

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ»
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧЕРЕЖДЕНИЕ «ПЕТЕРБУРГСКИЙ ИНСТИТУТ ЯДЕРНОЙ
ФИЗИКИ им. Б. П. КОНСТАНТИНОВА»

На правах рукописи

Мирошникова Валентина Вадимовна

РОЛЬ ТРАНСПОРТЕРА ABCG1 И АПОЛИПОПРОТЕИНА А-1
В ФОРМИРОВАНИИ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К АТЕРОСКЛЕРОЗУ

03.01.03 – молекулярная биология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Шварцман А.Л.

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ
2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1 Патогенез атеросклероза. Роль липопротеинов	12
1.1.1 Патоморфология атеросклероза.....	12
1.1.2 Система транспорта липидов в плазме крови	14
1.1.3 Антиатерогенные функции липопротеинов высокой плотности.....	17
1.1.4 Роль макрофагов в патогенезе атеросклероза	19
1.2 Обратный транспорт холестерина.....	20
1.3 Роль аполипопротеина А-I в развитии атеросклероза	23
1.3.1 Антиатерогенные свойства аполипопротеина А-I.....	24
1.3.2 Структура аполипопротеина А-I в составе ЛПВП.....	25
1.3.3 Мутации и варианты в кодирующей области гена <i>APOA1</i>	26
1.3.4 Регуляция экспрессии гена <i>APOA1</i>	29
1.3.5 Полиморфные варианты в регуляторных областях гена <i>APOA1</i>	29
1.4 Роль транспортера <i>ABCG1</i> в развитии атеросклероза.....	35
1.4.1 Структура и функции белка <i>ABCG1</i>	35
1.4.2 Изоформы белка <i>ABCG1</i>	38
1.4.3 Структура гена <i>ABCG1</i> и регуляция его экспрессии	39
1.4.4 Роль <i>ABCG1</i> в развитии атеросклероза.....	43
1.4.5 Полиморфные варианты гена <i>ABCG1</i>	46
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	50
2.1 Характеристика обследованных групп	50
2.2 Измерение концентрации липидов в плазме крови	53
2.3 Культивирование моноцитов и макрофагов.....	53

2.4 Оценка уровня мРНК гена <i>ABCG1</i>	54
2.5 Оценка содержания белка <i>ABCG1</i>	57
2.6 Выделение геномной ДНК из лейкоцитов периферической крови человека	58
2.7 Полимеразная цепная реакция и рестрикционный анализ	59
2.7.1 Идентификация вариантов $(-134)T>G$ гена <i>ABCG1</i>	60
2.7.2 Идентификация вариантов $(-204)A>C$ гена <i>ABCG1</i>	61
2.7.3 Идентификация вариантов $(-384)G>A$ гена <i>ABCG1</i>	63
2.7.4 Идентификация вариантов $(-75)G>A$ и $83C>T$ гена <i>APOA1</i>	64
2.8 Статистическая обработка данных	65
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	67
3.1 Экспрессия гена <i>ABCG1</i> у пациентов с атеросклерозом	67
3.2 Анализ вклада полиморфных вариантов генов <i>ABCG1</i> и <i>APOA1</i> в формирование предрасположенности к атеросклерозу	73
3.2.1 Анализ вклада вариантов $(-134)T>G$, $(-204)A>C$ и $(-384)G>A$ гена <i>ABCG1</i> в развитие атеросклероза	75
3.2.2 Анализ ассоциации вариантов $(-134)T>G$, $(-204)A>C$ и $(-384)G>A$ гена <i>ABCG1</i> с концентрацией липидов в плазме крови	77
3.2.3 Анализ влияния вариантов $(-134)T>G$ и $(-204)A>C$ на уровень экспрессии гена <i>ABCG1</i>	80
3.2.4 Анализ вклада вариантов $(-75)G>A$ и $83C>T$ гена <i>APOA1</i> в развитие атеросклероза	81
3.2.5 Анализ ассоциации вариантов $(-75)G>A$ и $83C>T$ гена <i>APOA1</i> с концентрацией липидов в плазме крови	83
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	85
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	95

ВЫВОДЫ.....	96
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....	97
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	100

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

7-кето-ХС	7-кетохолестерол
27-ОН-ХС	27-гидроксихолестерол
Апо А-I	аполипопротеин А-I
Апо А-II	аполипопротеин А-II
БПФЛ	белок-переносчик фосфолипидов
БПЭХС	белок-переносчик эфиров холестерина
ДИ	доверительный интервал
ИБС	ишемическая болезнь сердца
ИМ	инфаркт миокарда
ЛП	липопротеины
ЛПВП	липопротеины высокой плотности
ЛПНП	липопротеины низкой плотности
ЛПОНП	липопротеины очень низкой плотности
ЛХАТ	лецитин-холестерин-ацилтрансфераза
ОТХ	обратный транспорт холестерина
ОХС	общий холестерин
ПААГ	полиакриламидный гель
п.н.	пары нуклеотидов
ПЦР	полимеразная цепная реакция
ТГ	триглицериды
ФЛ	фосфолипиды
Х-ЛПВП	холестерин в составе липопротеинов высокой плотности
ХМ	хиломикроны
ХС	холестерин
ЭХС	эфиры холестерина
ABCA1	АТФ-связывающий кассетный транспортер A1
ABCG1	АТФ-связывающий кассетный транспортер G1
OR	отношение шансов

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Заболевания сердечно-сосудистой системы занимают первое место среди причин, приводящих к смерти, во многих странах мира, в том числе в России. По данным Министерства здравоохранения России, смертность от сердечно-сосудистых заболеваний составляет более 50% от всех причин, приводящих к смерти (Бокерия и др., 2007). В период с 1990 по 2010 год смертность от сердечно-сосудистых заболеваний в мире существенно возросла (Lozano et al, 2010). При этом 75-90% всех сердечно-сосудистых заболеваний обусловлены атеросклерозом (Липовецкий, 2012).

Атеросклероз – распространенное заболевание, характеризующееся возникновением в стенках артерий очагов липидной инфильтрации и разрастания соединительной ткани с образованием фиброзных бляшек, суживающих просвет и нарушающих физиологические функции пораженных артерий, что приводит к органным и общим расстройствам кровообращения (Бодрова, Ларионова, 2000). Существенное значение в патогенезе атеросклероза имеют нарушения липидного обмена, в частности, повышение уровня общего холестерина (ОХС) и снижение уровня антиатерогенных липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) плазмы крови (Климов, Никульчева, 1999). Однако атеросклероз нередко развивается и у лиц с нормальным уровнем липидов плазмы крови (Вельков, 2010). Это свидетельствует о том, что ведущую роль в атерогенезе может играть снижение скорости элиминации холестерина (ХС) из клеток интимы артерий, приводящее к его накоплению в артериальной стенке.

Атеросклероз является сложным многофакторным заболеванием, в развитии которого существенное значение имеет генетический компонент. Исследования уровня конкордантности при анализе близнецовых пар показали, что вклад наследственной предрасположенности в развитие сердечно-сосудистой патологии оценивается от 30% до 60% (Sivapalaratnam, 2011). Генетическая предрасположенность относится к немодифицируемым факторам

риска данного заболевания и имеет особенное значение в развитии атеросклероза в молодом возрасте. Известно, что полиморфные варианты генов вносят существенный вклад в вариации липидного профиля плазмы крови и развитие атеросклероза (Teslovich et al, 2010; Edmondson et al, 2011). Эпидемиологические исследования позволяют также предполагать, что изменения на уровне экспрессии генов могут вносить существенный вклад в развитие атеросклероза (Seo et al, 2004; Sinnaeve et al, 2009). Однако конкретные механизмы наследственной предрасположенности к атеросклерозу до настоящего времени остаются недостаточно изученными. Поэтому актуальность исследований, посвященных изучению молекулярно-генетических основ развития атеросклероза, направленных как на создание эффективной системы профилактики данного заболевания, так и на поиск новых молекулярных мишеней для антиатерогенной терапии, не вызывает сомнения.

Учитывая современные представления о патогенезе атеросклероза и роли моноцитов и макрофагов сосудистой стенки в накоплении липидов и инициации формирования атеросклеротических бляшек, для настоящего исследования были выбраны генетические детерминанты, которые предположительно могут определять скорость элиминации ХС из сосудистой стенки. Аполипопротеин А-I (Апо А-I) является основным фактором, определяющим концентрацию ЛПВП в плазме крови, играя при этом важнейшую роль в биосинтезе, структуре и обеспечении функции ЛПВП (Miller et al., 2003; Kontush, Chapman, 2006; Zannis et al, 2006). Снижение концентрации Апо А-I в плазме крови является независимым фактором риска развития атеросклероза (Chan et al, 2006). Транспортёр ABCG1 осуществляет перенос ХС и оксистеролов через мембрану клетки на частицы ЛПВП (Gelissen et al, 2006; Terasaka et al, 2007). Апо А-I и транспортёр ABCG1 играют ключевую роль в эффективной мобилизации ХС из макрофагов и предотвращении их трансформации в пенистые клетки (Jessup et al, 2006;

Mukhamedova et al, 2008). Поэтому в настоящем исследовании была изучена роль экспрессии гена *ABCG1* в моноцитах и макрофагах и полиморфных вариантов генов *ABCG1* и *APOA1* в формировании предрасположенности к атеросклерозу.

Цель исследования

Исследование ассоциации уровня экспрессии гена *ABCG1* и вариантов генов *ABCG1* и *APOA1* с атеросклерозом в популяции Санкт-Петербурга.

Задачи исследования

1. Анализ уровня мРНК гена *ABCG1* и содержания белка *ABCG1* в моноцитах и макрофагах у пациентов с атеросклерозом и в контрольной группе.
2. Анализ ассоциации уровня экспрессии гена *ABCG1* со степенью тяжести атеросклеротических поражений сосудов.
3. Оценка вклада вариантов генов *ABCG1* ((-134)*T>G*, (-204)*A>C* и (-384)*G>A*) и *APOA1* ((-75)*G>A* и 83*C>T*) в риск развития атеросклероза в популяции Санкт-Петербурга.
4. Анализ ассоциации вышеперечисленных вариантов генов *ABCG1* и *APOA1* с уровнем ОХС и Х-ЛПВП плазмы крови.

Научная новизна полученных результатов

1. Впервые у пациентов с атеросклерозом, не принимающих статины и другие гиполипидемические препараты, была исследована экспрессия гена транспортера *ABCG1* в моноцитах и макрофагах, стимулированных фактором макрофагов М-CSF. Впервые показана корреляция уровня экспрессии гена *ABCG1* в моноцитах и степени артериального стеноза у пациентов с атеросклерозом. Впервые выявлен сниженный уровень мРНК

ABCG1 и белка *ABCG1* в дифференцированных макрофагах у пациентов с атеросклерозом.

2. Впервые определены частоты вариантов $(-134)T>G$, $(-204)A>C$ и $(-384)G>A$ гена *ABCG1* в популяции Санкт-Петербурга среди индивидуумов контрольной группы и пациентов с атеросклерозом. Впервые показана ассоциация вариантов $(-134)T>G$ и $(-204)A>C$ гена *ABCG1* с уровнем ОХС плазмы крови у жителей Санкт-Петербурга.
3. Впервые исследован вклад вариантов $(-75)G>A$ и $83C>T$ гена *APOA1* в формирование предрасположенности к атеросклерозу в популяции Санкт-Петербурга. Выявлена ассоциация аллеля *T83* гена *APOA1* с повышением концентрации Х-ЛПВП и со снижением риска развития атеросклероза у жителей Санкт-Петербурга.

Практическое значение работы

Результаты настоящего исследования представляют интерес для понимания молекулярно-генетических основ развития атеросклероза. Показано, что снижение уровня экспрессии гена *ABCG1* в моноцитах и макрофагах может являться значимым фактором в развитии и прогрессировании атеросклеротического процесса. Полученные данные об ассоциации уровня экспрессии гена *ABCG1* с атеросклерозом у человека могут быть полезны для разработки новых методов коррекции атеросклероза. С целью своевременной профилактики полученные данные могут также быть использованы для формирования групп повышенного риска развития атеросклероза.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Уровень мРНК гена *ABCG1* и белка *ABCG1* снижен в макрофагах у пациентов с атеросклерозом.

2. Пациенты с окклюзиями артерий характеризуются пониженным уровнем мРНК гена *ABCG1* в моноцитах по сравнению с пациентами, не имеющими окклюзий, и по сравнению с контрольной группой.
3. Варианты *(-134)G* и *(-204)C* гена *ABCG1* ассоциированы с повышением концентрации ОХС плазмы крови у жителей Санкт-Петербурга.
4. Вариант *T83* гена *APOA1* ассоциирован со снижением относительного риска развития атеросклероза и с повышением концентрации Х-ЛПВП плазмы крови у жителей Санкт-Петербурга.

Личное участие автора в получении результатов, изложенных в диссертации

Осмотр и ангиографическая диагностика атеросклероза у пациентов, забор у них периферической крови, измерения концентрации липидов плазмы крови осуществлялись сотрудниками ПСПбГМУ им ак. И.П. Павлова и Центра атеросклероза и нарушений липидного обмена клинической больницы №122 г. Санкт-Петербурга. Культивирование моноцитов выполнено на базе отдела биохимии НИИЭМ СЗО РАМН под руководством д.м.н., проф. А.Д. Денисенко. Культивирование макрофагов выполнено совместно с научным сотрудником ФГБУ «ПИЯФ» Е.П. Деминой. Анализ уровня мРНК *ABCG1* и содержания белка *ABCG1* в моноцитах и макрофагах выполнен автором лично. Выделение ДНК для создания банка ДНК пациентов с атеросклерозом и контрольной группы выполнено автором лично. Типирование полиморфных вариантов генов *ABCG1* и *APOA1* проведено автором лично. Автор провел статистический анализ всех полученных данных и сформулировал выводы. Описание собственных исследований, анализ и обсуждение результатов выполнены автором самостоятельно. Материалы, вошедшие в представленную работу, обсуждались и публиковались совместно с соавторами и научным руководителем.

Апробация работы

Результаты работы были доложены на Российском национальном конгрессе кардиологов, Москва, 2008; на 7-ом международном симпозиуме «Горизонты молекулярной биологии», Гёттинген, 2010; на Всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия», Санкт-Петербург, 2010; на 65-ом международном научно-практическом конгрессе «Актуальные проблемы современной медицины», Киев, 2011; на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы медицинской науки», Ярославль, 2013; на Европейской конференции по генетике человека, Париж, 2013; на Российском национальном конгрессе кардиологов, Санкт-Петербург, 2013; на 67-ом международном научно-практическом конгрессе «Актуальные проблемы современной медицины», Киев, 2013.

По теме диссертации опубликовано 16 работ, из них 4 статьи.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 133 страницах машинописного текста, содержит 14 таблиц, иллюстрирована 24 рисунками и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения результатов, заключения, выводов, списка работ, опубликованных по теме диссертации, и списка литературы, включающего 266 научных источников (19 – на русском языке и 247 – на иностранном).

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Патогенез атеросклероза. Роль липопротеинов

1.1.1 Патоморфология атеросклероза

Атеросклероз характеризуется инфильтрированием во внутреннюю оболочку артерий крупного и среднего калибра окисленных аполипопротеин-В и холестерин-содержащих липопротеинов (ЛП) с последующим образованием атероматозных бляшек и разрастанием соединительной ткани в очагах поражения (Климов, Никульчева, 1999). Образование атеросклеротической бляшки отражается на кровотоке по сосуду и затрудняет снабжение кровью соответствующего органа. Клиническая картина зависит от локализации атеросклеротических повреждений: наиболее часто развиваются ишемическая болезнь сердца (ИБС), нарушения кровообращения головного мозга, нередко приводящие к инфаркту миокарда (ИМ) и ишемическому инсульту, соответственно, облитерирующий атеросклероз сосудов нижних конечностей (Бодрова, Ларионова, 2000). Однако многочисленные клинические и патологоанатомические наблюдения свидетельствуют, что избирательное поражение какого-либо одного сосудистого региона является скорее исключением, чем правилом. Так, сочетанный атеросклероз коронарных и мозговых артерий встречается в 20-46% случаев, коронарных и периферических артерий – в 16-90 % (Карпов, Дудко, 1998).

Общее строение стенки крупных артерий, наиболее часто поражаемых при атеросклерозе, представлено на рисунке 1. В артериях эластического типа, к которым относятся крупные сосуды, отчетливо выделяются три слоя: внутренняя оболочка (интима), средняя (медия) и наружная (адвентиция), разделенные между собой эластическими пластинами (Карпов, Дудко, 1998). Внутренняя оболочка образована монослоем эндотелиальных клеток, субэндотелиальным слоем и внутренней эластической мембраной. Субэндотелиальный слой состоит из тонких эластических и коллагеновых

волокон и малодифференцированных соединительно-тканых клеток. Средняя оболочка артерии (медия) состоит из множества гладкомышечных клеток, между которыми находится небольшое количество эластических и коллагеновых волокон, и наружной эластической мембраны. Гладкомышечные клетки мультипотентны, способны к миграции и пролиферации, что обуславливает утолщение интимы при атеросклерозе. Наружная оболочка (адвентиция) состоит из рыхлой соединительной ткани, образованной пучками эластических и коллагеновых волокон, гладкомышечными клетками и фибробластами. Через этот слой проходят капилляры, проникающие примерно до двух третей меди и обеспечивающие кровоснабжение самой сосудистой стенки. В зависимости от развития различных слоев стенки артерии подразделяются на сосуды мышечного, эластического и смешанного (мышечно-эластического) типов.

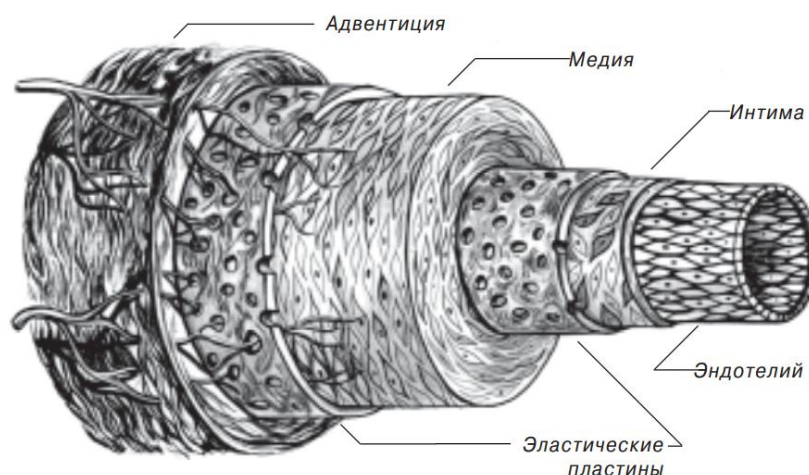


Рисунок 1. Строение стенки артерии эластического типа (Карпов, Дудко, 1998).

