

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

### СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ СОСУДОВ У БОЛЬНЫХ С КЛИНИЧЕСКИ ВЫРАЖЕННЫМ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ

М.С. Назаренко<sup>1,2\*</sup>, А.В. Марков<sup>1</sup>, А.А. Слепцов<sup>1</sup>, Ю.А. Королёва<sup>1</sup>, Д.В. Шарыш<sup>2</sup>,  
А.А. Зарубин<sup>1</sup>, Н.Р. Валиахметов<sup>2</sup>, И.А. Гончарова<sup>1</sup>, Э.Ф. Муслимова<sup>3</sup>,  
М.С. Кузнецов<sup>3</sup>, Б.Н. Козлов<sup>3</sup>, С.А. Афанасьев<sup>3</sup>, В.П. Пузырев<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт медицинской генетики,  
Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук,  
634050, Томск, Набережная реки Ушайки, 10; \*эл. почта: maria.nazarenko@medgenetics.ru

<sup>2</sup>Сибирский государственный медицинский университет, Томск

<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт кардиологии,  
Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск

С использованием микрочипов HumanHT-12 BeadChip (“Illumina”, США) проведён сравнительный полногеномный анализ экспрессии генов в клетках сонных артерий, пораженных атеросклерозом, и клетках интактных внутренних грудных артерий у пациентов с клинически выраженным атеросклерозом на поздних стадиях патологического процесса. Существенное снижение уровня экспрессии в клетках сонных артерий, поражённых атеросклерозом, по сравнению с интактными внутренними грудными артериями, выявлено для генов *APOD*, *FABP4*, *CIDEA* и *FOSB*, а увеличение экспрессии – для гена *SPP1* ( $|FC| > 64$ ;  $p_{FDR} < 0,05$ ). В клетках атеросклеротически поражённых артерий по сравнению с интактными сосудами выявлено преобладание доли генов со сниженной функциональной активностью. В частности, выявлено снижение экспрессии генов иммунорегуляторного ответа (метаболизм арахидоновой кислоты, взаимодействие “цитокин-цитокинный рецептор”, сигнальные пути NOD-подобных рецепторов, Jak-STAT и TNF). Наиболее значимыми биологическими процессами, в которых участвуют белковые продукты генов со снижением экспрессии в атеросклеротически поражённых сонных артериях по сравнению с интактными внутренними грудными артериями, являются ответы клетки на действие ионов металлов (металлотионеины), а для белковых продуктов генов с увеличением экспрессии в атеросклеротически изменённых артериях – организация внеклеточного матрикса.

**Ключевые слова:** экспрессия генов; атеросклероз сонных артерий; сосуды; микрочипы

**DOI:** 10.18097/PBMC20186405416

## ВВЕДЕНИЕ

Атеросклеротическое поражение артерий является патоморфологическим субстратом и причиной развития таких тяжёлых и угрожающих жизни сердечно-сосудистых заболеваний, как ишемическая болезнь сердца (инфаркт миокарда) и хроническое нарушение мозгового кровообращения (ишемический инсульт). Учитывая высокую медико-социальную значимость атеросклеротического поражения артерий, изучение молекулярных механизмов развития и прогрессии данной патологии остаётся в фокусе внимания научного сообщества. Полученные результаты, с практической точки зрения, являются особо ценными для поиска новых молекулярных мишеней атеросклероза и его лечения.

В последнее десятилетие, благодаря развитию новых высокоразрешающих технологий, стало возможным выполнение широкомасштабного молекулярного профилирования клеток и тканей с помощью микрочипов и массового параллельного секвенирования. Такие работы активно проводятся в отношении оценки экспрессии генов при атеросклерозе у человека *in vivo* [1-3]. Однако результаты таких работ трудно сопоставимы, поскольку исследования различаются по дизайну,

локализации исследуемых артерий, анализируемой стадии патологического процесса, используемым технологиям, биоинформатическим инструментам анализа данных, включающим критерии отбора дифференциально экспрессирующихся генов и их функциональной аннотации.

Исходя из этого, целью настоящей работы была идентификация дифференциально экспрессирующихся генов между гистологически охарактеризованными поражёнными атеросклерозом сонными, а также интактными внутренними грудными артериями и оценкой связи их белковых продуктов с биологическими процессами, сигнальными и метаболическими путями.

## МЕТОДИКА

Образцы сонных артерий, поражённых атеросклерозом (САБ), были взяты у трёх мужчин, имевших выраженный атеросклероз этих сосудов и прошедших по показаниям каротидную эндатерэктомию. Образцы интактных внутренних грудных артерий (ВГА) взяты у двух других мужчин во время операции аортокоронарного шунтирования. Возраст пациентов составил 55-61 год. Из лекарственных препаратов они получали статины,

антигипертензивные средства и дезагреганты. Пара “сонная артерия – внутренние грудные артерии” является адекватной моделью изучения механизмов развития атеросклероза, поскольку среди сосудов головного мозга чаще и тяжелее атеросклерозом поражаются экстракраниальные (сонные) артерии, являясь причиной развития острых сосудистых событий, а внутренние грудные артерии очень редко подвергаются атеросклеротическому изменению, в связи с чем они используются в качестве шунтов при коронарном шунтировании. Кроме того, важным аргументом использования данных артерий является их доступность для исследования. Все пациенты дали информированное согласие на участие в исследовании. Собранный биологический материал был заморожен в жидком азоте и хранился при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$  вплоть до исследования.

