

мРНК ГЕНА *ABCA1* И УРОВЕНЬ БЕЛКА *ABCA1* В МАКРОФАГАХ, АКТИВИРОВАННЫХ М-CSF, У ПАЦИЕНТОВ С АРТЕРИАЛЬНЫМ СТЕНОЗОМ

© *Е. П. Демина*,^{1, *} *В. В. Мирошникова*,¹ *Н. В. Майоров*,²
В. В. Давыденко,² *А. Л. Шварцман*^{1, 3}

¹ *Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова, Гатчина, Ленинградская обл.,*

² *С.-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова*

и ³ *Институт экспериментальной медицины Северо-Западного отделения РАМН, Санкт-Петербург;*

* *электронный адрес: citritt@gmail.com*

Транспортер *ABCA1* является одним из основных факторов, определяющих уровень антиатерогенных ЛПВП в плазме крови и принимающих активное участие в удалении холестерина из периферических тканей. Однако влияние экспрессии гена *ABCA1* и уровня белка *ABCA1* в макрофагах в развитии атеросклероза остается практически неизученным. Методом полимеразной цепной реакции в реальном времени определяли содержание мРНК гена *ABCA1* в макрофагах, культивированных в течение 5 сут с колониестимулирующим фактором макрофагов М-CSF. Уровень мРНК *ABCA1* у пациентов с артериальным стенозом был повышен по сравнению с контрольной группой ($P = 0.04$). Согласно результатам Вестерн-блоттинга, в макрофагах у этих пациентов содержание белка *ABCA1* было ниже, чем в контрольной группе ($P = 0.01$). Таким образом, наши результаты показывают, что уровень мРНК *ABCA1* и уровень белка *ABCA1* в макрофагах могут оказаться значимыми факторами в развитии атеросклероза.

Ключевые слова: атеросклероз, артериальный стеноз, обратный транспорт холестерина, *ABCA1*, макрофаги.

Принятые сокращения: *ABCA1* — АТФ-связывающий кассетный транспортер А1, ЛПВП — липопротеины высокой плотности, ОТХ — обратный транспорт холестерина, М-CSF — колониестимулирующий фактор макрофагов.

Сердечно-сосудистые заболевания, обусловленные атеросклерозом, по данным эпидемиологических исследований, являются основной причиной смерти во всем мире, в том числе и в России (Сердечно-сосудистые заболевания ВОЗ, 2011; Roger et al., 2012). Атеросклероз, согласно определению Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), — это переменная комбинация изменений интимы артерий, включающая в себя накопление липидов, сложных углеводов, фиброзной ткани, компонентов крови, отложение кальция и сопутствующие изменения средней оболочки артериальной стенки. По некоторым данным, частота встречаемости многоочагового атеросклероза варьирует от 18 до 54 % (Чернявский и др., 2006).

На молекулярно-клеточном уровне ключевым компонентом в атерогенезе является накопление внутриклеточных липидов и снижение уровня антиатерогенных липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) (Feig et al., 2008). Предполагается, что обратный транспорт холестерина (ОТХ) из клеток периферических тканей к печени, в которой ЛПВП играют важную роль, является одним из основных механизмов, обуславливающих антиатерогенные свойства ЛПВП. Нагруженные холестерином макрофаги (так называемые пенные клетки) являются клеточными маркерами атеросклеротических повреждений. Транспорт холестерина из макрофагов интимы может за-

щищать сердечно-сосудистую систему от дальнейшего развития атеросклероза. Таким образом, активация ОТХ может быть эффективной терапевтической стратегией уменьшения риска развития атеросклероза (Rader, 2006).

Одним из ключевых белков ОТХ является АТФ-связывающий кассетный транспортер А1 (*ABCA1*), который осуществляет перенос холестерина на аполипопротеин А1. В интима артерий при атеросклерозе наблюдается высокий уровень экспрессии гена *ABCA1* (Seo et al., 2004). Нарушения функционирования белка *ABCA1* или снижение экспрессии гена *ABCA1* приводят к ускоренному темпу атерогенеза и раннему развитию атеросклероза (Oram, Heineckel, 2005). Дефицит *ABCA1* в макрофагах сопровождается повышенным уровнем холестерина в мембране, увеличением его отложения на артериальной стенке и усилением образования липидных пятен (Franccone et al., 2005; Yvan-Charvet et al., 2008; Choi et al., 2009). Это свидетельствует о том, что *ABCA1* может принимать активное участие в удалении холестерина из атеросклеротических бляшек, а уровень экспрессии его гена может влиять как на начало атеросклеротического процесса, так и на стабильность уже существующих атероматозных бляшек. В исследованиях *in vitro* и *in vivo* было показано, что транспортер *ABCA1* является основным фактором, определяющим уровень антиатерогенных ЛПВП в плазме крови (Oram, Heineckel, 2005). Известно,

