

## ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ТРАНСПОРТЕРА ABCG1 В МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТКАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С АТЕРОСКЛЕРОЗОМ

© В. В. Мирошникова,<sup>1,2,\*</sup> Е. П. Демина,<sup>1</sup> Н. В. Майоров,<sup>2</sup> В. В. Давыденко,<sup>2</sup> П. С. Курьянов,<sup>2</sup>  
В. Н. Вавилов,<sup>2</sup> А. Г. Виноградов,<sup>3</sup> А. Д. Денисенко,<sup>3</sup> А. Л. Шварцман<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Петербургский институт ядерной физики, Гатчина,

<sup>2</sup> Первый С.-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова

и <sup>3</sup> Институт экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург;

\* электронный адрес: [mutantropol@mail.ru](mailto:mutantropol@mail.ru)

Антиатерогенная роль липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) была продемонстрирована во многих экспериментальных, клинических и эпидемиологических исследованиях. Основным механизмом, обуславливающим антиатерогенный потенциал ЛПВП, связан с их участием в обратном транспорте холестерина (ОТХ) из периферических тканей в печень. Трансмембранный транспортер ABCG1 является ключевым белком ОТХ. Его функция заключается в элиминации холестерина из клетки и его переносе на ЛПВП. Однако роль транспортера ABCG1 в развитии атеросклероза у человека остается неизученной. Целью данного исследования явилось изучение экспрессии гена *ABCG1* у пациентов с атеросклерозом. С использованием ПЦР в реальном времени был проведен сравнительный анализ содержания мРНК *ABCG1* в лейкоцитах, моноцитах и макрофагах, активированных колониестимулирующим фактором макрофагов M-CSF, у пациентов с атеросклерозом и в контрольной группе. В моноцитах и макрофагах пациентов и представителей контрольной группы методом иммуноблотинга было измерено содержание белка ABCG1. Уровни мРНК *ABCG1* ( $P < 0.001$ ) и белка ABCG1 ( $P < 0.05$ ) были снижены в макрофагах пациентов с атеросклерозом. Уровень мРНК *ABCG1* в моноцитах пациентов с окклюзионным поражением артерий был ниже, чем у пациентов с меньшей степенью стеноза и в контрольной группе ( $P < 0.05$ ). Корреляции уровня экспрессии гена *ABCG1* с концентрацией общего холестерина и холестерина в составе ЛПВП плазмы крови выявлено не было. Таким образом, можно заключить, что снижение уровня экспрессии гена *ABCG1* в моноцитах и макрофагах может являться значимым фактором в развитии и прогрессировании атеросклеротического процесса.

Ключевые слова: атеросклероз, обратный транспорт холестерина, ABCG1, моноциты, макрофаги.

Принятые сокращения: ABCG1 — АТФ-связывающий кассетный транспортер G1, ЛПВП — липопротеины высокой плотности, ЛПНП — липопротеины низкой плотности, ОТХ — обратный транспорт холестерина, ОХ — общий холестерин,  $X_{\text{лпвп}}$  и  $X_{\text{лпнп}}$  — уровень холестерина в составе ЛПВП и ЛПНП соответственно, ТГ — триглицериды, M-CSF — колониестимулирующий фактор макрофагов.

Развитие атеросклероза характеризуется отложением холестеринсодержащих липопротеинов в стенках артерий, что приводит к образованию атероматозных бляшек и часто ассоциировано со снижением концентрации липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) в плазме крови (Boden, 2000; Hovingh et al., 2005). Антиатерогенная роль ЛПВП убедительно продемонстрирована во многих экспериментальных, клинических и эпидемиологических исследованиях (Stein, Stein, 1999; Escola-Gil et al., 2006). Согласно современным представлениям, антиатерогенные свойства ЛПВП обусловлены прежде всего их участием в обратном транспорте холестерина (ОТХ) из периферических тканей в печень (Lewis, Rader, 2005). Ключевую роль в ОТХ играют АТФ-связывающие кассетные транспортеры семейства ABC.

Трансмембранный транспортер ABCG1 осуществляет перенос холестерина через мембрану клетки на части-

цы ЛПВП, обеспечивая их насыщение холестерином (Tarling, 2013). Предполагается, что на внешней клеточной мембране ABCG1 локализуется преимущественно в районе липидных рафтов (Matsuo, 2010). Транспортер ABCG1 присутствует также и на мембранах эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи, что свидетельствует о том, что он вовлечен во внутриклеточный транспорт холестерина (Gelissen et al., 2006). Было показано, что транспортер ABCG1 препятствует накоплению в клетках токсичных окисленных форм холестерина, в частности 7-кето-холестерола, увеличение содержания которого отличает сформировавшуюся атеросклеротическую бляшку от липидного пятна (Душкин, 2006; Terasaka et al., 2008).

Начальная стадия атерогенеза предполагает активную миграцию моноцитов периферической крови в суб-эндотелиальное пространство артерии и последующее

превращение моноцитов в макрофаги (мононуклеарные фагоциты) (Moore, Tabas, 2011). Накапливая липиды, макрофаги интимы трансформируются в пенистые клетки, которые являются основным клеточным компонентом атеросклеротической бляшки. Опосредованное транспортером ABCG1 удаление избыточного холестерина из макрофагов сосудистой стенки имеет важное значение в обеспечении антиатерогенной функции ЛПВП и способствует защите сердечно-сосудистой системы от развития атеросклероза. Эксперименты с трансгенными животными показали, что нокаут гена ABCG1 приводит к усиленному накоплению липидов в стенке артерий, снижению активности эндотелиальной NO-синтазы и прогрессированию атеросклероза (Kennedy et al., 2005; Terasaka et al., 2008; Westertep et al., 2010; Meurs et al., 2012; Munch et al., 2012). Таким образом, изменение уровня экспрессии гена ABCG1 в моноцитах и макрофагах может оказывать влияние на эффективность ОТХ из сосудистой стенки и как следствие — на развитие атеросклероза.

