

На правах рукописи

МИРОШНИКОВА
Валентина Вадимовна

**Роль транспортера ABCG1 и аполипопротеина А-I
в формировании предрасположенности
к атеросклерозу**

03.01.03 – молекулярная биология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2014

Работа выполнена в Отделении молекулярной и радиационной биофизики Федерального государственного бюджетного учреждения «Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова» Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», г. Гатчина.

Научный руководитель: **Шварцман Александр Львович,**
доктор биологических наук,
заведующий лабораторией молекулярной генетики человека ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова» НИЦ «Курчатовский институт», г. Гатчина.

Официальные оппоненты: **Горбунова Виктория Николаевна,**
доктор биологических наук,
профессор кафедры медицинской генетики ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава РФ, г. Санкт-Петербург.

Черкашин Дмитрий Викторович,
доктор медицинских наук,
начальник кафедры военно-морской терапии ФГБВОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова» МО РФ, г. Санкт-Петербург.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта» РАМН, г. Санкт-Петербург.

Защита состоится «___» _____ 2014 г. в _____ часов на заседании Диссертационного совета Д.002.230.01 на базе ФГБУН «Институт цитологии» РАН по адресу: 194064, г. Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4.

Сайт института <http://www.cytspb.rssi.ru>

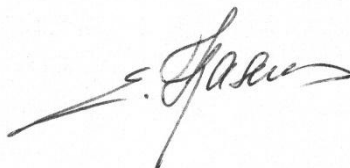
Адрес электронной почты института cellbio@incras.ru

Факс института 8 (812) 297 35 41.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУН «Институт цитологии» РАН и на сайте www.cytspb.rssi.ru

Автореферат разослан «___» _____ 2014 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
кандидат биологических наук



Е. В. Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Заболевания сердечно-сосудистой системы, обусловленные атеросклерозом, занимают первое место среди причин, приводящих к смерти во многих странах мира, в том числе в России. По данным Министерства здравоохранения Российской Федерации, доля смертей от сердечно-сосудистых заболеваний в структуре общей смертности населения составляет более 50 % (*Бокерия и др., 2007*).

Атеросклероз – распространенное заболевание, характеризующееся возникновением в стенках артерий очагов липидной инфильтрации и разрастания соединительной ткани с образованием фиброзных бляшек, суживающих просвет и нарушающих физиологические функции пораженных артерий, что приводит к органным и общим расстройствам кровообращения (*Аронов, Лупанов, 2009*). Существенное значение в патогенезе атеросклероза имеют нарушения липидного обмена, в частности повышение уровня общего холестерина (ОХС) и снижение уровня антиатерогенных липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) плазмы крови (*Kontush, Chapman, 2006*). В то же время атеросклероз нередко развивается и у лиц с нормальным уровнем липидов плазмы крови. Это свидетельствует о том, что ведущую роль в атерогенезе может играть снижение скорости элиминации холестерина (ХС) из клеток интимы артерий, приводящее к его накоплению в артериальной стенке.

Атеросклероз является сложным многофакторным заболеванием, в развитии которого существенное значение имеет генетический компонент. Исследования уровня конкордантности при анализе близнецовых пар показали, что вклад наследственной предрасположенности в развитие сердечно-сосудистой патологии оценивается от 30 до 60 % (*Sivapalaratnam, 2011*). Генетическая предрасположенность относится к немодифицируемым факторам риска данного заболевания и имеет особенное значение в развитии атеросклероза в молодом возрасте. Известно, что полиморфные варианты генов вносят существенный вклад в вариации липидного профиля плазмы крови и развитие атеросклероза (*Teslovich et al., 2010; Edmondson et al., 2011*). Эпидемиологические исследования позволяют также предполагать, что изменения на уровне экспрессии генов могут вносить существенный вклад в развитие атеросклероза (*Seo et al., 2004; Sinnaeve et al., 2009*). Однако конкретные механизмы наследственной предрасположенности к атеросклерозу до настоящего времени остаются недостаточно изученными. Поэтому актуальность исследований, посвященных изучению молекулярно-

генетических основ развития атеросклероза, направленных как на создание эффективной системы профилактики данного заболевания, так и на поиск новых молекулярных мишеней для антиатерогенной терапии, не вызывает сомнения.

Учитывая современные представления о патогенезе атеросклероза и роли моноцитов и макрофагов сосудистой стенки в накоплении липидов и инициации формирования атеросклеротических бляшек, для настоящего исследования были выбраны генетические детерминанты обратного транспорта ХС (ОТХ), которые предположительно могут определять скорость элиминации ХС из сосудистой стенки. Аполипопротеин А-I (Апо А-I) является основным фактором, определяющим концентрацию ЛПВП в плазме крови, играя при этом важнейшую роль в биосинтезе, структуре и обеспечении функции ЛПВП (*Kontush, Chapman, 2006*). Снижение концентрации Апо А-I в плазме крови является независимым фактором риска развития атеросклероза (*Chan, Watts, 2006*). Транспортёр ABCG1 осуществляет перенос ХС и оксистеролов через мембрану клетки на частицы ЛПВП (*Gelissen et al., 2006; Terasaka et al., 2007*). Апо А-I и транспортёр ABCG1, таким образом, играют ключевую роль в эффективной мобилизации ХС из макрофагов и предотвращении их трансформации в пенистые клетки. Поэтому в настоящем исследовании была изучена роль экспрессии гена *ABCG1* в моноцитах и макрофагах и полиморфных вариантов генов *ABCG1* и *APOA1* в формировании предрасположенности к атеросклерозу.

Цель исследования

Исследование ассоциации уровня экспрессии гена *ABCG1* и вариантов генов *ABCG1* и *APOA1* с атеросклерозом в популяции Санкт-Петербурга.

Задачи исследования

1. Анализ уровня мРНК гена *ABCG1* и содержания белка ABCG1 в моноцитах и макрофагах у пациентов с атеросклерозом и в контрольной группе.
2. Анализ ассоциации уровня экспрессии гена *ABCG1* со степенью тяжести атеросклеротических поражений сосудов.
3. Оценка вклада вариантов генов *ABCG1* ((-134)T > G, (-204)A > C и (-384)G > A) и *APOA1* ((-75)G > A и 83C > T) в риск развития атеросклероза в популяции Санкт-Петербурга.
4. Анализ ассоциации вышеперечисленных вариантов генов *ABCG1* и *APOA1* с уровнем ОХС и ХС в составе ЛПВП (Х-ЛПВП) плазмы крови.