Перед проведением экспрессионного анализа сонные артерии были окрашены гематоксилин-эозином и иммуногистохимически с антителами к альфа-актину гладкомышечных клеток (клон 1A4, RTU, “Dako”, США) и с антителами к рецептору CD68 (клон KP1, RTU, “Dako”). Атеросклеротическое поражение артерий представляло собой позднюю стадию патологического процесса – тип VI (согласно гистологической классификации [4]).

Сравнительный полногеномный анализ уровня экспрессии генов между САБ и ВГА проведен с помощью микрочипов HumanHT-12 BeadChip (“Illumina”, США). Образцы сосудов гомогенизировали с помощью TissueLyser (“Qiagen”, Германия) в Trizol (“Thermo Fisher Scientific”, США). Качество образцов оценивали с помощью системы капиллярного электрофореза Agilent 2100 Bioanalyzer (“Agilent Technologies”, США) и спектрофотометрического измерения.

Далее выполняли синтез и очистку кДНК, получение биотинилированной кРНК, её очистку и гибридизацию. Все этапы были выполнены согласно стандартному протоколу производителя (“Illumina”). После гибридизации выполнено сканирование изображения с использованием Illumina BeadArray Reader System (“Illumina”). Первичные данные обработаны в пакете программ GenomeStudio Gene Expression Module (“Illumina”).

Биоинформатический анализ данных по уровню экспрессии генов осуществлен с помощью пакетов lumi, limma в программной среде R (“Bioconductor”). После оценки контроля качества и обработки первичных данных в дальнейший анализ были включены 47320 проб, которые принадлежали 31421 транскрипту. Дифференциально экспрессируемыми считались гены с кратностью различий уровня экспрессии между группами образцов  $|FC| \geq 2$  и  $p_{FDR} < 0,05$ . При полученной на микрочипах кратности различий уровня экспрессии ( $FC > 2$  между атеросклеротическими бляшками и интактными внутренними грудными артериями специфичность результатов микрочипового исследования составляет 95,3% [5]. Функциональная аннотация дифференциально экспрессируемых генов, принадлежность их белковых продуктов к сигнальным

и метаболическим путям была выполнена с помощью программы Web-based GENE SeT AnaLYsis Toolkit [6].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

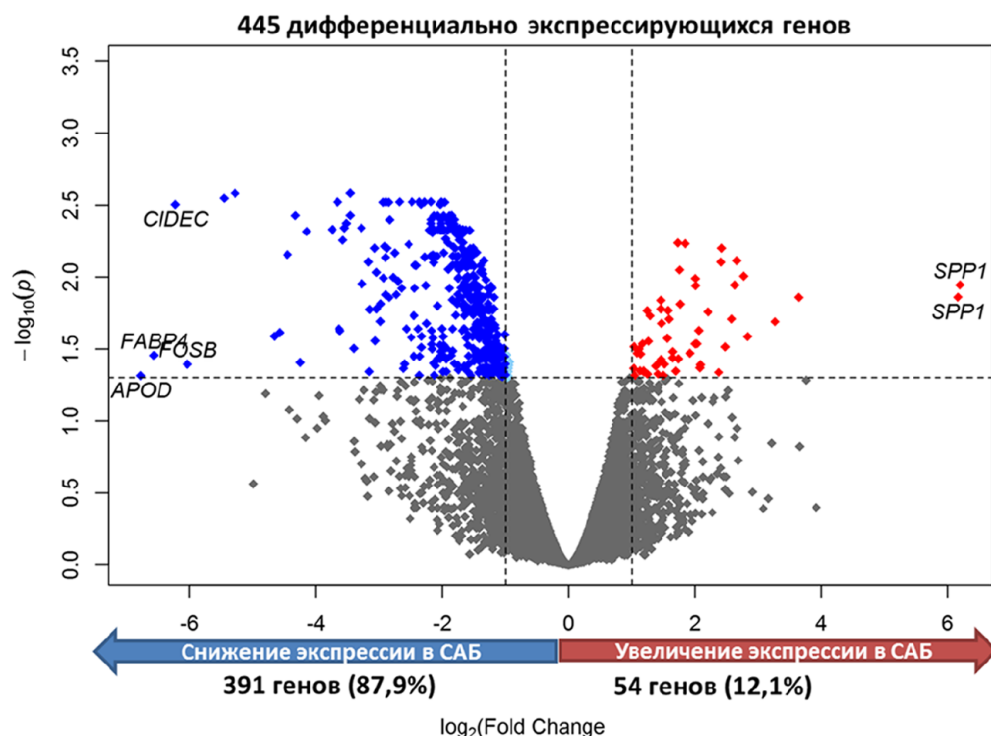
Между клетками САБ и ВГА выявлено 469 дифференциально экспрессируемых транскриптов, принадлежащих 445 генам ( $|FC| \geq 2$ ;  $p_{FDR} < 0,05$ ; рисунок; Приложение). Экспрессия 391 (87,9%) гена была ниже в клетках САБ по сравнению с ВГА, а 54 (12,1%) гена имели более высокий уровень экспрессии в атеросклеротически поражённых артериях. Диспропорция количества гипо- и гиперэкспрессирующихся генов между сравниваемыми сосудами может быть обусловлена гибелью клеток, а также снижением функциональной активности генов в клетках из области атеросклеротических бляшек на поздних стадиях патологического процесса.