Атеросклероз – патология, характерная для артерий эластического и смешанного типа (Бодрова, Ларионова, 2000). Через артериальную стенку в направлении адвентиции осуществляется постоянный ток плазмы крови вместе с макромолекулярными соединениями, в том числе ЛП (Карпов, Дудко, 1998). Таким образом, основная часть энергетических потребностей артериальной стенки, особенно ее бессосудистых структур (интимы и внутренней трети

медиин), восполняется за счет ЛП плазмы крови. Предполагается, что в норме ЛП проходят без задержки в адвентицию и удаляются через систему лимфатических сосудов. Однако при атеросклерозе холестерин-содержащие ЛП накапливаются в интимае (Липовецкий, 2000). ХС оказывает на артериальную стенку прямое повреждающее действие, вызывая раздражение окружающих гладкомышечных клеток, что приводит к их пролиферации и к усиленной продукции коллагена и эластина (Липовецкий, 2000). В результате разрастания соединительной ткани вокруг отложений липидов образуются атеросклеротические бляшки.

1.1.2 Система транспорта липидов в плазме крови

В начале XX столетия Н.Н. Аничков впервые показал, что решающее значение при развитии атеросклероза имеет нарушение гомеостаза ХС и его накопление в тканях, и сформулировал тезис: «без холестерина нет атеросклероза» (Климов, Никульчева, 1999). В своих экспериментах, ставших классическими, Н.Н. Аничков совместно с С.С. Халатовым установил, что введение пищи с высоким содержанием ХС в рацион кроликов приводит к образованию атеросклеротических бляшек в стенке аорты и в коронарных артериях. В последующем эта теория была подтверждена рядом экспериментальных, эпидемиологических и клинических исследований. Положения данной теории были развиты А.Н. Климовым, исследования которого были посвящены роли атерогенных ЛП в развитии атеросклероза (Климов и др., 2000). А.Н. Климов переформулировал слова Н.Н. Аничкова таким образом: «без атерогенных липопротеинов нет атеросклероза».

ХС – важнейший в биологическом отношении липид, представитель класса стеролов (Рисунок 2). В организме человека ХС выполняет разнообразные физиологические функции. ХС является предшественником половых и кортикостероидных гормонов, витамина D₃ и желчных кислот, а

также неотъемлемым компонентом клеточных мембран (Климов, Никульчева, 1999). Основным местом синтеза ХС является печень. ХС – гидрофобная молекула, поэтому он транспортируется с током крови к периферическим тканям в составе высокомолекулярных белково-липидных комплексов – липопротеинов (ЛП).

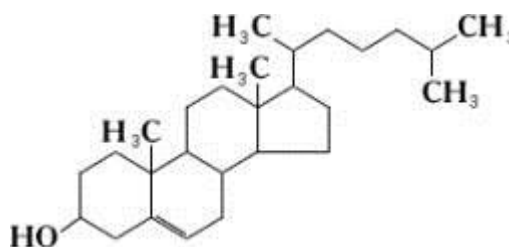


Рисунок 2. Химическая формула холестерина.

ЛП плазмы крови делятся на четыре группы: хиломикроны (ХМ), ЛП очень низкой плотности (ЛПОНП), ЛП низкой плотности (ЛПНП), ЛП высокой плотности (Климов, Никульчева, 1999). ЛП-частицы различаются по размеру, плотности, электрофоретической подвижности, содержанию ХС и триглицеридов (ТГ) и составу аполиipoproteинов (Таблица 1). Аполиipoproteины стабилизируют структуру ЛП, участвуют в метаболизме ЛП, взаимодействуя со специфическими рецепторами клеток, и выступают в качестве кофакторов ряда ферментов плазмы крови (Карпов, Дудко, 1998).

Таблица 1

Основные характеристики липопротеинов плазмы крови.

Класс ЛП	Соотношение ХС и ТГ	Основной апопротеин	Плотность, г/мл	Диаметр, А°
ХМ	ТГ>ХС	аполиipoproteин В-48	<0.95	800-5000
ЛПОНП	ТГ>ХС	аполиipoproteи В-100	<1.006	300-800
ЛПНП	ХС>ТГ	аполиipoproteи В-100	1.019-1.063	180-280
ЛПВП	ХС>ТГ	Апо А-I, Апо А-II	1.063-1.21	50-90

Все циркулирующие в плазме ЛП имеют сферическую форму (Климов, Никульчева, 1999). Неполярные липиды, а именно ТГ и эфиры холестерина (ЭХС), составляют гидрофобное ядро частицы. Полярные липиды (фосфолипиды (ФЛ) и незэтерифицированный ХС) и белки формируют поверхностный гидрофильный слой, который, с одной стороны, защищает внутреннюю гидрофобную липидную сферу, а с другой – обеспечивает растворимость и транспорт ЛП-частицы в водной среде. Толщина наружной оболочки составляет 2.1-2.2 нм, что соответствует половине толщины клеточных мембран (Климов, Никульчева, 1999). Следовательно, наружная оболочка ЛП-частицы образована липидным монослоем и представляет собой не гомогенный слой, а мозаичную поверхность с выступающими участками белка. Такая структура делает ЛП-частицу менее обособленной по сравнению с клеткой, окруженной бислойной мембраной, и объясняет способность ЛП обмениваться своими липидными компонентами (ЭХС, ТГ и ФЛ) друг с другом (Климов, Никульчева, 1999).

ХМ образуются в энтероцитах тонкого кишечника и на 99% состоят из липидов, в основном ТГ (Климов, Никульчева, 1999). ЛПОНП синтезируются в печени и секретируются в кровоток, где под действием липолитических ферментов превращаются в ЛПНП. ЛПНП были названы «атерогенными», так как данный класс ЛП наиболее богат ХС (до 45%) (Климов, Никульчева, 1999). В составе ЛПНП ХС доставляется к клеткам. Далее ЛПНП специфически взаимодействуют с клеточными рецепторами, в результате чего происходит рецепторопосредованный захват ХС. Организм человека не имеет ферментов, катаболизирующих ХС во внепеченочных тканях, поэтому избыток неиспользованного ХС, который при нарушениях его гомеостаза может накапливаться в циркулирующих макрофагах и периферических тканях, в том числе в стенке артерий, служит причиной развития атеросклероза. Антиатерогенные ЛПВП принимают участие в транспорте ХС из периферических тканей в печень для его последующей экскреции из организма.

в составе желчных кислот (Климов, Никульчева, 1999). Этот процесс получил название обратного транспорта холестерина (ОТХ).

1.1.3 Антиатерогенные функции липопротеинов высокой плотности

Участие в ОТХ является важнейшей функцией ЛПВП, обеспечивающей антиатерогенные свойства данного класса липопротеинов (Kontush, Chapman, 2006). Также антиатерогенные свойства ЛПВП обусловлены их антиоксидантным и противовоспалительным свойствами (Kontush, Chapman, 2006). В частице ЛПВП (Рисунок 3) содержится наибольшее количество белка по сравнению с другими классами ЛП, что обуславливает самую высокую плотность и маленький размер ЛПВП среди всех ЛП. ЛПВП содержит примерно 50% белка, 25% ФЛ, 20% ХС и 5% ТГ (Lund-Katz et al, 2003). Основные белки ЛПВП – АпоА-I и аполипопротеин А-II (АпоА-II) – составляют 70% и 20% от всей массы белка соответственно, примерно 5% приходится на аполипопротеины группы С (Климов, Никульчева, 1999). В качестве минорных компонентов в ЛПВП присутствуют аполипопротеины А-IV, Е, D, F, J, L-I, М (Kontush, Chapman, 2006). Частицы ЛПВП имеют плотность в диапазоне 1.063-1.210 г/мл и подразделяются на 2 субкласса ЛПВП₂ (плотность 1.063-1.125 г/мл) и ЛПВП₃ (плотность 1.125-1.210 г/мл) (Lund-Katz et al, 2003).

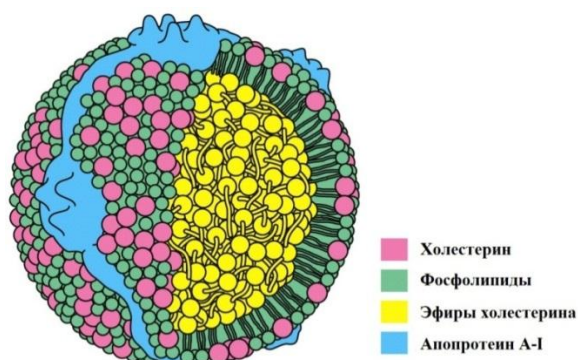


Рисунок 3. Модель частицы ЛПВП (Lund-Katz et al, 2003).

Процесс развития преждевременного атеросклероза часто ассоциирован со снижением уровня холестерина в составе ЛПВП (Х-ЛПВП) плазмы крови. Многочисленные клинические, эпидемиологические и экспериментальные исследования продемонстрировали наличие обратной связи между концентрацией Х-ЛПВП плазмы крови с развитием атеросклероза, что свидетельствует об антиатерогенной роли ЛПВП (Fredenrich, Bayer, 2003; Escola-Gil et al, 2006; Chan, 2006). Независимым доказательством антиатерогенной функции ЛПВП является значительное повышение риска развития атеросклероза у лиц с семейной гипоальфалипотеинемией (Miller et al, 2003; Hovingh et al, 2005). Семейная гипоальфапротеинемия – патология, при которой наблюдается значительное снижение уровня ЛПВП, а именно ниже 0.9 ммоль/л (0.4-0.9 ммоль/л). В основе развития семейной гипохолестеринемии часто лежат мутации в гене основного структурного белка ЛПВП Апо А-I (ген *APOA1*) (Ordovas et al, 1986; Yamakawa-Kobayashi et al, 1999; Cohen et al, 2004). При гиперхолестеринемии, которая является фактором риска развития атеросклероза, также часто наблюдаются нарушения обмена ЛПВП – снижение концентрации Апо А-I и Х-ЛПВП плазмы крови (Schaefer et al, 1992; Frenais et al, 1999). В настоящее время установлены следующие нормальные значения: для показателя ОХС плазмы крови – не более 5.5 ммоль/л; для показателя Х-ЛПВП плазмы крови – не менее 1 ммоль/л у мужчин и 1.2 ммоль/л у женщин (Кухарчук и др., 2012). В то же время в клинической практике известно много случаев, когда атеросклероз развивался у лиц с нормальным уровнем Х-ЛПВП плазмы крови (Вельков, 2010; Grundtman, 2011). Это позволяет предполагать, что изменение функции ЛПВП скорее, чем изменение их концентрации, может определять антиатерогенность ЛПВП (Navab, 2009). Накопление ЭХС в ретикулоэндотелиальной системе пациентов с болезнью Танжер, у которых отсутствуют ЛПВП, свидетельствует о том, что ЛПВП играют ведущую роль в удалении холестерина из периферических

тканей (Oram, Vaughan, 2006). Значительное число работ указывает на то, что основной функцией ЛПВП является их участие в ОТХ (Lewis, Rader, 2005).

1.1.4 Роль макрофагов в патогенезе атеросклероза

Патологическое накопление липидов моноцитами и макрофагами интимы и трансформация макрофагов в пенистые клетки является центральным звеном в развитии атеросклеротического поражения (Никифоров и др., 2012). В настоящее время известно, что нормально структурированные ЛПНП не обладают атерогенной активностью и захват нативных ЛПНП не приводит к накоплению ХС в клетках (Климов, Никульчева, 1999). Однако попадая в субэндотелиальное пространство артерий, ЛПНП часто подвергаются различным атерогенным модификациям: при взаимодействии с компонентами внеклеточного матрикса, под влиянием различных протеаз, свободных радикалов и т.д. (Steinberg, 2009; Levitan et al, 2010). Модифицированные ЛПНП обладают целым рядом атерогенных свойств, наиболее важным из которых является их повышенный захват скэвенджер-рецепторами макрофагов (Allahverdian, 2012). Перегрузка макрофагов ЛПНП приводит к тому, что макрофаги не справляются с деградацией ЛПНП, а внутриклеточное накопление ХС и его эфиров в цитозоле макрофагов в свою очередь является критическим фактором для образования пенистой клетки (Никифоров и др., 2012). Пенные клетки получили свое название благодаря тому, что визуально напоминают пену — они наполнены большим количеством пузырьков, содержащих захваченные ЛП и продукты их распада. Пенные клетки трудно подвергаются метаболизации и являются терминальным этапом жизни макрофагов, после чего они погибают, а их содержимое изливается в интиму (Липовецкий, 2000). ХС и его эфиры при этом вызывают раздражение окружающих гладкомышечных клеток, что приводит к их пролиферации и к усиленной продукции коллагена и эластина. Вокруг ХС и его эфиров формируется фиброзная капсула, которая изолирует их от окружающих тканей.

Популяция макрофагов интимы в местах атеросклеротических повреждений пополняется за счет повышенной миграции моноцитов из кровотока в субэндотелиальное пространство артерий и их последующей дифференциации (Moore, Tabas, 2011). Поэтому впоследствии атеросклеротическая бляшка может увеличиться в размерах за счет дальнейшего накопления ЛП (Липовецкий Б.М, 2000). Макрофаги способствуют также и независимым от размера изменениям морфологии бляшки, в частности, формированию некротического ядра (Moore, Tabas, 2011).

Эффективность элиминации избыточного ХС из моноцитов и макрофагов артериальной стенки, в частности, в местах формирующихся атеросклеротических повреждений, может играть ведущую роль в развитии атеросклероза. Элиминация ХС из макрофагов интимы осуществляется в процессе ОТХ и предотвращает их трансформацию в пенистые клетки.

1.2 Обратный транспорт холестерина

По современным представлениям, ОТХ состоит из 3 основных этапов (Rosenson et al, 2012):

1. Переход свободного ХС через мембрану клетки на внеклеточный акцептор – аполипопротеин А-I или ЛПВП;
2. Транспорт ХС в печень;
3. Поглощение ЭХС клетками печени.

Первый этап ОТХ – переход свободного (неэстерифицированного) ХС из клетки на частицы ЛПВП – является ключевым. Известно несколько механизмов удаления ХС из клетки: пассивная диффузия молекул ХС через мембрану клетки и активный транспорт, опосредованный белками семейства ABC транспортеров (Yancey et al, 2003). Диффузия ХС определяется градиентом концентрации ХС между плазматической мембраной и

поверхностным слоем частиц ЛПВП (Yancey, Bortnick, 2003; Jessup et al, 2006). Однако посредством диффузии переносится незначительное количество ХС. Большая часть ХС переносится транспортерами ABCA1 и ABCG1 (Wang et al, 2004; Jessup et al, 2006; Oram, Vaughan, 2006; Gelissen et al, 2006; Yvan-Charvet et al, 2010; Rosenson et al, 2012).

Основной структурный белок ЛПВП Апо А-I является первым акцептором ХС на этапе биогенеза ЛПВП. При взаимодействии Апо А-I с транспортером ABCA1 происходит формирование незрелых пре- β -ЛПВП, которые имеют дискоидальную форму (Рисунок 4) (Denis et al, 2004; Yokoyama, 2006; Vedhachalam et al, 2007). Пре- β -ЛПВП образуются в основном в гепатоцитах печени и энтероцитах тонкого кишечника (Перова и др., 2006). Незрелые пре- β -ЛПВП характеризуются низкой стабильностью и поэтому нуждаются в дальнейшем присоединении липидов (Atmeh, Abd Elrazeq, 2005). Под действием фермента лецитин-холестерин-ацилтрансферазы (ЛХАТ) пре- β -ЛПВП трансформируются в зрелые α -ЛПВП, которые имеют сферическую форму (Рисунок 4) (Yokoyama, 2006). Апо А-I при этом выступает в роли кофактора для ЛХАТ (Kontush, Chapman, 2006). Реакция ЛХАТ представляет собой реакцию эстерификации ХС, в ходе которой остатки ненасыщенных жирных кислот из sn-2 положения фосфотидилхолина (лецитина) переносятся к гидроксильной группе молекулы ХС (Климов, Никульчева, 1999). Эта реакция протекает на поверхности ЛПВП, когда в их липидном монослое появляется избыток неэстерифицированного ХС. Образующиеся в результате реакции ЛХАТ эфиры ЭХС перемещаются в центр частицы ЛПВП, образуя гидрофобное ядро, которое в дальнейшем будет пополняться ЭХС.

