



© Е. П. Демина¹,
В. В. Мирошникова¹,
Н. В. Майоров²,
В. В. Давыденко²,
А. Л. Шварцман^{1,3}

¹ФГБУ Санкт-Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова;

²Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова;

³ФГБУ НИИ экспериментальной медицины Северо-Западного отделения Российской академии медицинских наук, Санкт-Петербург

✳ **Ядерные рецепторы $LXR\alpha/\beta$ и $PPAR\gamma$ играют важную роль в регуляции липидного обмена и обратного транспорта холестерина. Однако влияние уровней экспрессии генов $LXR\alpha/\beta$ и $PPAR\gamma$ в макрофагах при развитии атеросклероза остается практически неизученным. Методом полимеразной цепной реакции в реальном времени определяли содержания $LXR\alpha$ мРНК, мРНК $LXR\beta$ и $PPAR\gamma$ мРНК в макрофагах, культивированных в течение 5 суток с колониестимулирующим фактором макрофагов М-CSF. Уровень $LXR\beta$ мРНК и $PPAR\gamma$ мРНК у пациентов со стенозом коронарных артерий был понижен по сравнению с контрольной группой, $p < 0,001$. Уровень мРНК $LXR\alpha$ в макрофагах в исследуемых группах не отличался ($p = 0,17$). Мы предполагаем, что уровни экспрессии генов $LXR\beta$ и $PPAR\gamma$ в макрофагах могут быть значимыми факторами, ассоциированными с развитием атеросклероза.**

✳ **Ключевые слова:** атеросклероз; стеноз коронарных артерий; макрофаги; гены $LXR\alpha/\beta$, ген $PPAR\gamma$.

Поступила в редакцию 03.06.2013
Принята к публикации 30.12.2013

СНИЖЕНИЕ УРОВНЯ $LXR\beta$ мРНК И $PPAR\gamma$ мРНК В МАКРОФАГАХ, СТИМУЛИРОВАННЫХ КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩИМ ФАКТОРОМ М-CSF У БОЛЬНЫХ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ

Принятые сокращения: ОТХ — обратный транспорт холестерина, LXR — печеночный X рецептор, М-CSF — колониестимулирующий фактор макрофагов, PPAR — рецептор активации пролиферации пероксисом.

ВВЕДЕНИЕ

В понимании механизмов развития атеросклероза важное значение имеют печеночные X рецепторы (LXR), $LXR\alpha$ и $LXR\beta$ относящиеся к семейству ядерных рецепторов, которые регулируют гомеостаз и обратный транспорт холестерина (ОТХ), усиливают экспрессию аполипопротеина Е и транспортеров ABCA1 и ABCG1 (Bensinger et al., 2008; Oosterveer et al., 2010).

Значительный интерес в атерогенезе представляет и рецептор активации пролиферации пероксисом (PPAR) γ , который также относится к семейству ядерных рецепторов и играет ключевую роль в регуляции энергообмена и липидного обмена (Wahli et al., 2012). Было показано, что $PPAR\gamma$ экспрессируется в макрофагах и в пенистых клетках в местах атеросклеротических поражений (Apostoli et al., 2012), и его экспрессия может критически влиять на функции макрофагов, включая их активацию, продукцию цитокинов и их преобразование в пенистые клетки, что, в свою очередь, влияет на развитие атеросклероза.

Таким образом, можно предположить, что изменение уровня экспрессии ядерных рецепторов $LXR\alpha$, $LXR\beta$ и $PPAR\gamma$ может оказывать влияние на эффективность ОТХ и, как следствие, на предрасположенность к развитию атеросклероза у человека.

Цель данной работы заключалась в оценке уровня мРНК генов $LXR\alpha$, $LXR\beta$ и $PPAR\gamma$ в макрофагах у пациентов с атеросклерозом и у лиц без сердечно-сосудистой патологии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Проведение данной работы одобрено этическим комитетом Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова.