Наиболее выраженное снижение уровня экспрессии в клетках САБ по сравнению с ВГА выявлено для генов *APOD*, *FABP4*, *CIDEA* и *FOSB*, а увеличение экспрессии – для гена *SPP1* ( $|FC| > 64$ ;  $p_{FDR} < 0,05$ ; рисунок). Согласно данным литературы, изменение экспрессии генов *APOD*, *FABP4*, *CIDEA* и *SPP1* достаточно часто выявляется в клетках сосудов при атеросклерозе у человека [2].

В настоящем исследовании впервые выявлено снижение экспрессии гена *FOSB* в клетках САБ по сравнению с ВГА у человека. Данный ген кодирует FosB – прото-онкоген, который принадлежит семейству транскрипционных факторов белков-активаторов 1 (AP-1). Гены данного семейства экспрессируются в ответ на различные стимулы. Увеличение экспрессии гена *FOSB*, а также других генов семейства AP-1 – *JUN* и *JUNB* выявлено в макрофагах атеросклеротических бляшек сонных артерий по сравнению с моноцитами крови у больных атеросклерозом, а также в моноцитах больных атеросклерозом по сравнению с индивидами без данной патологии [7]. Показано, что у модельных животных в макрофагах FosB, JUN и JunB участвуют в формировании пенных клеток [8]. Кроме того, данные белки регулируют продукцию цитокинов, а также контролируют продукцию внеклеточного матрикса [9].

Наиболее значимыми биологическими процессами (по классификации Gene Ontology), в которых участвуют белковые продукты генов с усилением экспрессии в САБ по сравнению с ВГА, являются процессы организации внеклеточного матрикса (GO:0030198; *CD44*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL5A2*, *FMOD*, *HAPLN1*, *ITGA11*, *ITGAV*, *SPARC*, *SPP1*, *SULF1*, *TIMP1*;  $p_{FDR} = 1,44 \times 10^{-7}$ ), а для белковых продуктов генов со снижением экспрессии в атеросклеротически измененных артериях – ответ клетки на действие ионов металлов (GO:0071248; *CREB1*, *FABP4*, *FOSB*, *GSN*, *JUN*, *JUNB*, *JUND*, *MT1A*, *MT1E*, *MT1M*, *MT1X*, *MT2A*;  $p_{FDR} = 0,0003$ ; табл. 1).

Кроме того, белковые продукты 54 генов с усилением экспрессии в САБ по сравнению с ВГА участвуют в ответе клетки на действие стимулов



**Рисунок.** Диаграмма рассеяния разности уровня экспрессии 31421 транскриптов между клетками атеросклеротически измененных сонных артерий (САБ) и интактных внутренних грудных артерий (ВГА). Примечание: точки представляют дифференциально экспрессирующиеся транскрипты; горизонтальная пунктирная линия определяет пороговое значение уровня значимости ( $p < 0,05$ ), а две вертикальных пунктирных линии – кратность различий уровня экспрессии генов ( $|FC| \geq 2$ ); для генов, наиболее сильно различающихся по уровню экспрессии ( $|FC| > 64$ ), приведены названия; для гена *SPP1* указаны транскрипты NM\_001040058.1 и NM\_000582.2.

(GO:0050896; 35 генов;  $p_{FDR} = 0,0004$ ), передвижении и адгезии клетки (GO:0040011; 14 генов;  $p_{FDR} = 0,0007$ ; GO:0022610; 11 генов;  $p_{FDR} = 0,0022$ ), процессе развития (GO:0032502; 26 генов;  $p_{FDR} = 0,0022$ ; табл. 1). При функциональной аннотации белковых продуктов 391 гена со сниженной экспрессией выявлено преобладание таких категорий, как программируемая клеточная гибель (GO:0012501; 46 генов;  $p_{FDR} = 0,002$ ), ответ клетки на действие липидов (GO:0033993; 26 генов;  $p_{FDR} = 0,00723$ ), ответ клетки на действие внешних стимулов (GO:0009605; 38 генов;  $p_{FDR} = 0,0078$ ), развитие сосудов (GO:0001944; 20 генов;  $p_{FDR} = 0,0078$ ), регуляция воспалительного ответа (GO:0050727; 11 генов;  $p_{FDR} = 0,0095$ ), ответ клетки на действие химических стимулов (GO:0042221; 63 гена;  $p_{FDR} = 0,0164$ ; табл. 1).