Несмотря на многочисленные исследования, проведенные с использованием трансгенных животных, роль транспортера ABCG1 в развитии атеросклероза у человека остается практически неизученной. Было продемонстрировано снижение экспрессии гена ABCG1 в мононуклеарных клетках периферической крови у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа, который является фактором высокого риска развития атеросклероза (Mauldin et al., 2008; Zhou et al., 2008).

Целью нашего исследования явилось изучение экспрессии гена ABCG1 в мононуклеарных клетках периферической крови у пациентов с атеросклерозом. Его актуальность связана с поиском новых диагностических маркеров развития атеросклероза, а также потенциальных мишеней для антиатерогенной терапии. Исследования экспрессии генов в лейкоцитах периферической крови при атеросклерозе направлены на выявление биомаркеров развития данного заболевания (Seo et al., 2004; Sinnaeve et al., 2009). Поэтому в рамках настоящей работы мы провели сравнительный анализ уровня мРНК ABCG1 в лейкоцитах у пациентов с атеросклерозом и в контрольной группе. Поскольку эффективность элиминации избыточного холестерина из моноцитов и макрофагов артериальной стенки, в частности в местах формирующихся атеросклеротических повреждений, может играть роль в развитии атеросклероза, мы также провели сравнительный анализ уровня мРНК ABCG1 и содержания белка ABCG1 в моноцитах и макрофагах у пациентов с атеросклерозом и в контрольной группе.

## Материал и методика

Работа включала в себя три последовательных этапа: изучение экспрессии гена ABCG1 в лейкоцитах, моноцитах и макрофагах, полученных при дифференцировке моноцитов *in vitro*. На каждом этапе формировали группы пациентов с атеросклерозом, диагностированным методом ангиографии, и соответствующие контрольные группы (схема на рис. 1). С помощью ангиографии определяли локализацию пораженных атеросклерозом артерий и оценивали степень тяжести атеросклеротических поражений (т. е. размеры бляшек, которые перекрывают просвет артерии и тем самым нарушают кровоток). Все пациенты имели атеросклеротические бляшки различного размера как минимум в одном из трех артериальных бассейнов — церебральном, коронарном и бассейне артерий нижних конечностей. Ни пациенты, ни представители контрольной группы не принимали статинов или других гиполипидемических препаратов. Контрольные группы составляли лица без сердечно-сосудистых заболеваний в анамнезе, не страдающие артериальной гипертензией, сахарным диабетом или нарушениями липидного обмена, соответствующие группам пациентов по возрасту и полу. Настоящая работа одобрена этическим комитетом ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова.

Концентрацию общего холестерина (ОХ), холестерина в составе ЛПВП и триглицеридов (ТГ) в плазме крови измеряли энзиматическим методом с использованием наборов фирмы BioSystems на автоанализаторе А—15 (BioSystems, Испания). Концентрацию холестерина ( $[X]$ ) в составе липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) рассчитывали по формуле Фридвальда  $[X]_{\text{ЛПНП}} = [ОХС] - [X]_{\text{ЛПВП}} - ТГ/2.2$ .

Для первого этапа лейкоциты выделяли методом центрифугирования в градиенте плотности. 4 мл свежесобранной цельной крови (в пробирки, содержащие ЭДТА в концентрации 2 мг/мл; Vacuette, Австрия) смешивали в равном соотношении с фосфатно-солевым буферным раствором (PBS), наслаивали на фиколл-верографин и центрифугировали (1500 об/мин, 30 мин). Затем отбирали клетки на границе раздела плазмы и смеси фиколла. Далее лейкоцитарную фракцию дважды промывали в PBS с помощью центрифугирования (1500 об/мин, 15 мин) и использовали для выделения РНК.

Для второго этапа работы мононуклеарную фракцию получали так же, как описано выше, однако использовали больший объем крови (от 20 до 50 мл). После двух отмывок в PBS мононуклеарные клетки ресуспенди-