Группу пациентов составили 11 человек с атеросклерозом, подтвержденным при ангиографическом исследовании. Ангиографическая диагностика атеросклероза проводилась на кафедре госпитальной хирургии № 2 ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова. Группа больных была гетерогенной по степени локального (% окклюзии артерии атерогенной бляшкой) и диффузного (общее количество артерий, пораженных атеросклерозом) атеросклероза. Однако у всех больных, в как минимум, в одной артерии коронарного бассейна выявлен стеноз более 50%. Пациенты, вошедшие в выборку, не принимали ни статинов, ни каких-либо иных гиполипидемических средств. Контрольная группа состояла из 11 человек без сердечно-сосудистых заболеваний в анамнезе. Группа соответствовала группе пациентов по полу и возрасту. Характеристики исследованных групп представлены в таблице 1.

Таблица 1

Характеристики исследованных групп

Показатели		Пациенты (N=11)	Контроль (N=11)	p
Средний возраст		54,2 ± 2,1	49,8 ± 3,5	0,22
Пол	мужской	11	11	
	женский	0	0	
Общий холестерин, ммоль/л		4,85 ± 1,31	5,33 ± 1,18	0,37
Х-ЛПВП, ммоль/л		1,22 ± 0,25	1,49 ± 0,33	0,09
Х-ЛПНП, ммоль/л		2,60 ± 1,06	3,09 ± 0,90	0,26
Х-ЛПОНП, ммоль/л		1,02 ± 0,55	0,75 ± 0,47	0,26
Триглицериды, ммоль/л		2,26 ± 1,21	1,66 ± 1,03	0,34
Коэффициент атерогенности		2,96 ± 0,62	2,73 ± 1,18	0,34
Средний стеноз		2,20 ± 0,81		
Кол-во артерий		5,87 ± 3,83		
Курение		4	3	
Диабет		1	0	

При постановке диагноза у всех пациентов и представителей контрольной группы измеряли энзиматическим колориметрическим методом с использованием наборов BioSystems (Испания) концентрацию общего холестерина и холестерина в составе липопротеинов высокой плотности в плазме крови.

Для получения макрофагов свежесобранную кровь смешивали в равном соотношении с фосфатно-солевым буферным раствором (PBS). Смесь наслаивали на фикоколл-верографин, центрифугировали (1500 об/мин, 30 мин), мононуклеары промывали в PBS, центрифугировали (1500 об/мин, 15 мин). Затем клетки ресуспендировали в культуральной среде (альфаMEM, 10 % эмбриональная сыворотка, 5 мкг/мл антибиотиков (пенициллин G, стрептомицин), 15 нг/мл M-CSF) и инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 2 ч. После чего прикрепившиеся к чашкам Петри моноциты культивировали в присутствии фактора макрофагов M-CSF 15 нг/мл (R&D Systems, США) в течение 5 суток с ежедневной заменой питательной среды. Клетки отмывали в PBS, центрифугировали, хранили при температуре -86 °C.

Для выделения тотальной мРНК и проведения реакции обратной транскрипции были использованы наборы RNeasy Minikit (Qiagen, Германия) и cDNA synthesis kit (Fermentas, Литва). Чистоту РНК оценивали по отношению поглощения при длинах волн 260 и 280 нм (критерий чистоты 1.8). Уровень мРНК генов *LXRα*, *LXRβ*, *PPARγ* определяли методом ПЦР в реальном времени на приборе CFX96 (BioRad, США). Последовательности праймеров и зондов, использованные в данной работе (Бигль, Санкт-Петербург), представлены в таблице 2. После денатурации при 95 °C в течение 10 мин проводили 45 циклов амплификации в следующем температурно-временном режиме: плавление 95 °C — 30 с, отжиг-синтез 60 °C — 30 с. Измерения для каждой пробы повторяли в трех экземплярах. Относительное содержание мРНК *LXRα*, мРНК *LXRβ*, мРНК *PPARγ* рассчитывали методом стандартных кривых. Количество мРНК *LXRα*, мРНК *LXRβ*, мРНК *PPARγ* нормировали по отношению к мРНК эндогенного гена *ACTB*, т.е. делили количество мРНК *LXRα*, мРНК *LXRβ*, мРНК *PPARγ*, рассчитанное с использованием CFX96 (BioRad,

