



<https://doi.org/10.29001/2073-8552-2021-36-4-156-163>
УДК 616.132.2-004.6:577.125.8

Анализ дифференциальной экспрессии генов липидного обмена в атеросклеротических бляшках у пациентов с коронарным атеросклерозом

Е.В. Шахтшнейдер^{1, 2}, Д.Е. Иванощук^{1, 2}, Ю.И. Рагино¹, В.С. Фишман²,
Я.В. Полонская¹, Е.В. Каштанова¹, А.М. Чернявский³, И.С. Мурашов³,
М.И. Воевода²

¹ Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, 630089, Российская Федерация, Новосибирск, ул. Б. Богаткова, 175/1

² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, 630090, Российская Федерация, Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 10

³ Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина Министерства здравоохранения Российской Федерации, 630055, Российская Федерация, Новосибирск, ул. Речкуновская, 15

Аннотация

Цель: выполнить анализ дифференциальной экспрессии генов липидного обмена в атеросклеротических бляшках разных типов у пациентов с коронарным атеросклерозом.

Материал и методы. Исследование выполнено на образцах атеросклеротических бляшек пациентов с коронарным атеросклерозом без острого коронарного синдрома со стабильной стенокардией напряжения II–IV функционального класса (ФК) в возрасте 45–65 лет. Коронарный атеросклероз подтвержден коронароангиографией. Забор тканей атеросклеротической бляшки проведен интраоперационно при наличии показаний. Полногеномное секвенирование рибонуклеиновой кислоты (РНК) выполнено с использованием Illumina's TruSeq RNA Sample Preparation Kit (Illumina, USA).

Результаты. Статистически значимые различия в экспрессии генов между разными типами бляшек были отмечены для *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1*, *LIPA*, *STAP1*, *ABCA1*, *APOA1*, *APOE*, *LPL*, *SCARB1* и *SREBF2*. Наблюдалось 8-кратное статистически значимое увеличение экспрессии гена *APOE* ($p < 0,0001$) в нестабильных атеросклеротических бляшках дистрофически-некротического вида. В стабильных атеросклеротических бляшках отмечалось 8-кратное статистически значимое увеличение экспрессии генов *LDLR* и *APOB* ($p < 0,0001$). Не было получено статистически значимых различий в изменении экспрессии генов *ABCG5*, *ABCG8*, *APOC3*, *CETP*, *CLPS*, *CYP7A1* и *PNPLA5*.

Заключение. Исследование показало различия в активности отдельных генов липидного обмена в атеросклеротических бляшках разных типов у пациентов с коронарным атеросклерозом. Полученные данные могут стать основой для разработки тест-систем с целью прогнозирования развития атеросклеротического процесса и его осложнений.

Ключевые слова: атеросклеротические бляшки, экспрессия генов, ген *APOE*, ген *APOC1*, ген *LDLR*, ген *APOB*, гены липидного метаболизма, транскриптом.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Прозрачность финансовой деятельности: биохимические и гистологические исследования выполнены при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации по поддержке ведущих научных школ НШ-2595.2020.7, молекулярно-генетические исследования выполнены при поддержке гранта РФФИ № 19-015-00458.

Соответствие принципам этики: исследование одобрено этическим комитетом НИИТГМ – филиала ИЦиГ СО РАН (протокол № 68 от 04.06.2019 г.).

Для цитирования: Шахтшнейдер Е.В., Иванощук Д.Е., Рагино Ю.И., Фишман В.С., Полонская Я.В., Каштанова Е.В., Чернявский А.М., Мурашов И.С., Воевода М.И. Анализ дифференциальной экспрессии генов липидного обмена в атеросклеротических бляшках у пациентов с коронарным атеросклерозом. *Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины*. 2021;36(4):156–163. <https://doi.org/10.29001/2073-8552-2021-36-4-156-163>.

Шахтшнейдер Елена Владимировна, e-mail: 2117409@mail.ru.

Analysis of differential expression of lipid metabolism genes in atherosclerotic plaques in patients with coronary atherosclerosis

Elena V. Shakhtshneider^{1, 2}, Dinara E. Ivanoshchuk^{1, 2}, Yuliya I. Ragino¹, Veniamin S. Fishman², Yana V. Polonskaya¹, Elena V. Kashtanova¹, Alexander M. Chernyavsky^{1, 2, 3}, Ivan S. Murashov³, Michael I. Voevoda²

¹ Research Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, 175/1, B. Bogatkova str., Novosibirsk, 630089, Russian Federation

² Institute of Cytology and Genetics, 10, Lavrentieva ave., Novosibirsk, 630090, Russian Federation

³ National Medical Research Center named after Academician E.N. Meshalkin, 15, Rechkunovskaya str., Novosibirsk, 630055, Russian Federation

Abstract

Aim. The goal of the study was to analyze the differential expression of lipid metabolism-related genes in the atherosclerotic plaques of different types in patients with coronary atherosclerosis.

Material and Methods. The study was performed on the specimens of atherosclerotic plaques in 45–65-year-old patients with coronary atherosclerosis with stable exertional angina functional class II-IV without acute coronary syndrome. Coronary atherosclerosis was verified by coronary angiography. Atherosclerotic plaque tissue was sampled intraoperatively when indicated. Whole-genome sequencing of ribonucleic acid (RNA) was performed using the TruSeq RNA Sample Preparation Kit (Illumina, USA).