Научная новизна

1. Впервые у пациентов с атеросклерозом, не принимающих статины и другие гиполипидемические препараты, была исследована экспрессия гена транспортера *ABCG1* в моноцитах и макрофагах, стимулированных фактором М-CSF. Впервые показана корреляция уровня экспрессии гена *ABCG1* в моноцитах и степени артериального стеноза у пациентов с атеросклерозом. Впервые выявлен сниженный уровень мРНК *ABCG1* и белка *ABCG1* в дифференцированных макрофагах у пациентов с атеросклерозом.
2. Впервые определены частоты вариантов $(-134)T > G$, $(-204)A > C$ и $(-384)G > A$ гена *ABCG1* в популяции Санкт-Петербурга среди индивидуумов контрольной группы и пациентов с атеросклерозом. Впервые показана ассоциация вариантов $(-134)T > G$ и $(-204)A > C$ гена *ABCG1* с уровнем ОХС плазмы крови у жителей Санкт-Петербурга.
3. Впервые исследован вклад вариантов $(-75)G > A$ и $83C > T$ гена *APOA1* в формирование предрасположенности к атеросклерозу в популяции Санкт-Петербурга. Выявлена ассоциация аллеля *T83* гена *APOA1* с повышением концентрации Х-ЛПВП и со снижением риска развития атеросклероза у жителей Санкт-Петербурга.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты настоящего исследования представляют интерес для понимания молекулярно-генетических основ развития атеросклероза. Показано, что снижение уровня экспрессии гена *ABCG1* в моноцитах и макрофагах может являться значимым фактором в развитии и прогрессировании атеросклеротического процесса. Полученные данные об ассоциации уровня экспрессии гена *ABCG1* с атеросклерозом у человека могут быть полезны для разработки новых методов в коррекции атеросклероза. С целью своевременной профилактики полученные данные могут также быть использованы для формирования групп повышенного риска развития атеросклероза.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Уровень мРНК гена *ABCG1* и белка *ABCG1* снижен в макрофагах у пациентов с атеросклерозом.
2. Пациенты с окклюзиями артерий характеризуются пониженным уровнем мРНК гена *ABCG1* в моноцитах по сравнению с пациентами, не имеющими окклюзий, и по сравнению с контрольной группой.

3. Варианты *G(-134)* и *C(-204)* гена *ABCG1* ассоциированы с повышением концентрации ОХС плазмы крови у жителей Санкт-Петербурга.
4. Вариант *T83* гена *APOA1* ассоциирован со снижением относительного риска развития атеросклероза и с повышением концентрации Х-ЛПВП плазмы крови у жителей Санкт-Петербурга.

Личное участие автора в получении результатов, изложенных в диссертации

Осмотр и ангиографическая диагностика атеросклероза у пациентов, забор у них периферической крови, измерения концентрации липидов плазмы крови осуществлялись сотрудниками ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова и Центра атеросклероза и нарушений липидного обмена клинической больницы № 122 г. Санкт-Петербурга. Культивирование моноцитов выполнено на базе отдела биохимии ФГБУ «НИИЭМ» РАМН под руководством д. м. н., проф. А. Д. Денисенко. Культивирование макрофагов выполнено совместно с научным сотрудником ФГБУ «ПИЯФ» НИЦ КИ Е. П. Деминой. Анализ уровня мРНК *ABCG1* и содержания белка *ABCG1* в моноцитах и макрофагах выполнен автором лично. Выделение ДНК для создания банка ДНК пациентов с атеросклерозом и контрольной группы выполнено автором лично. Типирование полиморфных вариантов генов *ABCG1* и *APOA1* проведено автором лично. Автор провел статистический анализ всех полученных данных и сформулировал выводы. Описание собственных исследований, анализ и обсуждение результатов выполнены автором самостоятельно. Материалы, вошедшие в представленную работу, обсуждались и публиковались совместно с соавторами и научным руководителем.

Апробация работы

Результаты работы были доложены на Российском национальном конгрессе кардиологов, Москва, 2008; на 7-м Международном симпозиуме «Горизонты молекулярной биологии», Гёттинген, 2010; на Всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия», Санкт-Петербург, 2010; на 65-м Международном научно-практическом конгрессе «Актуальные проблемы современной медицины», Киев, 2011; на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы медицинской науки», Ярославль, 2013; на Европейской конференции по генетике человека, Париж, 2013; на Российском национальном конгрессе кардиологов, Санкт-Петербург,

2013; на 67-м Международном научно-практическом конгрессе «Актуальные проблемы современной медицины», Киев, 2013.

Публикации

Результаты диссертационной работы отражены в 16 печатных работах соискателя, в том числе опубликованы в 4-х статьях в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации основных результатов диссертационных исследований.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа построена по общепринятому плану и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения результатов, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 133 страницах машинописного текста, иллюстрирована 14 таблицами, 24 рисунками и фотографиями. Список литературы включает 266 наименований, из них 248 – зарубежные публикации.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Характеристика обследованных групп

Были обследованы 222 пациента (средний возраст $53,8 \pm 0,7$ года, средний возраст начала заболевания $48,4 \pm 0,6$ лет, 70 % мужчин и 30 % женщин) с атеросклерозом, подтвержденным при ангиографическом исследовании. Критерием отбора служило наличие гемодинамически значимых стенозов как минимум в одной артерии одного из трех артериальных бассейнов – церебрального, коронарного, бассейна артерий нижних конечностей.

Контрольная группа состояла из 382 индивидуумов (средний возраст $47,1 \pm 0,3$ лет, 66 % мужчин и 34 % женщин). Все члены контрольной группы проходили обследование у врача-кардиолога с целью исключения диагноза сердечно-сосудистых заболеваний. Возраст лиц в контрольной группе соответствовал возрасту начала заболевания у пациентов. Все пациенты и лица, вошедшие в контрольную группу, являлись жителями Санкт-Петербурга и не были связаны узами родства.

У всех пациентов и у всех представителей контрольной группы были определены варианты $(-134)T > G$ (SNP ID rs1378577), $(-204)A > C$ (SNP ID rs1893590) и $(-384)G > A$ (SNP ID rs4148082) гена *ABCG1* и варианты $(-75G) > A$ (SNP ID rs670) и $83C > T$ (SNP ID rs5069) гена *APOA1*.

Для исследования экспрессии гена *ABCG1* в моноцитах и макрофагах были отобраны подгруппы пациентов, которые не принимали статины либо другие гиполипидемические препараты, и соответствующие по возрасту контрольные группы (рисунок 1).