Таблица 2

Праймеры и зонды, использованные в работе

Ген	Последовательности праймеров и зондов
<i>LXRα</i>	5'-CTTGCTCATTGCTATCAGCATCTT-3'
	5'-ACATATGTGTGCTGCAGCCTCT-3'
	5'-FAM-TCTGCAGACCGGCCAACGTG-RTQ1-3'
<i>LXRβ</i>	5'-CTTCGCTAAGCAAGTGCCTG-3'
	5'-GCAGCATGATCTCGATAGTGG-3'
	5'-CGGGAGGACCAGATCGCCCT-RTQ1-3'
<i>PPARγ</i>	5'-GATGTCTCATAATGCCATCAGGTT-3'
	5'-GGATTCAGCTGGTCGATATCACT-3'
	5'-FAM-CCAACAGCTTCTCCTTCTCGGCCTG-RTQ1-3'
<i>ACTB</i>	5'-CGTGCTGCTGACCGAGG-3'
	5'-ACAGCCTGGATAGCAACGTACA-3'
	5'-R6G-CCAACCGCGAGAAGATGACCCAGAT-BHQ1-3'

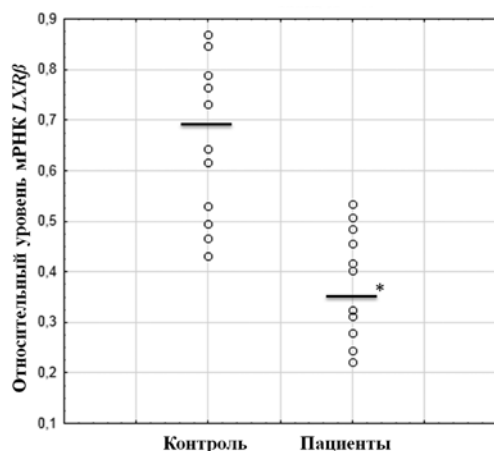


Рис. 1. Относительные уровни *LXRβ* мРНК в макрофагах для группы пациентов и контрольной группы, * — $p < 0,001$. Нормирование результатов проведено с помощью измерений соответствующих показателей для гена β -актина. Ось абсцисс — исследуемые группы; ось ординат — относительный уровень мРНК (отн. ед.)

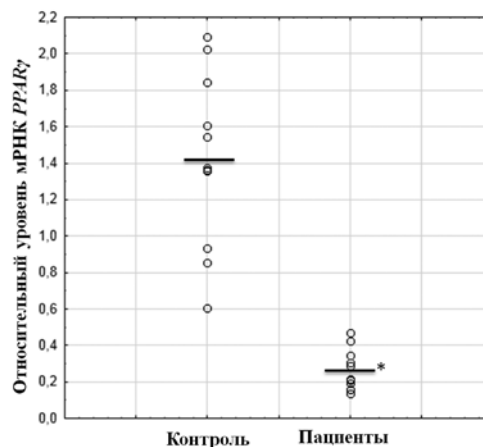


Рис. 2. Относительные уровни *PPARγ* мРНК в макрофагах для группы пациентов и контрольной группы, * — $p < 0,001$. Нормирование результатов проведено с помощью измерений соответствующих показателей для гена β -актина. Ось абсцисс — исследуемые группы; ось ординат — относительный уровень мРНК (отн. ед.)

США), на количество мРНК *ACTB* с последующим усреднением данных, расчетом отклонений и вычислением погрешности.

Статистическую обработку данных провели при помощи пакета программ Statistica 6.0. Показатели, полученные в различных группах, сравнивали с помощью непараметрического метода U-теста Манна–Уитни ($p < 0,05$ принимали за значимый уровень достоверности). Для анализа корреляции между количественными характеристиками использовался метод корреляции по Спирмену (Zar J. H. (1998) Biostatistical Analysis).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Наши эксперименты продемонстрировали достоверное снижение содержания мРНК *LXRβ* ($p < 0,001$) и мРНК *PPARγ* ($p < 0,001$) в макрофагах, стимулированных колониестимулирующим фактором M-CSF, после 5 суток культивирования у пациентов с атеросклерозом по сравнению с контрольной группой (рис. 1–2).