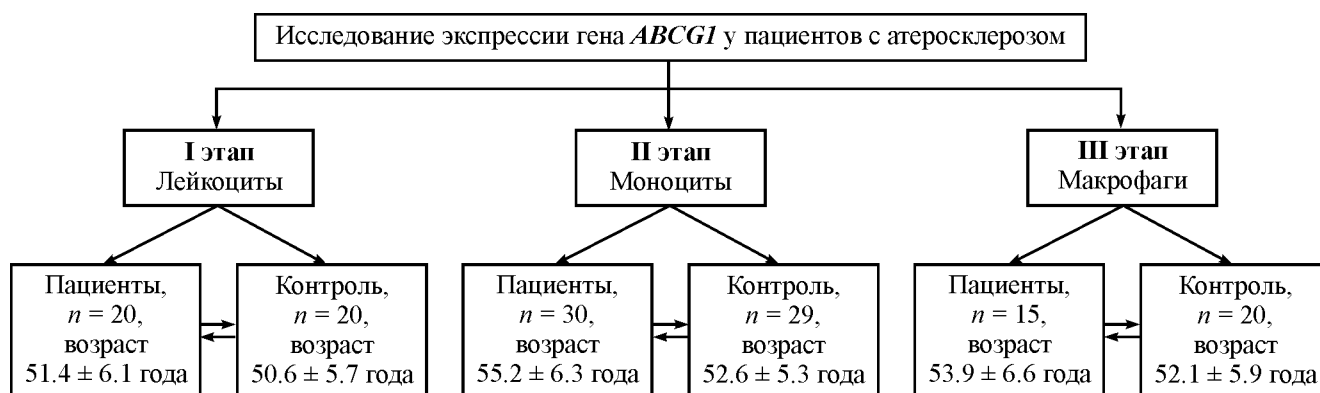


Рис. 1. Схема работы. Этапы и формирование экспериментальных (пациенты) и контрольных групп.

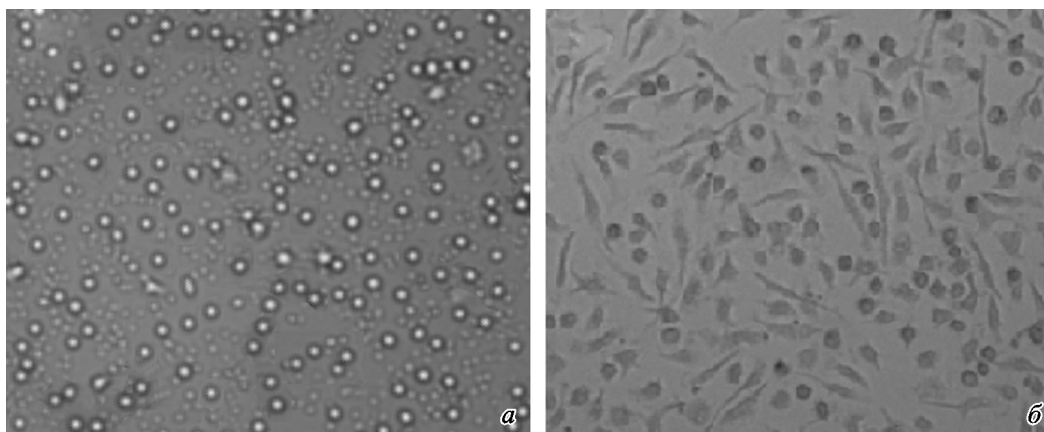


Рис. 2. Микрофотографии полученных моноцитов и макрофагов в культуре.

*а* — моноциты через 24 ч культивирования, *б* — макрофаги через 5 сут культивирования в присутствии фактора макрофагов M-CSF.

ровали в культуральной среде (альфа-МЕМ, 10 % эмбриональной сыворотки, 5 мкг/мл смеси пенициллина G и стрептомицина) и инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 2 ч. Далее 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 1 сут для получения более чистой культуры (рис. 2). На третьем этапе для получения макрофагов моноциты культивировали в тех же условиях с добавлением фактора M-CSF в течение 5 сут с ежедневной заменой питательной среды. Микрофотографии моноцитов и макрофагов показаны на рис. 2. Популяция моноцитов характеризовалась значительным числом клеток сферической и овальной форм. Популяция макрофагов отличалась присутствием множества клеток неправильной формы. Клетки дважды отмывали в PBS и использовали для выделения РНК или хранили осадок клеток при –86 °С для последующего выделения белка.

У всех пациентов и представителей контрольных групп измеряли относительный уровень мРНК *ABCG1*. Для выделения тотальной РНК и проведения реакции обратной транскрипции были использованы наборы RNeasy Mini columns (Qiagen, Нидерланды) и iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, США). Чистоту препарата РНК оценивали по отношению поглощения при длинах волн 260 и 280 нм (критерий чистоты 2). Отсутствие деградации РНК проверяли с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле по соотношению интенсивности полос, соответствующих 28S и 18S рРНК (2 : 1 в случае отсутствия деградации).

Относительный уровень мРНК *ABCG1* определяли методом ПЦР в реальном времени на приборе CFX96 Touch (Bio-Rad, США). В качестве референсного гена использовали ген β-актина (*ACTB*), который является одним из наиболее стабильно экспрессирующихся генов домашнего хозяйства для исследуемых типов клеток (Maesh et al., 2010). Использовали следующие праймеры и зонды (Синтол, Россия): для гена *ABCG1* 5'-CACGTACSTACAGTGGATGT-3' — прямой и 5'-GTCTAAGCCATAGATGGAGA-3' — обратный, зонд 5'-FAM-CTATGTCAGGATGGGTTCTGAAG-BHQ1-3'; для гена *ACTB*: 5'-CGTGCTGCTGACCGAGG-3' — прямой и 5'-ACAGCCTGGATAGCAACGTACA-3' — обратный, зонд 5'-R6GCCAACCGCGAGAAGATGACCCAGAT-BHQ1-3'.