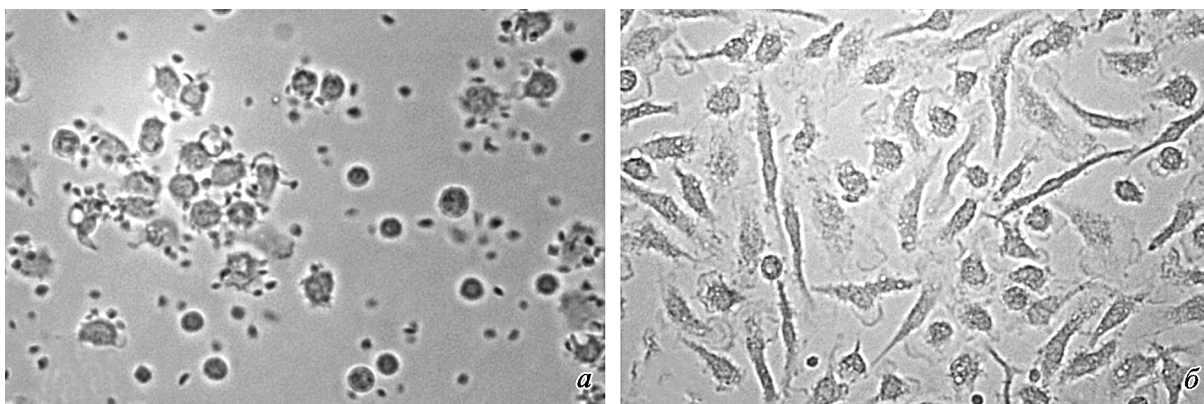


Рис. 1. Дифференцировка моноцитов, культивированных в присутствии М-CSF, в макрофаги.
 а — моноциты, культивированные 2 ч; б — макрофаги через 5 сут культивирования в присутствии М-CSF. Об. 20×.

что высокий уровень холестерина в макрофагах индуцирует экспрессию гена *ABCA1* (Denis et al., 2003). Таким образом, корреляция между содержанием мРНК *ABCA1* в макрофагах и уровнем холестерина в составе ЛПВП также может отражать развитие атеросклероза.

На основе на этих данных было сделано предположение, что уровень экспрессии гена *ABCA1* и уровень белка *ABCA1* в макрофагах могут быть ассоциированы с развитием атеросклероза. Эта гипотеза послужила предпосылкой для проведения настоящего исследования. Цель работы заключалась в оценке уровня мРНК гена *ABCA1* и уровня белка *ABCA1* в макрофагах, активированных М-CSF, у пациентов с артериальным стенозом и у лиц без сердечно-сосудистой патологии.

Материал и методика

Проведение настоящей работы одобрено этическим комитетом С.-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова. Группа пациентов состояла из 11 человек с атеросклерозом, подтвержденным ангиографическим исследованием (средний возраст — 54.2 ± 2.1 года). Ангиографическую диагностику артериального стеноза, отражающего атеросклеротические изменения в сосудах, проводили на кафедре госпитальной хирургии № 2 СПбГМУ им. И. П. Павлова. Пораженные атеросклерозом артерии располагались в коронарном бассейне. Пациенты, вошедшие в выборку для изучения экспрессии *ABCA1* в клетках крови, не принимали ни статинов, ни каких-либо иных гиполипидемических средств. Контрольная группа состояла из 11 человек без сердечно-сосудистых заболеваний в анамнезе и соответствовала группе пациентов по полу и возрасту (средний возраст — 49.8 ± 3.5 года).

У всех пациентов и представителей контрольной группы измеряли концентрацию общего холестерина и холестерина в составе ЛПВП в плазме крови с помощью энзиматического метода, используя набор WyoSystems (Испания).