Уровень мРНК *LXRα* в макрофагах в исследуемых группах не отличался ($p = 0,17$) (рис. 3).

Корреляции уровня экспрессии генов *LXRα*, *LXRβ*, *PPARγ* с показателями липидного спектра крови и со степенью атеросклеротических повреждений не выявлено (данные не приведены).

ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение молекулярных механизмов атеросклероза артерий и возможности его коррекции в настоящее время приобрели особую значимость в связи с ростом заболевания практически во всех исследуемых популяциях. При этом особое внимание в исследованиях уделяется

макрофагам артериальной стенки, представляющих собой основной тип клеток, участвующих в метаболизме липидов при атеросклерозе (Rader et al., 2005).

ОТХ является основным процессом в снижении содержания холестерина в макрофагах и регресса атеросклеротической бляшки (Meurs et al., 2010). Несмотря на наличие большого количества информации о роли *LXRα*, *LXRβ* и *PPARγ* как противовоспалительных и антиатерогенных медиаторов, в настоящее время практически нет данных о роли экспрессии данных генов в развитии атеросклероза.

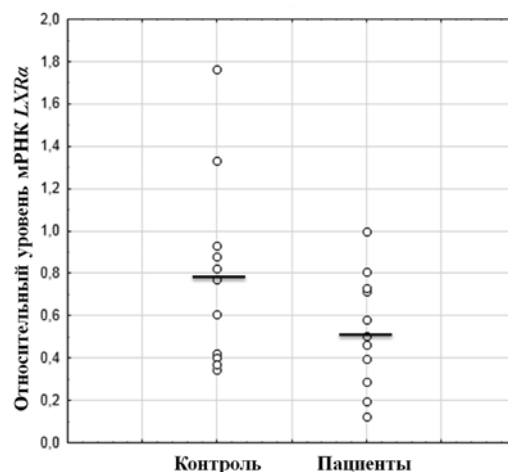


Рис. 3. Относительные уровни *LXRα* мРНК в макрофагах для группы пациентов и контрольной группы. Нормирование результатов проведено с помощью измерений соответствующих показателей для гена β -актина. Ось абсцисс — исследуемые группы; ось ординат — относительный уровень мРНК (отн. ед.)

Именно определение уровня экспрессии этих транскрипционных факторов в макрофагах, стимулированных колониестимулирующим фактором M-CSF, предпринято в настоящем исследовании.

Наше исследование продемонстрировало отсутствие корреляции уровня экспрессии генов *LXRα*, *LXRβ*, *PPARγ* с показателями липидного спектра крови. Логично предположить, что только уровень мРНК генов ядерных рецепторов не определяет концентрацию липидов плазмы крови. Полученные данные свидетельствуют, что в липидный обмен вовлечены многие факторы, и нет прямой связи между показателями липидного спектра крови с уровнем транскрипционных факторов.

Было показано статистически значимое снижение содержания *PPARγ* мРНК в макрофагах после 5 суток культивирования у пациентов с атеросклерозом по сравнению с контрольной группой. Полученные пилотные данные могут свидетельствовать о том, что уменьшение уровня *PPARγ* мРНК может быть ассоциировано с развитием атеросклероза.

В литературе существуют значительные противоречия относительно роли *PPARγ* в развитии атеросклероза. Наши данные согласуются с результатами, в которых было отмечено снижение уровня экспрессии *PPARγ* в атеросклеротических бляшках (Soumian et al., 2005) и в макрофагах, коррелировавшее с прогрессией атеросклероза (Giaginis et al., 2011).

С другой стороны, было показано значительное повышение содержания *PPARγ* в макрофагах человека при атеросклерозе (Amoruso et al., 2009). В работе Sueyoshi и др. (Sueyoshi et al., 2010) также было показано, что уровень *PPARγ* мРНК в атероматозных бляшках был достоверно выше, чем содержание *PPARγ* мРНК в интиме сосуда. Эти данные дают возможность предположить, что экспрессия *PPARγ* может быть связана с формированием атеросклеротических бляшек и *PPARγ* участвует в ранних стадиях развития атеросклероза у человека.