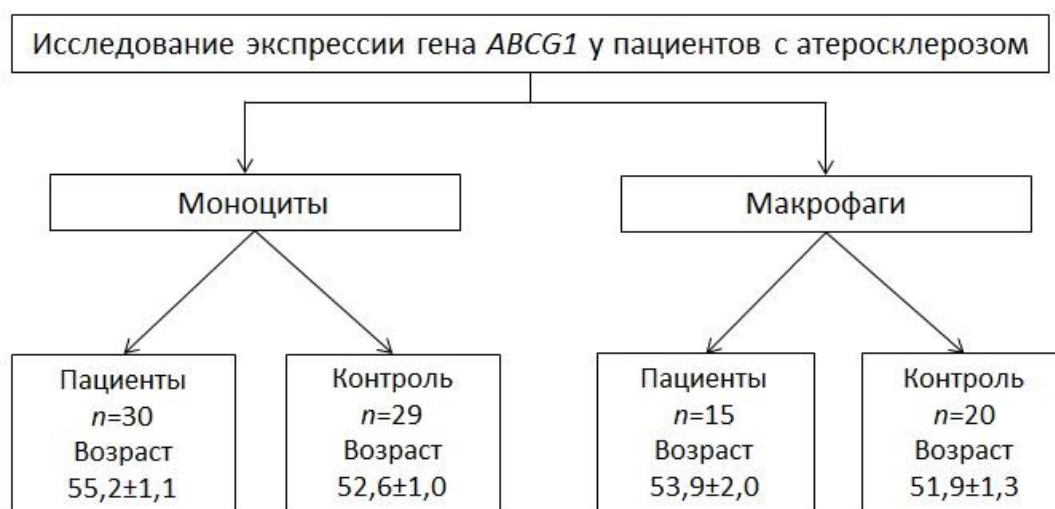


Рисунок 1 – Дизайн эксперимента по изучению экспрессии гена *ABCG1* в моноцитах и макрофагах

Методы исследования

Мононуклеарную фракцию получали из свежесобранной периферической крови методом градиентного центрифугирования при 1 600 об./мин в растворе Фиколла ($\rho = 1,077$, GE Healthcare UK Limited, Великобритания). После двух отмывок в PBS мононуклеарные клетки ресуспендировали в культуральной среде (альфа-МЕМ, 10%-я эмбриональная сыворотка, 5 мкг/мл антибиотиков (пенициллин G, стрептомицин)) и инкубировали в CO_2 -инкубаторе (5 % CO_2 , 37 °C) в течение 2 ч. После этого клетки дважды промывали в PBS. Прикрепившиеся к чашкам Петри моноциты культивировали в присутствии колониестимулирующего фактора макрофагов M-CSF (R&D Systems, США; 15 нг/мл) в течение суток для получения более чистой культуры. Для получения макрофагов моноциты культивировали в тех же условиях в течение 5 сут. Далее моноциты и макрофаги были использованы для определения содержания мРНК *ABCG1* и белка ABCG1.

Тотальная РНК была выделена с использованием набора для выделения РНК RNeasy Mini Kit (Qiagen, Нидерланды). кДНК получали методом обратной транскрипции с использованием набора iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, США).

Определение уровня мРНК *ABCG1* проводилось методом количественной ПЦР в режиме реального времени с флуоресцентными зондами TaqMan на приборе CFX96 Touch (Bio-Rad, США). В качестве референс-гена использовали ген *ACTB* (β -актин). В экспериментах были использованы разработанные нами олигонуклеотидные праймеры и зонды, синтезированные фирмой «Синтол» (Москва).

Содержание белка *ABCG1* в моноцитах и макрофагах оценивали методом вестерн-блоттинга с использованием первичных антител к *ABCG1* (1 : 500; NB400-132, Novus Biologicals, США). Результаты нормировали относительно окрашивания β -актина (1 : 10 000; ab8227, Abcam, Великобритания). Клетки лизировали, количество общего белка определяли по методу Бредфорд с использованием соответствующего набора («Силекс», Россия) на спектрофотометре SmartSpec™ Plus (Bio-Rad, США). В экспериментах использовали вторичные антитела для *ABCG1* и β -актина – goat anti-rabbit IgG-H&L (HRP) (1 : 3 000; ab6721, Abcam, Великобритания). Результаты идентифицировали с использованием набора Amersham ECL™ Plus System (Amersham, Великобритания) и фотопленки СЕА (Швеция).

Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции. Идентификацию вариантов $(-75)G > A$ и $83C > T$ проводили методом ПЦР с последующим рестрикционным анализом, как описано ранее (*Pulkkinen et al.*, 2000). Идентификацию вариантов $(-134)T > G$ гена *ABCG1* проводили методом аллель-специфической ПЦР, как описано ранее (*Furuyma et al.*, 2009). Для идентификации генетических вариантов $(-204)A > C$ и $(-384)G > A$ гена *ABCG1* были разработаны оригинальные методы детекции на основе ПЦР и анализа полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (*Мирошникова и др.*, 2013).

Концентрацию ОХС и Х-ЛПВП в плазме крови измеряли на автоанализаторе А-15 (BioSystems, Испания) с использованием наборов фирмы BioSystems. Коэффициент атерогенности (K_a) рассчитывали по формуле

$$K_a = \frac{ОХС - Хлпвп}{Хлпвп} . \quad (1)$$

Статистический анализ был проведен с использованием программы SPSS, версия 17.0. Для сравнения распределения генотипов между группами был использован критерий χ^2 . Отношение шансов (OR) рассчитывали с 95%-м доверительным интервалом по формуле

$$OR = \frac{a \times d}{b \times c}, \quad (2)$$

где a и b – количество больных, имеющих и не имеющих мутантный аллель, c и d – количество человек контрольной группы, имеющих и не имеющих мутантный аллель соответственно. Границы доверительного интервала (ДИ) вычисляли по формулам:

$$OR_{\min} = OR^{(1 - 1,96/\sqrt{\chi^2})}, \quad (3)$$

$$OR_{\max} = OR^{(1 + 1,96/\sqrt{\chi^2})}, \quad (4)$$

$$\chi^2 = ((a \times d) - (b \times c) - 0,5 \times n)^2 \times \frac{(n-1)}{n_0 \times n_1 \times m_0 \times m_1}, \quad (5)$$

где $n_1 = a + b$; $n_0 = c + d$; $m_1 = a + c$; $m_0 = b + d$; $n = n_1 + n_0 + m_1 + m_0$.