Для получения макрофагов свежесобранную кровь смешивали в равном соотношении с фосфатно-солевым буферным раствором (PBS). Смесь наслаивали на фико-колл-верографин, центрифугировали (1500 об/мин, 30 мин), мононуклеары промывали в PBS, центрифугировали (1500 об/мин, 15 мин) Клетки ресуспендировали в

культуральной среде альфаMEM, содержащей 10 % сыворотки крови плодов коровы, 5 мкг/мл антибиотиков (пенициллин G и стрептомицин) и 15 нг/мл фактора макрофагов М-CSF и инкубировали в CO_2 -инкубаторе в течение 2 ч, после чего промывали в PBS. Прикрепившиеся к чашкам Петри моноциты культивировали в присутствии 15 нг/мл М-CSF (R&D Systems, США) в течение 5 сут с ежедневной заменой питательной среды. Микрофотографии моноцитов и макрофагов представлены на рис. 1. Популяция моноцитов характеризовалась значительным числом клеток сферической и овальной форм, имеющих округлое темное ядро, а макрофаги были представлены крупными клетками с выраженной адгезией на стекле и значительным присутствием полигональных клеток со множеством псевдоподий. Клетки отмывали в PBS, центрифугировали и хранили при -86°C .

Для выделения тотальной мРНК и проведения реакции обратной транскрипции использовали наборы RNeasy Minikit (Qiagen, Германия) и cDNA synthesis kit (Fermentas, Литва). Чистоту РНК оценивали по отношению поглощения при длинах волн 260 и 280 нм (критерий чистоты 1.8). Уровень мРНК гена *ABCA1* определяли методом ПЦР в реальном времени на приборе CFX96 Touch (BioRad, США). В качестве референсного гена использовали ген бета-актина (*ACTB*). Последовательности праймеров и зондов, использованные в данной работе (Бигль, Санкт-Петербург), представлены в таблице. После денатурации при 95°C в течение 10 мин проводили 45 циклов амплификации в следующем температурно-временном режиме: плавление — 95°C 30 с, отжиг-синтез — 60°C 30 с. Измерения для каждой пробы проверяли трижды. Количество мРНК *ABCA1* нормировали по отношению к мРНК *ACTB*. Относительное содержание мРНК *ABCA1* рассчитывали методом стандартных кривых согласно методическим указаниям фирмы-изготовителя.

Относительный уровень белка *ABCA1* в макрофагах определяли методом Вестерн-блоттинга. Для выделения мембранной фракции макрофаги лизировали в растворе следующего состава: 150 мМ NaCl, 1 % Triton X-100, 50 мМ Tris, рН 8, коктейль из ингибиторов протеаз (Roche, США). Количество общего белка определяли по методу Бредфорд на спектрофотометре SmartSpecTMPlus (BioRad, США). Использовали первые кроличьи поликлональные антитела к *ABCA1* (1 : 1000; ab7360, Abcam, Великобритания) и к β -актину (1 : 10000; ab8227, Abcam, Великобритания) и вторые антикроличьи антитела, конъю-

Праймеры и зонды, использованные в работе

<i>ABCA1</i>	Прямой	5'-GGGAGGCTCCCGGAGTT-3'
	Обратный	5'-GTATAAAAGAAGCCTCCGAGCATC-3'
	Зонд	5'-FAM-AACTTTAACAATCCATTGTGGCTCGCCTGT-RTQ1-3'
<i>ACTB</i>	Прямой	5'-CGTGTGCTGACCGAGG-3'
	Обратный	5'-ACAGCCTGGATAGCAACGTACA-3'
	Зонд	5'-R6G-CCAACCGCGAGAAGATGACCCAGAT-BHQ1-3'

югированные с пероксидазой хрена (1 : 3000; ab6721, Abcam, Великобритания). Связанные с соответствующим белком на обоих фрагментах мембраны вторые антитела идентифицировали с использованием набора Amersham ECL Plus System (Amersham Biosciences, Великобритания). Данные вестерн-блотинга анализировали с помощью программы ImageJ (Версия 1.38a для Windows, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Содержание *ABCA1* нормировали к содержанию β -актина.

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета программ Statistica 6.0. Показатели, полученные в различных группах, сравнивали с помощью непараметрического *U*-теста Манна—Уитни ($P < 0.05$ принимали за значимый уровень достоверности). Для анализа корреляции между количественными характеристиками использовали метод корреляции по Спирману.