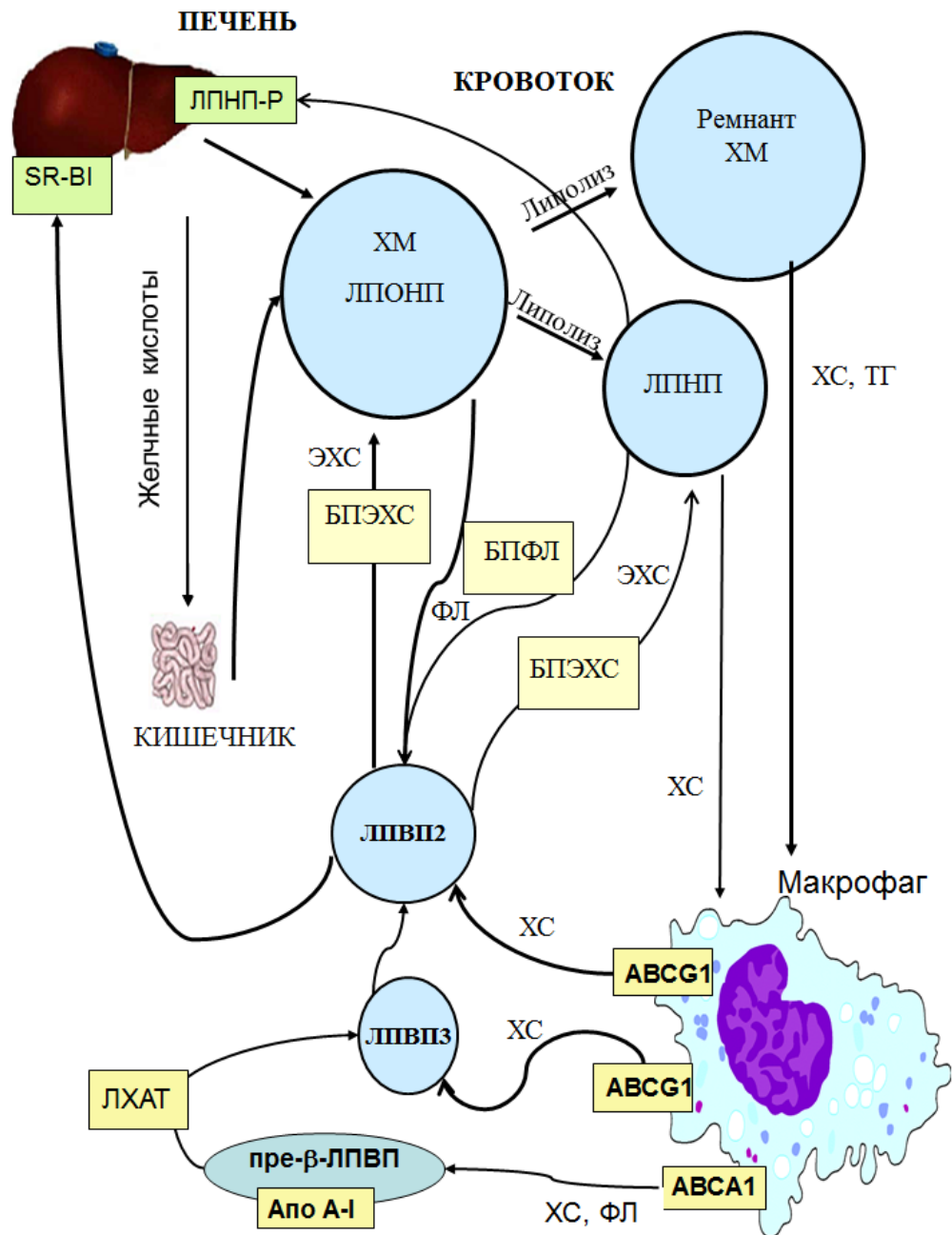


Рисунок 4. Система транспорта липидов в крови. Сокращения: ХС – свободный холестерин, ЭХС – эфиры холестерина, БПЭХС – белок, переносящий ЭХС, ФЛ – фосфолипиды, БПФЛ – белок, переносящий фосфолипиды, ЛХАТ – лецитин-холестерин-ацилтрансфераза, ТГ – триглицериды.

Дальнейшее насыщение α -ЛПВП холестерином происходит при участии транспортера ABCG1 (Рисунок 4) (Jessup et al, 2006; Gelissen et al, 2006). Есть данные, что в опосредованном транспортером ABCG1 переносе ХС из клетки в

качестве акцептора могут выступать также и пре- β -ЛПВП (Gelissen et al, 2006; Sankaranarayanan et al, 2009). Однако преимущественными акцепторами ХС являются наиболее плотные и мелкие частицы ЛПВП, принадлежащие к подфракции ЛПВП₃. По мере насыщения холестерином и его эстерификации ЛПВП₃ постепенно увеличиваются в размере и трансформируются в подфракцию ЛПВП₂, характеризующуюся меньшей плотностью (Торховская и др., 2006). Белок-переносчик ЭХС (БПЭХС) осуществляет перенос ЭХС с ЛПВП на ХМ и ЛПОНП в обмен на ТГ (Рисунок 4) (Торховская и др., 2006). Белок-переносчик ФЛ (БПФЛ) осуществляет перенос ФЛ, высвобождающихся в результате липолиза ХМ и ЛПОНП, на ЛПВП. Это также способствует постепенному формированию ЛПВП₂, поступающих затем в печень с участием рецепторов, проявляющих сродство к апопротеинам А-I и Е (Торховская и др., 2006).

В конечном итоге ЭХС, входящие в состав ЛПВП, могут быть: 1) избирательно захвачены из ЛПВП скавенджер-рецепторами SR-BI печени, надпочечников, гонад; 2) захвачены клетками печени и почек вместе с ЛПВП путем эндоцитоза; 3) перенесены с помощью БПЭХС на ЛПНП и ЛПОНП, которые, в свою очередь, поглощаются печенью посредством специфичных рецепторов печени к апобелкам этих ЛП (Lewis, Rader, 2005). В печени ЭХС подвергаются катаболизму и секретируются преимущественно с желчными кислотами (Климов, Никульчева, 1999).

1.3 Роль аполипопротеина А-I в развитии атеросклероза

Апо А-I играет важнейшую роль в синтезе, структуре и функции ЛПВП. Апо А-I синтезируется в печени и стенке тонкого кишечника и в виде проапобелка поступает в кровоток, где происходит его дальнейшее созревание (Климов, Никульчева, 1999). Зрелый белок Апо А-I имеет в своем составе 243 аминокислоты с молекулярной массой 28 кДа. Концентрация Апо А-I в плазме

крови определяется уровнем экспрессии гена *APOA1* и скоростью его липидации (Soxi-Thomas et al, 1989). Приблизительно 5% Апо А-I находится в плазме крови в свободном, не ассоциированном с липидами, состоянии. Доля Апо А-I, ассоциированного с пре- β -ЛПВП, составляет 1-5% от всего Апо А-I плазмы крови (Miyazaki et al, 2013). Таким образом, большая часть Апо А-I находится в составе альфа ЛПВП.

1.3.1 Антиатерогенные свойства аполипопротеина А-I

Многочисленные клинические и эпидемиологические исследования продемонстрировали, что снижение концентрации Апо А-I в плазме крови является независимым фактором риска развития атеросклероза (Lamarche et al, 1996; Roeters et al, 2000; Walldius et al, 2001; Talmud et al, 2002; Chan et al, 2006). Известно, что у лиц с нонсенс мутациями в гене *APOA1* наблюдается пониженный уровень ЛПВП и преждевременное развитие атеросклероза (Matsunaga et al, 1991; Leren et al, 1997; Huang et al, 1998; Yamakawa-Kobayashi et al, 1999; Shioji et al, 2004).

Антиатерогенные свойства Апо А-I человека были продемонстрированы в экспериментах с трансгенными животными, которые приобретали устойчивость к атерогенным нарушениям стенок сосудов после введения в геном гена *APOA1* человека (Luoma , 1997; Benoit et al., 1999; Belalcazar et al., 2003). Было показано, что применение пептида-миметика Апо А-I в комбинации со статинами уменьшает атеросклероз у модельных животных (Ying R 2013). В то же время нокаут гена *APOA1* приводит к снижению концентрации ЛПВП плазмы крови и развитию атеросклероза у модельных животных: при этом мыши *APOA1*^{-/-} имеют более обширные атеросклеротические повреждения сосудов, чем мыши *APOA1*^{+/-} (Moore et al, 2005). Исследования показали, что Апо А-I проявляет свои антиатерогенные свойства, прежде всего, за счет его участия в элиминации ХС из макрофагов (Mukhamedova et al, 2008; Su et al, 2008).

1.3.2 Структура аполипопротеина А-I в составе ЛПВП

Белок Апо А-I отличается высокой степенью спирализации: в свободном состоянии 55% его вторичной структуры приходится на альфа-спираль, 8% – на бета-структуру (Климов, Никульчева, 1999). В ассоциированном с ЛПВП состоянии доля альфа-спиралей достигает 80% (Saito et al., 2003). Согласно данным кристаллографического анализа в пространственной структуре Апо А-I можно выделить альфа-спиральные повторы из 22 и 11 аминокислот (Segrest et al., 1992; Brouillette et al., 2001; Zannis et al, 2006). В процессе биогенеза ЛПВП Апо А-I принимает различные конформации: эти особенности его структуры, по-видимому, и определяют взаимодействие ЛПВП с липидами и с ферментами плазмы крови (Rosenson et al, 2012). Формирующиеся на первом этапе биогенеза ЛПВП незрелые частицы пре-β-ЛПВП представляет собой пласт фосфолипидного бислоя с вкраплениями ХС, окруженного двумя или более молекулами Апо А-I в антипараллельной ориентации (Рисунок 5) (Davidson, Thompson, 2007; Lund-Katz, 2010).

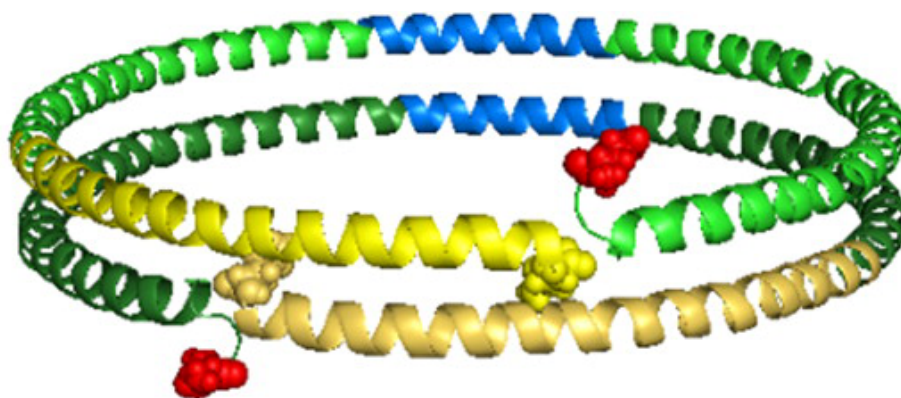


Рисунок 5. Структура Апо А-I в пре-β-ЛПВП (Davidson, Thompson, 2007).

Для конформации Апо А-I в сферических ЛПВП была предложена модель «трилистника», когда три молекулы Апо А-I формируют трехмерную клетку-ячейку, которая стабилизирует липиды в ЛПВП (Рисунок 6) (Huang et al, 2011).



Рисунок 6. Модель пространственной структуры Апо А-I в сферических ЛПВП (Huang et al, 2011).

Центральный домен Апо А-I имеет важное значение для активации фермента ЛХАТ (Frankand, Marcel, 2000; Mei, Atkinson, 2011). N- и C-концевые домены Апо А-I ответственны за связывание с липидами (Palgunachari et al, 1996; Brouillette et al., 2001; Saito et al, 2004). Концевые домены также взаимодействуют друг с другом для поддержания целостной структуры ЛПВП (Tricerri et al., 2000; Fang et al., 2003).

1.3.3 Мутации и варианты в кодирующей области гена *APOA1*

Несомненно, правильная структура Апо А-I играет важную роль в процессе формирования и созревания ЛПВП, а также в обеспечении их антиатерогенной функции. Согласно последним данным, 0.27% индивидуумов являются носителями мутаций/вариантов в кодирующей области гена *APOA1*, которые ассоциированы со снижением концентрации Апо А-I и/или Х-ЛПВП в плазме крови (Haase et al, 2012). На рисунке 7 представлены известные аминокислотные замены, а также делеции аминокислот, для которых характерны низкие уровни Х-ЛПВП в плазме крови (Zannis et al, 2006; Haase et al, 2012). Так, замена Arg160Leu (вариант «Осло») характеризуется снижением

уровня Х-ЛПВП на 70%, а утрата участка полипептидной цепи 143-165 приводит к отсутствию ЛПВП даже у гетерозиготных носителей (Leren et al, 1997; Koukos et al, 2007). Некоторые из этих структурных отличий также приводят к снижению способности Апо А-I активировать фермент ЛХАТ (Рисунок 7) (Cho et al, 2001). Влияние некоторых перечисленных аминокислотных замен на структуру Апо А-I были изучены подробно. Например, замена Gly26Arg приводит к дестабилизации альфа-спирали между 41 и 56 аминокислотными остатками, в результате чего она превращается бета-структуру (Lagerstedt et al, 2007; Chetty et al, 2012). Снижение уровня Х-ЛПВП, обусловленное изменением структуры основного белка Апо А-I, по всей видимости, объясняет повышенный риск развития атеросклероза у большинства гетерозиготных носителей этих мутаций (Hovingh et al, 2004; Zannis et al, 2006). Для вариантов Апо А-I Pro165Arg и Arg160Leu также была продемонстрирована сниженная способность удалять ХС из гладко-мышечных клеток (Daum et al, 1999). Таким образом, структура Апо А-I может определять не только концентрацию ЛПВП, но и эффективность элиминации ХС из тканей. Соответственно, изменение структуры Апо А-I может модифицировать антиатерогенную функцию ЛПВП, не влияя при этом на концентрацию Х-ЛПВП. Так, вариация аминокислотного состава Ala164Ser, которая не сопровождается понижением концентрации Апо А-I и Х-ЛПВП плазмы крови, отличается наибольшим риском развития ИМ со смертельным исходом в отличие от всех прочих аминокислотных замен (Haase et al, 2011). Также были описаны замещения Glu76Gln и Ala152Thr в белке Апо А-I, для которых характерно повышение концентрации Апо А-I в плазме крови (Haase et al, 2012).

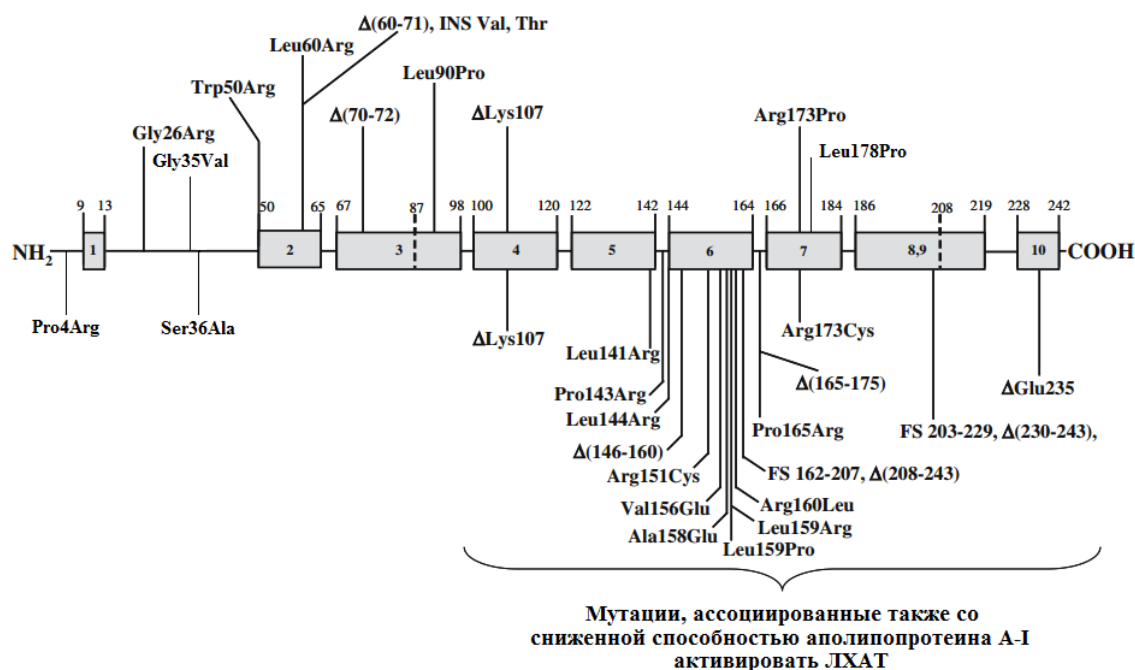


Рисунок 7. Структурные отличия АпоА-I, обусловленные мутациями в кодирующей области гена *APOA1*, приводящие к снижению уровня Х-ЛПВП плазмы крови (Zannis et al, 2006; дополнено Haase et al, 2012).

В то же время варианты Апо А-I Arg173Cys (вариант «Милан») и Arg151Cys (вариант «Париж»), напротив, характеризуются атеропротективным эффектом, хотя и приводят к снижению концентрации Х-ЛПВП плазмы крови и триглицеридемии, то есть состоянию, которому соответствует повышенный риск развития сердечно-сосудистой патологии (Franceschini et al, 1980; Weisgraber et al, 1983; Bruckert et al, 1997; Klon et al, 2000). Также у данных вариантов Апо А-I снижена способность активировать ЛХАТ. Для людей-носителей вариантов Arg173Cys и Arg151Cys и трансгенных мышей, экспрессирующих эти варианты, показана повышенная способность сыворотки крови к элиминации ХС из периферических клеток (Franceschini et al, 1999), что может указывать на более эффективный ОТХ. Данный эффект объясняется некоторыми структурными особенностями, которые приобретает Апо А-I при этих замещениях. Обладая повышенным сродством к липидам, мутантный Апо

А-I-Милан способен образовывать гомодимеры по цистеину, которые переносят ХС с большей скоростью (Alexander et al, 2009; Gursky et al, 2013).

1.3.4 Регуляция экспрессии гена *APOA1*

Ген *APOA1* локализуется на хромосоме 11q23.3 в кластере генов *APOA1-C3-A4-A5* (Lai et al, 2005). Ген *APOA1* экспрессируется, в основном, в печени (80%) и кишечнике (20%) (Shemer et al, 1991). Тканеспецифичная экспрессия данного гена контролируется, в первую очередь, эпигенетически, то есть статусом метилирования промоторной области (Shemer et al, 1991; Nagae et al, 2011; Halley et al, 2013). Для дополнительной регуляции экспрессии гена *APOA1* важен также дистальный энхансер, находящийся на расстоянии около 9 тысяч п.н. ниже старта транскрипции (Zannis et al, 2001; Mishiro et al, 2009).

Промоторная область гена *APOA1* содержит ТАТА-бокс в положении (-30/-25) от сайта начала транскрипции (Mooradian, 2004). В 5'-фланкирующем районе (-256/-1) располагаются сайты связывания факторов Sp1, PPARs, ARP-1, HNF-3, HNF-4, а также сайт RARE, с которым связываются рецепторы ретиноевой кислоты RAR и RXR (Mooradian, 2004). Предполагают, что все вышеперечисленные транскрипционные факторы участвуют в гормон-зависимой регуляции экспрессии гена *APOA1* (Mooradian, 2004). В частности, показано, что эстрогены повышают экспрессию гена *APOA1*, поэтому для женщин характерны более высокие уровни ЛПВП плазмы крови (Lamon-Fava, 1999).

1.3.5 Полиморфные варианты в регуляторных областях гена *APOA1*

Регуляторная область гена *APOA1* отличается содержанием большого числа однонуклеотидных замен (Haase et al, 2012; Bandarian et al, 2013). Наиболее распространенными и изученными относительно их влияния на

липидный спектр плазмы крови являются полиморфные варианты $(-75)G>A$ (ref SNP ID rs670) в промоторной области и $83C>T$ (ref SNP ID rs5069) в регуляторной области гена *APOA1*.