Соответствие данных нормальному распределению проверялось с помощью критериев Шапиро – Уилка или Колмогорова – Смирнова, в зависимости от размера выборки. В случае соответствия данных нормальному распределению при сравнении уровней липидов плазмы крови при носительстве различных генотипов использовали t -критерий Стьюдента (или t -критерий в модификации Уэлча в случае неоднородных дисперсий) в случае двух выборок и метод One-Way ANOVA в случае трех выборок. Для проверки статистически достоверного результата, полученного при использовании One-Way ANOVA, был использован апостериорный критерий Джеймса – Ховелла. В случае несоответствия данных нормальному распределению сравнение полученных значений между отдельными группами предполагало использование непараметрического критерия Манна – Уитни. Для анализа корреляции между количественными характеристиками пользовались методом Спирмена. Значения $p < 0,05$ считались статистически значимыми. Средние величины приведены со стандартной ошибкой среднего.

Результаты исследования

Экспрессия гена ABCG1 у пациентов с атеросклерозом

В нашем исследовании мы сравнили уровень экспрессии гена *ABCG1* в моноцитах и макрофагах, стимулированных фактором макрофагов M-SCF, в группе пациентов с атеросклерозом и в контрольной группе. Использование фактора макрофагов M-SCF позволяет получить макрофаги с проатерогенным фенотипом, которые преимущественно присутствуют в атеросклеротических бляшках (*Waldo et al.*, 2008).

На первом этапе исследования содержание мРНК *ABCG1* было определено в моноцитах, активированных фактором М-CSF в течение суток, у пациентов с атеросклерозом и в контрольной группе. Значимых различий между группой пациентов с атеросклерозом и контрольной группой выявлено не было (рисунок 2). Индивидуумы мужского и женского пола не отличались по уровню мРНК *ABCG1* в моноцитах (в группе пациентов: $1,10 \pm 0,13$ у мужчин и $1,05 \pm 0,23$ у женщин, $p = 0,862$; в контрольной группе: $1,41 \pm 0,12$ у мужчин и $1,11 \pm 0,19$ у женщин, $p = 0,121$). На следующем этапе исследования был проведен сравнительный анализ содержания мРНК *ABCG1* в макрофагах, полученных путем дифференцировки моноцитов в присутствии фактора макрофагов М-CSF в течение 5 сут., у пациентов с атеросклерозом и в контрольной группе. Уровень мРНК *ABCG1* в макрофагах в группе пациентов был ниже, чем в соответствующей контрольной группе (рисунок 2) (Мирошникова и др., 2014).

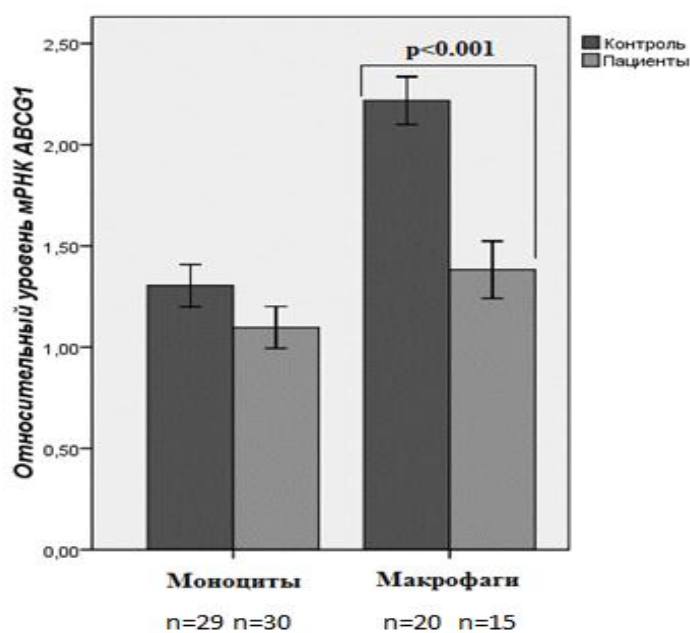


Рисунок 2 – Относительные уровни мРНК *ABCG1* в моноцитах и макрофагах у пациентов с атеросклерозом (светлые столбцы) и в соответствующих контрольных группах (темные столбцы)

Мы также провели измерения содержания белка *ABCG1* в моноцитах (9 пациентов и 6 контрольных образцов) и макрофагах (7 пациентов и 4 контрольных образца). Относительные уровни белка *ABCG1* в моноцитах не отличались и составили: для группы пациентов – $0,15 \pm 0,04$, для контрольной группы – $0,20 \pm 0,02$ ($p=0,145$). Содержание белка *ABCG1* в макрофагах у

пациентов с атеросклерозом было снижено по сравнению с контрольной группой (рисунок 3).

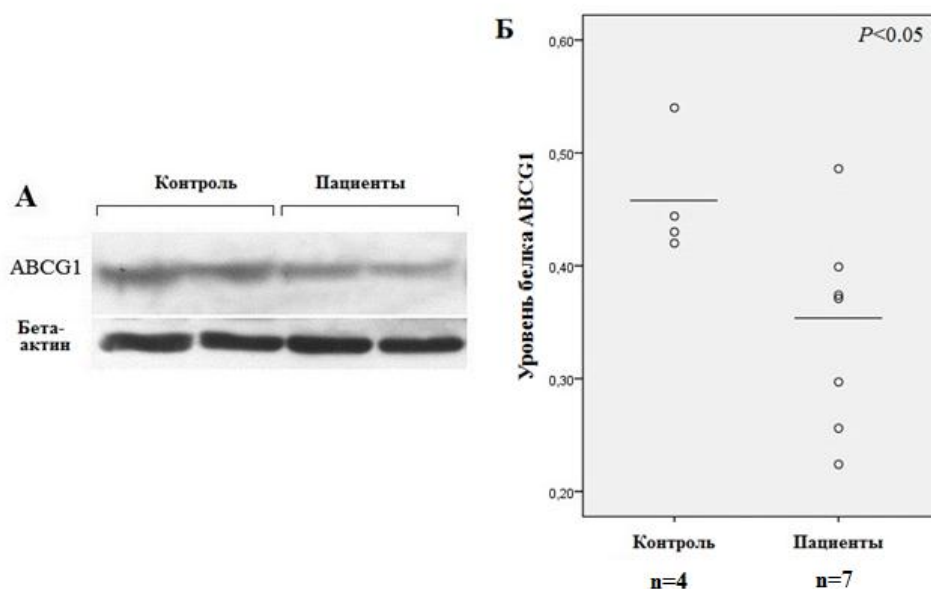


Рисунок 3 – Результаты вестерн-блоттинга для белка ABCG1 в макрофагах (А); относительные уровни белка ABCG1 в макрофагах у пациентов и у лиц из контрольной группы (Б)