Results. We analyzed the differences in the expression of 12 genes including *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1*, *LIPA*, *STAP1*, *ABCA1*, *APOA1*, *APOE*, *LPL*, *SCARB1*, and *SREBF2* depending on the type of atherosclerotic plaques. The expression level of *APOE* gene was eight times higher in unstable atherosclerotic plaques of dystrophic-necrotic type ($p < 0.0001$). The expression levels of *LDLR* and *APOB* genes were eight times higher in stable atherosclerotic plaques ($p < 0.0001$). We did not find differences in the expression levels of the *ABCG5*, *ABCG8*, *APOC3*, *CETP*, *CLPS*, *CYP7A1*, and *PNPLA5* genes.

Conclusion. The study showed the differences in the activity of individual metabolism-related genes in the atherosclerotic plaques of different types in patients with coronary atherosclerosis. Obtained data may become the basis for the development of test systems aimed at predicting the development of atherosclerotic process and its complications.

Keywords:	atherosclerotic plaques, expression of genes, gene <i>APOE</i> , gene <i>APOC1</i> , gene <i>LDLR</i> , gene <i>APOB</i> , lipid metabolism-related genes, transcriptome.
Conflict of interest:	the authors do not declare a conflict of interest.
Financial disclosure:	Biochemical and histological studies were carried out with the financial support of the grant of the President of the Russian Federation for the support of leading scientific schools НШ-2595.2020.7. Molecular genetic studies were carried out with the support of the RFBR grant No. 19-015-00458.
Adherence to ethical standards:	the study protocol was approved by the local Ethics Committee of the Institute of Internal and Preventive Medicine (protocol No. 68 from 04.06.2019).
For citation:	Shakhtshneider E.V., Ivanoshchuk D.E., Ragino Y.I., Fishman V.S., Polonskaya Y.V., Kashtanova E.V., Chernyavsky A.M., Murashov I.S., Voevoda M.I. Analysis of differential expression of lipid metabolism genes in atherosclerotic plaques in patients with coronary atherosclerosis. <i>The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine</i> . 2021;36(4):156–163. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2021-36-4-156-163 .

Введение

Современные методы диагностики позволяют оценить степень распространения атеросклеротического повреждения и локализацию отдельных бляшек, но не могут прогнозировать ее развитие и прогрессирование. Острое коронарное событие часто является первым

проявлением ишемической болезни сердца с бессимптомным течением или происходит на фоне стабильного течения заболевания без клинических признаков дестабилизации состояния пациента. Для раннего определения признаков нестабильности атеросклеротической бляшки и выбора наиболее подходящего времени для оперативного вмешательства используют два основных

метода: визуализацию атеросклеротических бляшек инвазивными или неинвазивными методами и определение биологических маркеров нестабильной атеросклеротической бляшки. Комплексное изображение, полученное при использовании оптической когерентной томографии, или молекулярная визуализация с использованием целевых индикаторов, позволяет анализировать морфологию бляшки, состав и степень воспаления. Использование визуализации в кардиологии может быть предложено для оценки фенотипа бляшек высокого риска [1, 2].

Определение предшествующих белкам транскриптов является информативным показателем изменений при патологических процессах и позволяет оценить степень выраженности заболевания до возникновения его фенотипических проявлений. Изучение транскриптома разных видов атеросклеротической бляшки и выявление тканеспецифических транскриптов, маркирующих процессы деструкции, является актуальным направлением в разработке методов оценки динамики развития заболевания.

Высокая вариабельность процессов, происходящих в атеросклеротической бляшке в зависимости от стадии бляшки и ее локализации, активно влияет на дифференциальную экспрессию генов [3, 4]. В исследованиях также было показано различие в экспрессии генов в атеросклеротических бляшках, находящихся в разных артериальных руслах [5].

Ранее нами был проведен анализ дифференциальной экспрессии генов металлопротеиназ, вовлеченных в процессы стабилизации и дестабилизации атеросклеротической бляшки [6]. Определено статистически значимое 8-кратное увеличение активности гена MMP9 в нестабильной атеросклеротической бляшке дистрофически-некротического вида ($p < 0,0001$).

Цель исследования: анализ дифференциальной экспрессии генов липидного обмена в двух типах атеросклеротических бляшек: в стабильной бляшке фиброзного вида и нестабильной бляшке дистрофически-некротического вида.

Материал и методы

Исследование одобрено этическим комитетом НИИ-ТГПМ – филиала ИЦиГ СО РАН. Образцы атеросклеротических бляшек были собраны в ФГБУ НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина Минздрава России. В исследование включены мужчины с коронарным атеросклерозом без острого коронарного синдрома со стабильной стенокардией напряжения II–IV функционального класса (ФК), подтвержденной данными коронароангиографии, в возрасте 45–65 лет. Для каждого пациента заполнен протокол исследования, выполнен забор крови и тканей атеросклеротической бляшки в ходе операции при наличии интраоперационных показаний. Эндартерэктомия выполнена на коронарных артериях, от каждого пациента получено по три образца атеросклеротических бляшек. Каждый фрагмент полученного материала атеросклеротических бляшек симметрично разделен на 4 части для гистологического, биохимического (2 части) и молекулярно-генетического исследований. Исследование каждого фрагмента выполнялось отдельно.