Результаты

Наши эксперименты показали, что в макрофагах пациентов с атеросклерозом повышено содержание мРНК *ABCA1* через 5 сут культивирования клеток в присутствии М-CSF (по сравнению с макрофагами лиц контрольной группы, $P = 0.04$) (рис. 2). В контрольной груп-

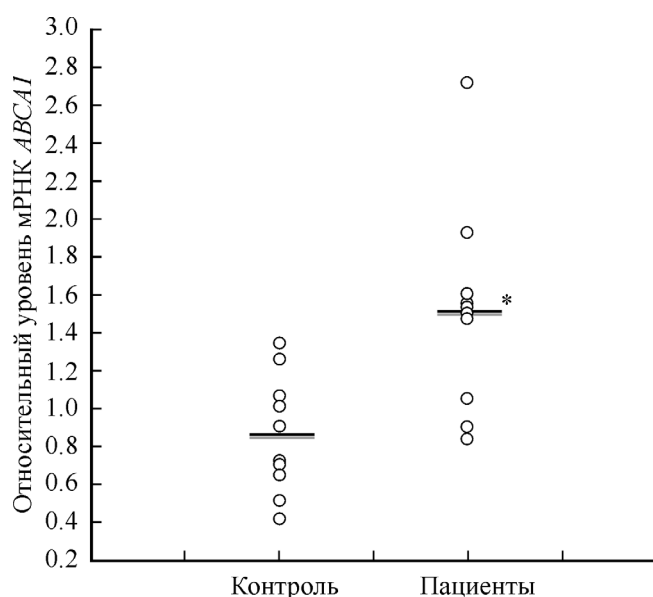


Рис. 2. Относительное содержание мРНК гена *ABCA1* в макрофагах пациентов с артериальным стенозом и лиц контрольной группы.

Результаты нормированы по соответствующим показателям для гена β -актина. Звездочкой показана достоверность отличия от контроля при $P = 0.04$.

пе обнаружили корреляцию уровня мРНК *ABCA1* в макрофагах с уровнем холестерина в составе ЛПВП (коэффициент корреляции $r = 0.65$, $P < 0.05$) (рис. 3). Такой корреляции в группе пациентов не было. Не обнаружено выраженных корреляций между уровнем холестерина в составе ЛПВП и уровнем белка *ABCA1* в макрофагах и у лиц контрольной группы, и у пациентов. Согласно результатам Вестерн-блотинга (рис. 4), в макрофагах пациентов через 5 сут культивирования содержание белка *ABCA1* было ниже, чем в макрофагах лиц контрольной группы ($P = 0.01$) (рис. 5).

Обсуждение

Задачей нашего исследования было изучение экспрессии гена *ABCA1* в макрофагах, активированных фактором М-CSF. М-CSF является одним из цитокинов, стимулирующих превращение моноцитов в макрофаги. Экспрессия М-CSF повышена в атеросклеротических бляшках человека и животных (Clinton et al., 1992). Ранее было показано, что макрофаги, активированные М-CSF, характеризуются проатерогенным фенотипом и что именно этот подкласс макрофагов преимущественно присутствует в атеросклеротических бляшках (Waldo et al., 2008; Irvine et al., 2009). Таким образом, инкубирование моноцитов в течение 5 сут в присутствии М-CSF позволяет получить макрофаги и исследовать экспрессию гена *ABCA1* в условиях, приближенных к условиям *in vivo*.

Миграция моноцитов (макрофагов) в интиму сосудов является ключевым моментом в формировании атеросклеротического повреждения сосудов. Этот процесс стимулируется как атерогенными липопротеинами, так и воспалительными цитокинами (Lundberg, Hansson, 2010). Таким образом, исследование экспрессии гена *ABCA1* именно в макрофагах актуально для изучения развития атеросклероза.

Показано, что нокаут *ABCA1* в макрофагах мышей сопровождается усилением атеросклеротических повреждений сосудов. При этом трансплантация костного мозга от мышей с нокаутом гена *ABCA1* мышам с выключенным геном рецептора к холестерину низкой плотности (стандартной модели атеросклероза) приводит к увеличению степени атеросклеротических повреждений сосудов, не влияя на уровень холестерина ЛПВП в плазме крови (Eck et al., 2002). В то же время мыши, которым был трансплантирован костный мозг от мышей линии с гиперэкспрессией гена *ABCA1*, характеризовались уменьшением степени атеросклеротических повреждений сосудов (Eck et al., 2006). Кроме того, были получены результаты о значительном уменьшении *in vivo* ОТХ в макрофагах *ABCA1*-дефицитных мышей (Wang et al., 2007).