Мы провели анализ корреляции уровня мРНК *ABCG1* в моноцитах со степенью тяжести атеросклеротических поражений сосудов. Уровень мРНК *ABCG1* в моноцитах негативно коррелировал с показателем максимального артериального стеноза ($r = -0,45$, $p = 0,016$). Максимальный стеноз оценивался по данным ангиографического исследования как максимальная степень (в %) перекрытия артерии атеросклеротической бляшкой. Данная величина зависит от размера атеросклеротической бляшки. Оклюзия артерии, т. е. 100%-е перекрытие (закупорка) просвета артерии, является наиболее тяжелым случаем атеросклеротического повреждения. Уровень мРНК *ABCG1* в моноцитах у пациентов с окклюзиями артерий различных отделов сердечно-сосудистой системы ($N = 12$) был достоверно ниже по сравнению с пациентами, не имеющими окклюзий ($N = 18$), и по сравнению с контрольной группой ($N = 29$) (рисунок 4). Следует заметить, что размер бляшки зависит от темпа накопления липидов в стенке артерии, но далеко не всегда от длительности заболевания (Липовецкий, 2000). Действительно, степень тяжести атеросклеротических повреждений у пациентов, отобранных для настоящего исследования, не коррелировала с длительностью заболевания (коэффициенты корреляции: между длительностью заболевания и показателем максимального

артериального стеноза $r = 0,156$, $p = 0,456$; между длительностью заболевания и количеством пораженных артерий $r = 0,161$, $p = 0,443$). Это, в свою очередь, указывает на возможное влияние уровня экспрессии гена *ABCG1* в моноцитах на скорость формирования атеросклеротических бляшек.

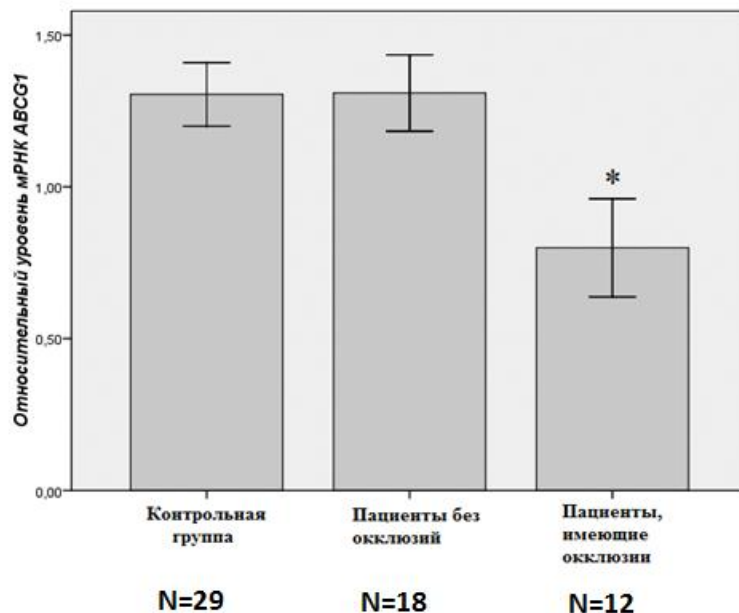


Рисунок 4 – Относительный уровень мРНК *ABCG1* в моноцитах у пациентов с окклюзиями артерий, у пациентов, не имеющих окклюзий, и в контрольной группе; * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой и $p < 0,05$ по сравнению с подгруппой пациентов, не имеющих окклюзий

В то же время оценить корреляцию уровня мРНК *ABCG1* в макрофагах со степенью тяжести атеросклеротического поражения не представилось возможным, т. к. данная группа пациентов была клинически однородной. Среди пациентов, которым выполнялось исследование экспрессии гена *ABCG1* в макрофагах, было выявлено только 2 человека с окклюзией.

Наше исследование не продемонстрировало корреляции уровня мРНК *ABCG1* в моноцитах и макрофагах с уровнем Х-ЛПВП плазмы крови ни в группе пациентов, ни в контрольной группе. В целом наши результаты согласуются с данными, полученными ранее и указывающими на то, что опосредованный транспортером *ABCG1* отток ХС из макрофагов может не вносить существенного вклада в концентрацию Х-ЛПВП в плазме крови (Nakanishi et al., 2008). В то же время есть данные, что уровень мРНК *ABCG1* в моноцитах отличается у людей с экстремально низкими и экстремально высокими уровнями Х-ЛПВП плазмы крови (Holven et al., 2013). Отсутствие в нашем исследовании корреляции между уровнем экспрессии гена *ABCG1* и

X-ЛПВП плазмы крови можно объяснить тем фактом, что в наших выборках не было представлено людей с очень высоким уровнем X-ЛПВП и большинство имело среднестатистические показатели. Известно, что атеросклероз нередко развивается и у лиц с нормальным уровнем X-ЛПВП плазмы крови. Таким образом, концентрация X-ЛПВП в плазме крови не всегда адекватно отражает антиатерогенную функцию ЛПВП, которая лучше характеризуется скоростью оттока ХС из макрофагов сосудистой стенки (*Navab et al.*, 2009). В мировой литературе есть данные об ассоциации снижения уровня экспрессии гена *ABCG1* со снижением ОТХ из макрофагов (*Kennedy et al.*, 2005; *Mauldin et al.*, 2008). Также известно, что ОТХ из макрофагов является основным средством реализации антиатерогенного потенциала ЛПВП (*Kontush, Chapman*, 2006). Наше исследование продемонстрировало, что уровень экспрессии гена *ABCG1* в М-CSF-макрофагах снижен у пациентов с атеросклерозом. Мы наблюдали сниженный уровень мРНК *ABCG1* в моноцитах пациентов с окклюзиями артерий по сравнению с пациентами, имеющими менее выраженные атеросклеротические повреждения. Суммируя полученные результаты, можно заключить, что снижение уровня экспрессии гена *ABCG1* в моноцитах и макрофагах может являться значимым фактором в развитии и прогрессировании атеросклеротического процесса.