Праймеры располагались в разных экзонах. Зонды были мечены различными красителями для одновременной детекции *ABCG1* и *ACTB* при постановке реакции в одной пробирке. ПЦР проводили в объеме 25 мкл при следующих условиях: после денатурации при 95 °С в течение 3 мин проводили 45 циклов амплификации в следующем температурно-временном режиме: плавление — 95 °С, 10 с; отжиг — 57 °С, 10 с; синтез — 72 °С, 10 с. Измерения для каждой пробы повторяли трижды. Количество мРНК *ABCG1* нормировали по отношению к мРНК *ACTB*. Относительное содержание мРНК *ABCG1* рассчитывали с использованием метода стандартных кривых согласно методическим указаниям фирмы-изготовителя прибора. Стандартную кривую в каждом эксперименте строили как для гена *ABCG1*, так и для гена β-актина.

Уровень белка *ABCG1* в моноцитах (у 9 пациентов и 6 контрольных лиц) и макрофагах (у 7 пациентов и 4 контрольных лиц) определяли методом Вестерн-блоттинга. Клетки лизировали в растворе (50 мМ Tris, pH 8.0, 150 мМ NaCl, 1 % Тритона X-100, 0.5 % дезоксихолата натрия, 0.1 % SDS), включающем в себя коктейль из ингибиторов протеаз (Roche, Швейцария). Количество общего белка определяли по методу Бредфорд. В работе использовали первичные кроличьи поликлональные антитела к *ABCG1* (1 : 500; NB400-132, Novus Biologicals, США) и к β-актину (1 : 10 000; ab8227, Abcam, Великобритания) и вторичные антикроличьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (1 : 3000; ab6721, Abcam, Великобритания). Вторичные антитела, связанные с соответствующим белком на фрагментах мембраны, идентифицировали с использованием набора Amersham ECL™ Plus System (Amersham, Великобритания). Данные Вестерн-блоттинга анализировали с помощью программы ImageJ (Версия 1.38a для Windows, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Содержание *ABCG1* нормировали к содержанию β-актина.

Статистический анализ проводили с использованием пакета программ SPSS 17.0. Для проверки соответствия данных нормальному распределению использовали критерий Шапиро—Уилка. На каждом этапе исследования для сравнения средних значений числовых показателей между группой пациентов и соответствующей контрольной группой использовали непараметрический критерий — U-тест Манна—Уитни. Данные представлены как средние значения и их стандартные отклонения. Для ана-

лиза корреляции между количественными характеристиками использовали метод Спирмана. Результаты считали достоверными при  $P < 0.05$ .

### Результаты

Первый этап исследования не выявил значимых различий между уровнями мРНК ABCG1 в лейкоцитах у больных атеросклерозом и у лиц без сердечно-сосудистой патологии (рис. 3). Не выявили корреляций и между уровнем мРНК ABCG1 в лейкоцитах и уровнем ОХ Х<sub>ЛПНП</sub> и степенью тяжести атеросклеротических повреждений. Белок ABCG1 практически не детектировался в лейкоцитах, что сделало невозможным проведение сравнительного анализа содержания белка ABCG1 в лейкоцитах у пациентов и в контрольной группе.

На втором этапе исследования мы измерили содержание мРНК ABCG1 и белка ABCG1 в моноцитах, активированных фактором М-CSF. Значимых различий между пациентами и контрольной группой не выявили (рис. 3). Относительные уровни белка ABCG1 в моноцитах составили:  $0.15 \pm 0.11$  у пациентов ( $n = 9$ ) и  $0.20 \pm 0.05$  в контрольной группе ( $n = 6$ ) ( $P = 0.145$ ). Однако уровень мРНК ABCG1 негативно коррелировал со степенью тяжести заболевания ( $r = -0.45$ ,  $P = 0.016$ ), в качестве критерия которой был взят показатель максимального артериального стеноза. Максимальный стеноз оценивали как максимальную степень (%) перекрытия артерии атеросклеротической бляшкой. Данная величина зависит от размера атеросклеротической бляшки. Оклюзия артерии, т. е. 100%-ное перекрытие (закупорка) просвета артерии, является наиболее тяжелым случаем атеросклеротического повреждения. Уровень мРНК ABCG1 в моноцитах в подгруппе пациентов с окклюзиями артерий различных отделов сердечно-сосудистой системы ( $n = 12$ ) был ниже, чем у пациентов, не имеющих окклюзий ( $n = 18$ ), и в контрольной группе ( $n = 29$ ) (рис. 4). При этом степень тяжести атеросклеротических повреждений у пациентов, отобранных для настоящего исследования, не коррелиро-

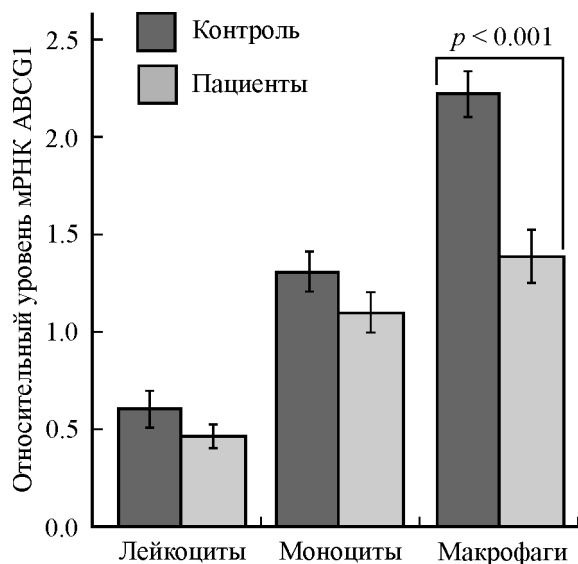


Рис. 3. Относительный уровень мРНК ABCG1 в лейкоцитах, моноцитах и макрофагах пациентов с атеросклерозом (светлые столбцы) и в соответствующих контрольных группах (черные столбцы).