В предыдущей работе мы показали, что в лейкоцитах у пациентов с атеросклерозом снижен уровень мРНК ABCA1 по сравнению с контрольной группой, что указывает на то, что развитие атеросклероза может быть ассоциировано с изменением уровня экспрессии гена ABCA1 в лейкоцитах периферической крови (Демина и др., 2011). В настоящем исследовании мы провели сравнительный анализ уровня мРНК ABCA1 и уровня белка ABCA1 в макрофагах у пациентов с атеросклерозом, подтвержденным ангиографическим исследованием, и у лиц без сердечно-сосудистой патологии. Мы показали повышение содержания мРНК ABCA1 в макрофагах пациентов с атеросклерозом через 5 сут культивирования клеток по сравнению с макрофагами лиц контрольной группы.

В другой работе, напротив, было отмечено снижение экспрессии гена ABCA1 в циркулирующих моноцитах у пациентов, страдающих коронарной болезнью сердца и перенесших инфаркт миокарда в молодом возрасте (до 40 лет) (Sivapalaratnam et al., 2012). Этот результат мог быть обусловлен тем, что все пациенты, принявшие участие в этом исследовании, принимали симвастатин, снижающий экспрессию генов ABCA1 и ABCG1 в моноцитах у человека (Wong et al., 2008; Gengivir et al., 2010). Важно отметить, что в нашем исследовании пациенты не получали статинов и других гиполипидемических препаратов. С другой стороны, полученные нами данные согласуются с результатами, в которых показано повышение уровня экспрессии гена ABCA1 в атероматозных бляшках по сравнению со здоровыми артериями (Albrecht et al., 2004). Сравнение пациентов с аневризмой сонной артерии и пациентов с аневризмой брюшной аорты с лицами контрольной группы без признаков атеросклероза показало, что уровень ABCA1 при атеросклерозе повышен (Soumian et al., 2005), что также согласуется с полученными нами данными.

Следует отметить, что в макрофагах лиц контрольной группы наблюдалась корреляция между уровнем мРНК ABCA1 и уровнем холестерина в составе ЛПВП ($r = 0.65$, $P < 0.05$). Эти результаты могут указывать на то, что высокий уровень холестерина в составе ЛПВП индуцирует в макрофагах экспрессию ABCA1 (Denis et al., 2003).

В нашем исследовании в макрофагах пациентов с атеросклерозом было выявлено увеличение уровня экспрессии ABCA1 и в то же время снижение содержания белка по сравнению с макрофагами контрольной группы. Необходимо отметить, что уровень экспрессии ABCA1 не всегда предсказывает уровень белка (Gygi et al., 1999). Так, показано, что у мышей сердце и почки, имея наивысший уровень мРНК ABCA1, одновременно содержат наименьшее количество белка ABCA1 (Wellington et al., 2002). В литературе есть данные, аналогичные нашим, о том, что в атеросклеротических бляшках человека на фоне увеличения содержания мРНК ABCA1 содержание белка ABCA1 существенно снижается по сравнению с неповрежденными артериями (Albrecht et al., 2004).

Существует доказательство того, что состав и микроокружение атеросклеротической бляшки также могут влиять на деградацию белка ABCA1 (Albrecht et al., 2004). В макрофагах показан быстрый распад белка ABCA1 со временем полужизни менее 1 ч (Ogam et al., 2000; Arakawa, Yokoуama, 2002). При атеросклеротическом поражении сосудов макрофаги имеют тенденцию накапливать большое количество свободного холестерина (Tabas, 1997). Показано, что увеличение внутриклеточного свободного холестерина ускоряет деградацию ABCA1 в мак-

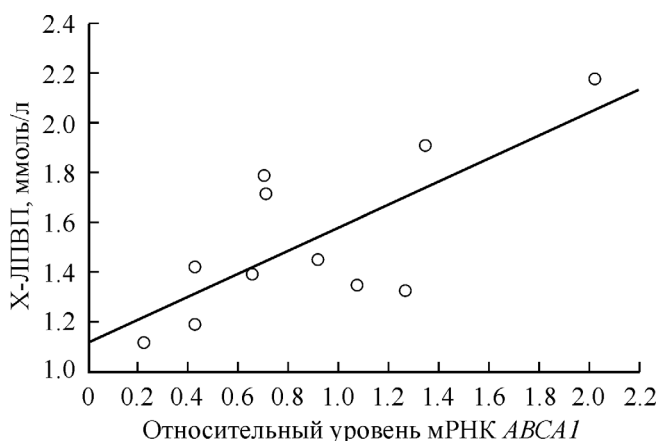


Рис. 3. Корреляция между уровнями мРНК ABCA1 и холестерина (X) в составе ЛПВП макрофагов контрольной группы ($r = 0.45$; $P < 0.05$).