Гистологическое исследование

Гистологическое исследование всех образцов выполнено в патоморфологической лаборатории ФГБУ НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина Минздрава России (руководи-

тель лаборатории – д-р мед. наук, проф. А.М. Волков). Выполнено макроскопическое описание образцов, включающее описание степени распространенности бляшки, стенозирования просвета артерии, наличия/отсутствия кровоизлияния в структуры бляшки, участков обызвествления, тромбов и окрашивания образцов гематоксилин-эозином и по методу Ван Гизона. Анализ фрагментов интимы/меди коронарных артерий проведен на бинокулярном микроскопе Axiostar Plus (C. Zeiss, Германия). Определены стадии формирования бляшки, подробно описано состояние покрышки бляшки, ее эндотелиальной поверхности, ядра бляшки, периферии бляшки/очага, клеточно-элементный состав всех компонентов атеросклеротического очага.

Общее количество образцов атеросклеротических бляшек составило 144 шт.:

- стадия липидных пятен/полосок – 15 образцов,
- нестабильные бляшки – 58 образцов,
- стабильные атеросклеротические бляшки – 71 образец.

Стабильные атеросклеротические бляшки были представлены в 24 случаях атероматозными стабильными молодыми бляшками, в 47 случаях – атероматозными стабильными бляшками с фиброзом/кальцинозом.

Из 58 образцов нестабильных бляшек было 12 бляшек липидного типа, 4 бляшки с воспалением/эрозией и 42 бляшки дистрофически-некротического типа.

Определены типы нестабильных бляшек [7]:

1. Липидный тип – фиброатерома с тонкой фиброзной покрышкой.
2. Воспалительно-эрозивный тип – бляшка с повышенным содержанием протеогликанов или воспалением, приводящим к эрозии и тромбозу.
3. Дистрофически-некротический тип – бляшка с кальцинированным ядром.

Нестабильная атеросклеротическая бляшка определялась как поврежденная бляшка с толщиной фиброзной покрышки менее 65 мкм, инфильтрированная макрофагами и Т-лимфоцитами (более 25 клеток в поле зрения диаметром 0,3 мм) с крупным липидным ядром (>40%).

После проведения гистологического исследования каждого из образцов и определения типов бляшек было выполнено полногеномное секвенирование рибонуклеиновой кислоты (РНК) для двух образцов атеросклеротических бляшек, полученных от неродственных пациентов, в двух технических повторах: стабильной бляшки фиброзного вида и нестабильной бляшки дистрофически-некротического вида.

Пациенты для изучения транскриптома были выбраны по следующим критериям: оба пациента мужского пола, возраст – 61–64 года, получающие лекарственную терапию одинаковыми препаратами, с диагнозом: ишемическая болезнь сердца, стенокардия напряжения III ФК, постинфарктный кардиосклероз (ПИКС), хроническая сердечная недостаточность (ХСН) IIA ст., ФК III (NYHA). Во всех трех образцах атеросклеротических бляшек каждого из пациентов тип и вид бляшек был однороден по результатам гистологического исследования.

Пациент 1 (61 год) – стабильные атеросклеротические бляшки фиброзного вида в трех образцах коронарных сосудов представлены значительно стенозирующими просвет сосуда бляшками (70–75%) из плотной соединительной ткани, содержащей пучки коллагеновых и эластических волокон, с крупным формирующимся

кальцификатом. Клеточная активность отсутствует. Определяется стадия фиброза и кальциноза.

Пациент 2 (64 года) – нестабильные атеросклеротические бляшки дистрофически-некротического вида в трех образцах коронарных сосудов представлены значительно стенозирующими просвет сосуда бляшками (70–80%), с участками рыхлой и плотной фиброзной ткани с очаговыми некрозами и отложениями солей кальция. Бляшки содержат небольшие ядра из аморфных масс и пенистых клеток с умеренной мононуклеарной инфильтрацией. Толстая покрывка с плотной фиброзной тканью с разрывами. Интима сосуда умеренно утолщена за счет плотной фиброзной ткани с инфильтрацией пенистыми клетками и плотно соединена с покрывкой бляшки.

Молекулярно-генетическое исследование

При заборе материала атеросклеротических бляшек фрагмент, предназначенный для молекулярно-генетического исследования, помещался в стабилизирующий раствор RNeasy (QIAGEN, Германия) для предотвращения деградации РНК. Затем пробы ткани атеросклеротических бляшек замораживались для последующей транскрипции.

Выделение РНК из образцов проводили с применением набора РеалБест экстракция 100 (АО Вектор Бест, Новосибирск, Россия). Подтверждение наличия РНК, качество и количество полученных проб тотальной РНК проверялось на приборе «Erosch» (BioTek, США). Качество извлеченной РНК контролировалось с помощью системы капиллярного электрофореза Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Tec. Inc., США). Подготовка библиотек для секвенирования проведена с использованием Illumina's TruSeq RNA Sample Preparation Kit (Illumina, США). Количественный анализ библиотек выполнен на флуориметре Qubit® 2.0 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США), качество библиотек контролировалось с использованием системы Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Tec. Inc., США). Полногеномный профиль экспрессии определен с помощью высокотехнологического секвенирования на приборе HiSeq 2000 (Illumina, США).

Данные секвенирования картированы на геном человека версии GRCh38 с использованием программы BWA 0.7.12. Расчет RPKM (Reads Per Kilobase Million, число

чтений на миллион килобаз) осуществлялся для генов, присутствующих в аннотации используемой версии генома человека.

