9 glioma cells during vitamin D-induced cell death program // *Cell Death Diff.* – 1998. – **5**. – P. 116–125.
- Bobryshev Y. Calcification of elastic fibers in human atherosclerotic plaque // *Atherosclerosis.* – 2005. – **180**. – P. 293–303.
- Bostrom K., Tsao D., Shen S., Wang Y., Demer L.L. Matrix GLA protein modulates differentiation induced by bone morphogenetic protein-2 in C3H10T1/2 cells // *J. Biol. Chem.* – 2001. – **276**. – P. 14044–14052.
- Bostrom K., Watson K.E., Horn S., Wortham C., Herman I.M., Demer L.L. Bone morphogenetic expression in human atherosclerotic lesions // *J. Clin. Invest.* – 1993. – **91**. – P. 1800–1809.
- Briehl M.M., Miesfeld R.L. Isolation and characterization of transcripts induced by androgen withdrawal and apoptotic cell death in the rat ventral prostate // *Mol. Endocrinol.* – 1991. – **5**. – P. 1318–1388.
- Cancela L., Hsieh C.-L., Francket U., Price P.A. Molecular structure, chromosome assignment, and promoter organization of the human matrix Gla protein gene // *J. Biol. Chem.* – 1990. – **265**. – P. 15040–15048.
- Cancela M.L., Hu B., Price P.A. Effect of cell density and growth factors on matrix Gla protein expression by normal rat kidney cells // *J. Cell. Physiol.* – 1997. – **171**. – P. 125–134.
- Cancela M.L., Price P.A. Retinoic acid induces matrix Gla protein gene expression in human bone cells // *Endocrinology.* – 1992. – **130**. – P. 102–108.
- Coppinger J.A., Cagney G., Toomey S. Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions // *Blood.* – 2004. – **103**. – P. 2096–2104.
- Farzaneh-Far A., Davies J.D., Braam L.A., Spronk H.M., Proudfoot D., Chan S.W., O'Shaughnessy K.M., Weissberg P.L., Vermeer C., Shanahan C.M. A Polymorphism of the human matrix r-carboxyglutamic acid protein promoter alters binding of an activating protein-1 complex and is associated with altered transcription and serum levels // *J. Biol. Chem.* – 2001. – **276**. – P. 32466–32473.
- Farzaneh-Far A., Proudfoot D., Weissberg P.L., Shanahan C.M. Matrix gla protein is regulated by a mechanism functionally related to the calcium-sensing receptor // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* – 2000. – **277**. – P. 736–740.
- Farzaneh-Far A., Weissberg P.L., Proudfoot D., Shanahan C.M. Transcriptional regulation of matrix gla protein // *Z. Kardiol.* – 2001. – **90**, Suppl. 3. – P. 38–42.
- Fraser J.D., Otawara Y., Price P.A. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates the synthesis of matrix r-carboxyglutamic acid protein by osteosarcoma cells // *J. Biol. Chem.* – 1988. – **263**. – P. 911–916.
- Fraser J.D., Price P.A. Induction of matrix Gla protein synthesis during prolonged 1,25-dihydroxyvitamin D3 treatment of osteosarcoma cells // *Calcif. Tissue Int.* – 1990. – **46**. – P. 270–279.
- Fraser J.D., Price P.A. Lung, heart, and kidney express high levels of mRNA for the vitamin K-dependent matrix Gla protein // *J. Biol. Chem.* – 1988. – **263**. – P. 11033–11036.
- Fukui N., Zhu Y., Maloney W.J., Clohisy J., Sandell L.J. Stimulation of BMP-2 expression by pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF-alpha in normal and osteoarthritic chondrocytes // *J. Bone Joint Surg. Amer.* – 2003. – **85** (A Suppl. 3). – P. 59–66.
- Hackeng T.M., Rosing J., Spronk H.M., Vermeer C. Total chemical synthesis of human matrix Gla protein // *Protein Sci.* – 2001. – **10**. – P. 864–870.
- Hale J.E., Fraser J.D., Price P.A. The identification of matrix Gla protein in cartilage // *J. Biol. Chem.* – 1988. – **263**. – P. 5820–5824.
- Hale J.E., Williamson M.K., Price P.A. Carboxyl-terminal proteolytic processing of matrix Gla protein // *Ibid.* – 1991. – **266**. – P. 21145–21149.