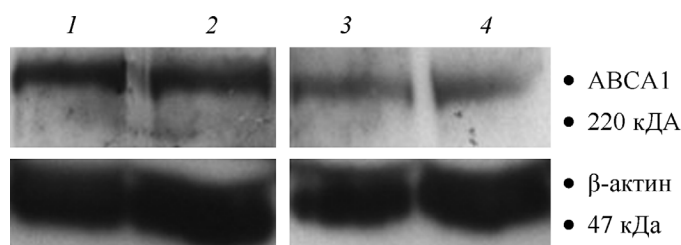


Рис. 4. Результаты вестерн-блоттинга белка ABCA1 в макрофагах, активированных M-CSF.

Показаны результаты для различных представителей контрольной группы (дорожки 1, 2) и группы пациентов (дорожки 3, 4).

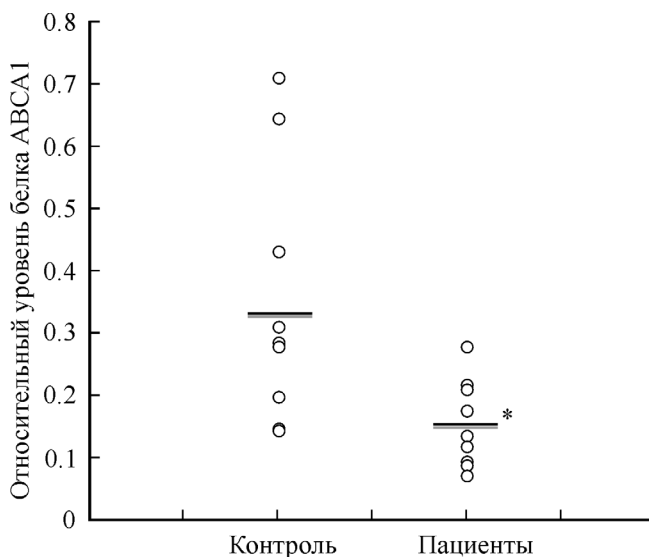


Рис. 5. Уровни белка ABCA1 в макрофагах пациентов и лиц контрольной группы.

Результаты нормированы по соответствующим показателям для β-актина. Звездочкой показана достоверность отличия от контроля при $P = 0.01$.

рофагах (Feng, Tabas, 2002). В то же время связывание ABCA1 с аполипопротеинами AI и AII замедляет деградацию ABCA1 в клетках THP-1, защищая ABCA1 в макрофагах от разрушения тиоловой и калпаиновой протеазами, и увеличивает отток фосфолипидов и холестерина (Arakawa, Yokoyama, 2002; Wang, Chen, 2003). Эти данные позволяют предположить, что регулирование ABCA1 на посттранскрипционном уровне может быть важным фактором, определяющим его функции.

Таким образом, наше исследование показало, что уровень экспрессии гена *ABCA1* в макрофагах и уровень белка ABCA1 могут оказаться значимыми факторами в развитии атеросклероза и могут представлять мишени для антиатерогенной терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-01151).