LXR играют ключевую роль в патогенезе атеросклероза, регулируя экспрессию важных генов, вовлеченных в липидный гомеостаз и воспалительную реакцию в макрофагах (Bensinger et al., 2008; Oosterveer et al., 2010). Более того установлено, что *LXR* ингибируют атеросклероз *in vitro* и *in vivo* (Calkin et al., 2012). При этом было продемонстрировано, что *LXR* агонисты увеличивают ОТХ за счет усиления экспрессии транспортеров *ABCA1* и *ABCG1* в макрофагах, что является основным моментом механизма *LXR*-зависимой защиты от атеросклероза (Calkin et al., 2012).

В нашем исследовании установлено сниженное содержание *LXRβ* мРНК в макрофагах после 5 суток культивирования у пациентов с атеросклерозом по сравнению с контрольной группой, в то время как в содержании *LXRα* мРНК разница не показана.

Таким образом, наше пилотное исследование показало, что уровни экспрессии генов *LXRβ* и *PPARγ* в макрофагах могут быть значимыми факторами, ассоциированными с развитием атеросклероза.

Работа поддержана РФФИ (грант № 10-04-01151-а).

ЛИТЕРАТУРА

1. Amoruso A., Bardelli C., Fresu L. G. et al. (2009) **Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Expression in Monocyte/Macrophages from Coronary Artery Disease Patients and Possible Gender Differences.** *J. Pharmacol. Exp Ther.* V. 331 (2): P. 531–538.
2. Apostoli A.J., Nicol C.J. (2012) **PPAR Medicines and Human Disease: The ABCs of It All.** *PPAR Res.* 2012:504918.
3. Bensinger S.J., Tontonoz P. (2008) **Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors.** *Nature.* V. 454: P. 470–477.
4. Calkin A. C., Tontonoz P. (2012) **Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* V. 13(4): P. 213–24.
5. Giaginis C., Klonaris C., Katsargyris A. et al. (2011) **Correlation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma (PPAR-gamma) and Retinoid X Receptor-alpha (RXR-alpha) expression with clinical risk factors in patients with advanced carotid atherosclerosis.** *Med. Sci. Monit.* V. 17 (7): P. 381–391.
6. Li A. C., Binder C.J., Gutierrez A. et al. (2004) **Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPARalpha, beta/delta, and gamma.** *J Clin. Invest.* V. 114 (11): P. 1564–1576.
7. Meurs I., Van Eck M., Van Berkel T.J. (2010) **High-density lipoprotein: key molecule in cholesterol efflux and the prevention of atherosclerosis.** *Curr. Pharm. Des.* V. 16: P. 1445–1467.
8. Oosterveer M.H., Greifhorst A., Groen A.K. et al. (2010) **The liver X receptor: control of cellular lipid homeostasis and beyond: implications for drug design.** *Prog. Lipid. Res.* V. 49: P. 343–352.
9. Rader D. J., Pure E. (2005) **Lipoproteins, macrophage function, and atherosclerosis: beyond the foam cell?** *Cell metabolism.* V. 1: P. 223–230.
10. Soumian S., Gibbs R., Davies A. et al. (2005) **mRNA expression of genes involved in lipid efflux and matrix degradation in occlusive and ectatic atherosclerotic disease.** *J. Clin. Pathol.* V. 58: P. 1255–1260.
11. Sueyoshi S., Mitsumata M., Kusumi Y. et al. (2010) **Increased expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha and PPAR-gamma in human atherosclerosis.** *Pathol. Res. Pract.* V. 206 (7): P. 429–438.

12. Wahli W., Michalik L. (2012) **PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation.** *Trends Endocrinol. Metab.* V. 23 (7): P. 351–363.
13. Zar J.H. (1998) **Biostatistical Analysis.** 4th edition. Prentice Hall.