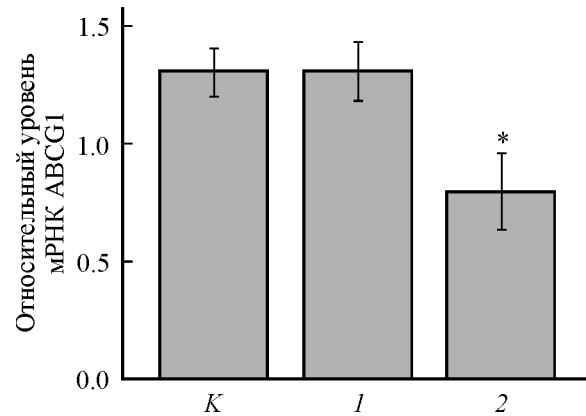


Рис. 4. Относительный уровень мРНК ABCG1 в моноцитах в подгруппах пациентов, не имеющих окклюзий артерий (1), имеющих окклюзии (2) и в контрольной группе (К).

Звездочкой показана достоверность отличий от контроля при  $P < 0.05$ .

вала с длительностью заболевания (коэффициент корреляции  $r$  между длительностью заболевания и показателем максимального артериального стеноза составил  $-0.156$ ,  $P = 0.456$ ; между длительностью заболевания и количеством пораженных артерий —  $0.161$ ,  $P = 0.443$ ).

На третьем этапе исследования мы измеряли содержание мРНК ABCG1 и белка ABCG1 в макрофагах, активи-

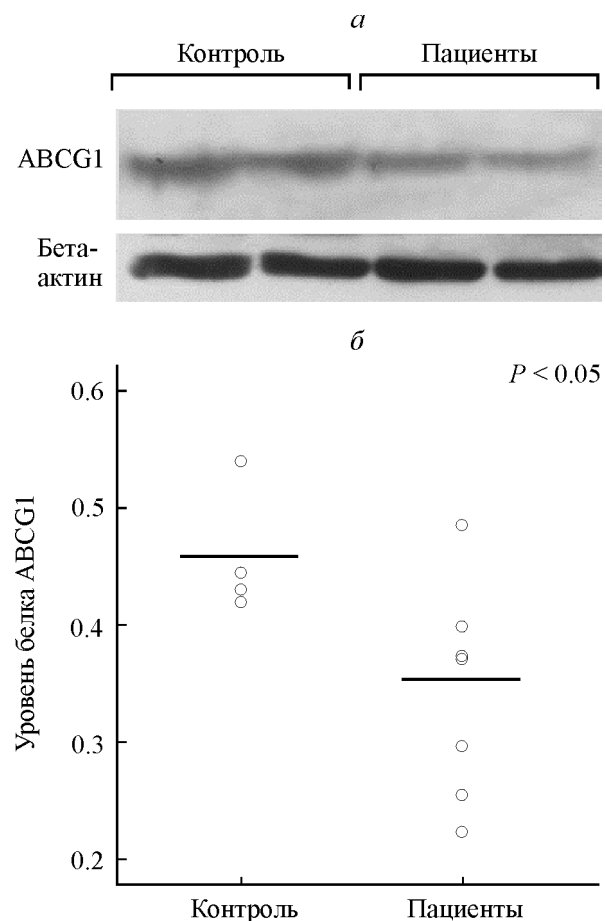


Рис. 5. Изменение уровня белка ABCG1 в макрофагах пациентов с атеросклерозом и лиц из контрольной группы. а — результаты иммуноблотинга; б — данные денситометрии полос иммуноблота, отн. ед.

вированных фактором М-CSF. Уровень мРНК *ABCG1* в макрофагах пациентов с атеросклерозом был ниже, чем в соответствующей контрольной группе (рис. 3). Содержание белка *ABCG1* в макрофагах у пациентов с атеросклерозом также было снижено по сравнению с контрольной группой (рис. 5). Корреляция между уровнем мРНК *ABCG1* в макрофагах и степенью тяжести атеросклеротического поражения сосудов хотя и прослеживалась, но была статистически незначима ( $r = -0.390$ ,  $P = 0.168$ ).

Таким образом, мы не выявили корреляции уровня экспрессии гена *ABCG1* в моноцитах и макрофагах с показателями липидного спектра крови ни в группе пациентов, ни в контрольной группе. Однако показатель  $X_{\text{ЛПВП}}$  у пациентов всех групп был ниже, чем у лиц в соответствующих контрольных группах.

### Обсуждение

Атеросклероз — сложное многофакторное заболевание, развивающееся при тесном взаимодействии генетических и экзогенных факторов. Однако вопрос о генетических факторах риска развития атеросклероза для конкретных популяций остается неизученным. Эпидемиологические исследования показывают, что независимые от полиморфных вариантов белков вариации генной экспрессии тоже вносят вклад в развитие заболевания (Seo et al., 2004; Sinnaeve et al., 2009; Демина и др., 2013). Трансмембранный транспортер *ABCG1*, осуществляющий элиминацию холестерина из периферических тканей, в том числе из сосудистой стенки, и его перенос на частицы ЛПВП, определяет ключевое звено в обеспечении антиатерогенного потенциала ЛПВП (Tarling, 2013). Нужно отметить, что роль транспортера *ABCG1* в развитии атеросклероза у человека до настоящего времени была изучена недостаточно. В настоящей работе мы впервые провели сравнительный анализ экспрессии гена *ABCG1* в лейкоцитах, моноцитах и макрофагах пациентов с атеросклерозом и лиц без сердечно-сосудистой патологии.