Список литературы

- Демина Е. П., Мирошникова В. В., Родыгина Т. И., Курьянов П. С., Виноградов А. Г., Денисенко А. Д., Шварцман А. Л. 2011. Экспрессия гена транспортера ABCA1 в лимфоцитах и макрофагах периферической крови больных атеросклерозом. Молекуляр. биол. 45 (2) : 289—293.
- Сердечно-сосудистые заболевания ВОЗ. 2011. Информационный бюллетень № 317.
- Чернявский А. М., Караськов А. М., Мироненко С. П., Ковляков В. А. 2006. Хирургическое лечение мультифокального атеросклероза. Бюлл. СО РАМН. 2 (120) : 126—131.
- Albrecht C., Soumian S., Amey J. S., Sardini A., Higgins C. F., Davies A. H., Gibbs R. G. 2004. ABCA1 expression in carotid atherosclerotic plaques. *Stroke*. 35 : 2801—2806.
- Arakawa R., Yokoyama S. 2002. Helical apolipoproteins stabilize ATP-binding cassette transporter A1 by protecting it from thiol protease-mediated degradation. *J. Biol. Chem.* 277 : 22 426—22 429.
- Choi H. Y., Rahmani M., Wong B. W., Allahverdian S., McManus B. M., Pickering J. G., Chan T., Francis G. A. 2009. ATP binding cassette transporter A1 expression and apolipoprotein A-I binding are impaired in intima-type arterial smooth muscle cells. *Circulation*. 119 : 3223—3231.
- Clinton S. K., Underwood R., Hayes L., Sherman M. L., Kufe D. W., Libby P. 1992. Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis. *Amyk. J. Pathol.* 140 : 301—316.
- Denis M., Bissonnette R., Haidar B., Krimbou L., Bouvier M., Genest J. 2003. Expression, regulation, and activity of ABCA1 in human cell lines. *Mol. Gene. Metab.* 78 : 265—274.
- Eck M., Bos I. S., Kaminski W. E., Orso E., Rothe G., Twisk J., Bottcher A., Van Amersfoort E. S., Christiansen-Weber T. A., Fung-Leung W.-P., Van Berkel T. J., Schmitz G. 2002. Leukocyte ABCA1 controls susceptibility to atherosclerosis and macrophage recruitment into tissues. *PNAS*. 99 : 6298—6303.
- Eck M., Singaraja R. R., Ye D., Hildebrand R. B., James E. R., Hayden M. R., Van Berkel T. J. C. 2006. Macrophage ATP-binding cassette transporter A1 overexpression inhibits atherosclerotic lesion progression in low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26 : 929—934.
- Feig J. E., Shamir R., Fisher E. A. 2008. Atheroprotective effects of HDL: beyond reverse cholesterol transport. *Curr. Drug Targets*. 9 : 196—203.
- Feng B., Tabas I. 2002. ABCA1-mediated cholesterol efflux is defective in free cholesterol-loaded macrophages. Mechanism involves enhanced ABCA1 degradation in a process requiring full NPC1 activity. *J. Biol. Chem.* 277 : 43 271—43 280.
- Francone O. L., Royer L., Boucher G., Haghpassand M., Freeman A., Brees D., Aiello R. J. 2005. Increased cholesterol deposition, expression of scavenger receptors, and response to chemotactic factors in Abca1-deficient macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25 : 1198—1205.
- Genvigir F. D., Rodrigues A. C., Cerda A., Arazi S. S., Willich M. A., Oliveira R., Hirata M. H., Dorea E. L., Bernik M. M., Curi R., Hirata R. D. 2010. Effects of lipid-lowering drugs on reverse cholesterol transport gene expressions in peripheral blood mononuclear and HepG2 cells. *Pharmacogenomics*. 11 : 1235—1246.
- Gygi S. P., Rochon Y., Franza B. R., Aebersold R. 1999. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 19 (3) : 1720—1730.
- Irvine K. M., Andrews M. R., Fernandez-Rojo M. A., Schroeder K., Burns C. J., Su S., Wilks A. F., Parton R. G., Hume D. A., Sweet M. J. 2009. Colony-stimulating factor-1 (CSF-1) delivers a proatherogenic signal to human macrophages. *J. Leukocyt. Biol.* 85 : 278—288.
- Lundberg A. M., Hansson G. K. 2010. Innate immune signals in atherosclerosis. *Clin. Immunol.* 134 : 5—24.
- Oram J. F., Heinecke J. W. 2005. ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease. *Physiol. Rev.* 85 : 1343—1372.
- Oram J. F., Lawn R. M., Garvin M. R., Wade D. P. 2000. ABCA1 is the cAMP-inducible apolipoprotein receptor that mediates cholesterol secretion from macrophages. *J. Biol. Chem.* 275 : 34 508—34 511.
- Rader D. J. 2006. Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies. *J. Clin. Invest.* 116 : 3090—3100.
- Roger V. L., Go A. S., Lloyd-Jones D. M., Benjamin E. J., Berry J. D., Borden W. B. et al. 2012. Executive summary: heart disease and stroke statistics-2012 update: a report from the American Heart Association. American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. 125 : 188—197.
- Seo D., Wang T., Dressman H., Herderick E. E., Iversen E. S., Dong C., Vata K., Milano C. A., Rigat F., Pittman J., Nevins J. R., West M., Goldschmidt-Clermont P. J. 2004. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24 : 1922—1927.
- Sivapalaratnam S., Basart H., Watkins N. A., Maiwald S., Rendon A., Krishnan U., Sondermeijer B. M., Creemers E. E., Pinto-Sietsma S. J., Hovingh K., Ouwehand W. H., Kastelein J. J., Goodall A. H., Trip M. D. 2012. Monocyte gene expression signature of patients with early onset coronary artery disease. *PLoS ONE*. 7 : e32166.
- Soumian S., Gibbs R., Davies A., Albrecht C. J. 2005. mRNA expression of genes involved in lipid efflux and matrix degradation in occlusive and ectatic atherosclerotic disease. *Clin. Pathol.* 58 : 1255—1260.
- Tabas I. 1997. Free cholesterol-induced cytotoxicity. A possible contributing factor to macrophage foam cell necrosis in advanced atherosclerotic lesions. *Trends Cardiovas. Med.* 7 : 256—263.
- Waldo S. W., Li Y., Buono C., Zhao B., Billings E. M., Chang J., Kruth H. S. 2008. Heterogeneity of human macrophages in culture and in atherosclerotic plaques. *Amer. J. Pathol.* 172 : 1112—1126.
- Wang N., Chen W., Linsel-Nitschke P., Martinez L. O., Agerholm-Larsen B., Silver D. L., Tall A. R. 2003. A PEST sequence in ABCA1 regulates degradation by calpain protease and stabilization of ABCA1 by apoA-I. *J. Clin. Invest.* 111 : 99—107.
- Wang X., Collins H. L., Ranalletta M., Fuki I. V., Billheimer J. T., Rothblat G. H., Tall A. R., Rader D. J. 2007. Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport *in vivo*. *J. Clin. Invest.* 117 : 2216—2224.
- Wellington C. L., Walker E. K., Suarez A., Kwok A., Bissada N., Singaraja R., Yang Y. Z., Zhang L. H., James E., Wilson J. E., Francone O., McManus B. M., Hayden M. R. 2002. ABCA1 mRNA and protein distribution patterns predict multiple different roles and levels of regulation. *Lab. Invest.* 82 : 273—283.