Если рассматривать локализацию в клетке, то белковые продукты генов со снижением экспрессии в САБ по сравнению с ВГА находятся преимущественно в цитоплазме клеток, где участвуют в формировании липидных капель (GO:0005811; *CIDEA*, *CIDE*, *FABP4*, *G0S2*, *LIPE*, *PLIN1*, *PLIN4*, *PLIN5*;  $p_{FDR} = 0,00121$ ; табл. 1). Это может отражать уменьшение активности процесса формирования пенистых клеток в атеросклеротических бляшках на поздних стадиях патологического процесса и свидетельствует в пользу их стабилизации.

При функциональной аннотации белковых продуктов дифференциально экспрессирующихся генов в категориях базы данных KEGG, установлено,

что белковые продукты генов с увеличением экспрессии в САБ по сравнению с ВГА участвуют, прежде всего, во взаимодействии “внеклеточный матрикс-рецептор” и фокальной адгезии, а также сигнальном пути PI3K-Akt, активации тромбоцитов, гликолизе (табл. 2).

В то же время, белковые продукты генов со снижением экспрессии в САБ вовлечены в широкий круг сигнальных и метаболических путей: сигнальный путь MAPK и дифференцировку остеокластов, сигнальный путь NOD-подобных рецепторов, метаболизм арахидоновой кислоты и ретинола, сигнальный путь адипокинов, взаимодействие цитокин-цитокин рецептор, сигнальные пути Jak-STAT, TNF, TGF-бета, а также абсорбцию минералов (табл. 2).

Наиболее близким к настоящему исследованию по материалу, методам и биоинформатическому анализу является работа Sulkava и соавт. [2]. В данной работе количество дифференциально экспрессирующихся генов между САБ и ВГА составило 2292 гена ( $FC \geq 2$ ;  $p < 0,05$ ). При сопоставлении списков генов с измененным уровнем экспрессии в клетках артерий, 75 генов были общими в нашей работе и в исследовании Sulkava и соавт. [2]. Причём общими были гены *APOD*, *FABP4*, *CIDE* и *SPP1*, характеризующиеся выраженным изменением уровня экспрессии в клетках САБ по сравнению с ВГА. Однако большинство генов (370 или 83%) не были выявлены ранее.

Таблица 1. Основные функциональные категории дифференциально экспрессируемых генов в клетках атеросклеротических бляшек сонных артерий (САБ) и интактных внутренних грудных артерий (ВГА), согласно классификации Gene Ontology