- Herrmann S.M., Whatling C., Brand E., Nikaud, Garipey J., Simon A., Evans A., Ruidavets L.B., Arweiler D., Luc G., Tiret L., Henney A., Cambien F. Polymorphisms of the human matrix Gla protein (MGP) gene, vascular calcification, and myocardial infarction // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2000. – **20**. – P. 2386–2393.
- Holbrook A.M., Pereira J.A., Labiris R. McDonald H., Douketis J.D., Crowther M., Wells P.S. Systematic overview of warfarin and its drug and food interactions // *Arch. Intern. Med.* – 2005. – **165**. – P. 1095–1106.
- Hruska K.A., Mathew S., Saab G. Bone morphogenetic proteins in vascular calcification // *Circulat. Res.* – 2005. – **97**. – P. 105–114.
- Jeziorska M., McCollum C., Wooley D.E. Observations on bone formation and remodelling in advanced atherosclerotic lesions of human carotid arteries // *Virchows Arch.* – 1998. – **433**. – P. 559–565.
- Kirfel J., Kelter M., Cancela L.M., Price P.A., Schule R. Identification of a novel negative retinoic acid responsive element in the promoter of the human matrix Gla protein gene // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – **94**. – P. 2227–2232.
- Kobayashi N., Kitazawa R., Maeda S., Schurgers L.J., Kitazawa S. T-138C polymorphism of matrix Gla protein promoter alters its expression but is not directly associated with atherosclerotic vascular calcification //

- Kobe J. *Med. Sci.* – 2004. – 50. – P. 69–81.
26. Levy R.J., Howard S.L., Oshry L.J. Carboxylglutamic acid (Gla) containing proteins of human calcified atherosclerotic plaque solubilized by EDTA // *Atherosclerosis*. – 1986. – **59**. – P.155–160.
 27. Levy R.J., Lian J.B., Gallop P. Atherocalcin, a γ -carboxylglutamic acid containing protein from atherosclerotic plaque // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* – 1979. – **91**. – P. 41–49.
 28. Lian J.B., Skinner M., Glimcher M.J., Gallop P. The presence of γ -carboxylglutamic acid in the proteins associated with ectopic calcification // *Ibid.* – 1976. – **73**. – P. 349–356.
 29. Loeser R., Carlson C.S., Tulli H., Jerome W.G., Miller L., Wallin R. Articular-cartilage matrix gamma-carboxylglutamic acid-containing protein. Characterization and immunolocalization // *Biochem. J.* – 1992. – **282** (Pt 1). – P. 1–6.
 30. Luo G., Ducey P., McKee M.D., Pinero G.J., Loyer E., Behringer R.R., Karsenty G. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein // *Nature*. – 1997. – **386**. – P. 78–81.
 31. Masterjohn C. Vitamin D toxicity redefined: vitamin K and the molecular mechanism // *Med. Hypoth.* – 2007. – **68**. – P. 1026–1034.
 32. Meredith J.E., Fazeli B., Schwartz M.A. The extracellular matrix as a cell survival factor // *Mol. Biol. Cell.* – 1993. – **4**. – P. 953–961.
 33. Mori K., Shioi A., Jono S., Nishizawa Y., Morii H. Expression of matrix Gla protein (MGP) in an in vitro model of vascular calcification // *FEBS Lett.* – 1998. – **433**. – P. 19–22.
 34. Munroe P.B., Olgunturk R.O., Fryns J.P., Van Maldergem L., Ziereisen F., Yuksel B., Gardiner R.M., Chung E. Mutations in the gene encoding the human matrix Gla protein cause Keutel syndrome // *Nat. Genet.* – 1999. – **21**. – P. 142–144.
 35. Murshed M., Schinke T., McKee M.D., Karsenty G. Extra cellular matrix mineralization is regulated locally: different roles of two gla-containing proteins // *J. Cell. Biol.* – 2004. – **165**. – P. 625–630.
 36. Newman B., Gigout L.I., Sudre L., Grant M.E., Wallis G.A. Coordinated expression of matrix Gla protein is required during endochondral ossification for chondrocyte survival // *J. Cell Biol.* – 2001. – **154**. – P. 659–666.