Анализ вклада полиморфных вариантов генов *ABCG1* и *APOA1* в формирование предрасположенности к атеросклерозу

Частоты генотипов исследованных вариантов генов *ABCG1* и *APOA1* в группе пациентов с атеросклерозом и в контрольной группе представлены в таблице 1.

В группе пациентов с атеросклерозом наблюдалось достоверное снижение частоты аллеля *T83* гена *APOA1* по сравнению с контрольной группой. Таким образом, носительство аллеля *T83* гена *APOA1* (генотипы *TT83* и *CT83*) было ассоциировано со снижением риска развития атеросклероза по сравнению с носителями генотипа *CC83* (*Мирошникова и др.*, 2010).

Частоты других исследованных вариантов генов *ABCG1* и *APOA1* не отличались между группой пациентов и контрольной группой.

Таблица 1 – Частоты вариантов генов *ABCG1* и *APOA1* в группе пациентов с атеросклерозом и в контрольной группе

Варианты генов <i>ABCG1</i> и <i>APOA1</i>	Группа пациентов с атеросклерозом (<i>N</i> = 222)	Контрольная группа (<i>N</i> = 382)
<i>ABCG1</i> <i>TT</i> <i>n</i> (%)	133 (59,9)	224 (58,6)
(-134) <i>T</i> > <i>G</i> <i>TG</i> <i>n</i> (%)	77 (34,7)	129 (33,8)
<i>GG</i> <i>n</i> (%)	12 (5,4)	29 (7,6)
аллель <i>T</i>	0,77	0,76
аллель <i>G</i>	0,23	0,24
<i>ABCG1</i> <i>AA</i> <i>n</i> (%)	94 (42,3)	166 (43,5)
(-204) <i>A</i> > <i>C</i> <i>AC</i> <i>n</i> (%)	99 (44,6)	167 (43,7)
<i>CC</i> <i>n</i> (%)	29 (13,1)	49 (12,8)
аллель <i>A</i>	0,65	0,65
аллель <i>C</i>	0,35	0,35
<i>ABCG1</i> <i>GG</i> <i>n</i> (%)	215 (96,8)	367 (96,1)
(-384) <i>G</i> > <i>A</i> <i>GA</i> <i>n</i> (%)	7 (3,2)	14 (3,7)
<i>AA</i> <i>n</i> (%)	0 (0)	1 (0,2)
аллель <i>G</i>	0,98	0,98
аллель <i>A</i>	0,02	0,02
<i>APOA1</i> <i>GG</i> <i>n</i> (%)	141 (63,5)	237 (62,0)
(-75) <i>G</i> > <i>A</i> <i>GA</i> <i>n</i> (%)	75 (33,8)	126 (33,0)
<i>AA</i> <i>n</i> (%)	6 (2,7)	19 (5)
аллель <i>G</i>	0,80	0,79
аллель <i>A</i>	0,20	0,21
<i>APOA1</i> <i>CC</i> <i>n</i> (%)	210 (94,6)	338 (88,5)
83 <i>C</i> > <i>T</i> <i>CT</i> <i>n</i> (%)	12 (5,4)	40 (10,5)
<i>TT</i> <i>n</i> (%)	0 (0)	4 (1,0)
аллель <i>C</i>	0,973	0,937
аллель <i>T</i>	0,027	0,063*

* $p = 0,004$; OR(*CT* + *TT* vs. *CC*) = 0,44 (95%-й ДИ 0,29–0,66).

Среди больных атеросклерозом, которые не принимали статинов и других препаратов, способных повлиять на уровень липидов плазмы крови, и в контрольной группе был проведен сравнительный анализ содержания ОХС и Х-ЛПВП в плазме крови у носителей различных генотипов исследованных вариантов генов *ABCG1* и *APOA1*. В таблице 2 представлены выявленные ассоциации исследованных генотипов с уровнем липидов плазмы крови в контрольной группе.

Таблица 2 – Содержание холестерина плазмы крови при различных генотипах полиморфных вариантов генов *ABCG1* и *APOA1* в контрольной группе

Варианты генов <i>ABCG1</i> и <i>APOA1</i>		ОХС, ммоль/л	Х-ЛПВП, ммоль/л	Коэффициент атерогенности
<i>ABCG1</i> (-134) <i>T</i> > <i>G</i>	<i>TT</i>	5,12 ± 0,11	1,12 ± 0,03	3,96 ± 0,20
	<i>TG</i> + <i>GG</i>	5,62 ± 0,15 <i>p</i> = 0,015	1,19 ± 0,04	4,08 ± 0,19
<i>ABCG1</i> (-204) <i>A</i> > <i>C</i>	<i>AA</i>	5,06 ± 0,14	1,14 ± 0,03	3,85 ± 0,20
	<i>AC</i> + <i>CC</i>	5,50 ± 0,12 <i>p</i> = 0,037	1,16 ± 0,03	4,14 ± 0,19
<i>APOA1</i> 83 <i>C</i> > <i>T</i>	<i>CC</i>	5,52 ± 0,12	1,13 ± 0,02	4,18 ± 0,16
	<i>CT</i> + <i>TT</i>	5,15 ± 0,19 <i>p</i> = 0,017	1,33 ± 0,08 <i>p</i> = 0,013	3,15 ± 0,30

Варианты *G(-134)* и *C(-204)* гена *ABCG1* были ассоциированы с повышением концентрации ОХС плазмы крови в контрольной группе (Мирошникова и др., 2013). Нужно отметить, что данные варианты находятся в неравновесном сцеплении, поэтому влияние на концентрацию ОХС плазмы крови одного из полиморфных вариантов может объясняться влиянием второго варианта. Так, в группе пациентов ассоциация с уровнем ОХС плазмы крови наблюдалась только в случае вариантов (-134)*T* > *G* гена *ABCG1*. Среди больных атеросклерозом носительство генотипа *GG(-134) ABCG1* было ассоциировано с более высоким уровнем ОХС плазмы крови по сравнению с носителями генотипов *TT(-134)* и *TG(-134)* ($6,11 \pm 0,22$ vs. $5,30 \pm 0,11$, $p = 0,014$). Нужно отметить, что среди пациентов все носители генотипа *GG(-134) ABCG1* являлись носителями генотипа *CC(-204) ABCG1*, тогда как среди пациентов – носителей генотипа *CC(-204) ABCG1* были носители различных генотипов (-134)*T* > *G* *ABCG1*. Таким образом, самый высокий уровень ОХС плазмы крови среди пациентов наблюдался при носительстве сочетанного генотипа *GG(-134)CC(-204) ABCG1*.