Название категории, ID GO	Кол-во генов	P <sub>FDR</sub>
<b>Гиперэкспрессируемые в САБ</b>		
<b>Биологические процессы</b>		
Организация внеклеточного матрикса (extracellular matrix organization), GO:0030198; <i>CD44, COL1A2, COL3A1, COL5A2, FMOD, HAPLN1, ITGA11, ITGAV, SPARC, SPP1, SULF1, TIMP1</i>	12	<b>1,44×10<sup>-7</sup></b>
Ответ на стимулы (response to stimulus), GO:0050896; <i>CTHRC1, INSIG2, HTRA1, RAB23, SULF1, SEMA6D, COL3A1, SPP1, FMOD, TIMP1, SPARC, CDH13...</i>	35	0,0004
Передвижение клетки (locomotion), GO:0040011; <i>FAP, SPP1, CTHRC1, COL5A2, TIMP1, SCG2, CDH13, SULF1, ACTB, SEMA6D, COL1A2, ITGAV, ALCAM, COL3A1...</i>	14	0,0007
Биологическая адгезия (biological adhesion), GO:0022610; <i>SPP1, THBS2, CDH13, NME2, ITGA11, ITGAV, CD44, ALCAM, COL3A1, EDIL3, HAPLN1...</i>	11	0,0022
Процесс развития (developmental process), GO:0032502; <i>CTHRC1, INSIG2, COL5A2, THBS2, S100A4, RAB23, SULF1, SEMA6D, PKM, ALCAM, COL3A1, SPP1, FMOD, TIMP1, SCG2...</i>	26	0,0022
Биологическая регуляция (biological regulation), GO:0065007; <i>CTHRC1, INSIG2, HTRA1, RAB23, SULF1, PPP1R3C, COL3A1, SPP1, FMOD, TIMP1, SPARC, CDH13, ACOT11, NME2, ITGA11...</i>	37	0,0048
<b>Молекулярная функция</b>		
Связывание с молекулами внеклеточного матрикса, гиалуроновой кислоты, белками и ионами кальция (binding), GO:0005488; <i>CTHRC1, INSIG2, HTRA1, RAB23, SULF1, PPP1R3C, SEMA6D, COL3A1, HAPLN1, SPP1, TIMP1, SPARC, CDH13, NME2, ITGA11...</i>	41	0,0334
<b>Клеточный компонент</b>		
Часть внеклеточного региона, GO:0044421 (extracellular region part); <i>ACOT11, ACTB, ALCAM, ATP6AP2, CD44, CDH13, CFB, COL1A2, COL3A1, COL5A2, CRTAC1, CTHRC1, DKK3, EDIL3, FAP, FCGBP, FMOD, GAPDH, HAPLN1, HTRA1, ITGAV, NME2, PKM, PRSS23, RAB23, S100A4, SCG2, SPARC, SPP1, SULF1, THBS2</i>	31	<b>8,54×10<sup>-10</sup></b>
<b>Гипоэкспрессируемые в САБ</b>		
<b>Биологические процессы</b>		
Ответ на ионы металлов, GO:0071248 (cellular response to metal ion); <i>CREB1, FABP4, FOSB, GSN, JUN, JUNB, JUND, MT1A, MT1E, MT1M, MT1X, MT2A</i>	12	<b>0,000257</b>
Программируемая клеточная гибель (programmed cell death), GO:0012501; <i>TYRO3, GCLM, TRIM24, C6, APOPT1, RASSF6, MBD4, JUN, INHBB, MYC, DSG2, XRCC2, LEP, CREB1, SIK1...</i>	46	0,002
Ответ на липиды (response to lipid), GO:0033993; <i>ABCC8, CA4, CXCL2, DSG2, FOSB, GATA2, GHR, IL10, IL6, JUN, JUNB, JUND, KLF4, LEP, MBD4, MGST1, NR4A1, NR4A2, NR4A3, PRDM2, PTGDS, SOCS3, SSTR2, TNFAIP3, TRIM24, ZC3H12A</i>	26	0,00723
Ответ на внешние стимулы (response to external stimulus), GO:0009605; <i>TYRO3, TRIM24, SEMA3E, CXCL2, EIF2AK4, BHLHE40, JUN, ABLIM1, INHBB, ZFP36, SPTBN1, JUNB, GHR, LEP, CREB1...</i>	38	0,0078
Развитие сосудов (vasculature development), GO:0001944; <i>TNFAIP3, NR4A1, APOD, RGCC, SEMA3E, ZFAND5, POFUT1, SOCS3, JUN, ZC3H12A...</i>	20	0,0078
Регуляция воспалительного ответа (regulation of inflammatory response), GO:0050727; <i>TYRO3, TNFAIP3, BIRC3, IL6, KLF4, APOD, ZFP36, IL10, SPN, FABP4, PLA2G2A</i>	11	0,0095
Ответ на химические стимулы (response to chemical), GO:0042221; <i>GCLM, GPX3, HCAR1, TRIM24, CA4, SEMA3E, CXCL2, DNAJB1, MT1X, EIF2AK4, MT1E, CYP4B1, NAMPT, JUND, ABCC8...</i>	63	0,0164
<b>Молекулярная функция</b>		
Связывание с ионами цинка (zinc ion binding), GO:0008270; <i>ZNF786, TRIM24, CA4, ZNF486, MT1X, ZNF69, MT1E, ZNF876P, PTGR2, E4F1, ZNF483, ABLIM1, TDRD1, PPP1R10, GATA2...</i>	46	0,0444
Связывание с ДНК (DNA binding), GO:0003677; <i>ZNF786, TRIM24, ZNF486, MCMDC2, BHLHE40, ZNF69, GABPB2, ZNF876P, E4F1, JUND, ZNF483, JUN, PPP1R10, DEM1, GATA2, MYC...</i>	52	0,0444
<b>Клеточный компонент</b>		
Липидные капли (lipid droplet), GO:0005811; <i>CIDEA, CIDEA, FABP4, G0S2, LIPE, PLIN1, PLIN4, PLIN5</i>	8	<b>0,00121</b>

Примечание: жирным шрифтом выделены показатели с наиболее низким уровнем статистической значимости (P<sub>FDR</sub>).

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ

Таблица 2. Основные функциональные категории дифференциально экспрессируемых генов в клетках атеросклеротически изменённых сонных артерий (САБ) и интактных внутренних грудных артерий (ВГА), согласно классификации KEGG