Ранее было продемонстрировано снижение экспрессии гена *ABCG1* в циркулирующих моноцитах, выделенных из крови пациентов с атеросклерозом коронарных артерий, которые получали препарат симвастатин (Sivapalaratnam et al., 2012). В то же время известно, что симвастатин может снижать экспрессию гена *ABCG1* в моноцитах и макрофагах (Wong et al., 2008; Genvigir et al., 2010). Логично предположить, что наблюдаемое в исследовании (Sivapalaratnam et al., 2012) снижение уровня экспрессии гена *ABCG1* в моноцитах периферической крови (Sivapalaratnam et al., 2012) может быть связано с применением симвастатина. С целью более адекватной оценки ассоциации экспрессии гена *ABCG1* с атеросклерозом для настоящего исследования были отобраны пациенты, которые не принимали статинов или других гиполипидемических препаратов. Кроме того, мы активировали моноциты и макрофаги фактором М-CSF. Макрофаги, полученные при дифференцировке моноцитов в присутствии фактора М-CSF, характеризуются проатерогенным фенотипом, и именно этот подкласс макрофагов преимущественно присутствует в атеросклеротических бляшках (Waldo et al., 2008).

Мы не выявили различий между группой пациентов с атеросклерозом и контрольной группой по уровню экспрессии гена *ABCG1* в моноцитах. Однако уровни мРНК *ABCG1* и белка *ABCG1* в макрофагах у пациентов с ате-

росклерозом были снижены. В то же время уровень мРНК гена *ABCG1* не коррелировал с  $X_{\text{ЛПВП}}$  ни в группе пациентов, ни в контрольной группе. Нужно учитывать, что основная масса ЛПВП синтезируется в печени и кишечнике. Поэтому наши результаты согласуются с данными, полученными ранее и указывающими на то, что опосредованный транспортером *ABCG1* отток холестерина из макрофагов не вносит существенного вклада в значения  $X_{\text{ЛПВП}}$  в плазме крови (Nakanishi et al., 2009). Известно, что атеросклероз нередко развивается у лиц с нормальным уровнем  $X_{\text{ЛПВП}}$  (Barter et al., 2007). Следовательно, концентрация  $X_{\text{ЛПВП}}$  в плазме крови не всегда адекватно отражает антиатерогенную функцию ЛПВП, которая лучше характеризуется скоростью оттока холестерина из макрофагов сосудистой стенки (Navab et al., 2009). У пациентов с сахарным диабетом 2-го типа сниженные уровни мРНК *ABCG1* и белка *ABCG1* коррелировали со снижением оттока холестерина из макрофагов (Mauldin et al., 2008). Таким образом, низкий уровень экспрессии гена *ABCG1* в макрофагах может приводить к подавлению оттока холестерина из макрофагов и пенных клеток и как следствие к снижению эффективности ОТХ (Kennedy et al., 2005; Mauldin et al., 2008; Zhou et al., 2008). Идентифицированы локализованные в промоторной области полиморфные варианты гена *ABCG1*, влияющие на риск развития сердечно-сосудистой патологии (Xu et al., 2011; Schou et al., 2012). Таким образом, вариации экспрессии гена *ABCG1* могут вносить вклад в риск развития атеросклероза независимо от уровня липидов в плазме крови.

В настоящей работе мы наблюдали значимое снижение уровня мРНК *ABCG1* в моноцитах в подгруппе пациентов с окклюзиями артерий по сравнению с пациентами, не имеющими окклюзий, независимо от длительности заболевания. Это свидетельствует о связи между уровнем экспрессии гена *ABCG1* в моноцитах и размером атеросклеротических бляшек. Следует заметить, что размер бляшки зависит от темпа накопления липидов в стенке артерии, но далеко не всегда от длительности заболевания (Липовецкий, 2012). Таким образом, сниженный уровень экспрессии гена *ABCG1* коррелирует с усиленными темпами атерогенеза, что было продемонстрировано в экспериментах с трансгенными животными (Kennedy et al., 2005; Westerterp et al., 2010; Meurs et al., 2012). Необходимо также отметить, что по мере прогрессирования атеросклеротического процесса в атеросклеротических бляшках существенно увеличивается содержание окисленных стеролов, особенно 7-кето-холестерола, которые не являются естественными лигандами транскрипционных факторов, способных индуцировать экспрессию гена *ABCG1* (Sabot et al., 2005; Душкин, 2006). Это также может способствовать снижению экспрессии гена *ABCG1* в макрофагах при развитии атеросклероза, наблюдаемому в нашем исследовании. Поэтому отмеченное ранее увеличение содержания мРНК *ABCG1* в биоптатах атеросклеротических бляшек (Щелкунова и др., 2013) может быть связано с повышенным содержанием в них макрофагов и пенных клеток и с миграцией моноцитов к местам повреждений.