Частота варианта $(-75)G>A$ гена *APOA1* варьирует в различных популяциях мира. В европейских странах частота аллеля $A(-75)$ гена *APOA1* составляет от 11% до 20% (Wang et al, 1996; Baroni et al, 2003; Ordovas et al, 2002; Souverein et al, 2005; Haase et al, 2012), в Африке – 10% (Kamboh et al, 1999), в Узбекистане – 10% (Bekmetova et al, 2010), в Японии – 13.5%-16% (Akita et al, 1995; Bai et al, 1996), в Бразилии – 18% (de Franka et al, 2005); среди белого населения США и Канады – 19% (Minnich et al, 1995; Larson et al, 2002), в странах Ближнего Востока – 19%-22% (Al-Yahyaee et al, 2004; Albahrani et al, 2007; Al-Bustan et al, 2013; Bandarian et al, 2013), в Китае – 34%-36% (Wu et al, 2000; Ma et al, 2005; Li et al, 2008; Ding et al, 2012).

Данные об ассоциации вариантов $(-75)G>A$ гена *APOA1* с концентрацией липидов плазмы крови весьма противоречивы. В таблице 2 представлены данные по влиянию вариантов $(-75)G>A$ гена *APOA1* на показатели липидного спектра крови в различных популяциях. Нужно отметить, что для большинства европейских стран была отмечена ассоциация аллеля $A(-75)$ гена *APOA1* с повышением концентрации Апо А-I и Х-ЛПВП плазмы крови (Juo et al, 1999; Haase et al, 2012). В то же время в других популяциях носительство аллеля $A(-75)$ гена *APOA1* ассоциировалось со сдвигом липидного профиля плазмы крови в сторону атерогенности, то есть характеризовалось снижением концентрации Апо А-I и Х-ЛПВП и/или повышением концентрации ОХС и Х-ЛПНП в плазме крови (Matsunaga et al, 1995; Larson et al, 2002; Chhabra et al, 2005; Shanker et al, 2008; Li et al, 2008; Yin et al, 2011; Каюмова и др, 2011; Al-Bustan et al, 2013). В нескольких исследованиях была показана ассоциация генотипа $AA(-75)$ гена *APOA1* с повышением уровня ТГ плазмы крови (Xu et al, 1994; Souverein et al, 2005). В одной работе было также показано, что при носительстве аллеля $A(-75)$ гена *APOA1* может наблюдаться преобладание во

фракции ЛПВП частиц ЛПВП₃ и снижение насыщенных холестерином ЛПВП₂, что может свидетельствовать о снижении эффективности элиминации ХС из тканей (Ruano et al, 2005). С другой стороны, в ряде исследований не было выявлено какого-либо эффекта вариантов $(-75)G>A$ гена *APOA1* на показатели липидов в плазме крови (Civeira et al, 1993; Lopez-Miranda et al, 1994; Ordovas et al, 2002; Bandarian et al, 2013; Ma et al, 2005; Ding et al, 2012; Liu et al, 2010; Akita et al, 1995; Chen et al, 2009; de Franka et al, 2005).

Известно, что однонуклеотидные замены в регуляторных областях генов могут затрагивать сайты посадки различных транскрипционных факторов и таким образом влиять на уровень экспрессии гена. Несколько исследований указывает на снижение эффективности транскрипции в случае аллеля $A(-75)$ гена *APOA1* (Smith et al, 1992; Wang et al, 1998). Другие авторы, напротив, сообщают, что аденин в позиции (-75) соответствует более высокому уровню активности промотора гена *APOA1* (Angotti et al, 1994; Chen et al, 2009). Полиморфизм $(-75)G>A$ находится в составе GC-богатой области 5'-GCC(G/A)GGG-3' в промоторном регионе гена *APOA1* (Angotti et al, 1994). Известно, что промоторы некоторых других генов содержат консенсусную последовательность 5'-GCCGGGG-3' – такую же, как в случае аллеля $G(-75)$ – негативно регулирующую транскрипцию этих генов (Angotti et al, 1994).

Влияние вариантов (-75)G>A гена APOA1 на концентрацию липидов в плазме крови

Эффект аллеля A(-75) гена APOA1 на концентрацию липидов в плазме крови
<i>Повышение концентрации Apo A-I и/или X-ЛПВП в плазме крови:</i> • Европа (Talmud et al, 1994) • Италия (Pagani et al, 1990; Xu et al, 1994) • Англия (Jeenah et al, 1990) • Исландия (Sigurdsson et al, 1992) • Финляндия (Meng et al, 1997) • Дания (Naase et al, 2012) • Австралия (Wang et al, 1996) • США, Питсбург (Kamboh et al, 1996) • Канада (Minnich et al, 1995) • Индия, Дели (Padmaja et al, 2009; Dawar et al, 2010) • Ряд провинций Китая (Saha et al, 1994; Zou et al, 2003) • Метаанализ (Juo et al, 1999)
<i>Понижение концентрации Apo A-I и/или X-ЛПВП в плазме крови:</i> • Япония (Matsunaga et al, 1995) • Северная Индия (Chhabra et al, 2005) • Ряд провинций Китая (Li et al, 2008; Yin et al, 2011)
<i>Повышение атерогенных показателей ОХС и/или X-ЛПНП без снижения X-ЛПВП и Apo A-I:</i> • США, Бостон (Larson et al, 2002) • Кувейт (Al-Bustan et al, 2013) • Иран (Daneshpour et al, 2011) • Россия, республика Башкортостан (Каюмова и др., 2011) • Южная Индия (Shanker et al, 2008)

В настоящее время ряд работ указывает на связь между типом питания и эффектом варианта (-75)G>A гена APOA1 на обмен липидов (Marin et al, 2002; Ordovas et al, 2002; Masson et al, 2003; Gomez et al, 2010). В исследованиях было показано, что влияние этого варианта на уровень X-ЛПВП плазмы крови

зависит от уровня потребления насыщенных и полиненасыщенных жирных кислот (Ordovas et al, 2002; Gomez et al, 2010). Полиненасыщенные жирные кислоты способствуют повышению уровня экспрессии гена *APOA1* при наличии замены $(-75)G>A$ в промоторной области и, таким образом, повышению Х-ЛПВП плазмы крови у носителей аллеля *A(-75)* (Ordovas et al, 2002). В то же время пища, обогащенная насыщенными жирными кислотами, способствует проявлению атерогенных преобразований липидного спектра плазмы крови у носителей аллеля *A(-75)* (Gomez et al, 2010). Это в свою очередь может объяснить популяционно-зависимый эффект аллеля *A(-75)* на липидный спектр плазмы крови и риск развития атеросклероза. После диеты, обогащенной насыщенными жирными кислотами, носители аллеля *A(-75)* гена *APOA1* отличались от носителей генотипа *GG(-75) APOA1* преобладанием в плазме крови маленьких и плотных частиц ЛПНП, которые считаются более атерогенными (Rizzo, Berneis, 2006; Gomez et al, 2010). Для носителей аллеля *A(-75)* гена *APOA1* также характерна более длительная послеобеденная гиперлипидемия в ответ на прием жирной пищи по сравнению с носителями генотипа *GG(-75) APOA1* (Marin et al, 2002). В то же время известно, что послеобеденная гиперлипидемия, то есть увеличение концентрации ОХС, Х-ЛПНП и ТГ в плазме крови, способствует развитию сердечно-сосудистых заболеваний (Tanaka, 2004; Tushuizen et al, 2005). Так, у жителей Индии и Узбекистана аллель *A(-75)* гена *APOA1* повышает риск развития атеросклероза (Chhabra S. et al, 2005; Shanker et al, 2008; Bekmetova et al, 2010). В популяции Испании носительство аллеля *A(-75)* гена *APOA1* ассоциировано с повышенным риском развития ИМ у мужчин до 50 лет (Reguero et al, 1998). Также было показано, что носители генотипа *AA(-75)* гена *APOA1* предрасположены к развитию сахарного диабета 2 типа, который в свою очередь является фактором высокого риска развития сердечно-сосудистой патологии (Morcillo et al, 2005). В популяции Санкт-Петербурга было показано снижение концентрации Х-ЛПВП у женщин с сахарным диабетом при носительстве аллеля *A(-75)* гена

APOA1 (Быстрова, 2009). Это может косвенно свидетельствовать о том, что этот вариант может вносить вклад в риск развития атеросклероза у жителей Санкт-Петербурга.

Частота аллеля *T83* ($83C>T$) гена *APOA1* в большинстве стран колеблется от 2.7% до 5%, в Омане она составляет 6.7%, в Нигерии – 40% (Kamboh et al, 1999; Demanchi et al, 2005; Souverein et al, 2005; Albahrani et al, 2007; Shanker et al, 2008; Haase et al, 2012). Необходимо отметить, что данному варианту иногда сопутствует тесно-сцепленный с ним вариант $84G>A$ (ref SNP ID rs1799837), частота которого оценивается приблизительно в 0.3%-0.7% (Wang et al, 1995; Al-Bustan et al, 2013). Эти однонуклеотидные замены расположены в «горячей» точке метилирования CCGG и могут участвовать в регуляции экспрессии гена *APOA1* (Wang et al, 1995).

В таблице 3 обобщены сведения о влиянии вариантов $83C>T$ гена *APOA1* на показатели липидного спектра крови. Так, повышение концентрации Апо А-I и/или Х-ЛПВП и снижение концентрации ТГ в плазме крови наблюдается при носительстве аллеля *T83* гена *APOA1* среди белого населения Европы и США, а также в Китае (Kamboh et al, 1996; Larson et al, 2002; Zou et al, 2003; Ma et al, 2003). В нескольких исследованиях было показано, что носительство аллеля *T83* гена *APOA1* ассоциировано со снижением риска развития атеросклероза и ожирения (Zou et al, 2003; Chen et al, 2009). С другой стороны ряд исследований не установил вклада этих вариантов в риск развития сердечно-сосудистой патологии (Wang et al, 1998; Padmaja et al, 2009).

В целом, можно заключить, что влияние вариантов $(-75)G>A$ и $83C>T$ гена *APOA1* на концентрацию Апо А-I носит популяционно-зависимый характер. Таким образом, оценка вклада этих вариантов в формирование предрасположенности к развитию атеросклероза должно выполняться для конкретной популяции. Влияние этих вариантов на развитие атеросклероза в популяции Санкт-Петербурга до сих пор оставалось неизученным.

Влияние вариантов $83C>T$ гена *APOA1* на концентрацию Апо А-I и Х-ЛПВП в плазме крови

Эффект аллеля $T83$ гена <i>APOA1</i> на концентрацию Апо А-I и Х-ЛПВП в плазме крови
<i>Повышение концентрации Апо А-I и/или Х-ЛПВП в плазме крови:</i> • Финляндия (Pulkkinen et al, 2000) • Дания (Haase et al, 2012) • Австралия (Wang et al, 1996) • США, белое население (Kamboh et al, 1996; Larson et al, 2002) • Китай (Zou et al, 2003) • Гонконг (Ma et al, 2003)
<i>Не влиял на концентрации Апо А-I и/или Х-ЛПВП в плазме крови:</i> • Нигерия (Kamboh et al, 1996) • Кувейт (Al-Bustan et al, 2013) • Иран (Bandarian et al, 2013) • Индия (Padmaja et al, 2009)

1.4 Роль транспортера ABCG1 в развитии атеросклероза

1.4.1 Структура и функции белка ABCG1

АТФ-связывающий кассетный транспортер ABCG1 млекопитающих был впервые описан в середине 1990-х годов как гомолог белка «white protein» *Drosophila Melanogaster* (Klucken et al, 2000). Транспортер ABCG1 является основным представителем подсемейства ABCG суперсемейства ABC транспортеров, которое представлено у человека 49 белками (Schmitz et al, 2001). Белок имеет в своем составе 678 или 666 аминокислот в зависимости от изоформы, его молекулярная масса составляет 74-76 кДа (Engel et al, 2006). В структуре белка ABCG1 выделяют 1 трансмембранный домен, состоящий из шести гидрофобных альфа спиралей. Нуклеотид-связывающая область, локализованная в цитозоле, содержит высококонсервативные последовательности Walker A и Walker B, которые представлены во многих

белках, использующих АТФ в качестве источника энергии, и мотив Walker C (или Signature), уникальный для ABC транспортеров (Lorkowski, Cullen , 2002). Особенностью доменной архитектуры транспортеров подсемейства ABCG является то, что трансмембранный домен находится на С-конце белка, а АТФ-связывающий на N-конце (Рисунок 8А). Поскольку активный ABC транспортер должен иметь 2 трансмембранных домена и 2 домена для гидролиза АТФ, то предполагается, что для выполнения своей функции необходимо образование гомодимера ABCG1, представленного на рисунке 8Б (Gellisen et al, 2006). При этом функция транспортера ABCG1 заключается в обеспечении переноса ХС, а также оксистеролов на частицы ЛПВП (Wang et al, 2004).

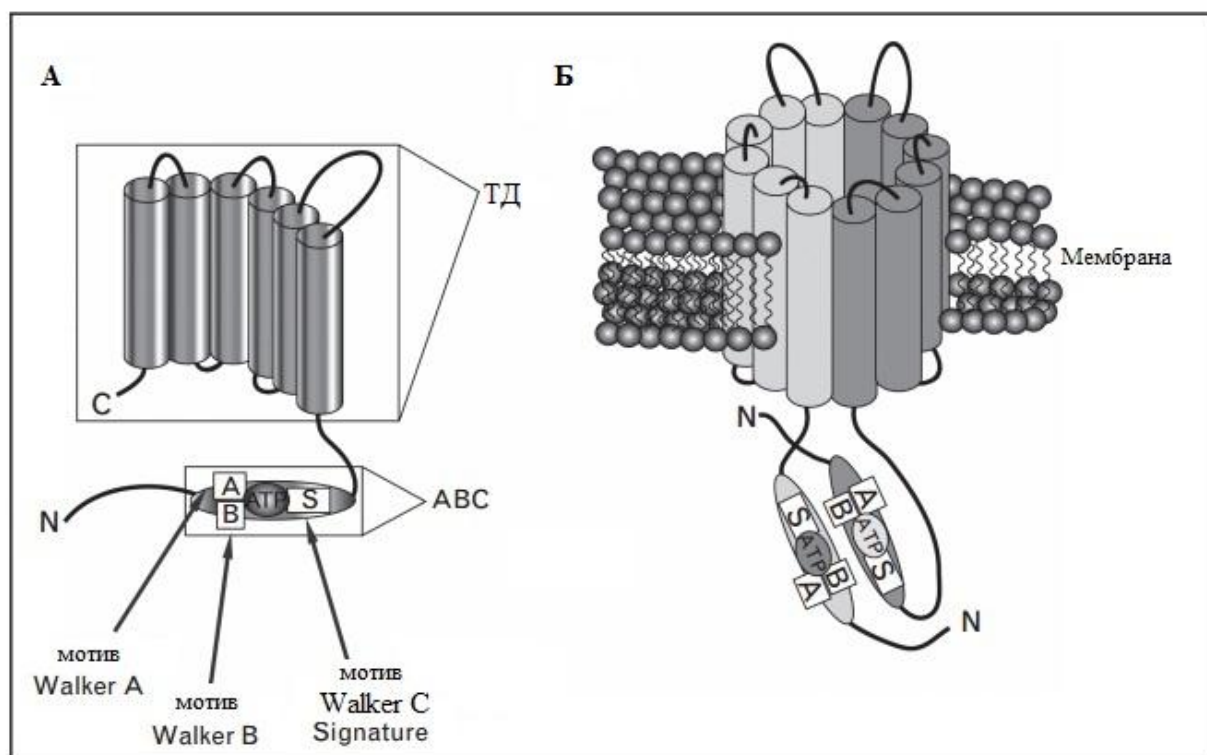


Рисунок 8. А. Доменная организация транспортера ABCG1. Обозначения: ТД – трансмембранный домен, ABC – АТФ-связывающий домен. **Б.** Гомодимер ABCG1 (Tarling, 2013).

На цитоплазматической мембране ABCG1 локализуется преимущественно в районе липидных рафтов (Matsuo, 2010). Транспортер ABCG1 присутствует также и на мембранах эндосом, эндоплазматического

ретикулума и аппарата Гольджи, что свидетельствует о том, что он вовлечен во внутриклеточный транспорт ХС (Gellisen et al, 2006, Sturek et al, 2010; Tarling, 2013). Показано, что пальмитоилирование по 311 остатку цистеина необходимо для встраивания белка ABCG1 в цитоплазматическую мембрану и осуществления транспорта ХС (Munday, Lopez, 2007; Gu et al, 2013). Находящиеся поблизости Asn316 и Phe320, входящие в состав консервативного участка для всех ABCG транспортеров, также важны для траффика ABCG1 к клеточной мембране (Wang et al, 2013).

Механизм переноса ХС на частицы ЛПВП в настоящее время не ясен. Однако предполагается, что ABCG1 обеспечивает транспорт ХС к внешнему слою мембраны и для этого не требуется непосредственное связывание ABCG1 с белками ЛПВП (Wang et al, 2006). Известно, что гиперэкспрессия гена *ABCG1* приводит к увеличению мембранных пулов ХС, доступного для ЛПВП (Wang et al, 2006). Также продемонстрирована роль ABCG1 в образовании внеклеточных микродоменов, богатых свободным ХС (Freeman et al, 2013). На сегодняшний день предложено несколько моделей, описывающих возможный механизм переноса ХС через мембрану с участием транспортера ABCG1. Первая модель предполагает, что транспортер ABCG1 помогает молекуле ХС преодолеть энергетический барьер и войти в поверхностный гидрофильный слой мембраны, после чего должна произойти встреча молекулы ХС с акцептором, которым в большинстве случаев является ЛПВП (Yvan-Charvet et al, 2010). Согласно второй модели транспортер ABCG1 является флюппазой: 1) либо фосфолипид-флюппазой, которая вызывает соответствующие изменения в фосфолипидном бислое, которые обеспечивают переход стерина во внешний слой мембраны; 2) либо холестерин-флиппазой (Yvan-Charvet et al, 2010). Есть предположения, что ABCG1 может быть фосфатидил-серин транслоказой, так как показано, что связывание с фосфатидил-серином существенно увеличивает АТФазную активность ABCG1 (Seres et al, 2008; Hirayama et al, 2013).