Название категории, ID KEGG	Кол-во генов	P <sub>FDR</sub>
<b>Гиперэкспрессируемые в САБ</b>		
Взаимодействие «внеклеточный матрикс-рецептор» (ECM-receptor interaction), 04512; <i>CD44, COL1A2, COL3A1, COL5A2, ITGA11, ITGAV, SPPI, THBS2</i>	8	7,15×10 <sup>-9</sup>
Фокальная адгезия (Focal adhesion), 04510; <i>ACTB, COL1A2, COL3A1, COL5A2, ITGA11, ITGAV, SPPI, THBS2</i>	8	3,6×10 <sup>-6</sup>
Сигнальный путь PI3K-Akt (PI3K-Akt signaling pathway), 04151; <i>COL1A2, COL3A1, COL5A2, ITGA11, ITGAV, SPPI, THBS2</i>	7	0,0014
Активация тромбоцитов (Platelet activation), 04611; <i>ACTB, COL1A2, COL3A1, COL5A2</i>	4	0,0168
Гликолиз/глюконеогенез (Glycolysis / Gluconeogenesis), 00010; <i>ALDH1B1, GAPDH, PKM</i>	3	0,0341
<b>Гипоэкспрессируемые в САБ</b>		
Сигнальный путь MAPK (MAPK signaling pathway), 04010; <i>JUN, PLA2G2D, NR4A1, MYC, GADD45B, HSPA1A, JUND, HSPA1B, PLA2G2A</i>	9	0,0048
Дифференцировка остеокластов (Osteoclast differentiation), 04380; <i>JUN, CREB1, JUNB, FOSB, SOCS3, JUND</i>	6	0,0072
Сигнальный путь NOD-подобных рецепторов (NOD-like receptor signaling pathway), 04621; <i>CXCL2, TNFAIP3, BIRC3, IL6</i>	4	0,0088
Метаболизм арахидоновой кислоты (Arachidonic acid metabolism), 00590; <i>GPX3, PLA2G2D, PTGDS, PLA2G2A</i>	4	0,0088
Метаболизм ретинола (Retinol metabolism), 00830; <i>DHRS3, RDH10, RDH5, ADH1C</i>	4	0,0108
Сигнальный путь адипокинов (Adipocytokine signaling pathway), 04920; <i>LEP, ACACB, LEPR, SOCS3</i>	4	0,0124
Взаимодействие «цитокин-цитокиновый рецептор» (Cytokine-cytokine receptor interaction), 04060; <i>CNTFR, CSF2RA, CXCL2, GHR, IL10, IL6, INHBB, LEP, LEPR, TNFRSF10D, TNFSF14, TNFSF15</i>	12	0,0193
Jak-STAT сигнальный путь (JAK-STAT signaling pathway), 04630; <i>CNTFR, CSF2RA, GHR, IL10, IL6, LEP, LEPR, MYC, SOCS3</i>	9	0,0193
Сигнальный путь TNF (TNF signaling pathway), 04668; <i>BIRC3, CREB1, CXCL2, IL6, JUN, JUNB, SOCS3, TNFAIP3</i>	8	0,0193
Сигнальный путь TGF-бета (TGF-beta signaling pathway), 04350; <i>BMP8B, INHBB, THBS4, MYC</i>	4	0,0206
Абсорбция минералов (Mineral absorption), 04978; <i>MTIE, MTIM, MTIX, MT2A, TF</i>	5	0,0318

При сравнении результатов настоящего исследования и работы Seo и соавт. [10], где было проанализировано изменение экспрессии генов в образцах поражённой атеросклерозом аорты, общими оказались гены *SPPI, FOSB, GATA2, HOXA5* и *NR4A2*, однако большая часть дифференциально экспрессирующихся генов в исследованиях различалась. Более того, лишь 48 (10,8%) дифференциально экспрессирующихся генов обозначены в базе данных HuGE Navigator в качестве кандидатов для атеросклеротического поражения артерий.

В целом, результаты настоящего исследования согласуются с имеющимися представлениями относительно участия белковых продуктов дифференциально экспрессирующихся генов в организации внеклеточного матрикса, иммунновоспалительного ответа, пролиферации клеток, программируемой клеточной гибели и метаболизма липидов [2]. Однако, согласно литературным данным, преобладающими и наиболее “активными” в клетках артерий, поражённых атеросклерозом,

являются процессы иммунновоспалительного ответа и ремоделирования внеклеточного матрикса. Напротив, в настоящем исследовании процесс иммунновоспалительного ответа и связанных с ним сигнальных путей (NOD-подобных рецепторов, метаболизм арахидоновой кислоты, взаимодействие “цитокин-цитокиновый рецептор” Jak-STAT, TNF) был подавлен на уровне экспрессии генов, а процесс организации внеклеточного матрикса оставался “активным”.

Выявленные по сравнению с литературными данными противоречия в изменении направленности экспрессии генов иммунновоспалительного ответа в клетках атеросклеротических бляшек сонных артерий могут быть связаны со многими факторами. В частности, это различие в дизайне работы, анализируемых выборок, используемых методов. Альтернативное объяснение заключается в изменении стандартов лечения больных в последние годы. Большинство ранее опубликованных работ, где проводился анализ экспрессии генов в сосудах

у больных с атеросклерозом, было выполнено с использованием биологических образцов, собранных до активного использования статинов в практике. В нашей работе все обследованные больные получали статины, поэтому данный препарат может быть фактором, который изменяет экспрессию генов в клетках атеросклеротически поражённых сонных артерий. Известно, что кроме основного влияния статинов – снижения уровня холестерина ЛПНП в крови – они оказывают противовоспалительный и сосудопротективный эффекты. Это осуществляется через различные сигнальные и метаболические пути, в том числе через активацию сигнального пути PI3K-Akt и супрессию сигнального пути AP-1 в эндотелиальных клетках, а также ингибирование сигнального пути MAPK в гладкомышечных клетках [11]. Показано, что статины могут изменять экспрессию целого ряда генов, белковые продукты которых входят в состав сигнальных и метаболических путей [12]. В частности, происходит активация гена *TIMP1*, белковый продукт которого участвует в организации внеклеточного матрикса, но ингибирование функциональной активности генов воспалительного ответа (*IL6*), сигнального пути AP-1 (*JUN*) [13]. Экспрессия данных генов была изменена и в настоящем исследовании.