 37. Nishimoto S.K., Nishimoto M. Matrix Gla protein C-terminal region binds to vitronectin. Co-localization suggests binding occurs during tissue development // *Matrix Biol.* – 2005. – **24**. – P. 353–361.
 38. Owen T.A., Aronow M.S., Barone L.M., Bettencourt B., Stein G.S., Lian J.B. Pleiotropic effects of vitamin D on osteoblast gene expression are related to the proliferative and differentiated state of the bone cell phenotype: Dependency upon basal levels of gene expression, duration of exposure, and bone matrix competency in normal rat osteoblast cultures // *Endocrinology*. – 1991. – **128**. – P. 1496–1504.
 39. Parhami F., Morrow A.D., Balucan J., Leitinger N., Watson A.D., Tintut Y., Berliner J.A., Demer L.L. Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation. A possible explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 1997. – **17**. – P. 680–687.
 40. Pereira L., Andrikopoulos K., Tian J., Lee S.Y., Keene D.R., Ono R., Reinhardt D.P., Sakai L.Y., Biery N.J., Bunton T., Dietz H.C., Ramirez F. Targeting of the gene encoding fibrillin-1 recapitulates the vascular aspect of Marfan syndrome // *Nat. Genet.* – 1997. – **17**. – P. 218–222.
 41. Pereira L., Lee S.Y., Gayraud B., Andrikopoulos K., Shapiro S.D., Bunton T., Biery N.J., Dietz H.C., Sakai L.Y., Ramirez F. Pathogenetic sequence for aneurysm revealed in mice underexpressing fibrillin-1 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1999. – **96**. – P. 3819–3823.
 42. Price P.A., Chan W.S., Jolson D.M., Williamson M.K. The elastic lamellae of devitalized arteries calcify when incubated in serum. Evidence for a serum calcification factor // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2006. – **26**. – P. 1079–1085.
 43. Price P.A., Faus S.A., Williamson M.K. Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves // *Ibid.* – 1998. – **18**. – P. 1400–1407.
 44. Price P.A., Faus S.A., Williamson M.K. Warfarin-induced artery calcification is accelerated by growth and vitamin D // *Ibid.* – 2000. – **20**. – P. 317–327.
 45. Price P.A., Kaneda Y. Vitamin K counteracts the effect of warfarin in liver but not in bone // *Thrombosis*. – 1987. – **46**. – P. 121–131.
 46. Price P.A., Rice J.S., Williamson M.K. Conserved phosphorylation of serines in the Ser-X-Glu/Ser(P) sequences of the vitamin K-dependent matrix Gla protein from shark, lamb, rat, cow, and human // *Protein Sci.* – 1994. – **3**. – P. 822–830.
 47. Price P.A., Sloper S.A. Concurrent warfarin treatment further reduces bone mineral levels in 1,25-dihydroxyvitamin D3-treated rats // *J. Biol. Chem.* – 1983. – **258**. – P. 6004–6007.
 48. Price P.A., Thomas G.R., Pardini A.W., Figueira W.F., Caputo J.M., Williamson M.K. Discovery of a high molecular weight complex of calcium, phosphate, fetuin, and matrix gamma-carboxylglutamic acid protein in the serum of etidronate-treated rats // *Ibid.* – 2002. – **277**. – P. 3926–3934.
 49. Price P.A., Urist M.R., Otawara Y. Matrix Gla protein, a new γ -carboxylglutamic acid-containing protein which is associated with the organic matrix of bone // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* – 1983. – **117**. – P. 765–771.
 50. Price P.A., Williamson M.K. Effects of warfarin on bone: studies on the vitamin K-dependent protein of rat bone // *J. Biol. Chem.* – 1981. – **256**. – P. 12754–12759.
 51. Price P.A., Williamson M.K. Primary structure of bovine matrix Gla protein, a new vitamin K-dependent

- bone protein // *J. Biol. Chem.* – 1985. – **260**. – P. 14971–14975.
52. Proudfoot D., Shanahan C.M. Molecular mechanisms mediating vascular calcification: role of matrix Gla protein // *Nephrology (Carlton)*. – 2006. – **11**. – P. 455–461.