Результаты и обсуждение

В результате анализа дифференциальной экспрессии генов методом полногеномного секвенирования РНК определены транскрипты генов со статистически значимыми различиями экспрессии в разных типах атеросклеротических бляшек у пациентов с коронарным атеросклерозом. В результате исследования были получены данные по 208 различным транскриптам, 40% из которых были изоформами известных генов. Различия в дифференциальной экспрессии показаны для генов: аполинпротеинов, белков воспалительного цикла, металлопротеиназ, трансмембранных гликопротеинов. Определены гены с максимальной активностью в нестабильных атеросклеротических бляшках: *MAFF*, *ATF3*, *HMGB3*, *HSPA5*, *ZFP36*, *MMP9*. Определены общие патогенные пути с измененной экспрессией генов в нестабильных атеросклеротических бляшках: гипоксии, окислительного стресса, хемокинов, актинового цитоскелета, внеклеточного матрикса.

При анализе активности генов липидного метаболизма статистически значимые различия в экспрессии между типами бляшек были отмечены в генах *LDLR*, *APOB*, *LDLRAP1*, *LIPA*, *STAP1*, *ABCA1*, *APOA1*, *APOE*, *LPL*, *SCARB1* и *SREBF2*. Результаты исследования представлены в таблице 1.

Наблюдалось 8-кратное статистически значимое увеличение экспрессии *APOE* ($p < 0,0001$) в нестабильных атеросклеротических бляшках дистрофически-некротического вида. Для нестабильных атеросклеротических бляшек дистрофически-некротического вида также было отмечено повышение экспрессии генов *ABCA1*, *LIPA*, *LPL*, *SCARB1* и *STAP1*. В стабильных атеросклеротических бляшках наблюдалось 8-кратное статистически значимое увеличение экспрессии генов *LDLR* и *APOB* ($p < 0,0001$), а также повышенная экспрессия генов *LDLRAP1* и *SREBF2*.

Не было получено статистически значимых различий в активности генов *ABCG5*, *ABCG8*, *APOC3*, *CETP*, *CLPS*, *CYP7A1* и *PNPLA5*.

Таблица 1. Экспрессия генов липидного обмена в атеросклеротических бляшках

Table 1. Expression of lipid metabolism genes in atherosclerotic plaques

Идентификационный номер ID	Ген Gene	САБ тп1 SAP v1	САБ тп2 SAP v2	НАБ тп1 UAP v1	НАБ тп2 UAP v2	Степень количественного изменения Log2 fold change	Уровень значимости p-value Significance level p-value
NM_005502	<i>ABCA1</i>	294,5	279,0	913,6	888,9	1,647393201	3,89E-53
NM_022436	<i>ABCG5</i>	5,8	4,3	3,4	4,1	-0,312573199	0,71717578
NM_022437	<i>ABCG8</i>	1,4	1,4	0,0	0,0	-1,011003757	0,25306836
NM_000384	<i>APOB</i>	26,0	21,6	6,9	8,3	-1,514048911	0,00601312
NM_000040	<i>APOC3</i>	0,0	0,0	0,0	1,4	0,380698431	0,57326719
NM_001302689	<i>APOE</i>	365,3	368,1	6928,0	6972,9	4,238955475	0,000000001
NM_001302690	<i>APOE</i>	365,3	368,1	6927,3	6972,9	4,23888385	0,000000001
NM_000041	<i>APOE</i>	365,3	368,1	6937,6	6981,9	4,240885685	0,000000001
NM_001302691	<i>APOE</i>	365,3	368,1	6937,6	6981,9	4,240885685	0,000000001
NM_001302688	<i>APOE</i>	365,3	368,1	6937,6	6981,9	4,240885685	0,000000001
NM_000078	<i>CETP</i>	10,1	11,5	14,5	18,6	0,558494786	0,33944116
NM_001286085	<i>CETP</i>	10,1	11,5	14,5	18,6	0,558494786	0,33944116

Окончание табл. 1
End of table 1

Идентификационный номер ID	Ген Gene	САБ тп1 SAP v1	САБ тп2 SAP v2	НАБ тп1 UAP v1	НАБ тп2 UAP v2	Степень количественного изменения Log2 fold change	Уровень значимости p-value Significance level p-value
NM_001252597	CLPS	0,0	0,0	0,0	0,7	0,30093549	0,63214135
NM_001252598	CLPS	0,0	0,0	0,0	0,7	0,30093549	0,63214135
NM_001832	CLPS	0,0	0,0	0,0	0,7	0,30093549	0,63214135
NM_000780	CYP7A1	1,4	1,4	0,0	3,5	0,12098096	0,90450351
NM_001195803	LDLR	1621,4	1615,0	621,9	594,2	-1,410434648	5,04E-92
NM_000527	LDLR	1621,4	1615,0	621,9	594,2	-1,410434648	5,04E-92
NM_001195798	LDLR	1621,4	1615,0	621,9	594,2	-1,410434648	5,04E-92
NM_001195800	LDLR	1621,4	1615,0	621,9	594,2	-1,410434648	5,04E-92
NM_001195799	LDLR	1621,4	1615,0	621,9	594,2	-1,410434648	5,04E-92
NM_015627	LDLRAP1	223,8	221,5	133,8	146,3	-0,663898859	0,00013271
NM_001288979	LIPA	135,7	142,4	932,9	946,8	2,74490548	2,86E-95
NM_000235	LIPA	135,7	142,4	932,9	946,8	2,74490548	2,86E-95
NM_001127605	LIPA	135,7	142,4	932,9	946,8	2,74490548	2,86E-95
NM_000237	LPL	18,8	21,6	122,7	121,5	2,521350346	9,78E-14
NM_138814	PNPLA5	1,4	1,4	1,4	0,7	-0,210980891	0,83342672
NM_001177675	PNPLA5	1,4	1,4	1,4	0,7	-0,210980891	0,83342672
NM_005505	SCARB1	70,7	77,7	208,2	211,9	1,484062372	3,89E-12
NM_001082959	SCARB1	70,7	77,7	208,2	211,9	1,484062372	3,89E-12
NR_103834	SREBF2	616,5	589,6	417,1	407,9	-0,546434713	1,42E-07
NM_004599	SREBF2	616,5	589,6	417,1	407,9	-0,546434713	1,42E-07
NM_012108	STAP1	2,9	2,9	25,5	23,5	2,616230491	0,00019694