Настоящая работа продемонстрировала, что уровень экспрессии гена *ABCG1* в макрофагах, активированных фактором М-CSF, снижен у пациентов с атеросклерозом. Кроме того, мы наблюдали сниженный уровень мРНК *ABCG1* в моноцитах пациентов с окклюзиями артерий по сравнению с пациентами, имеющими менее развитые

атеросклеротические повреждения. Поэтому можно заключить, что снижение уровня экспрессии гена ABCG1 в моноцитах и макрофагах может являться значимым фактором в развитии и прогрессировании атеросклеротического процесса.

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

### Список литературы

- Демина Е. П., Мирошникова В. В., Майоров Н. В., Давыденко В. В., Шварцман А. Л. 2013. мРНК гена ABCA1 и уровень белка ABCA1 в макрофагах, активированных М-CSF, у пациентов с артериальным стенозом. Цитология. 55 (8) : 580—585. (Demina E. P., Miroshnikova V. V., Majorov N. V., Davydenko V. V., Schwarzman A. L. 2013. ABCA1 mRNA and protein levels in M-CSF-activated macrophages from patients with arterial stenosis. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 7 (6) : 522—527.)
- Душкин М. И. 2006. Макрофаги и атеросклероз: патофизиологические и терапевтические аспекты. Бюл. СО РАМН. 2 (120) : 47—55. (Dushkin M. I. 2006. Macrophages and atherosclerosis: pathophysiological and therapeutic aspects. Bull. SO RAMN. 2 (120) : 47—55.)
- Липовецкий Б. М. 2012. Дислипидемия, атеросклероз и их связь с ишемической болезнью сердца и мозга. М.: Эко-Вектор. 65 с. (Lipovetskiy B. M. 2012. Dyslipidemia, atherosclerosis and their relation with ischemic heart and brain disease. M.: Eco-Vector. 65 p.)
- Щелкунова Т. А., Морозов И. А., Рубцов П. М., Самоходская Л. М., Андрианова И. В., Собенин И. А., Орехов А. Н., Смирнов А. Н. 2013. Изменения в уровне экспрессии генов в интиме аорты в ходе атерогенеза. Биохимия. 5 : 610—619. (Shchelkunova T. A., Morozov I. A., Rubtsov P. M., Samokhodskaya L. M., Andrianova I. V., Sobenin I. A., Orekhov A. N., Smirnov A. N. 2013. Changes in levels of gene expression in human aortal intima during atherogenesis. Biochemistry (Moscow). 78 (5) : 463—470.)
- Barter P., Gotto A. M., La Rosa J. C., Maroni J., Szarek M., Grundy S. M., Kastelein J. J., Bittner V., Fruchart J. C. 2007. HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular events. N. Engl. J. Med. 357 : 1301—1310.
- Boden W. E. 2000. High-density lipoprotein cholesterol as an independent risk factor in cardiovascular disease: assessing the data from Framingham to the veterans affairs high-density lipoprotein intervention trial. Amer. J. Cardiol. 86 : 19—22.
- Escola-Gil J. C., Cample-Berdiel L., Palomer X., Ribas V., Ordonez-Llanos J., Blanco-Vaca F. 2006. Antiatherogenic role of high-density lipoproteins: insights from genetically engineered-mice. Front. Biosci. 11 : 1328—1348.
- Gelissen I. C., Harris M., Rye K. A., Quinn C., Brown A. J., Kockx M., Cartland S., Packianathan M., Kritharides L., Jessup W. 2006. ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to ApoA-I. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 26 : 534—540.
- 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 (9) : 1235—1246.
- Hovingh G. K., de Groot E., van der Steeg W., Boekholdt S. M., Hutten B. A., Kuivenhoven J. A., Kastelein J. J. 2005. Inherited disorders of HDL metabolism and atherosclerosis. Curr. Opin. Lipidol. 16 (2) : 139—145.
- Kennedy M. A., Barrera G. C., Nakamura K., Baldan A., Tarr P. T., Fishbein M. C., Frank J. S., Francone O., Edwards P. A. 2005. ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. Cell. Metab. 1 : 121—131.
- Lewis G. F., Rader D. J. 2005. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. Circ. Res. 96 : 1221—1232.
- Maesh M., Sendelbach S., Lorkowski S. 2010. Selection of reliable reference genes during THP-1 monocyte differentiation into macrophages. BMC Mol. Biol. 11 : 90.
- Matsuo M. 2010. ATP-binding cassette proteins involved in glucose and lipid homeostasis. Biosci. Biotechnol. Biochem. 74 (5) : 899—907.
- Mauldin J. P., Nagelin M. H., Wojcik A. J., Srinivasan S., Skafien M. D., Ayers C. R., McNamara C. A., Hedrick C. C. 2008. Reduced expression of ABCG1 increases cholesterol accumulation in macrophages of patients with type 2 diabetes. Circulation. 117 : 2785—2792.
- Meurs I., Lammers B., Zhao Y., Out R., Hildebrand R. B., Hoekstra M., Van Berkel T. J. C., Van Eck M. 2012. The effect of ABCG1 deficiency on atherosclerotic lesion development in LDL receptor knockout mice depends on the stage of atherogenesis. Atherosclerosis. 221 (1) : 41—47.
- Moore K. J., Tabas I. 2011. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. Cell. 145 : 341—355.
- Münch G., Bültmann A., Li Z., Holthoff H. P., Ullrich J., Wagner S., Ungerer M. 2012. Overexpression of ABCG1 protein attenuates arteriosclerosis and endothelial dysfunction in atherosclerotic rabbits. Heart Int. 7 : e12.
- Navab M., Anantharamaiah G. M., Reddy S. T., Van Lenten B. J., Fogelman A. M. 2009. HDL as a biomarker, potential therapeutic target, and therapy. Diabetes. 58 : 2711—2717.
- Nakanishi S., Vikstedt R., Soderlund S., Lee-Rueckert M., Hukka A., Ehnholm C., Muilu M., Metso J., Naukkarinen J., Palotie L., Kovanen P. T., Jauhainen M., Taskinen M. R. 2009. Serum, but not monocyte macrophage foam cells derived from low HDL-C subjects, displays reduced cholesterol efflux capacity. J. Lipid. Res. 50 : 183—192.
- Sabol S. L., Brewer H. B., Santamarina-Fojo S. 2005. The human ABCG1 gene: identification of LXR response elements that modulate expression in macrophages and liver. J. Lipid. Res. 46 : 2151—2167.
- Schou J., Frikke-Schmidt R., Kardassis D., Thymiakou E., Nordestgaard B. G., Grande P., Tybjarg-Hansen A. 2012. Genetic variation in ABCG1 and risk of myocardial infarction and ischemic heart disease. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 32 : 506—515.
- 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. Gene expression phenotypes of atherosclerosis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 24 : 1922—1927.
- Sinnaeve P. R., Donahue M. P., Grass P., Seo D., Vonderscher J. V., Chibout S. D., Kraus W. E., Sketch M., Nelson C., Ginsburg G. S., Goldschmidt-Clermont P. J., Granger C. B. 2009. Gene expression patterns in peripheral blood correlate with the extent of coronary artery disease. PLoS ONE. 4 (9) : e7037.
- Sivapalaratnam S., Basart H., Watkins N. A., Maiwald S., Rendón A., Krishnan U., Sondermeijer B. M., Creemers E. E., Pinto-Sietsma S. J., Hovingh K., Ouweland 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.
- Stein O., Stein Y. 1999. Atheroprotective mechanisms of HDL. Atherosclerosis. 144 : 285—301.
- Tarling E. J. 2013. Expanding roles of ABCG1 and sterol transport. Curr. Opin. Lipidol. 24 : 138—146.
- Terasaka N., Yu S., Yvan-Charvet L., Wang N., Mzhavia N., Langlois R., Pagler T., Welch C. L., Goldberg I. J., Tall A. R. 2008. ABCG1 and HDL protect against endothelial dysfunction in mice fed a high-cholesterol diet. J. Clin. Invest. 118 : 3701—3713.
- 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.
- Westerterp M., Koetsveld J., Yu S., Han S., Li R., Goldberg I. J., Welch C. L., Tall A. R. 2010. Increased atherosclerosis in