1.4.2 Изоформы белка ABCG1

Альтернативный сплайсинг 36 нуклеотидов в экзоне 20 приводит к существованию у человека двух изоформ белка ABCG1(-12) и ABCG1(+12) (666 и 678 аминокислот), которые отличаются наличием пептида 12 аминокислот (VKQTKRLKGLRK) между трансмембранным и нуклеотид-связывающим доменами (Рисунок 9) (Engel et al, 2006). Обе эти изоформы присутствуют в макрофагах, гладкомышечных клетках артерий и эндотелиальных клетках, также в печени, легких, селезенке и мозге (Engel et al, 2006; Gellisen et al, 2010). Соотношение изоформ ABCG1(+12)/ABCG1(-12) варьирует в пределах 0.4-1 в различных органах и тканях (Gellisen et al, 2010). У мышей изоформа ABCG1(+12) отсутствует, она является уникальной для приматов и некоторых других млекопитающих (Gellisen et al, 2010; Burns et al, 2013). Изоформа ABCG1(-12) была детектирована на клеточной мембране клетки и отличается повышенной активностью в отношении элиминации ХС (Engel et al, 2006; Gellisen et al, 2010). В среднем, клетки, экспрессирующие только изоформу ABCG1(-12), выводят ХС в 2 раза быстрее, чем клетки, экспрессирующие только изоформу ABCG1(+12) (Gellisen et al, 2010). Были показаны различия в посттрансляционном процессинге изоформ ABCG1: изоформа ABCG1(+12) менее стабильна, чем ABCG1(-12) (Gellisen 2010). Предполагается, что протеинкиназа А играет роль в этом процессе, фосфорилируя серин в 389 положении белка, что является существенным для его функции, стабилизирует белок и защищает его от деградации (Gellisen et al, 2012).

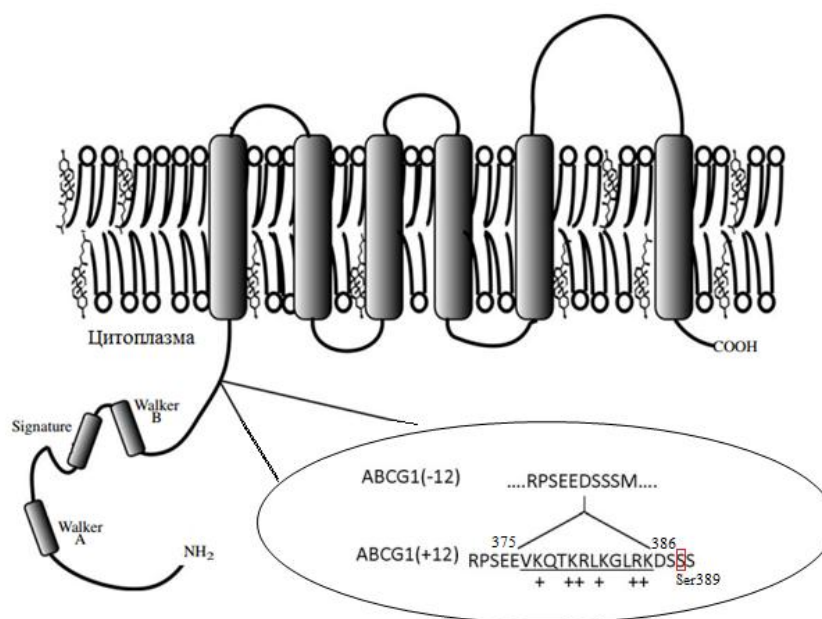


Рисунок 9. Вставка 12 аминокислот, объясняющая существование двух изоформ белка ABCG1 (Engel et al, 2006; дополнено Gellisen et al, 2012).

Анализ вторичной структуры ABCG1 показал, что область между аминокислотами 350 и 400 может образовать дополнительную альфа спираль в случае изоформы ABCG1(+12), что, безусловно, предполагает влияние на структуру и функции белка (Gellisen et al, 2012). Однако функция дополнительной изоформы ABCG1(+12) в настоящее время неизвестна.

1.4.3 Структура гена *ABCG1* и регуляция его экспрессии

Ген *ABCG1* локализован на длинном плече хромосомы 21 в локусе 21q22.3. Основной транскрипт состоит из 15 экзонов протяженностью 78 000 пар нуклеотидов (Sabot et al, 2005). Промоторная и 5'-нетранслируемая области гена *ABCG1* характеризуются большим содержанием гуанина и цитозина и содержит элементы, которые могут снижать уровень транскрипции (Lorkowski, Cullen, 2002). Регуляторная область гена *ABCG1* не имеет классического ТАТА-бокса и, по-видимому, несет в себе несколько альтернативных сайтов начала транскрипции (Langman et al, 2000; Lorkowski et al, 2001).

Ген *ABCG1* экспрессируется во всех органах и тканях, однако, наибольший уровень его экспрессии наблюдается в моноцитах и макрофагах, клетках эндотелия, нейронах, в тканях сердца, легких, почек, селезенки и мозга (Klucken et al, 2000; Tarr, Tarling, 2009).

Экспрессия гена *ABCG1* контролируется транскрипционными факторами $LXR\alpha$ и $LXR\beta$ и инициируется при перегрузке клетки ХС (Venkateswaran et al, 2000; Langman et al, 2000; Kennedy et al, 2001). В качестве лигандов для факторов $LXR\alpha$ и $LXR\beta$ выступают оксипроизводные ХС, которые являются основной формой запасаения ХС в клетке (Luoma, 2008). На рисунке 10 представлены возможные эндогенные лиганды, при взаимодействии с которыми происходит активация $LXR\alpha/LXR\beta$ и их последующая димеризация с RXR (Venkateswaran et al, 2000; Fu et al, 2001; Murthy et al, 2002).

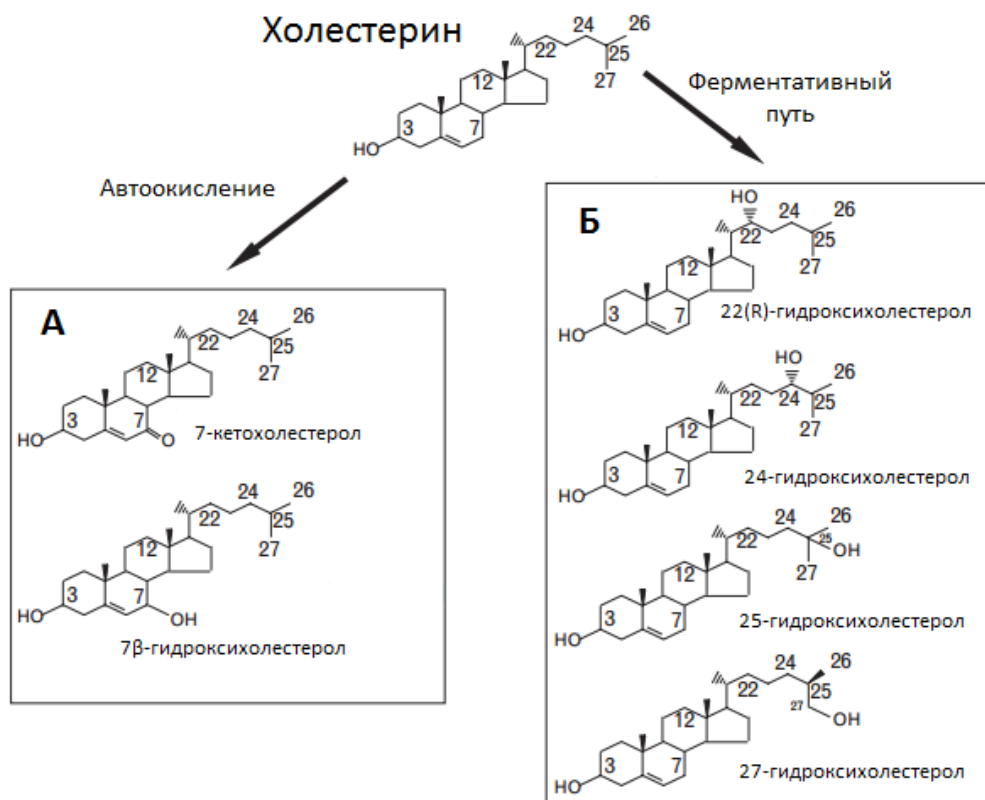


Рисунок 10. Оксипроизводные холестерина. А. Цитотоксичные оксистеролы, не являющиеся естественными лигандами для транскрипционных факторов $LXR\alpha$ и $LXR\beta$. Б. Оксистеролы, которые могут быть лигандами для факторов $LXR\alpha$ и $LXR\beta$ (Tarling, 2013).

Увеличение клеточного содержания ХС в норме должно приводить к образованию оксистеролов, активации LXR/RXR, индукции экспрессии гена *ABCG1* и усилению транспорта ХС (Venkateswaran et al, 2000; Murthy et al, 2002; Sabol et al, 2005). Гетеродимеры LXR/RXR связываются элементами LXRE (DR4 повторы) в регуляторных областях гена *ABCG1* (Рисунок 11А) (Sabol et al, 2005). На рисунке 11Б показано расположение элементов LXRE в гене *ABCG1* (Kennedy et al, 2001; Uehara et al, 2007; Iizuka et al, 2012). Коактиватор GPS2 осуществляет рекрутирование и посадку LXR/RXR в промоторной области гена *ABCG1* (Jakobsson et al, 2009). Показано, что в результате активация LXR α и/или LXR β происходит увеличение экспрессии гена *ABCG1* и перераспределение белка ABCG1 из внутриклеточного пула на клеточную мембрану (Wang et al, 2006).

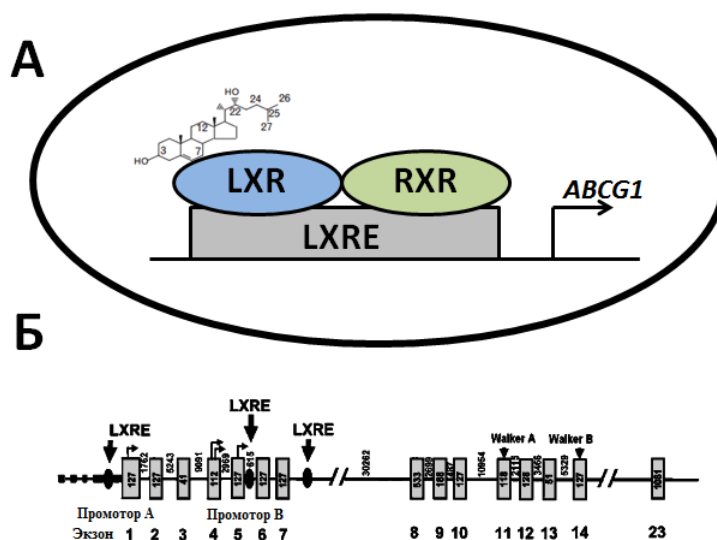


Рисунок 11. Регуляция экспрессии гена *ABCG1* при участии транскрипционных факторов LXR α и LXR β . **А.** Схематическое изображение активации гетеродимера LXR/RXR. **Б.** Расположение элементов LXRE в гене *ABCG1* (Iizuka et al, 2012, с модификациями).

Существуют дополнительные пути регуляции экспрессии гена *ABCG1* через систему LXR/RXR. В частности экспрессия гена *ABCG1* может быть

индуцирована через активацию транскрипционного фактора RXR ретиноевой кислотой (Majadlawieh, Ro, 2010). Было показано, что ядерные рецепторы PPAR α , PPAR γ и PPAR δ стимулируют отток ХС из макрофагов путем активации транскрипции гена *LXR α* , которая в свою очередь приводит к усилению транскрипции гена *ABCG1* (Chawla et al, 2001; Jiang et al, 2010; Baker et al, 2010; Majadlawieh, Ro, 2010). Физиологический лиганд для ядерных рецепторов PPARs неизвестен, однако, показана активация PPAR α и PPAR δ целым рядом насыщенных и ненасыщенных жирных кислот тогда, как в случае PPAR γ роль активаторов играют в основном полиненасыщенные жирные кислоты (Majadlawieh, Ro, 2010).

Антивоспалительный цитокин TGF β 1 также осуществляет положительную регуляцию экспрессии гена *ABCG1* через активацию LXR α (Hu et al, 2010). В то же время провоспалительные медиаторы такие, как IFN- γ , TNF- α , IL1 β и IL6, снижают экспрессию гена *ABCG1* путем ингибирования ядерного рецептора PPAR γ или через негативный фактор транскрипции STAT1 (Seo et al, 2011; Xue et al, 2012; Park et al, 2012).

Полиненасыщенные жирные кислоты снижают уровень экспрессии гена *ABCG1*, предположительно путем репрессии транскрипции генов *LXR α* и *LXR β* (Uehara et al, 2006; Ku et al, 2012; Sarabi et al, 2013). Транскрипционный фактор ZNF202, негативно регулирующий экспрессию генов липидного обмена, может подавлять экспрессию гена *ABCG1* в клетках печени. ZNF202 связывается с G_nT повторами в промоторе гена *ABCG1* и снижает уровень транскрипции гена *ABCG1* (Porsch-Ozcurumez et al, 2001).

В последнее время благодаря возросшему интересу к механизмам регуляции экспрессии генов посредством микроРНК удалось установить микроРНК, участвующие в контроле генов липидного обмена (Adlakha et al, 2013). Было показано, что связывание микроРНК-128-2 с 3'-нетранслируемой областью мРНК гена *ABCG1* негативно регулирует его экспрессию (Adlakha et al, 2013).

1.4.4 Роль ABCG1 в развитии атеросклероза

Значительное число работ указывает на то, что основной функцией транспортера ABCG1 является транспорт ХС через мембрану клетки на ЛПВП, то есть участие в ОТХ (Wang et al, 2004; Jessup et al, 2006; Gelissen et al, 2006). Роль ABCG1 в элиминации ХС из макрофагов была впервые продемонстрирована в работе Klucken et al, в ходе которой было установлено, что использование малых РНК, комплементарных мРНК *ABCG1* приводит к снижению оттока ХС (Klucken et al, 2000). Эксперименты с трансгенными животными показали ключевую роль транспортера ABCG1 в контроле гомеостаза холестерина в клетке и обеспечении оттока ХС на ЛПВП (Kennedy et al, 2005). У мышей с нокаутом гена *ABCG1* наблюдались массивные отложения липидов в макрофагах сосудистой стенки и в клетках печени без изменений уровня липидов в плазме крови (Kennedy et al, 2005; Out et al, 2006; Yvan-Charvet et al, 2007; Out et al, 2007). Гиперэксперсия гена *ABCG1* также не сопровождалась изменением уровня ЛПВП у мышей, однако, коррелировала с увеличением скорости элиминации ХС из макрофагов (Basso et al, 2006; Burgess et al, 2008).

Для выяснения роли ABCG1 в развитии атеросклероза особый интерес представляют опыты по пересадке костного мозга от мышей с нокаутом гена *ABCG1* животным с нокаутом гена аполипопротеина Е или гена рецептора ЛПНП, поскольку последние представляют собой модель экспериментальной гиперхолестеринемии. Однако разными исследовательскими группами в ходе таких экспериментов были получены противоположные результаты. Одни авторы сообщают об увеличении площади атеросклеротических повреждений сосудов в случае селективной инактивации гена *ABCG1* в макрофагах (Out et al, 2006; Lammers et al, 2009; Westerterp et al, 2010; Meurs et al, 2012). В других работах было продемонстрировано уменьшение атеросклеротических поражений у *Abcg1*^{-/-}*Ldlr*^{-/-} мышей (Basso et al, 2006; Ranalletta et al, 2006; Baldan et al, 2006). Последний результат можно объяснить повышенным

апоптозом *Abcg1*^{-/-} макрофагов, что в свою очередь приводит к гибели макрофагов ранее стадии их трансформации в пенистые клетки (Tarling et al, 2010).

Известно, что транспортер ABCG1 работает в тандеме с транспортером ABCA1. Транспортер ABCA1 переносит ХС на аполипопротеин А-I, тогда как ABCG1 осуществляет перенос ХС и оксистеролов на ЛПВП. Было показано, что комбинированный нокаут генов *ABCA1* и *ABCG1* приводит к значительному усилению темпов накопления холестерина в сосудистой стенке и развитию атеросклероза в сравнении с животными с нокаутом только одного гена (Yvan-Charvet et al, 2007; Out et al, 2008; Westerterp et al, 2013). Необходимо отметить, что ABCA1 и ABCG1 могут играть разные роли в атерогенезе, поскольку эти белки отличаются по своим функциям. В частности показано что, ABCG1 препятствует накоплению в клетке цитотоксических окисленных форм холестерина – 7-кето-холестерола (7-кето-ХС) и 7β-гидроксихолестерола (Engel et al, 2007; Terasaka et al, 2007).

Накопление 7-кето-ХС и 7β-гидроксихолестерола отличает сформировавшиеся и прогрессирующие атеросклеротические бляшки от начальных стадий атеросклеротических повреждений (Душкин, 2006). Необходимо отметить, что данные оксистеролы не являются лигандами для транскрипционных факторов LXRα и LXRβ (Рисунок 11) (Tarling, 2013). Таким образом, в процессе развития атеросклеротического поражения от липидного пятна к фиброзной бляшке уровень 27-гидроксихолестерола (27-ОН-ХС) увеличивается в 2 раза, а содержание 7-кето-ХС повышается в 6 раз, что свидетельствует об изменении отношения между этими оксистеролами (Душкин, 2006). Так, на ранних стадиях развития атеросклеротического очага наблюдается более низкое содержание аутоокисленных форм ХС по отношению к продуктам ферментативного гидроксилирования ХС (27-ОН-ХС:7-кето-ХС=3:1). На поздних стадиях развития атеросклеротического очага

соотношение этих оксистеролов выравнивается (27-ОН-ХС:7-кето-ХС=1:1) (Душкин, 2006).

Таким образом, атеропротективная роль ABCG1 может быть также связана с элиминацией 7-кето-ХС и других оксистеролов из макрофагов. Это, в свою очередь, объясняет другие антиатерогенные активности ABCG1, в частности препятствие оксистерол-индуцированному апоптозу макрофагов и обеспечение противовоспалительного потенциала ЛПВП (Terasaka et al, 2007; Westerterp et al, 2013). Апоптоз макрофагов имеет исключительное значение для формирования некротического ядра атеросклеротической бляшки и играет большую роль в ее дестабилизации на поздних стадиях атерогенеза (Moore, Tabas, 2011). Макрофаги мышей с нокаутом гена *ABCG1* отличаются повышенным уровнем секреции провоспалительных цитокинов и медиаторов, что в свою очередь может способствовать прогрессии атеросклероза (Yvan-Charvet et al, 2008; Yvan-Charvet et al, 2010).