Примечание: НАБ – нестабильные атеросклеротические бляшки дистрофически-некротического вида, САБ – стабильные атеросклеротические бляшки фиброзного вида, тп1, тп2 – технические повторы.

Note: UAP – unstable atherosclerotic plaque of dystrophic-necrotic type, SAB – stable fibrous atherosclerotic plaque, v1 and v2 – technical repeats.

На следующем этапе был выполнен анализ дифференциальной экспрессии генов между полученными нами образцами атеросклеротических бляшек и тканями интактных коронарных сосудов из базы данных GEO (Gene Expression Omnibus, NCBI). База данных Gene Expression Omnibus (GEO) – международное общедоступное хранилище, архивирующее и свободно распространяющее высокопроизводительные наборы данных экспрессии генов (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Образцы для анализа были стандартизованы по полу, возрасту, этнической принадлежности (европеоиды, non-Finnish). Для выявления транскриптов

генов со статистически значимыми различиями в экспрессии между типами бляшек были использованы: FDR < 0,05 (FDR – false discovery rate, средняя доля ложных отклонений гипотез), более чем 8-кратные различия ($-3 < \log_2 \text{fold_change} < +3$), экспрессия одного и того же гена в одном из типов бляшек на уровне более 50 RPKM.

Были определены различия в экспрессии более 190 генов между тканями атеросклеротических бляшек и тканями интактных коронарных сосудов. В том числе были выявлены статистически значимые различия в активности генов аполипопротеинов С1 и Е (табл. 2).

Таблица 2. Экспрессия генов аполипопротеинов С1 и Е в атеросклеротических бляшках и в тканях интактных коронарных сосудов

Table 2. Expression of genes for apolipoproteins C1 and E in atherosclerotic plaques and in tissues of intact coronary vessels

Ген Gene	Локус Locus	Экспрессия в интактных коронарных сосудах Expression in intact coronary vessels	Экспрессия в атеросклеротических бляшках Expression in atherosclerotic plaques	Степень количественного изменения log2 fold change	Уровень значимости p-value
АРОС1	19:44905753-44919349	2,13079	568,754	8,06027	0,0015
АРОЕ	19:44905753-44919349	75,1808	870,865	3,53401	0,0007

Полученные нами данные о дифференциальной экспрессии генов аполипопротеинов С1 и Е в атеросклеротических бляшках согласуются с ранее опубликованными результатами М. Sulkava и соавт. [4]. Были показаны несколько семейств генов, связанных с транспортом липидов, с максимальными различиями экспрессии в атеро-

склеротических бляшках. Активность аполипопротеина D была снижена во всех исследованных артериальных руслах, в то время как экспрессия аполипопротеина Е и аполипопротеина С1 значительно повышалась в атеросклеротических бляшках. Аполипопротеин С1 был особенно активирован в каротидных бляшках.

Обсуждение

Полученные результаты дополняют ранее опубликованную информацию о биохимических путях, дифференциально выраженных в атеросклеротических бляшках разных типов, локализованных в коронарных сосудах. Ранее W. Liu и соавт. провели исследование экспрессии генов и молекулярных механизмов, участвующих в прогрессировании атеросклеротических бляшек сонных артерий [8]. Сообщалось о дифференциально экспрессируемых генах и патологических путях воспалительных процессов и ремоделировании внеклеточного матрикса [9]. Нами были также определены патологические пути с измененной экспрессией генов в нестабильных атеросклеротических бляшках: гипоксии, окислительного стресса, хемокинов, актинового цитоскелета, внеклеточного матрикса, что согласуется с данными предыдущих исследований.

Показаны различия в активности отдельных генов липидного обмена в атеросклеротических бляшках разных типов. Дифференциально экспрессируемые гены включали *LDLR* и аполипопротеины E, B и C1 [10–13]. Повышенная экспрессия *APOE* и *APOC1* в образцах атеросклеротических бляшек, по-видимому, подтверждает корреляции, которые были обнаружены для этих генов с накоплением липидов и формированием бляшек [4, 14, 15].