Wong J., Quinn C. M., Gelissen I. C., Jessup W., Brown A. J. 2008. The effect of statins on ABCA1 and ABCG1 expression in human macrophages is influenced by cellular cholesterol levels and extent of differentiation. *Atherosclerosis*. 196 : 180—189.

Yvan-Charvet L., Welch C., Pagler T. A., Ranalletta M., Lamkanfi M., Han S., Ishibashi M., Li R., Wang N., Tall A. R. 2008. Inc-

reased inflammatory gene expression in ABC transporter-deficient macrophages: free cholesterol accumulation, increased signaling via toll-like receptors, and neutrophil infiltration of atherosclerotic lesions. *Circulation*. 118 : 1837—1847.

Поступила 30 IV 2013

ABCA1 mRNA AND PROTEIN LEVELS IN M-CSF MACROPHAGES FROM PATIENTS WITH ARTERIAL STENOSIS

E. P. Demina,^{1,*} V. V. Miroshnikova,¹ N. V. Majorov,² V. V. Davydenko,² A. L. Schwarzman^{1,3}

¹ B. P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute, Gatchina, ² St. Petersburg I. P. Pavlov State Medical University and ³ Institute of Experimental Medicine of the North West Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg;

* e-mail: citritt@gmail.com

ABCA1 transporter is one of the key factors defining the level of antiatherogenic HDL in plasma. It is actively involved in the removal of cholesterol from peripheral tissues by reverse cholesterol transport. However, the influence of the level of *ABCA1* mRNA and the level of ABCA1 protein in macrophages in atherosclerosis remains unexplored. Using real time PCR we determined *ABCA1* mRNA level in macrophages cultured for 5 days with macrophage colony-stimulating factor (M-CSF). *ABCA1* mRNA levels in macrophages from patients with arterial stenosis were increased when compared with the control group, $P = 0.04$. According to a Western blot analysis ABCA1 protein level in macrophages from patients was significantly lower than in the control group, $P = 0.01$. Our results suggest that the level of *ABCA1* mRNA and level of ABCA1 protein in macrophages may be important factors in the development of atherosclerosis.

Key words: ABCA1, artery stenosis, atherosclerosis, macrophages, reverse cholesterol transport.