 53. Proudfoot D., Skepper J.N., Hegyi L., Bennett M.R., Shanahan C.M., Peter L., Weissberg P.L. Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro. Evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies // *Circulat. Res.* – 2000. – **87**. – P. 1055–1062.
 54. Proudfoot D., Skepper J.N., Hegyi L., Farzaneh-Far A., Shanahan C.M., Weissberg P.L. The role of apoptosis in the initiation of vascular calcification // *Z. Kardiol.* – 2001. – **90**. – P. 43–46.
 55. Proudfoot D., Skepper J.N., Shanahan C.M., Weissberg P.L. Calcification of human vascular cells in vitro is correlated with high levels of matrix Gla protein and low levels of osteonin expression // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 1998. – **18**. – P. 379–388.
 56. Rannels S.R., Cancela M.L., Wolpert E.B., Price P.A. Matrix Gla protein mRNA expression in cultured type II pneumocytes // *Amer. J. Physiol.* – 1993. – **265**. – P. L270–L278.
 57. Reddi A.H., Reddi A. Bone morphogenetic proteins (BMPs): from morphogens to metabologens // *Cytokine Growth Factor Re.* – 2009. – **20**. – P. 341–342.
 58. Reynolds J.L., Joannides A.J., Skepper J.N., McNair R., Schurgers L.J., Proudfoot D., Jahnke-Dechent W., Weissberg P.L., Shanahan C.M. Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD // *J. Amer. Soc. Nephrol.* – 2004. – **15**. – P. 2857–2867.
 59. Rice J.S., Williamson M.K., Price P.A. Isolation and sequence of the vitamin K-dependent matrix Gla protein from the calcified cartilage of the soupfin shark // *J. Bone Min. Res.* – 1994. – **9**. – P. 567–576.
 60. Roy M.E., Nishimoto S.K. Matrix Gla protein binding to hydroxyapatite is dependent on the ionic environment: Calcium enhances binding affinity but phosphate and magnesium decrease affinity // *Bone*. – 2002. – **31**. – P. 296–302.
 61. Sato Y., Nakamura R., Satoh M., Fujishita K., Mori S., Ishida S., Yamaguchi T., Inoue K., Nagao T., Ohno Y. Thyroid hormone targets matrix Gla protein gene associated with vascular smooth muscle calcification // *Circulat. Res.* – 2005. – **97**. – P. 550–557.
 62. Schoppet M., Al-Fakhri N., Franke F.E., Katz N., Barth P.J., Maisch B., Preissner K.T., Hofbauer L.C. Localization of osteoprotegerin, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, and receptor activator of nuclear factor- κ B ligand in Mönckeberg's sclerosis and atherosclerosis // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* – 2004. – **89**. – P. 4104–4112.
 63. Schurgers L.J., Teunissen K.J., Knapen M.H., Kwaijtaal M., van Diest R., Appels A., Reutelingsperger C.P., Cleutjens J.P., Vermeer C. Novel conformation-specific antibodies against matrix gamma-carboxyglutamic acid (Gla) protein: undercarboxylated matrix Gla protein as marker for vascular calcification // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2005. – **25**. – P. 1629–1633.
 64. Severson A.R., Ingram R.T., Fitzpatrick L.A. Matrix proteins associated with bone calcification are present in human vascular smooth muscle cells grown in vitro // *In Vitro Cell. De Biol.* – 1995. – **31**. – P. 853–857.
 65. Shanahan C.M., Cary N.R., Metcalfe J.C., Weissberg P.L. High expression of genes for calcification regulating proteins in human atherosclerotic plaques // *J. Clin. Invest.* – 1994. – **93**. – P. 2393–2402.
 66. Shanahan C.M., Cary N.R., Salisbury J.R., Proudfoot D., Weissberg P.L., Edmonds M.E. Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Mönckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification // *Circulation*. – 1999. – **100**. – P. 2168–2176.
 67. Shanahan C.M., Proudfoot D., Tyson K.L., Cary N.R., Edmonds M., Weissberg P.L. Expression of mineralisation-regulating proteins in association with human vascular calcification // *Z. Kardiol.* – 2000. – **89**, Suppl. 2. – P. II/63-II/68.
 68. Shanahan C.M., Weissberg P.L., Metcalfe J.C. Isolation of gene markers of differentiated and proliferating vascular smooth muscle cells // *Circulat. Res.* – 1993. – **73**. – P. 193–204.