У мышей P301S было показано, что повышение экспрессии рецепторов липопротеинов низкой плотности приводит к снижению уровня белка аполипопротеина E – одного из важных факторов риска развития атеросклеротических бляшек [16, 17]. В нашем исследовании выявлено увеличение экспрессии гена *LDLR* и снижение экспрессии гена *APOE* в стабильной атеросклеротической бляшке и обратная закономерность – повышение количества матричной РНК (мРНК) аполипопротеина E и снижение количества мРНК рецептора липопротеинов

низкой плотности в нестабильной атеросклеротической бляшке. В стабильных атеросклеротических бляшках отмечена повышенная экспрессия генов *APOB*, *LDLRAP1* и *SREBF2*, функция которых тесно связана с работой рецептора липопротеинов низкой плотности [18, 19]. Возможно, отсутствие структурных перестроек в гене *LDLR* и/или его лигандов позволяет сохранять относительную стабильность атеросклеротических бляшек в коронарных сосудах.

Для бляшек дистрофически-некротического вида было отмечено повышение экспрессии генов *ABCA1*, *LIPA*, *LPL*, *SCARB1* и *STAP1* [20–23].

Ограничения исследования. При лечении обоих пациентов использовались липид-снижающие препараты группы статинов. Использование статинов может иметь влияние на экспрессию генов, но не объясняет различий в экспрессии генов между типами атеросклеротических бляшек. Несмотря на это, мы не можем отделить изменения экспрессии генов, вызванные патологическим состоянием, от тех, которые вызваны статинами или другими лекарственными препаратами.

Заключение

В заключение следует отметить, что развитие атеросклеротической бляшки значительно нарушает функцию артериальной стенки сосудов и приводит к различной экспрессии множества генов. Проведенный нами анализ экспрессии генов атеросклеротических бляшек человека подтверждает предыдущие ассоциации множества дифференциально экспрессирующихся генов семейств аполипопротеинов и рецепторов, относящиеся к метаболизму холестерина.

Полученные данные являются основой для разработки тест-систем с целью определения динамики атеросклеротического процесса и прогнозирования его осложнений.

Литература / References

- Noguchi T., Nakao K., Asaumi Y., Morita Y., Otsuka F., Kataoka Y. et al. Noninvasive coronary plaque imaging. *J. Atheroscler. Thromb.* 2018;25(4):281–293. DOI: 10.5551/jat.RV17019.
- Lu M., Peng P., Qiao H., Cui Y., Ma L., Cui B. et al. Association between age and progression of carotid artery atherosclerosis: a serial high resolution magnetic resonance imaging study. *Int. J. Cardiovasc. Imaging.* 2019;35(7):1287–1295. DOI: 10.1007/s10554-019-01538-4.
- Ahmadi A., Argulian E., Leipsic J., Newby D.E., Narula J. From subclinical atherosclerosis to plaque progression and acute coronary events: JACC state-of-the-art review. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2019;74(12):1608–1617. DOI: 10.1016/j.jacc.2019.08.012.
- Sulkava M., Raitoharju E., Levula M., Seppälä I., Lyytikäinen L.P., Mennander A. et al. Differentially expressed genes and canonical pathway expression in human atherosclerotic plaques – Tampere Vascular Study. *Sci. Rep.* 2017;7(1):41483. DOI: 10.1038/srep41483.
- Levula M., Oksala N., Airla N., Zeitlin R., Salenius J-P., Järvinen O. et al. Genes involved in systemic and arterial bed dependent atherosclerosis – Tampere Vascular Study. *PLoS One.* 2012;7(4):e33787. DOI: 10.1371/journal.pone.0033787.
- Иваношук Д.Е., Рагино Ю.И., Шахтштейнер Е.В., Михайлова С.В., Фишман В.С., Полонская Я.В. и др. Анализ дифференциальной экспрессии матричных металлопротеиназ в стабильной и нестабильной атеросклеротических бляшках методом полногеномного секвенирования РНК: пилотное исследование. *Российский кардиологический журнал.* 2018;(8):52–58. DOI: 10.15829/1560-4071-2018-8-52-58.
- Ivanoschuk D.E., Ragino Yu.I., Shakhshneider E.V., Mikhailova S.V., Fishman V.S., Polonskaya Ya.V. et al. Analysis of differential expression of matrix metalloproteinases in stable and unstable atherosclerotic lesions by a method of full genome sequencing of RNA: Pilot study. *Russian Journal of Cardiology.* 2018;(8):52–58 (In Russ.). DOI: 10.15829/1560-4071-2018-8-52-58.
- Murashov I.S., Volkov A.M., Kazanskaya G.M., Kliver E.E., Chernyavsky A.M., Nikityuk D.B. et al. Immunohistochemical features of different types of unstable atherosclerotic plaques of coronary arteries. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2018;166(1):102–106. DOI: 10.1007/s10517-018-4297-1.
- Liu W., Zhao Y., Wu J. Gene expression profile analysis of the progression of carotid atherosclerotic plaques. *Mol. Med. Rep.* 2018;17(4):5789–5795. DOI: 10.3892/mmr.2018.8575.
- Назаренко М.С., Марков А.В., Слепцов А.А., Королёва Ю.А., Шарыш Д.В., Зарубин А.А. и др. Сравнительный анализ экспрессии генов в клетках сосудов у больных с клинически выраженным атеросклерозом. *Биомедицинская химия.* 2018;64(5):416–422. DOI: 10.18097/pbmc20186405416.
- Nazarenko M.S., Markov A.V., Sleptsov A.A., Koroleva I.A., Sharysh D.V., Zarubin A.A. et al. Comparative analysis of gene expression in vascular cells of patients with advanced atherosclerosis. *Biomeditsinskaya Khimiya.* 2018;64(5):416–422 (In Russ.). DOI: 10.18097/pbmc20186405416.
- Vrablik M., Tichý L., Freiburger T., Blaha V., Satny M., Hubacek J.A. Genetics of familial hypercholesterolemia: New insights. *Front. Genet.* 2020;11:574474. DOI: 10.3389/fgene.2020.574474.
- Lumsden A.L., Mulugeta A., Zhou A., Hyppönen E. Apolipoprotein E (APOE) genotype-associated disease risks: a phenotype-wide, registry-based, case-control study utilising the UK Biobank. *EBioMedicine.* 2020;59:102954. DOI: 10.1016/j.ebiom.2020.102954.
- Welty F.K. Hypobetalipoproteinemia and abetalipoproteinemia: Liver disease and cardiovascular disease. *Curr. Opin. Lipidol.* 2020;31(2):49–55. DOI: 10.1097/MOL.0000000000000663.
- Fuier E.V., Gafencu A.V. Apolipoprotein C1: Its pleiotropic effects in lipid metabolism and beyond. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(23):5939. DOI: 10.3390/ijms20235939.