Следует отметить, что изменение экспрессии между артериями, поражёнными атеросклерозом, и интактными сосудами затрагивало некоторые семейства генов, в частности, гены *MT1A*, *MT1E*, *MT1M*, *MT1X*, *MT2A*, кодирующие металлотионеины (MTs). Это внутриклеточные белки, которые связывают металлы, обеспечивая гомеостаз цинка, меди, селена, а также детоксикацию токсических металлов (кадмий, ртуть, серебро, мышьяк и др.). Металлотионеины связаны с защитой клетки от повреждающего воздействия различных агентов. Экспрессия генов металлотионеинов активируется в ответ на металлы, окислительный стресс, воспалительные агенты, гормоны, хирургическое вмешательство. В частности, экспрессия генов металлотионеинов связана с гомеостазом цинка. Определённый характер питания, а также приём ряда лекарств (например, статинов) приводит к дефициту данного минерала в организме, особенно у пожилых людей, что сказывается на уровне экспрессии генов металлотионеинов. В области атеросклеротических бляшек нарушение гомеостаза цинка может усугубляться накоплением стареющих и низкопролиферирующих клеток.

Гены *MT1A*, *MT1E*, *MT1M* и *MT1X* кодируют изоформу MT-1, а ген *MT2A* – изоформу MT-2. Изоформы MT-1 и MT-2 данных белков выявлены в макрофагах, фибробластах и Т-лимфоцитах атеросклеротических бляшек сонных артерий на поздних стадиях патологического процесса [14]. Экспрессия гена *MT2A* тесно связана с воспалительным процессом и коррелирует с такими показателями как уровень С-реактивного белка и IL-6, являясь маркером иммуностарения [14, 15].

В настоящем исследовании для атеросклеротически поражённых артерий также показано координированное снижение экспрессии генов металлотионеинов и

цитокинов (*IL6* и *IL10*). Снижение экспрессии данных генов в САБ по сравнению с ВГА, по-видимому, отражает низкую активность системы защиты клеток от различных повреждающих стимулов, например окислительного стресса, при атеросклерозе на поздних стадиях патологического процесса. С одной стороны, это может иметь негативные последствия. Показано, что при злокачественных новообразованиях снижение экспрессии генов металлотионеинов в опухолевых клетках ассоциировано с плохим прогнозом [16]. С другой стороны, снижение экспрессии генов металлотионеинов может приводить к большей доступности ионов цинка для других на данный момент времени более важных процессов в клетке.

Для подтверждения полученных результатов необходимы дальнейшие исследования с использованием альтернативных методов (ПЦР в режиме реального времени или цифровой ПЦР), а также большего количества образцов сосудов, в том числе гистологически охарактеризованных.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Таким образом, в настоящем исследовании установлено, что на поздних стадиях атеросклеротического поражения артерий происходит, кроме существенного изменения экспрессии отдельных генов (*APOD*, *FABP4*, *CIDEA*, *FOSB*, *SPPI*), координированное изменение экспрессии семейств генов (белки AP-1, металлотионеины, перилипины). Наиболее выраженная активация экспрессии генов связана с таким биологическим процессом, как организация внеклеточного матрикса. В то же время, в атеросклеротически изменённых сонных артериях большая часть генов характеризуется снижением функциональной активности, в том числе генов иммунновоспалительного ответа. Наиболее существенное снижение экспрессии выявлено в отношении тех генов, белковые продукты которых контролируют клеточный ответ к ионам металлов.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено частично за счёт средств гранта РФФИ №16-04-00840.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Nai W., Threapleton D., Lu J., Zhang K., Wu H., Fu Y., Wang Y., Ou Z., Shan L., Ding Y., Yu Y., Dai M. (2016) Sci. Rep., 6, 18764. DOI: 10.1038/srep18764
2. Sulkava M., Raitoharju E., Levula M., Seppälä I., Lyytikäinen L.P., Mennander A., Järvinen O., Zeitlin R., Salenius J.P., Illig T., Klopp N., Mononen N., Laaksonen R., Kähönen M., Oksala N., Lehtimäki T. (2017) Sci. Rep., 7, 41483. DOI: 10.1038/srep41483
3. Steenman M., Espitia O., Maurel B., Guyomarch B., Heymann M.F., Pistorius M.A., Ory B., Heymann D., Houlgatte R., Gouëffic Y., Quillard T. (2018) Sci. Rep., 8, 3940. DOI: 10.1038/s41598-018-22292-y