Механизм влияния полиморфных вариантов (-134)*T* > *G* и (-204)*A* > *C* гена *ABCG1* на концентрацию ОХС в плазме крови неизвестен. Эти вариации представляют собой однонуклеотидные замены в промоторной области гена *ABCG1* в позициях (-134) и (-204) от сайта начала транскрипции и могут затрагивать сайты посадки транскрипционных факторов. Ранее для вариантов *G(-134)* и *C(-204)* гена *ABCG1* было показано снижение уровня транскрипции гена *ABCG1* (Furuuama et al., 2009; Olivier et al., 2012). Однако наше исследование не обнаружило влияния этих вариантов на уровень экспрессии

гена *ABCG1* в моноцитах и макрофагах человека. С другой стороны, не исключено тканеспецифичное влияние этих вариантов на экспрессию гена *ABCG1*.

Наше исследование также продемонстрировало ассоциацию вариантов *83C > T* гена *APOA1* с уровнем Х-ЛПВП плазмы крови у здоровых индивидуумов (*Мирошникова и др.*, 2014). В контрольной группе концентрация Х-ЛПВП плазмы крови у носителей аллеля *T83* гена *APOA1* была выше, чем у носителей генотипа *CC83 APOA1*. При этом коэффициент атерогенности у здоровых лиц – носителей аллеля *T83*, напротив, был ниже, чем у носителей генотипа *CC83 APOA1*. Следует отметить, что ассоциация аллеля *T83* гена *APOA1* с увеличением концентрации Апо А-I и Х-ЛПВП плазмы крови ранее была также показана среди белого населения США и Европы, а также в китайской популяции (*Pulkkinen et al.*, 2000; *Larson et al.*, 2002; *Zou et al.*, 2003; *Haase et al.*, 2012). Таким образом, атеропротективный эффект аллеля *T83* гена *APOA1* в популяции Санкт-Петербурга объясняется влиянием данного варианта на уровень антиатерогенных ЛПВП в плазме крови.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании у пациентов с атеросклерозом и в контрольной группе была исследована экспрессия гена транспортера *ABCG1* в моноцитах и макрофагах, стимулированных фактором М-CSF. Впервые было продемонстрировано, что уровень экспрессии гена *ABCG1* в макрофагах снижен у пациентов с атеросклерозом. У пациентов с окклюзиями артерий наблюдался сниженный уровень мРНК *ABCG1* в моноцитах по сравнению с пациентами, имеющими менее выраженные атеросклеротические повреждения. Таким образом, можно заключить, что снижение уровня экспрессии гена *ABCG1* в моноцитах и макрофагах может являться значимым фактором в развитии и прогрессировании атеросклеротического процесса. В данном исследовании была продемонстрирована протективная роль аллеля *T83* гена *APOA1* в формировании предрасположенности к атеросклерозу. Полученные данные могут быть использованы для формирования групп повышенного риска развития атеросклероза.

ВЫВОДЫ

1. В макрофагах, полученных при дифференцировке моноцитов в присутствии колониестимулирующего фактора макрофагов M-CSF, у пациентов с атеросклерозом снижен уровень мРНК гена *ABCG1* и белка *ABCG1*.
2. Уровень мРНК гена *ABCG1* в моноцитах снижен у пациентов с окклюзиями артерий по сравнению с пациентами, не имеющими окклюзий, и по сравнению с контрольной группой.
3. Для вариантов *G(-134)* и *C(-204)* гена *ABCG1* характерны более высокие значения концентрации общего холестерина плазмы крови.
4. Носительство варианта *T83* гена *APOA1* снижает риск развития атеросклероза и ассоциировано с повышением концентрации холестерина в составе ЛПВП плазмы крови у жителей Санкт-Петербурга.
5. Варианты $(-134)T > G$, $(-204)A > C$ и $(-384)G > A$ гена *ABCG1* и $(-75)G > A$ гена *APOA1* не влияют на риск развития атеросклероза в популяции Санкт-Петербурга.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. **Мирошникова, В. В.** Ассоциации генетических вариантов апопротеина А-1 с развитием атеросклероза у жителей Санкт-Петербурга / В. В. Мирошникова, Т. И. Родыгина, Е. П. Демина, П. С. Курьянов, С. А. Уразгильдеева, В. С. Гуревич, А. Л. Шварцман // Экологическая генетика. – 2010. – Т. 8. – № 2. – С. 24–28.
2. **Мирошникова, В. В.** Ассоциация полиморфных вариантов гена транспортера *ABCG1* с концентрацией холестерина плазмы крови при атеросклерозе / В. В. Мирошникова, А. А. Пантелеева, Е. П. Демина, П. С. Курьянов, В. Н. Вавилов, С. А. Уразгильдеева, В. С. Гуревич, О. В. Сироткина, А. Л. Шварцман // Медицинская генетика. – 2013. – Т. 12. – № 10. – С. 23–28.
3. **Мирошникова, В. В.** Влияние полиморфных вариантов гена аполипопротеина А-I на липидный спектр плазмы крови в популяции Санкт-Петербурга / В. В. Мирошникова, А. А. Пантелеева, С. Н. Пчелина, А. Л. Шварцман // Ученые записки СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова. – 2014. – Т. 21. – № 1. – С. 57–59.

4. **Мирошникова, В. В.** Особенности экспрессии гена транспортера ABCG1 в мононуклеарных клетках периферической крови у пациентов с атеросклерозом / В. В. Мирошникова, Е. П. Демина, Н. В. Майоров, В. В. Давыденко, П. С. Курьянов, В. Н. Вавилов, А. Г. Виноградов, А. Д. Денисенко, А. Л. Шварцман // Цитология. – 2014. – Т. 56. – № 3. – С. 234–240.