14. Marais A.D. Apolipoprotein E in lipoprotein metabolism, health and cardiovascular disease. *Pathology*. 2019;51(2):165–176. DOI: 10.1016/j.pathol.2018.11.002.
15. Low-Kam C., Rhoads D., Lo K.S., Barhdadi A., Boulé M., Alem S. et al. Variants at the APOE /C1/C2/C4 Locus Modulate Cholesterol Efflux Capacity Independently of High-Density Lipoprotein Cholesterol. *J. Am. Heart Assoc.* 2018;7(16):e009545. DOI: 10.1161/JAHA.118.009545.
16. Shi Y., Andhey P.S., Ising C., Wang K., Snipes L.L., Boyer K. et al. Overexpressing low-density lipoprotein receptor reduces tau-associated neurodegeneration in relation to apoE-linked mechanisms. *Neuron*. 2021;109(15):2413–2426.e7. DOI: 10.1016/j.neuron.2021.05.034.
17. Krishnan N., Chen X., Donnelly-Roberts D., Mohler E.G., Holtzman D.M., Gopalakrishnan S.M. Small molecule phenotypic screen identifies novel regulators of LDLR expression. *ACS Chem. Biol.* 2020;15(12):3262–3274. DOI: 10.1021/acscchembio.0c00851.
18. Sobati S., Shakouri A., Edalati M., Mohammadnejad D., Parvan R., Masoumi J. et al. PCSK9: A key target for the Treatment of Cardiovascular Disease (CVD). *Adv. Pharm. Bull.* 2020;10(4):502–511. DOI: 10.34172/apb.2020.062.
19. Crone B., Krause A.M., Hornsby W.E., Willer C.J., Surakka I. Translating genetic association of lipid levels for biological and clinical application. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 2021;35(3):617–626. DOI: 10.1007/s10557-021-07156-4.
20. Schaefer E.J., Geller A.S., Endress G. The biochemical and genetic diagnosis of lipid disorders. *Curr. Opin. Lipidol.* 2019;30(2):56–62. DOI: 10.1097/MOL.0000000000000590.
21. Kumari A., Kristensen K.K., Ploug M., Winther A.L. The importance of lipoprotein lipase regulation in atherosclerosis. *Biomedicines*. 2021;9(7):782. DOI: 10.3390/biomedicines9070782.
22. Nakagawa Y., Shimano H. CREBH regulates systemic glucose and lipid metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(5):1396. DOI: 10.3390/ijms19051396.
23. Aryal B., Price N.L., Suarez Y., Fernández-Hernando C. ANGPTL4 in metabolic and cardiovascular disease. *Trends Mol. Med.* 2019;25(8):723–734. DOI: 10.1016/j.molmed.2019.05.010.

Информация о вкладе авторов

Все члены группы авторов отвечают всем четырем критериям авторства и дополнительно участвовали в подготовке следующих разделов:

Шахтшнейдер Е.В. – полногеномное секвенирование РНК, анализ данных, подготовка рукописи.

Иванощук Д.Е. – полногеномное секвенирование РНК, анализ данных, подготовка рукописи.

Рагино Ю.И. – анализ данных биохимических исследований.

Фишман В.С. – биоинформационный анализ.

Полонская Я.В. – иммуноферментный анализ.

Каштанова Е.В. – иммуноферментный анализ.

Чернявский А.М. – интраоперационный забор атеросклеротических бляшек, анализ клинических данных, проверка содержания рукописи.

Мурашов И.С. – гистологическое исследование атеросклеротических бляшек.

Воевода М.И. – разработка концепции и дизайна исследования, окончательное утверждение для публикации рукописи.

Сведения об авторах

Шахтшнейдер Елена Владимировна, канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник, лаборатория молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук; ведущий научный сотрудник, сектор изучения моногенных форм распространенных заболеваний человека, Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук. ORCID 0000-0001-6108-1025.
E-mail: 2117409@mail.ru; shakhtshneyderev@bionet.nsc.ru.

Иванощук Динара Евгеньевна, научный сотрудник, лаборатория молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук; младший научный сотрудник, лаборатория молекулярной генетики человека, Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук. ORCID 0000-0002-0403-545X.
E-mail: dinara2084@mail.ru.

Рагино Юлия Игоревна, д-р мед. наук, профессор, чл.-корр. РАН, главный научный сотрудник, Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук. ORCID 0000-0002-4936-8362.
E-mail: ragino@mail.ru.