В последние годы появились доказательства участия ABCG1 в процессинге NO-синтазы в эндотелиальных клетках. Мыши с нокаутом гена *ABCG1* демонстрируют сниженную активность эндотелиальной NO-синтазы и, как следствие, дисфункцию эндотелия (Terasaka et al, 2008; Whetzel et al, 2010). Таким образом, транспортер ABCG1 предупреждает развитие эндотелиальной дисфункции, что также можно отнести к атеропротективным свойствам данного белка (Munch et al, 2012; Xue et al, 2012; Xue et al, 2013).

Можно заключить, что экспрессия гена *ABCG1* в макрофагах сосудистой стенки как до, так и после их трансформации в пенистые клетки, может иметь важное значение в патогенезе атеросклероза. Однако, несмотря на многочисленные исследования, проведенные с использованием трансгенных животных, роль транспортера ABCG1 в развитии атеросклероза у человека остается практически неизученной. Показано, что мРНК *ABCG1* детектируется в аутоптатах атеросклеротических бляшек человека, что свидетельствует о том, что ABCG1 может принимать участие в удалении ХС из бляшек и влиять на

развитие и прогрессирование атеросклероза (Щелкунова и др., 2013). Ранее было показано, что уровень мРНК *ABCG1* и белка *ABCG1* снижен в моноцитах и макрофагах пациентов с сахарным диабетом 2 типа (Mauldin et al, 2008; Zhou et al, 2008). Кроме того продемонстрировано, что сниженный уровень экспрессии гена *ABCG1* в макрофагах пациентов с сахарным диабетом 2 типа коррелирует со снижением оттока ХС из макрофагов, что может свидетельствовать о нарушении элиминации ХС из сосудистой стенки у данных пациентов (Mauldin et al, 2008). Таким образом, антиатерогенная активность транспортера *ABCG1* в макрофагах определяется, прежде всего, уровнем экспрессии гена *ABCG1*. Известно, что диабет 2 типа является фактором высокого риска развития сердечно-сосудистой патологии (Кисляк и др., 2008). Можно предположить, что снижение экспрессии гена *ABCG1* в моноцитах/макрофагах может быть одним из факторов, обуславливающим повышенный риск развития атеросклероза у пациентов с сахарным диабетом 2 типа. Это в свою очередь позволяет предполагать, что изменение экспрессии гена *ABCG1* в моноцитах/макрофагах может быть фактором, определяющим развитие атеросклероза у человека.

1.4.5 Полиморфные варианты гена *ABCG1*

Полногеномный анализ ассоциаций показал ассоциацию локуса хромосомы 21q22, где расположен ген *ABCG1*, с гиперхолестеринемией (Wang et al, 2011). Ген *ABCG1* содержит значительное число однонуклеотидных замен, основная часть которых находится в регуляторных областях данного гена (Iida et al, 2002). Только недавно была выявлена редкая вариация в кодирующей области гена *ABCG1*, приводящая к замене аминокислоты серин на лейцин в позиции 630 белка *ABCG1* (Ser630Leu) (Schou et al, 2012). Носительство этого аллеля гена *ABCG1* повышает относительный риск развития ИМ в 7.5 раз (95%ДИ (1.9–30.0)) (Schou et al, 2012). Таким образом, изменение структуры транспортера *ABCG1* может отражаться на его функции.

Для ряда популяций была продемонстрирована ассоциация полиморфных вариантов в регуляторных областях гена *ABCG1* с развитием коронарной болезни сердца (Furuyama et al, 2009; Xu et al, 2011; Schou et al, 2012). Исследования также показали, что вариации нуклеотидной последовательности в промоторной области гена *ABCG1* могут быть связаны с уровнем ОХС и Х-ЛПВП плазмы крови (Abellan et al, 2010; Abellan et al, 2011; Edmondson et al, 2011). Таким образом, можно предположить, что изменение уровня экспрессии гена *ABCG1* может оказывать влияние на эффективность ОХС и, как следствие, на предрасположенность к развитию атеросклероза.

Согласно последним данным в структуре гена выделяют два коровых промотора А и В, которые располагаются перед экзонами 1 и 5 соответственно (Iizuka et al, 2012). Снижение уровня транскрипции гена *ABCG1*, в частности, наблюдается при следующих заменах в промоторной области: $(-134)T>G$ (SNP ID rs1378577), $(-204)A>C$ (SNP ID rs1893590) и $(-384)G>A$ (SNP ID 4148082) в районе промотора А и $(-367)G>A$ (SNP ID rs57137919) и $(-376)C>T$ (SNP ID rs72542412) в районе промотора В (Iida et al, 2002; Xu et al, 2011; Olivier et al, 2012; Schou et al, 2012).

Редкие аллели вариантов $(-134)T>G$ и $(-204)A>C$ гена *ABCG1* встречаются в европейской популяции с частотой 20% и 26%, соответственно (Olivier et al, 2012). Для популяции Японии была показана ассоциация аллеля $G(-134)$ гена *ABCG1* с коронарной болезнью сердца (Furuyama et al, 2009). Однако вариант $(-134)T>G$ гена *ABCG1* в популяции Японии встречается значительно чаще, чем в популяции Европы: частота аллеля $G(-134)$ в исследовании Furuyama et al составила 44%. Также авторы работы отмечают снижение концентрации Х-ЛПВП в плазме крови у большинства носителей генотипа $GG(-134)$ *ABCG1* в японской популяции (Furuyama et al, 2009).

В это же время в популяционном исследовании, проведенном в Испании, была показана ассоциация вариантов $(-204)A>C$ гена *ABCG1* с концентрацией Х-ЛПВП плазмы крови (Abellan et al, 2010). Необходимо отметить, что, хотя

показано влияние полиненасыщенных жирных кислот на уровень экспрессии гена *ABCG1*, варианты $(-134)T>G$ и $(-204)A>C$ гена *ABCG1* не влияли на показатели липидного спектра плазмы крови в зависимости от содержания в пище полиненасыщенных жирных кислот (Abellan et al, 2011).

Исследование (Schou et al, 2012) продемонстрировало ассоциацию варианта $(-376)C>T$ с повышением относительного риска развития ИБС и ИМ в 2.2 раза (95% ДИ 1.2– 4.3). Также авторами было показано снижение уровня мРНК *ABCG1* в лимфоцитах у носителей генотипа *CT(-376)* по сравнению с носителями генотипа *CC(-376)* *ABCG1* (Schou et al, 2012). Однонуклеотидная замена $(-376)C>T$ встречается очень редко (частота редкого аллеля 0.2%) и расположена в сайте посадки транскрипционного фактора Sp1 (Schou et al, 2012). Следует отметить, что в возрасте 80 лет заболеваемость ИБС среди всех обследованных лиц составила 50% среди гетерозигот *CT(-376)* и только 25 % среди гомозигот *CC(-376)* (Schou et al, 2012). В то же время не было выявлено корреляции этого варианта с уровнем Х-ЛПВП, что дает основания полагать, что изменение экспрессии гена может быть независимым от уровня липидов плазмы крови фактором риска развития сердечно-сосудистой патологии, обусловленной атеросклерозом.

В то же время исследование Schou et al продемонстрировало снижение уровня Х-ЛПВП плазмы крови у носителей варианта $(-1082)C>T$ гена *ABCG1* (частота редкого аллеля 0.6%) (Schou et al, 2012). Однако ассоциации вариантов $(-1082)C>T$ гена *ABCG1* с развитием атеросклероза в этом исследовании выявлено не было.

В популяции Китая были установлены варианты $(-367)G>A$ (rs57137919) и $(-768)G>A$ (rs2234714) гена *ABCG1*, ассоциированные со снижением относительного риска развития коронарного атеросклероза и ИМ (Xu et al, 2011). Кроме того вариант $(-367)G>A$ гена *ABCG1* ассоциировался со снижением распространения диффузного атеросклероза, то есть с меньшим количеством пораженных артерий (Xu et al, 2011). Частота аллеля $(-367)A$ гена

ABCG1 в китайской популяции составила 26% по сравнению с 14% в европейской популяции (Xu et al, 2011; Schou et al, 2012). Частота аллеля (-768)A гена *ABCG1* в китайской популяции составила 46% по сравнению с 26% в европейской популяции (Xu et al, 2011; Schou et al, 2012). Однако, как показано в исследовании Schou et al, варианты (-367)G>A и (-768)G>A гена *ABCG1* не влияют на риск развития атеросклероза в популяции Европы. Также ни в исследовании Xu et al, ни в исследовании Schou et al не было показано ассоциации этих вариантов с показателями липидного спектра плазмы крови.

В целом, можно заключить, что полиморфные варианты гена *ABCG1* могут вносить вклад в формирование предрасположенности к атеросклерозу. Следует отметить, что влияние вариантов гена *ABCG1*, как и вариантов гена *APOA1*, на риск развития атеросклероза в популяции Санкт-Петербурга до настоящего времени оставалась неизученным. Апо А-I и транспортер *ABCG1* играют ключевую роль в эффективной мобилизации ХС из макрофагов и предотвращении их трансформации в пенистые клетки. Результаты исследований последних лет дают основания полагать, что уровень экспрессии гена *ABCG1* может быть фактором, влияющим на развитие и прогрессирование атеросклеротического процесса (Mauldin et al, 2008; Schou et al, 2012). Таким образом, настоящее исследование посвящено актуальной проблеме изучения роли экспрессии гена *ABCG1* в моноцитах и макрофагах и полиморфных вариантов генов *ABCG1* и *APOA1* в формировании предрасположенности к атеросклерозу.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Характеристика обследованных групп

Для проведения исследования были собраны образцы венозной крови 222 пациентов (70% мужчин и 30% женщин; средний возраст 53.78 ± 0.66 лет) с атеросклерозом, подтвержденным при ангиографическом исследовании. Обследование и ангиографическая диагностика атеросклероза проводились на кафедре факультетской хирургии в Санкт-Петербургском Государственном Медицинском Университете им. академика И.П. Павлова и в Клинической больнице №122 им. Л.Г. Соколова ФМБА г. Санкт-Петербурга. Первые клинические проявления атеросклероза у пациентов наблюдались в возрасте 48.44 ± 0.63 лет. Ангиографическое исследование выполнялось каждому пациенту в определенных артериальных бассейнах в зависимости от медицинских показаний для конкретного пациента. Локализация атеросклероза у каждого пациента была, как минимум, в одной артерии одного из трех артериальных бассейнов – церебральный, коронарный, бассейн артерий нижних конечностей. Группа пациентов была гетерогенной по степени локального (% окклюзии артерии атерогенной бляшкой) и диффузного (общее количество артерий, пораженных атеросклерозом) атеросклероза. У всех пациентов диагностированы соответствующие клинические проявления атеросклероза в зависимости от локализации пораженных артерий (ишемический инсульт или транзиторные ишемические атаки, ишемическая болезнь сердца или инфаркт миокарда, облитерирующий атеросклероз сосудов нижних конечностей). На рисунках 12 и 13 представлены ангиограммы двух пациентов с различной степенью стеноза коронарных артерий.

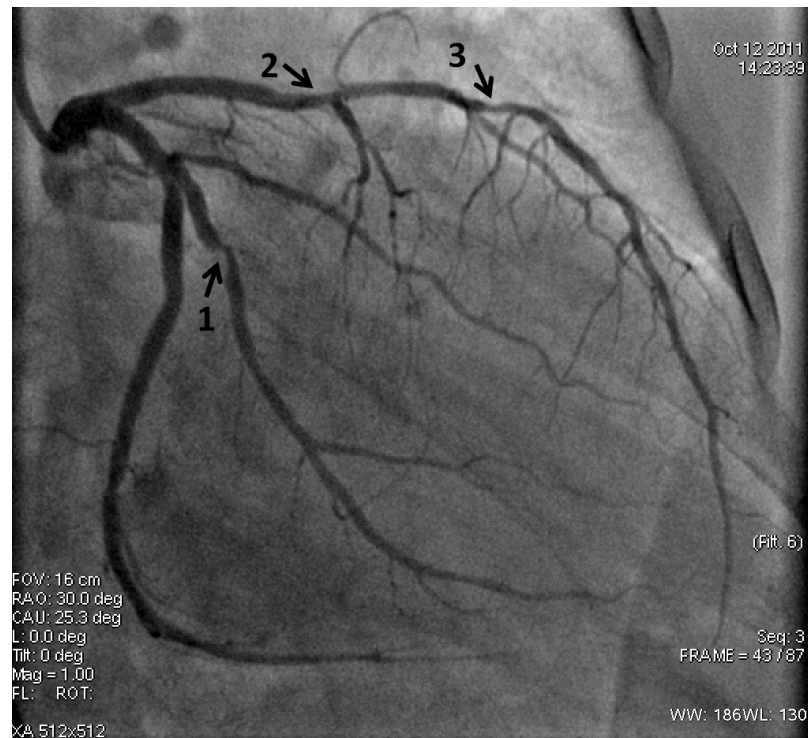


Рисунок 12. Ангиограмма пациента. Показаны: 1- стеноз 90% ветви тупого края; 2 – стеноз 25% и 3 – стеноз 50% передней межжелудочковой ветви левой коронарной артерии.



Рисунок 13. Ангиограмма пациента. Показана окклюзия (100%) передней межжелудочковой ветви левой коронарной артерии.

Контрольную группу составили 382 человек (66% мужчин и 34% женщин; средний возраст 47.12 ± 0.27 лет) без сердечно-сосудистых заболеваний, отмеченных в анамнезе. Лица, вошедшие в контрольную группу, были проконсультированы врачом-кардиологом, а проведенные обследования включали электрокардиографию, велоэргометрию, ЭХО-кардиографию. Возраст контрольной группы соответствовал возрасту начала заболевания у пациентов.

Все пациенты и лица, вошедшие в контрольную группу, являлись жителями Санкт-Петербурга и не были связаны узами родства.

У всех пациентов и у всех представителей контрольной группы были определены варианты $(-75G) > A$ (ref SNP ID rs670) и $83C > T$ (ref SNP ID rs5069) гена *APOA1* и варианты $(-134)T > G$ (SNP ID rs1378577), $(-204)A > C$ (SNP ID rs1893590) и $(-384)G > A$ (SNP ID rs4148082) гена *ABCG1*.

Для исследования экспрессии гена *ABCG1* в моноцитах и макрофагах были отобраны подгруппы пациентов, которые не принимали статины либо другие гиполипидемические препараты, и соответствующие по возрасту контрольные группы (Рисунок 14).

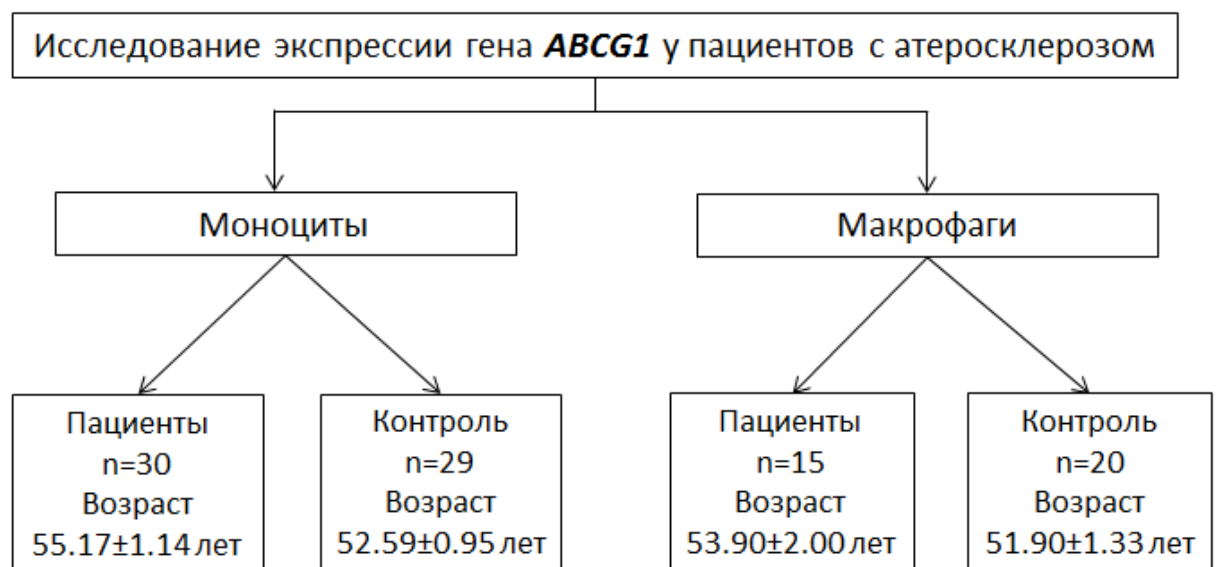


Рисунок 14. Дизайн эксперимента по изучению экспрессии гена *ABCG1* в моноцитах и макрофагах.

2.2 Измерение концентрации липидов в плазме крови

Концентрацию ОХС, Х-ЛПВП и ТГ в плазме крови измеряли на автоанализаторе А-15 (BioSystems, Испания) с использованием наборов фирмы BioSystems. Концентрацию Х-ЛПНП рассчитывали по формуле (1) Фридвальда. Коэффициент атерогенности (K_a) рассчитывали по формуле (2).

$$X_{лпнп} = OXC - X_{лпвп} - TG/2.2 \quad (1)$$

$$K_a = \frac{OXC - X_{лпвп}}{X_{лпвп}} \quad (2)$$

2.3 Культивирование моноцитов и макрофагов

Мононуклеарную фракцию получали из свежесобранной цельной крови (от 20 до 50 мл) методом градиентного центрифугирования при 1600 об/мин в растворе Фиколла ($\rho=1.077$, GE Healthcare UK Limited, Великобритания) по методике описанной ранее (Натвиг и др., 1980), дважды отмывали в холодном PBS. Далее мононуклеарные клетки ресуспендировали в культуральной среде (альфаМЕМ, 10% эмбриональная сыворотка, 5 мкг/мл антибиотиков (пенициллин G, стрептомицин)) и инкубировали в CO₂-инкубаторе при +37°C в течение 2 ч. После чего клетки дважды промывали в PBS. Прикрепившиеся к чашкам Петри моноциты культивировали в присутствии колоние-стимулирующего фактора макрофагов M-CSF (R&D Systems, США; 15 нг/мл) в течение суток для получения более чистой культуры. Для получения макрофагов моноциты культивировали в тех же условиях с добавлением фактора M-CSF в течение 5 суток с ежедневной заменой питательной среды. Микрофотографии моноцитов и макрофагов представлены на рисунке 15. Популяция моноцитов характеризовалась значительным числом клеток сферической и овальной форм. Популяция макрофагов отличалась присутствием множества клеток неправильной формы. Клетки дважды отмывали в PBS и использовали для выделения РНК или хранили сухой остаток клеток при температуре -86 °C для последующего выделения белка.