Тезисы:

1. **Зверева (Мирошникова), В. В.** Влияние вариантов гена аполипопротеина A1 на риск развития атеросклероза / В. В. Зверева (Мирошникова), Е. П. Демина, П. С. Курьянов, Т. И. Родыгина, А. Л. Шварцман // Материалы Российского национального конгресса кардиологов. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2008. – Т. 7. – № 6. – С. 149.
2. **Демина, Е. П.** Обратный транспорт холестерина и развитие атеросклероза / Е. П. Демина, П. С. Курьянов, **В. В. Зверева (Мирошникова)**, А. Г. Виноградов, А. Л. Шварцман // Материалы V съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров. – 2009. – С. 413.
3. **Miroshnikova, V.** ABCG1 Transporter in Atherosclerosis Development / V. Miroshnikova, E. Demina, T. Rodygina, P. Kurjanov, A. Vinogradov, A. Denisenko, A. Schwarzman // European Journal of Human Genetics. – 2010. – V. 18. – Suppl. 1. – P. 218.
4. **Miroshnikova, V.** Expression of ABCG1 Transporter Gene in Macrophages from Atherosclerotic Patients / V. Miroshnikova, E. Demina, T. Rodygina, P. Kurjanov, A. Vinogradov, A. Denisenko, A. Schwarzman // Abstract Book: 7 International PhD Student Symposium "Horizons in Molecular Biology". – P. 98.
5. **Мирошникова, В. В.** Экспрессия гена ABCG1 транспортера у больных атеросклерозом / В. В. Мирошникова, Е. П. Демина, Т. И. Родыгина, П. С. Курьянов, А. Г. Виноградов, А. Д. Денисенко, А. Л. Шварцман // Материалы Всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия». Медицинский академический журнал. – 2010. – Т. 10. – № 5. – С. 126.
6. **Мирошникова, В. В.** Снижение уровня экспрессии гена ABCG1 в макрофагах больных атеросклерозом / В. В. Мирошникова, П. С. Курьянов, Е. П. Демина, Т. И. Родыгина, А. Д. Денисенко, А. Л. Шварцман // Материалы Международного конгресса «Актуальные

- проблемы современной медицины». Украинский научно-медицинский молодежный журнал. – 2011. – № 1. – С. 260–261.
7. **Miroshnikova, V.** The Role of *ABCG1* Gene Expression in Atherosclerosis Development / V. Miroshnikova, E. Demina, T. Rodygina, P. Kurjanov, A. Denisenko, A. Schwarzman // *Cardiovascular Research*. – 2012. – V. 93. – Suppl. 1. – P. 271.
 8. **Miroshnikova, V.** Association of *PON1* and *APOA1* Genes Polymorphism with Men's Life Expectancy in Russian Population / V. Miroshnikova, A. Zaharchuk, O. Sirotkina, A. Taraskina, S. Pchelina // *European Journal of Human Genetics*. – 2012. – V. 20. – Suppl. 1. – P. 241.
 9. **Мирошникова, В. В.** Экспрессия гена транспортера ABCG1 при развитии атеросклероза / В. В. Мирошникова, П. С. Курьянов, Н. В. Майоров, Е. П. Демина, А. Л. Шварцман // Сборник тезисов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы медицинской науки». – 2013. – С. 121–122.
 10. **Miroshnikova, V.** Influence of Promoter SNPs on the ABCG1 Transporter Gene Expression Level / V. Miroshnikova, E. Demina, N. Mayorov, V. Davydenko, P. Kurjanov, V. Vavilov, A. Denisenko, A. Schwarzman // *European Journal of Human Genetics*. – 2013. – V. 21. – Suppl. 2. – P. 69.
 11. **Мирошникова, В. В.** Влияние полиморфных вариантов в промоторной области гена *ABCG1* на риск развития атеросклероза / В. В. Мирошникова, А. А. Пантелеева, П. С. Курьянов, Е. П. Демина, В. Н. Вавилов, С. А. Уразгильдеева, В. С. Гуревич, О. В. Сироткина, А. Л. Шварцман // Материалы Российского национального конгресса кардиологов. – 2013. – С. 379.
 12. **Пантелеева, А. А.** Полиморфизм гена *ABCG1* и его влияние на уровень холестерина плазмы крови и развитие атеросклероза / А. А. Пантелеева, **В. В. Мирошникова**, А. Л. Шварцман // Материалы международного конгресса «Актуальные проблемы современной медицины». Украинский научно-медицинский молодежный журнал. – 2013. – № 4(74). – С. 149–150.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Апо А-I – аполипопротеин А-I
 ДИ – доверительный интервал
 ЛПВП – липопротеины высокой плотности
 ОТХ – обратный транспорт холестерина
 ОХС – общий холестерин
 Х-ЛПВП – холестерин в составе ЛПВП
 ХС – холестерин
 ABCG1 – АТФ-связывающий кассетный транспортер G1
 M-CSF – колониестимулирующий фактор макрофагов
 ОР – отношение шансов

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Аронов Д. М., Лупанов В. П. М.: Триада-Х, 2009. 248 с. – Бокерия Л. А. и др., 2007. Бюллетень НЦССХ им. А. Н. Бакулева РАМН. 8(5): 5–11. – Липовецкий Б. М. СПб.: Наука, 2000. 119 с. – Chan D. C., Watts G. F., 2006. An International Journal of Medicine. 99: 277–287. – Edmondson A. C. et al., 2011. Circulation Cardiovascular Genetics. 4: 145–155. – Furuyama S. et al., 2009. The Journal of Atherosclerosis and Thrombosis. 16(3): 194–200. – Gelissen I. C. et al., 2006. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology. 26: 534–540. – Haase C. L. et al., 2012. PLoS Genetics. 8(11): e1003063. – Holven K. B. et al., 2013. PLoS One. 8(11): e78241. – Kennedy M. A. et al., 2005. Cell Metabolism. 1: 121–131. – Kontush A., Chapman M. J., 2006. Pharmacology. 58: 342–374. – Larson I. A. et al., 2002. Clinical Genetics. 61: 176–184. – Mauldin J. P. et al., 2008. Circulation. 117: 2785–2792. – Nakanishi S. et al., 2008. The Journal of Lipid Research. 50: 183–192. – Navab M. et al., 2009. Diabetes. 58: 2711–2717. – Olivier M. et al., 2012. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology. 32: 2223–2231. – Pulkkinen A. et al., 2000. Diabetes Care. 23(6): 791–795. – Seo D. et al., 2004. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology. 24: 1922–1927. – Sinnaeve P. R. et al., 2009. PLoS One. 4(9): e7037. – Sivapalaratnam S. et al., 2011. Current Atherosclerosis Reports. 13: 225–232. – Terasaka N. et al., 2007. PNAS. 104: 15093–15098. – Teslovich T. M. et al., 2010. Lipids Nature. 466(7307): 707–713. – Waldo S. W. et al., 2008. American Journal of Pathology. 172: 1112–1126. – Zou Y. et al., 2003. Chinese Medical Journal. 116(5): 665–668.