Фишман Вениамин Семенович, ведущий научный сотрудник, сектор геномных механизмов онтогенеза, Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук. ORCID 0000-0002-5573-3100.
E-mail: minja@bionet.nsc.ru.

Полонская Яна Владимировна, канд. мед. наук, старший научный

Information on author contributions

All authors met all four criteria for authorship and, additionally, contributed to the preparation of the following sections:

Shakhtshneider E.V. – genome-wide RNA sequencing, data analysis, and manuscript preparation.

Ivanoshchuk D.E. – genome-wide RNA sequencing, data analysis, and manuscript preparation.

Ragino Yu.I. – biochemical data analysis.

Fishman V.S. – bioinformatics analysis.

Polonskaya Ya.V. – enzyme-linked immunosorbent assay.

E.V. Kashtanova – enzyme-linked immunosorbent assay.

Chernyavsky AM – intraoperative collection of atherosclerotic plaques, analysis of clinical data, and revision of the manuscript.

Murashov I.S. – histological examination of atherosclerotic plaques.

Voevoda M.I. – study concept, study design, and final approval of the manuscript for publication.

Information about the authors

Elena V. Shakhtshneider, Cand. Sci. (Med.), Leading Research Scientist, Laboratory of Molecular Genetic Study of Therapeutic Diseases, Research Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of the Institute of Cytology and Genetics; Leading Research Scientist, Laboratory of Monogenic Forms of Common Human Diseases, Institute of Cytology and Genetics. ORCID 0000-0001-6108-1025.

E-mail: 2117409@mail.ru; shakhtshneyderev@bionet.nsc.ru.

Dinara E. Ivanoshchuk, Junior Research Scientist, Laboratory of Human Molecular Genetics, Institute of Cytology and Genetics; Research Scientist, Laboratory of Molecular Genetic Study of Therapeutic Diseases, Research Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of the Institute of Cytology and Genetics. ORCID 0000-0002-0403-545X.

E-mail: dinara2084@mail.ru.

Yuliya I. Ragino, Dr. Sci. (Med.), Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Professor, Chief Research Scientist, Research Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of the Institute of Cytology and Genetics. ORCID 0000-0002-4936-8362.

E-mail: ragino@mail.ru.

Veniamin S. Fishman, Dr. Sci. (Med.), Leading Research Scientist, Department of Genomic Mechanisms of Ontogenesis, Institute of Cytology and Genetics. ORCID 0000-0002-5573-3100.

E-mail: minja@bionet.nsc.ru.

Yana V. Polonskaya, Cand. Sci. (Med.), Senior Research Scientist, Laboratory of Clinical Biochemical and Hormonal Study of Therapeutic Diseases, Research Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of the Institute of Cytology and Genetics. ORCID 0000-0002-3538-0280;

E-mail: yana-polonskaya@yandex.ru.

Elena V. Kashtanova, Dr. Sci. (Biol.), Senior Research Scientist, Laboratory of Clinical Biochemical and Hormonal Study of Therapeutic Diseases, Research Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of

сотрудник, лаборатория клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний, Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук. ORCID 0000-0002-3538-0280.

E-mail: yana-polonskaya@yandex.ru.

Каштанова Елена Владимировна, д-р биол. наук, старший научный сотрудник, лаборатория клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний, Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук. ORCID 0000-0003-2268-4186.

E-mail: elekastanova@yandex.ru.

Чернявский Александр Михайлович, д-р мед. наук, профессор, руководитель Центра хирургии аорты, коронарных и периферических артерий, Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0001-9818-8678.

E-mail: amchern@mail.ru.

Мурашов Иван Сергеевич, научный сотрудник, лаборатория патоморфологии, Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0002-3712-1258.

E-mail: ivmurashov@gmail.com.

Воевода Михаил Иванович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, заведующий отделом молекулярной генетики человека, Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук. ORCID 0000-0001-9425-413X.

E-mail: mvoevoda@yandex.ru.

 **Шахтшнейдер Елена Владимировна**, e-mail: 2117409@mail.ru; shakhtshneyderev@bionet.nsc.ru.

the Institute of Cytology and Genetics. ORCID 0000-0003-2268-4186.

E-mail: elekastanova@yandex.ru.

Alexander M. Chernyavsky, PhD, MD, Professor, Honorary Scientist of the Russian Federation, Head of the Center for Aortic and Coronary Artery Surgery, National Medical Research Center named after Academician E.N. Meshalkin. ORCID 0000-0001-9818-8678.

E-mail: amchern@mail.ru.

Чернявский Александр Михайлович, д-р мед. наук, профессор, руководитель Центра хирургии аорты, коронарных и периферических артерий, Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0001-9818-8678.

Ivan S. Murashov, junior researcher pathomorphology and electron microscopy laboratories, National Medical Research Center named after Academician E.N. Meshalkin. ORCID 0000-0002-3712-1258.

E-mail: ivmurashov@gmail.com.

Michael I. Voevoda, a member of the Russian Academy of Sciences, PhD, MD, ScD, Professor, head of the Department of Human Molecular Genetics, the Institute of Cytology and Genetics. ORCID 0000-0001-9425-413X.

E-mail: mvoevoda@ya.ru.

 **Elena V. Shakhtshneider**, e-mail: 2117409@mail.ru; shakhtshneyderev@bionet.nsc.ru.

Received July 07, 2021

Поступила 21.07.2021