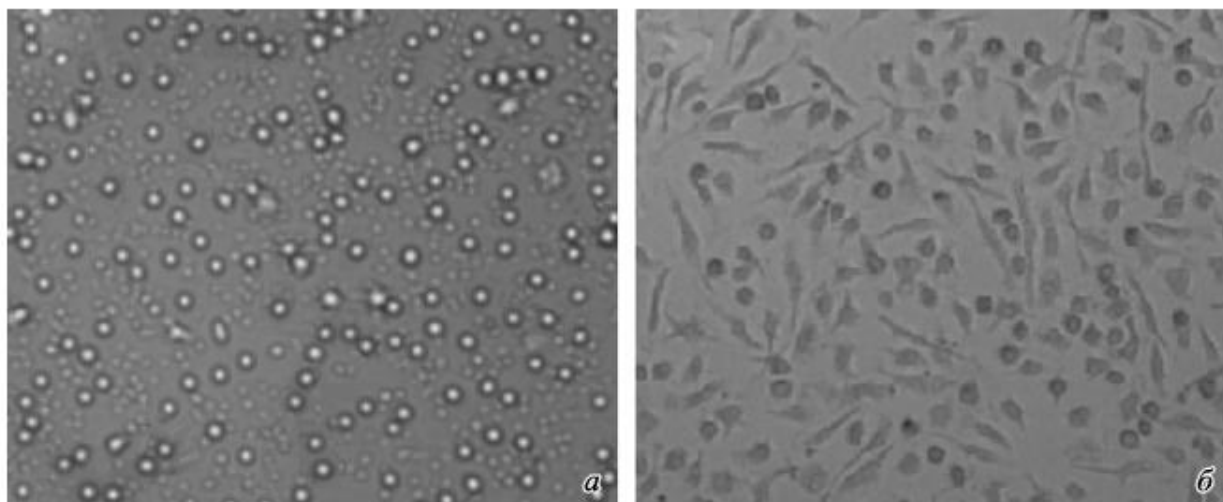


Рисунок 15. Микрофотографии полученных моноцитов и макрофагов в культуре: *а* – моноциты через 24 часа культивирования; *б* – макрофаги через 5 суток культивирования в присутствии фактора макрофагов M-CSF.

2.4 Оценка уровня мРНК гена *ABCG1*

Тотальная РНК была выделена из лимфоцитов с использованием набора для выделения РНК RNeasy Mini Kit (Qiagen, 74104, Нидерланды) в соответствии с инструкциями изготовителя. Чистоту выделенных образцов РНК проверяли спектрофотометрически. Если отношение их оптических плотностей при 260 нм и 280 нм было более или равнялось 2.0, а при 260 нм и 230 нм превышало значение 1.7, то образцы РНК считались очищенными от примесей. Целостность фракций рибосомальной РНК проверяли при помощи электрофореза в 1% агарозном геле по соотношению интенсивности полос, соответствующих 28S и 18S рРНК (2:1 в случае отсутствия деградации).

Для получения кДНК в ходе реакции обратной транскрипции использовали набор iScript[™] cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, США) согласно условиям производителя сразу после выделения РНК. Определение уровня мРНК гена *ABCG1* проводилось методом количественной ПЦР в режиме реального времени с флуоресцентными зондами TaqMan на приборе CFX96

Touch (Bio-Rad, США). Оценка уровня мРНК гена *ABCG1* и референсного гена была проведена с использованием разработанных нами с помощью программы PrimerExpress праймеров и зондов TaqMan (Таблица 4). В качестве референсного гена был использован конститутивно экспрессирующийся в клетках ген β -актина (*ACTB*), который является одним из наиболее стабильно экспрессирующихся генов «домашнего хозяйства» для исследуемых типов клеток (Maesh et al, 2010). Зонды отжигались на кДНК в местах экзон-экзонных стыков с целью исключения амплификации геномной ДНК. В экспериментах были использованы зонды и олигонуклеотиды фирмы «Синтол» (Москва).

Таблица 4

Нуклеотидная последовательность праймеров и зондов

Ген <i>ABCG1</i>	праймеры	5'-CACGTACCTACAGTGGATGT-3' – прямой 5'-GTCTAAGCCATAGATGGAGA-3' – обратный
	зонд	5'-(FAM)-CTATGTCAGGTATGGGTTCGAAG-(RTQ)1-3'
Ген <i>ACTB</i>	праймеры	5'-CGTGCTGCTGACCGAGG-3' – прямой 5'-ACAGCCTGGATAGCAACGTACA-3' – обратный
	зонд	5'-(R6G)-CCAACCGCGAGAAGATGACCCAGAT-(RTQ1)-3'

Зонды были мечены различными красителями для одновременной детекции *ABCG1* и *ACTB* при постановке реакции в одной пробирке. Амплификацию проводили в 25 мкл реакционной смеси. Амплификационная смесь состояла из 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄; 67 мМ Tris-HCl, pH 8,8; 1,5 мМ MgCl₂; 0,01% Tween 20; 0,2 мМ каждого dNTP; 0,5 мкМ каждого праймера, 0,7 мкМ каждого зонда TaqMan, 5 единиц активности (u) Taq ДНК полимеразы фирмы «Силекс» (Россия) и 1-15нг кДНК. ПЦР проводили в объеме 25 мкл в следующих условиях: после денатурации при 95°C в течение 3 мин проводили 45 циклов амплификации в следующем температурно-временном режиме:

плавление 95°C – 10 сек, отжиг 57°C – 10 сек, синтез 72°C – 10 сек. Каждый образец был амплифицирован в трех экземплярах, чтобы минимизировать отклонения результатов. В результате проведения ПЦР получали кинетические кривые, отображающие накопление ПЦР-продукта (Рисунок 16).

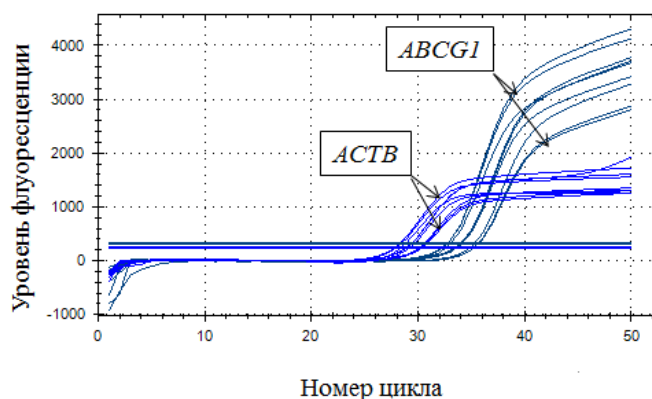


Рисунок 16. Кинетические кривые, полученные с использованием зондов TaqMan для генов *ABCG1* и *ACTB*.

Для построения стандартной кривой использовались следующие разведения контрольной кДНК: 1/2, 1/5, 1/10, 1/20, 1/40. Стандартная кривая в каждом эксперименте строилась как для гена *ABCG1*, так и для гена β -актина (Рисунок 17). Нормирование результатов проводили с помощью измерений соответствующих показателей для гена *ACTB*.

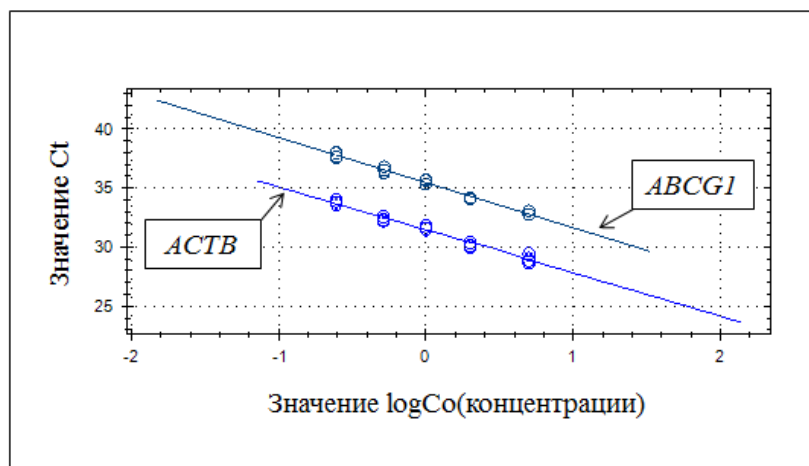


Рисунок 17. Стандартные кривые для генов *ABCG1* и *ACTB*.

2.5 Оценка содержания белка ABCG1

Мы проводили оценку содержания белка ABCG1 в культивированных моноцитах и макрофагах методом Вестерн блоттинга. Клетки лизировали в растворе (50 мМоль Tris, pH 8.0, 150 мМоль NaCl, 1% Triton X-100, 0,5% дезоксихолат натрия, 0,1% SDS), включающем коктейль из ингибиторов протеаз (Roche, Швейцария). Количество общего белка определяли по методу Бредфорд с использованием реагентов фирмы «Силекс» (Россия) на спектрофотометре SmartSpec™Plus (BioRad, США).

В качестве контроля использовали β -актин. Для этого равные количества белка клеточных лизатов смешивали с 4X буфером Лаеммли (200мМ Tris-HCl pH 6,8, 400 мМ β -меркаптоэтанол, 4 % додецилсульфат, 0,01 % бромфенол, 40 % глицерол (Laemmli et al, 1970) в соотношении 2 объёма белка/1 объём буфера, после чего кипятили в течение 3 мин при температуре 100⁰С. После кипячения пробы (20 мкг на лунку) наносились на 8% полиакриламидный гель (SDS-PAGE) с последующим проведением электрофореза в 1X трисглициновом буфере (5X стоковый раствор содержит: 25мМ Tris-HCl pH 8,8, 250 мМ глицина (pH 8,3), 0,1 % додецилсульфата). После этого с использованием прибора для полусухого переноса Semi-dry (Хеликон, Москва) проводился перенос белка с полиакриламидного геля на PVDF мембрану (Millipore, Massachusetts, США) с использованием буфера для переноса (39 мМ глицина, 48 мМ Tris-HCl pH 8,8, 0,037 % додецилсульфата, 20 % метанола). Далее мембрану однократно промывали в растворе PBS, после чего производили ее «забивку» 5% разведённым в растворе PBS обезжиренным сухим молоком (Альмабион, Россия) в течение 1 часа при комнатной температуре. После забивки инкубировали в течение ночи при +4⁰С PVDF фрагменты мембраны с первичными антителами к ABCG1 (1:500; NB400-132, Novus Biologicals, США) и с антителами к β -актину (1:10000; ab8227, Abcam, Великобритания). Антитела разводили в 1% растворе обезжиренного сухого молока (PBS, 0.05% Tween 20). После этого трижды промывали в холодном растворе PBS фрагменты

мембраны и инкубировали их в течение 1 часа при комнатной температуре со «вторичными антителами», конъюгированными с пероксидазой (1:3000; ab6721, Abcam, Великобритания). Затем снова трижды промывали холодным PBS. Далее связанные с соответствующим белком на мембране вторичные антитела идентифицировали с использованием набора LumigenTMPS-3 (GE Healthcare UK Limited, Великобритания) с использованием фотоплёнки CEA (Швеция). Данные вестерн-блоттинга анализировали с помощью программы ImageJ (Версия 1.38a для Windows, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Содержание ABCG1 нормировали к содержанию β -актина.

2.6 Выделение геномной ДНК из лейкоцитов периферической крови человека

Выделение ДНК из периферических лейкоцитов венозной крови выполнялось фенол-хлороформным методом (Маниатис и др., 1984). Лизис клеток крови проводили по методу Канкеля (Lahiri et al, 1992). Кровь собирали в пробирку, содержащую в качестве антикоагулянта 0,5 М раствор ЭДТА pH 8,0 (из расчета 1 мг ЭДТА на 1 мл крови). Собранная таким образом кровь замораживалась и хранилась при -20°C.

К 500 мкл крови добавляли 500 мкл раствора для лизиса эритроцитов (29 mM Tris-HCl pH7.4, 10mM NaCl, 3mM MgCl₂, 5% сахароза, 1% тритон X100), инкубировали в течение 5 мин., осторожно перемешивая, и центрифугировали 10 мин. при +9°C, 5000 об./мин. Супернатант сливали и осадок лейкоцитов ресуспендировали в растворе для лизиса мембран (29mM Tris-HCl pH7.4, 10mM NaCl, 1mM MgCl₂, 0.25M сахароза). Смесь центрифугировали при тех же условиях, супернатант сливали. К осадку добавляли 300 мкл раствора для протеиназы К (0.01M Tris-HCl, 0.01M NaCl, 0.01M ЭДТА pH8.0), 30мкл 30% SDS и протеиназу К до конечной концентрации 100 мкг/мл. Смесь инкубировали в течение 2-3 часов при +55°C для протеолиза.

Получившийся в результате протеолиза гомогенный раствор последовательно обрабатывали 300 мкл фенола, 300 мкл смеси фенол-хлороформ в соотношении 1/1, 300 мкл хлороформа. После каждой экстракции в течение 10 мин. при аккуратном перемешивании смесь центрифугировали 10 мин. при +20°C, 4000 об./мин. и отбирали водную фазу.

По окончании экстракции к водной фазе добавляли 1/10 объема 3М ацетата натрия и 2 объема 96% этанола. Осадок ДНК центрифугировали при +9°C, 10000 об./мин. в течение 10 мин. Затем осадок дважды промывали 70% этанолом при тех же условиях центрифугирования, высушивали на воздухе и растворяли в 100 мкл стерильной воды. Выход ДНК составлял 40-50 мкг ДНК из 500 мкл цельной крови.

2.7 Полимеразная цепная реакция и рестрикционный анализ

Типирование вариантов $(-134)T>G$ гена *ABCG1* проводили методом аллель-специфической ПЦР. Типирование других исследованных вариантов генов *ABCA1* и *ABCG1* проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и последующего рестрикционного анализа. Праймеры были синтезированы в фирме «Синтол» (Москва).

Продукты ПЦР и рестрикционного анализа подвергали электрофоретическому разделению при 30мА (150В) в полиакриламидном геле (ПААГ) соответствующей концентрации в трис-боратном буфере (0.9М Tris-ОН, 0.9М борная кислота, 20мМ ЭДТА), продолжительность электрофореза определяли по движению в ПААГ красителей ксилен-цианола и бромфенолового синего, входящих в состав буфера для нанесения проб (водный раствор 0.25% ксилен-цианола, 0.25% бромфенолового синего, 30% глицерина), результаты визуализировали в ультрафиолете после окрашивания бромистым этидием (Маниатис и др., 1984).

Амплификацию проводили на амплификаторе «Терцик» (термостат программируемый четырехканальный для проведения ПЦР анализа ТП4-ПЦР-01 – «Терцик» ТУ 9452-001-46482062-98) в микроцентрифужных полипропиленовых пробирках с крышкой объемом 600 мкл («Ахуген») с использованием термостабильной высокопроцессивной рекомбинантной Taq ДНК полимеразы фирмы «Силекс» (Россия).

2.7.1 Идентификация вариантов $(-134)T>G$ гена *ABCG1*

Идентификацию вариантов $(-134)T>G$ проводили методом аллель-специфической ПЦР, как описано ранее (Furuyama et al, 2009). Для амплификации соответствующих фрагментов ДНК были использованы следующие праймеры:

5'-ССАСТАТГТТСАСГААТГТАС-3' – общий прямой праймер F;

5'-СТАААГГГСАСГТТСТГТТССГТСА-3' – обратный праймер R1, специфичный для аллеля $T(-134)$;

5'-CAGGAAGTGAGCAGGGTTAGAAAAGGGCAGTTCTGTTCCCACC-3' – обратный праймер R2, специфичный для аллеля $G(-134)$.

ПЦР проводили с 0,5-1 мкг геномной ДНК в объеме 20 мкл. Амплификационная смесь состояла из 16,6 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 67 мМ Tris-HCl, pH 8,8; 1,5 мМ MgCl_2 ; 0,01% Tween 20; 0,2 мМ каждого dNTP; 1,5 мкМ праймера F, 1,8 мкМ праймера R1, 0,3 мкМ праймера R2 и 1 ед. Taq-полимеразы. Сверху наносили 25 мкл вазелинового масла для предотвращения испарения раствора.

После первоначальной денатурации при 95°C в течение 5 мин. 40 циклов амплификации проводили в следующем температурно-временном режиме: плавление 92°C – 40 сек., отжиг 57°C – 40 сек., синтез 72°C – 40 сек. После завершения 40 циклов амплификации проводили заключительный синтез при 72°C в течение 5 мин. В результате амплификации получали ПЦР продукты: размером 142 п.н. в случае аллеля $T(-134)$ и 161 п.н. в случае аллеля $G(-134)$.

Фрагменты ДНК подвергали электрофоретическому разделению в 8% ПААГ с последующей окраской бромистым этидием и визуализацией в ультрафиолете (Рисунок 18).

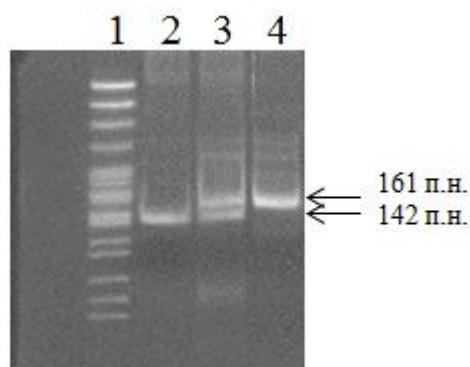


Рисунок 18. Идентификация вариантов $(-134)T>G$ гена *ABCG1*. 1 – маркер молекулярного веса рВR322/MspI, 2 – гомозигота *TT(-134)*, 3 – гетерозигота *TG(-134)*, 4 – гомозигота *GG(-134)*.