4. Stary H.C., Chandler A.B., Dinsmore R.E., Fuster V., Glagov S., Insull W. Jr., Rosenfeld M.E., Schwartz C.J., Wagner W.D., Wissler R.W. (1995) *Circulation*, **92**(5), 1355-1374.
5. Raitoharju E., Seppälä I., Lyytikäinen L.P., Levula M., Oksala N., Klopp N., Illig T., Laaksonen R., Kähönen M., Lehtimäki T. (2013) *Atherosclerosis*, **226**(1), 149-152. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.10.078
6. Wang J., Duncan D., Shi Z., Zhang B. (2013) *Nucleic Acids Res.*, **41**, W77-W83. DOI: 10.1093/nar/gkt439
7. Patino W.D., Kang J.G., Matoba S., Mian O.Y., Gochoico B.R., Hwang P.M. (2006) *Circ. Res.*, **98**(10), 1282-1289. DOI: 10.1161/01.RES.0000222284.48288.28
8. Thomas A.C., Eijgelaar W.J., Daemen M.J., Newby A.C. (2015) *PLoS One*, **10**(7), e0128163. DOI: 10.1371/journal.pone.0128163
9. Zenz R., Eferl R., Scheinecker C., Redlich K., Smolen J., Schonhauer H.B., Kenner L., Tschachler E., Wagner E.F. (2008) *Arthritis Res. Ther.*, **10**(1), 201. DOI: 10.1186/ar2338.
10. 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**(10), 1922-1927. DOI: 10.1161/01.ATV.0000141358.65242.1f
11. Antonopoulos A.S., Margaritis M., Shirodaria C., Antoniadou C. (2012) *Thromb. Haemost.*, **108**, 840-848.
12. Dichtl W., Dulak J., Frick M., Alber H.F., Schwarzacher S.P., Ares M.P., Nilsson J., Pachinger O., Weidinger F. (2003) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **23**(1), 58-63.
13. Blaschke S., Viereck V., Schwarz G., Klinger H.M., Guerluek S., Muller G.A. (2009) *Scand. J. Rheumatol.*, **38**(4), 235-239.
14. Daskalopoulou S.S., Daskalopoulos M.E., Theocharis S., Kavantzis N., Perrea D., Karandrea D., Constantinides A.G., Mikhailidis D.P., Nicolaides A.N., Liapis C.D. (2007) *Curr. Med. Res. Opin.*, **23**(3), 659-670. DOI: 10.1185/030079907X178829
15. Mocchegiani E., Giacconi R., Cipriano C., Muzzioli M., Gasparini N., Moresi R., Stecconi R., Suzuki H., Cavaliere E., Mariani E. (2002) *Exp. Gerontol.*, **37**(2-3), 349-357.
16. Brazão-Silva M.T., Rodrigues M.F., Eisenberg A.L., Dias F.L., de Castro L.M., Nunes F.D., Faria P.R., Cardoso S.V., Loyola A.M., de Sousa S.C. (2015) *Histopathology*, **67**(3), 358-367. DOI: 10.1111/his.12660.

Поступила: 04. 06. 2018.  
Принята к печати: 26. 06. 2018.

# COMPARATIVE ANALYSIS OF GENE EXPRESSION IN VASCULAR CELLS OF PATIENTS WITH ADVANCED ATHEROSCLEROSIS

M.S. Nazarenko<sup>1,2\*</sup>, A.V. Markov<sup>1</sup>, A.A. Sleptsov<sup>1</sup>, I.A. Koroleva<sup>1</sup>, D.V. Sharysh<sup>2</sup>, A.A. Zarubin<sup>1</sup>, N.R. Valiahetov<sup>2</sup>, I.A. Goncharova<sup>1</sup>, E.F. Muslimova<sup>3</sup>, M.S. Kuznecov<sup>3</sup>, B.N. Kozlov<sup>3</sup>, S.A. Afanasiev<sup>3</sup>, V.P. Puzyrev<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, RAS, 10 Ushaika emb., Tomsk, 634050 Russia; \*e-mail: maria.nazarenko@medgenetics.ru

<sup>2</sup>Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

<sup>3</sup>Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, RAS, Tomsk, Russia

In this study we performed a comparative gene expression analysis of carotid arteries in the area of atherosclerotic plaques and healthy internal mammary arteries of patients with advanced atherosclerosis by using microarray HumanHT-12 BeadChip ("Illumina"). The most down-regulated genes were *APOD*, *FABP4*, *CIDEA* and *FOSB*, and up-regulated gene was *SPPI* ( $|FC| > 64$ ;  $p_{FDR} < 0.05$ ). The majority of differentially expressed genes were down-regulated in advanced atherosclerotic plaques. Unexpectedly, genes involved in immune and inflammatory responses were down-regulated in advanced atherosclerotic plaques to compare with the healthy arteries (arachidonic acid metabolism, cytokine-cytokine receptor interaction, NOD-like receptor signaling pathway, Jak-STAT signaling pathway, TNF signaling pathway). "Cellular response to metal ion" (metallothioneins) and "Extracellular matrix organization" were the most significant Gene ontology terms among the down- and up-regulated genes, respectively.

**Key words:** gene expression; carotid atherosclerosis; vascular tissues; microarrays