mice with vascular ABCG1 deficiency. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30 : 2103—2105.

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.

Xu Y., Wang W., Zhang L., Qi L. P., Li L. Y., Chen L. F., Fang Q., Dang A. M., Yan X. W. 2011. A polymorphism in the

ABCG1 promoter is functionally associated with coronary artery disease in a Chinese Han population. *Atherosclerosis*. 219 : 648—654.

Zhou H., Tan K. C., Shiu S. W., Wong Y. 2008. Determinants of leukocyte adenosine triphosphate binding cassette transporter G1 gene expression in type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*. 57 : 1135—1140.

Поступила 19 XI 2013

#### ABCG1 TRANSPORTER GENE EXPRESSION IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS OF PATIENTS WITH ATHEROSCLEROSIS

V. V. Miroshnikova,<sup>1,2,\*</sup> E. P. Demina,<sup>1</sup> N. V. Mayorov,<sup>2</sup> V. V. Davydenko,<sup>2</sup> P. S. Kurjanov,<sup>2</sup> V. N. Vavilov,<sup>2</sup> A. G. Vinogradov,<sup>3</sup> A. D. Denisenko,<sup>3</sup> A. L. Schwarzman<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Petersburg Nuclear Physics Institute, Gatchina; <sup>2</sup> St. Petersburg I. P. Pavlov State Medical University and <sup>3</sup> Institute of Experimental Medicine RAMS, St. Petersburg;  
e-mail: mutantropol@mail.ru

Accumulation of cholesterol in arterial wall macrophages is a main hallmark of atherosclerosis. The ABCG1 transporter mediates cholesterol efflux to high density lipoproteins (HDL) and plays an important role in macrophage foam cell formation. The goal of our study was to investigate the potential role of ABCG1 in atherosclerosis development in humans. ABCG1 gene expression has been examined in leukocytes, monocytes and monocyte-derived macrophages of patients with atherosclerosis and in the control group. Real time PCR and Western blotting were used to determine ABCG1 mRNA and ABCG1 protein levels. Monocyte *ABCG1* mRNA level was inversely correlated with the rate of artery occlusion ( $r = -0.45$ ,  $P = 0.016$ ). Patients with 100 % artery occlusions had decreased monocyte *ABCG1* mRNA levels compared to patients who had smaller plaques and controls ( $P < 0.05$ ). *ABCG1* mRNA ( $P < 0.001$ ) and ABCG1 protein ( $P < 0.05$ ) levels in macrophages of patients with coronary artery stenosis were significantly reduced compared to the control group. No significant correlation between the *ABCG1* gene expression in mononuclear cells and HDL cholesterol concentration has been found. Our study suggests that decrease in the *ABCG1* gene expression in macrophages is associated with atherosclerosis.

Key words: ABCG1, atherosclerosis, monocytes, macrophages.