REDUCING OF *LXR β* AND *PPAR γ* MRNA IN M-CSF STIMULATED MACROPHAGES IN PATIENTS WITH LEVELS ATHEROSCLEROSIS

Demina Ye. P., Miroshnikova V. V., Mayorov N. V., Davydenko V. V., Schwartzman A. L.

☼ **SUMMARY:** Nuclear receptors *LXR α/β* and *PPAR γ* play an important role in lipid metabolism and reverse cholesterol transport. However, the influence of *LXR α/β* and *PPAR γ* mRNA levels in macrophages on atherosclerosis remains unexplored. Using real time PCR, we determined *LXR α* mRNA, *LXR β* mRNA and *PPAR γ* mRNA levels in macrophages cultured for 5 days with macrophage colony-stimulating factor (M-CSF). Levels of *LXR β* mRNA and *PPAR γ* mRNA in patients with arterial stenosis were reduced when compared with the control group, $p < 0.001$. *LXR α* gene mRNA level in macrophages was not changed in the study groups, ($p = 0.17$). Thus, our study shows that the *LXR β* and *PPAR γ* genes expression levels in macrophages may be significant factors associated with the development of atherosclerosis.

☼ **KEY WORDS:** artery stenosis; atherosclerosis; *LXR α/β* genes; macrophages; *PPAR γ* gene.

☼ Информация об авторах

Демина Екатерина Петровна — научный сотрудник. Отдел молекулярной и радиационной биофизики, лаборатория молекулярной генетики человека. ФГБУ Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова. Россия, 188300, Ленинградская обл., г. Гатчина, Орлова роща. E-mail: citritt@gmail.com.

Мирошникова Валентина Вадимовна — младший научный сотрудник. Отдел молекулярной и радиационной биофизики, лаборатория молекулярной генетики человека. ФГБУ Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова. Россия, 188300, Ленинградская обл., г. Гатчина, Орлова роща. E-mail: mutantropol@mail.ru.

Майоров Николай Владимирович — аспирант. Кафедра госпитальной хирургии № 2. Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова. 197089, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6/8. E-mail: nikolaj-majorov@yandex.ru.

Давыденко Владимир Валентинович — профессор. Кафедра госпитальной хирургии № 2. Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова. 197089, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6/8. E-mail: kuzet@mail.ru.

Шварцман Александр Львович — д. б. н., зав. лаб. Отдел молекулярной и радиационной биофизики, лаборатория молекулярной генетики человека. ФГБУ Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова. 188300, Гатчина. Отдел молекулярной генетики. ФГБУ Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины Северо-Западного отделения РАМН. 197376, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, д. 12. E-mail: aschwart1@yandex.ru.

Demina Yekaterina Petrovna — Molecular and Radiation Biophysics Department. B. P. Konstantinov Nuclear Physics Institute in Saint-Petersburg. 188300, Leningrad Region, Gatchina, Orlova rosha. E-mail: citritt@gmail.com.

Miroshnikova Valentina Vadimovna — Molecular and Radiation Biophysics Department. B. P. Konstantinov Nuclear Physics Institute in Saint-Petersburg. Russia, 188300, Leningrad Region, Gatchina, Orlova rosha. E-mail: mutantropol@mail.ru.

Mayorov Nikolay Vladimirovich — Hospital Surgery Department N 2. Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University. 197089, Saint-Petersburg, Lva Tolstogo St., 6/8. Russia. E-mail: nikolaj-majorov@yandex.ru.

Davydenko Vladimir Valentinovich — Hospital Surgery Department N 2. Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University. 197089, Saint-Petersburg, Lva Tolstogo St., 6/8. Russia. E-mail: kuzet@mail.ru.

Schwarzman Alexander Lvovich — Molecular and Radiation Biophysics Department. B. P. Konstantinov Nuclear Physics Institute in Saint-Petersburg. 188300, Gatchina. Russia. Molecular genetics Department. Institute of Experimental Medicine of the North West Branch of the Russian Academy of Medical Sciences. 197376, Saint-Petersburg, academica Pavlova St., 12. Russia. E-mail: aschwart1@yandex.ru.