 69. Singleton E.B., Merten D.F. An unusual syndrome of widened medullary cavities of the metacarpals and phalanges, aortic calcification and abnormal dentition // *Pediatr. Radiol.* – 1973. – **1**. – P. 2–7.
 70. Spronk H.M., Soute B.A., Schurgers L.J., Cleutjens J.P., Thijssen H.H., De Mey J.G., Vermeer C. Matrix Gla protein accumulates at the border of regions of calcification and normal tissue in the media of the arterial vessel wall // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* – 2001. – **289**. – P. 485–490.
 71. Steitz S.A., Speer M.Y., McKee M.D., Liaw L., Almeida M., Yang H., Giachelli C.M. Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification // *Amer. J. Pathol.* – 2002. – **161**. – P. 2035–2046.
 72. Stheneur C., Dumontier M.F., Guedes C., Fulchignoni-Lataud M.C., Tahiri K., Karsenty G., Corvol M.T. Basic fibroblast growth factor as a selective inducer of matrix Gla protein gene expression in proliferative chondrocytes // *Biochem. J.* – 2003. – **369**. – P. 63–70.
 73. Sweatt A., Sane D.C., Hutson S.M., Wallin L. Matrix Gla protein (MGP) and bone morphogenetic protein-2 in aortic calcified lesions of aging rats // *J. Thromb. Haemost.* – 2003. – **1**. – P. 178–185.
 74. Towler D.A., Bidder M., Latifi T., Coleman T., Semenkovich C.F. Diet-induced diabetes activates an osteogenic gene regulatory program in the aortas of low density lipoprotein receptor-deficient mice // *J.*

- Biol. Chem. – 1998. – **273**. – P. 30427–30434.
75. Tyson K.L., Reynolds J.L., McNair R., Zhang Q., Weissberg P.L., Shanahan C.M. Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2003. – **23**. – P. 489–494.
76. Urist M.R. Bone: formation by autoinduction // *Science*. – 1965. – **150**. – P. 893–899.
77. Wajih N., Borrás T., Xue W., Hutson S.M., Wallin R. Processing and transport of matrix gamma-carboxyglutamic acid protein and bone morphogenetic protein-2 in cultured human vascular smooth muscle cells: Evidence for an uptake mechanism for serum fetuin // *J. Biol. Chem.* – 2004. – **279**. – P. 43052–43060.
78. Wajih N., Sane D.C., Hutson S.M., Wallin R. The inhibitory effect of calumenin on the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system. Characterization of the system in normal and warfarin-resistant rats // *Ibid.* – P. 276–283.
79. Wallin R., Schurgers L., Wajih N. Effects of the blood coagulation vitamin K as an inhibitor of arterial calcification // *Thromb. Res.* – 2008. – **122**. – P. 411–417.
80. Yabe D., Nakamura T., Kanazawa N., Tashiro K., Honjo T. Calumenin, a Ca²⁺-binding protein retained in the endoplasmic reticulum with a novel carboxyl-terminal sequence, HDEF // *J. Biol. Chem.* – 1997. – **272**. – P. 232–239.
81. Yagami K., Suh J.Y., Enomoto-Iwamoto M., Koyama E., Abrams W.R., Shapiro I.M., Pacifici M., Iwamoto M. Matrix Gla protein is a developmental regulator of chondrocyte mineralization and, when constitutively expressed, blocks endochondral and intramembranous ossification in the limb // *J. Cell. Biol.* – 1999. – **147**. – P. 1097–1108.
82. Yang H., Curinga G., Giachelli C.M. Elevated extracellular calcium levels induce smooth muscle cell matrix mineralization in vitro // *Kidney Int.* – 2004. – **66**. – P. 2293–2299.
83. Zebboudj A.F., Imura M., Bostrom K. Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2 // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**. – P. 4388–4394.
84. Zhao J., Warburton D. Matrix Gla protein gene expression is induced by transforming growth factor-beta in embryonic lung culture // *Amer. J. Physiol.* – 1997. – **273**, Pt.1. – P. L282–L287.

Сум. ун-т М-ва освіти і науки України
E-mail: vikgarbuzova@yandex.ru

Матеріал надійшов до
редакції 11.03.2011