2.7.2 Идентификация вариантов $(-204)A>C$ гена *ABCG1*

Для амплификации соответствующего фрагмента ДНК были подобраны следующие праймеры (GenBank: AP001746.1):

5'-GCTTCACCAGCTCACTTTCC-3' – прямой праймер;

5'-GCATGATGCAATTCCATGTGT – обратный праймер.

ПЦР проводили с 0,5-1 мкг геномной ДНК в объеме 15 мкл. Амплификационная смесь состояла из 16,6 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 67 мМ Tris-HCl, pH 8,8; 2,5 мМ MgCl_2 ; 0,01% Tween 20; 0,2 мМ каждого dNTP; 1,5 мкМ каждого праймера и 1 ед. Taq-полимеразы. Сверху наносили 25 мкл вазелинового масла для предотвращения испарения раствора.

После первоначальной денатурации при 95°C в течение 5 мин. 35 циклов амплификации проводили в следующем температурно-временном режиме: плавление 92°C – 1 мин., отжиг 60°C – 1 мин., синтез 72°C – 1 мин. После завершения 35 циклов амплификации проводили заключительный синтез при

72°C в течение 5 мин. В результате амплификации получали ПЦР продукт размером 401 п.н.

Для проведения рестрикционного анализа ПЦР продукт, инкубировали с 1 ед. эндонуклеазы *Alu I* («СибЭнзим», Россия) в буфере *Y* («СибЭнзим», Россия), содержащем: 33 mM Tris-ацетат (pH 7.9 при 25°C), 10 mM магний-ацетат, 66 mM калий-ацетат, 1 mM DTT, при +37°C в течение ночи. В результате рестрикционного анализа в случае аллеля (-204)A получали фрагменты ДНК длиной 391 п.н. и 10 п.н. В случае аллеля (-204)C присутствует дополнительный сайт рестрикции для *Alu I* и получались фрагменты ДНК длиной 231 п.н., 170 п.н. и 10 п.н. Фрагменты ДНК подвергали электрофоретическому разделению в 8% ПААГ с последующей окраской бромистым этидием и визуализацией в ультрафиолете (Рисунок 19).

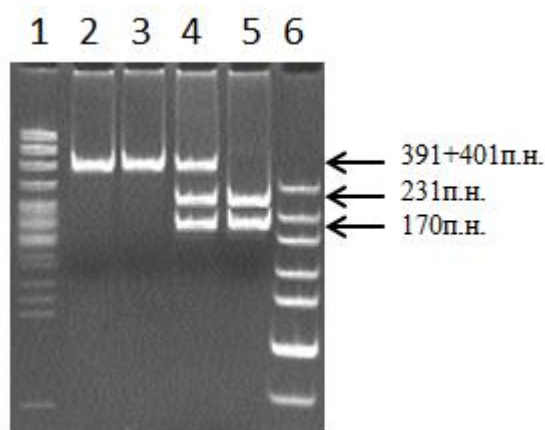


Рисунок 19. Идентификация вариантов (-204)A>C гена *ABCG1*. 1 – маркер молекулярного веса *pBR322/MspI*, 2 – ПЦР-продукт, 3 – гомозигота *CC(-204)*, 4 – гетерозигота *CA(-204)*, 5 – гомозигота *AA(-204)*, 6 – маркер молекулярного веса *Fermentas SM1223*.

2.7.3 Идентификация вариантов (-384)G>A гена *ABCG1*

Для амплификации соответствующего фрагмента ДНК были подобраны следующие праймеры (GenBank: AP001746.1):

5'-СТТТГСТГСААТААТСАТТГГСТАССГ-3' – прямой праймер;

5'-ААСТГАААТТССТССАГГТСТАСАГТ-3' – обратный праймер.

ПЦР проводили при таких же условиях, как описано для вариантов (-204)A>C гена *ABCG1*. В результате амплификации получался фрагмент размером 116 п.н.

Для проведения рестрикционного анализа ПЦР продукт, инкубировали с 1 ед. эндонуклеазы *MspI* («СибЭнзим», Россия) в буфере В («СибЭнзим», Россия), содержащем: 10 mM Tris-HCl (pH 7.6 при 25°C), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, при +37°C в течение ночи. В результате рестрикционного анализа в случае аллеля G(-384) получали фрагменты ДНК длиной 91 п.н. и 25 п.н. В случае аллеля A(-384) сайт узнавания для эндонуклеазы *MspI* отсутствует, поэтому получали один фрагмент длиной 116 п.н. Фрагменты ДНК подвергали электрофоретическому разделению в 8% ПААГ с последующей окраской бромистым этидием и визуализацией в ультрафиолете (Рисунок 20).

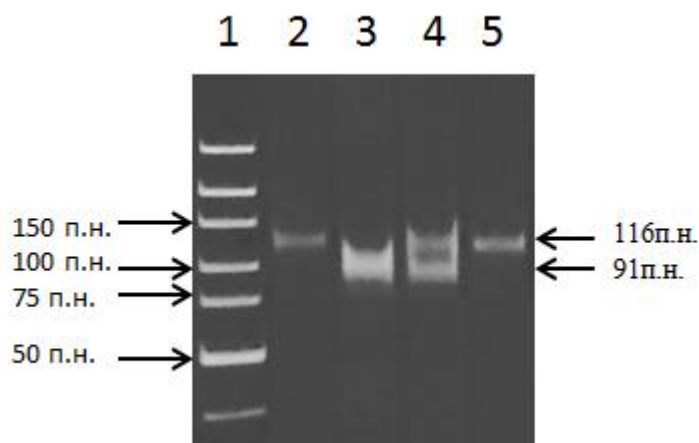


Рисунок 20. Идентификация вариантов (-204)A>C гена *ABCG1*. 1 – маркер молекулярного веса Fermentas SM1223, 2 – ПЦР-продукт, 3 – гомозигота GG(-384), 4 – гетерозигота GA(-384), 5 – гомозигота AA(-384).

2.7.4 Идентификация вариантов (-75)G>A и 83C>T гена APOA1

Идентификацию вариантов (-75)G>A и 83C>T проводили методом ПЦР с последующим рестрикционным анализом, как описано ранее (Pulkkinen et al, 2000). Для амплификации фрагмента 433 п.н. 5'-регуляторной области гена APOA1 были использованы следующие праймеры:

5'-AGGGACAGAGCTGATCCTTGAACCTTAAG-3' – прямой праймер;

5'-TTAGGGGACACCTAGCCCTCAGGAAGAGCA-3' – обратный праймер

ПЦР проводили с 0,5-1 мкг геномной ДНК в объеме 15 мкл. Амплификационная смесь состояла из 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄; 67 мМ Tris-HCl, pH 8,8; 1,5 мМ MgCl₂; 0,01% Tween 20; 0,2 мМ каждого dNTP; 1,5 мкМ каждого праймера и 1 ед. Taq-полимеразы. Сверху наносили 25 мкл вазелинового масла для предотвращения испарения раствора.

После первоначальной денатурации при 95°C в течение 5 мин. 35 циклов амплификации проводили в следующем температурно-временном режиме: плавление 92°C – 40 сек., отжиг 55°C – 40 сек., синтез 72°C – 40 сек. После завершения 35 циклов амплификации проводили заключительный синтез при 72°C в течение 5 мин.

Для проведения рестрикционного анализа ПЦР продукт, инкубировали с 1 ед. эндонуклеазы MspI («СибЭнзим», Россия) в буфере В («СибЭнзим», Россия), содержащем: 10 mM Tris-HCl (pH 7.6 при 25°C), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, при +37°C в течение ночи. Амплифицируемый участок содержит три сайта для рестриктазы MspI: (-75), +37 и +83. Замены гуанина на аденин в позиции (-75) и цитозина на тимин в позиции +83 приводят к утрате соответствующих сайтов для рестриктазы MspI, что позволяет проводить одновременную идентификацию данных полиморфных вариантов. Размер фрагментов: для аллеля A(-75) – 179 п.н.; для аллеля G(-75) – 113 и 66 п.н.; для аллеля T83 – 254 п.н.; для аллеля C83 – 209 и 45 п.н.

Фрагменты ДНК подвергали электрофоретическому разделению в 8% ПААГ с последующей окраской бромистым этидием и визуализацией в ультрафиолете (Рисунок 21).

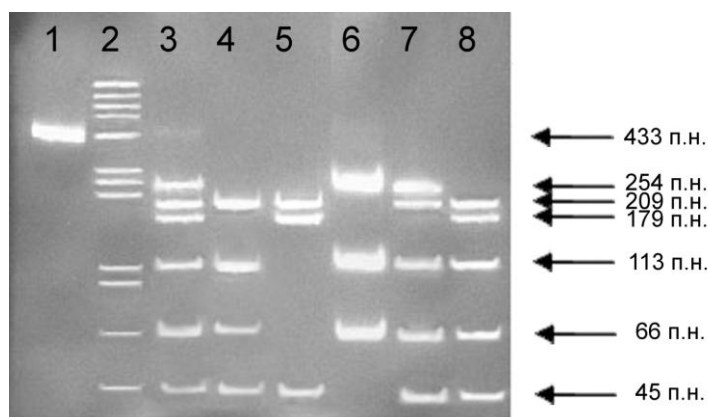


Рисунок 21. Идентификация полиморфных вариантов $(-75)G>A$ и $83C>T$ гена *APOA1*: 1 – ПЦР-продукт, 2 – маркер молекулярного веса pBr322/*AluI*, 3 – генотип *AG(-75)/CT83*, 4 – генотип *GG(-75)/CC83*, 5 – генотип *AA(-75)/CC83*, 6 – генотип *GG(-75)/TT83*, 7 – генотип *GG(-75)/CT83*, 8 – генотип *AG(-75)/CC83*.

2.8 Статистическая обработка данных

Статистический анализ был проведен с использованием программ SPSS версия 17.0 и Statistica 8.0. За значимый уровень достоверности принимали $p < 0.05$.

Для сравнения распределения генотипов между группами был использован критерий χ^2 . Отношение шансов (OR) рассчитывали с 95% доверительным интервалом (ДИ) по формулам (3-6):

$$OR = \frac{a \times d}{b \times c} \quad (3)$$

где a и b – количество пациентов, имеющих и не имеющих редкий (мутантный) аллель, c и d – количество человек контрольной группы, имеющих и не имеющих редкий (мутантный) аллель, соответственно. Границы ДИ определяли по формулам:

$$OR_{\min} = OR^{(1-1.96/\sqrt{\chi^2})} \quad (4)$$

$$OR_{\max} = OR^{(1+1.96/\sqrt{\chi^2})} \quad (5)$$

$$\chi^2 = ((a \times d) - (b \times c) - 0.5 \times n)^2 \times \frac{(n-1)}{n_0 \times n_1 \times m_0 \times m_1} \quad (6)$$

где $n_1=a+b$; $n_0=c+d$; $m_1=a+c$; $m_0=b+d$; $n=n_1+n_0+m_1+m_0$.

При анализе неравновесного сцепления расчет коэффициентов сцепления D' и r^2 производили по следующим формулам (Devlin, Risch, 1995):

$$D' = \frac{p_{11} \times p_{22} - p_{12} \times p_{21}}{\text{Min}(f_{12}, f_{21})} \quad (7)$$

$$r^2 = \frac{D'^2}{p_1 \times q_1 \times p_2 \times q_2} \quad (8)$$

где p_1 , q_1 , p_2 и q_2 – экспериментальные частоты аллелей; p_{11} , p_{22} , p_{12} и p_{21} – экспериментальные частоты сочетаний аллелей; f_{12} и f_{21} – ожидаемые частоты сочетаний аллелей.

Соответствие данных нормальному распределению проверялось с помощью критериев Шапиро-Уилка или Колмогорова-Смирнова в зависимости от размера выборки. В случае соответствия данных нормальному распределению при сравнении уровней липидов плазмы крови при носительстве различных генотипов использовали t-критерий Стьюдента (или в t-критерий в модификации Уэлча в случае неоднородных дисперсий) в случае двух выборок и метод One-Way ANOVA в случае трех выборок. Для проверки статистически достоверного результата, полученного при использовании One-Way ANOVA, был использован апостериорный критерий Джеймса-Ховелла.

В случае несоответствия данных нормальному распределению сравнение полученных значений между отдельными группами предполагало использование непараметрического критерия Манна-Уитни. Для анализа корреляции между количественными характеристиками пользовались методом Спирмана.

Средние величины в тексте диссертации и в таблицах приведены в виде среднего значения $\pm$ ст. ошибка среднего. В случае достоверных различий дополнительно приведены значения ДИ или медианы (минимум – максимум) в зависимости от используемого критерия.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Экспрессия гена *ABCG1* у пациентов с атеросклерозом

Для исследования экспрессии гена *ABCG1* в моноцитах и макрофагах согласно схеме, представленной в главе «Материалы и методы» (Рисунок 14), были отобраны пациенты, которые не принимали статины либо другие гиполипидемические препараты, и соответствующие по возрасту контрольные группы. Клинические характеристики пациентов представлены в таблице 5. Сравнительная характеристика групп пациентов и соответствующих контрольных групп, в которых производилась оценка относительного уровня мРНК *ABCG1*, приведена в таблице 6. В таблицах исследуемые группы пронумерованы следующим образом: группа 1 – исследование экспрессии гена *ABCG1* в моноцитах, группа 2 – исследование экспрессии гена *ABCG1* в макрофагах.

Таблица 5

Клинические характеристики пациентов

Особенности течения заболевания	Группа 1 N=30	Группа 2 N=15
Локализация атеросклероза:		
коронарные артерии (n, %)	20 (67)	15 (100)
церебральные артерии (n, %)	9 (30)	1 (7)
артерии нижних конечностей (n, %)	14 (47)	1 (7)
Окклюзия одной или нескольких артерий (n, %)	12 (40)	2 (13)
Инфаркт миокарда в анамнезе (n, %)	8 (27)	6 (40)
Ишемический инсульт в анамнезе (n, %)	2 (8)	0 (0)
Артериальная гипертензия (n, %)	14 (47)	7 (47)

Характеристика групп пациентов и соответствующих контрольных групп

	Группа 1		Группа 2	
	Пациенты (N=30)	Контроль (N=29)	Пациенты (N=15)	Контроль (N=20)
Возраст (лет)	55.17±1.14	52.59±0.95	53.9±2.00	51.90±1.33
Возраст первых клинических проявлений (лет)	48.37±0.82	—	47.73±1.18	—
Пол (муж/жен) %	70/30	70/30	100/0	100/0
Курение (п, %)	12 (40)	9 (31)	5 (33)	6 (30)
Общий холестерин (ммоль/л)	4.87±0.20	4.80±0.20	4.75±0.30	4.91±0.26
Холестерин ЛПВП (ммоль/л)	1.08±0.06*	1.35±0.05	1.15±0.07†	1.38±0.07
Холестерин ЛПНП (ммоль/л)	2.94±0.18	2.78±0.16	2.64±0.24	2.80±0.21
Триглицериды (ммоль/л)	1.73±0.18	1.38±0.16	2.05±0.30	1.49±0.21
Коэффициент атерогенности	3.74±0.24‡	2.66±0.19	3.20±0.21	2.67±0.25

*p=0.006, медианы (диапазон) в группе пациентов 1.03 (0.63-1.62), в контрольной группе 1.28 (1.00-2.18); ‡p=0.001, медианы (диапазон) в группе пациентов 3.30 (2.00-6.50), в контрольной группе 2.60 (1.60-5.40); †p=0.033, медианы (диапазон) в группе пациентов 1.10 (0.76-1.61), в контрольной группе 1.33 (1.00-2.18).

На первом этапе исследования содержание мРНК *ABCG1* было определено в моноцитах, активированных фактором М-CSF в течение суток, у пациентов с атеросклерозом и в контрольной группе. Значимых различий между группой пациентов с атеросклерозом и контрольной группой не было выявлено (Рисунок 22). При этом индивидуумы мужского и женского пола не отличались по уровню мРНК *ABCG1* в моноцитах (в группе пациентов: 1.10 ± 0.13 у мужчин и 1.05 ± 0.23 , $p=0.862$; в контрольной группе: 1.41 ± 0.12 у мужчин и 1.11 ± 0.19 у женщин, $p=0.121$). На следующем этапе исследования был проведен сравнительный анализ содержания мРНК *ABCG1* в макрофагах, полученных путем дифференцировки моноцитов в присутствии фактора макрофагов М-CSF в течение 5 суток, у пациентов с атеросклерозом и в контрольной группе. Уровень мРНК *ABCG1* в макрофагах в группе пациентов был ниже, чем в соответствующей контрольной группе (Рисунок 22).

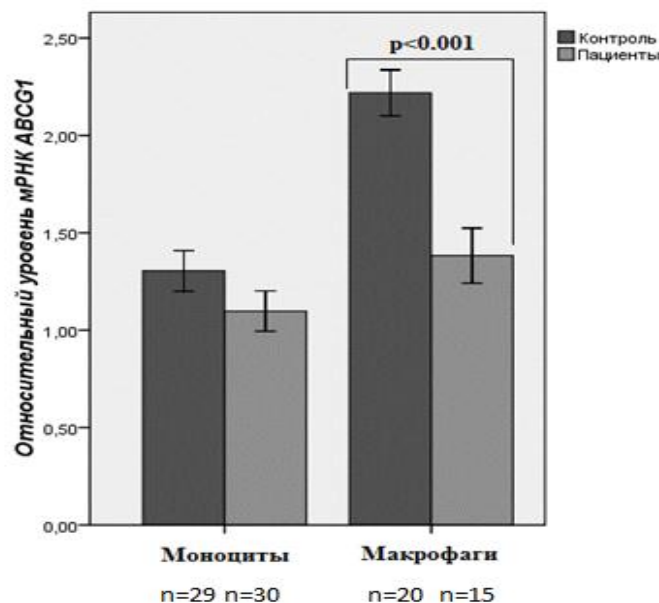


Рисунок 22. Относительные уровни мРНК *ABCG1* в моноцитах и макрофагах пациентов с атеросклерозом и в соответствующих контрольных группах.

Мы также провели измерения содержания белка *ABCG1* в моноцитах (9 пациентов и 6 контрольных образцов) и макрофагах (7 пациентов и 4

контрольных образцов). Относительные уровни белка ABCG1 в моноцитах не отличались и составили: для группы пациентов – 0.15 ± 0.04 , для контрольной группы 0.20 ± 0.02 ($p=0.145$). Содержание белка ABCG1 в макрофагах у пациентов с атеросклерозом было снижено по сравнению с контрольной группой (Рисунок 23).

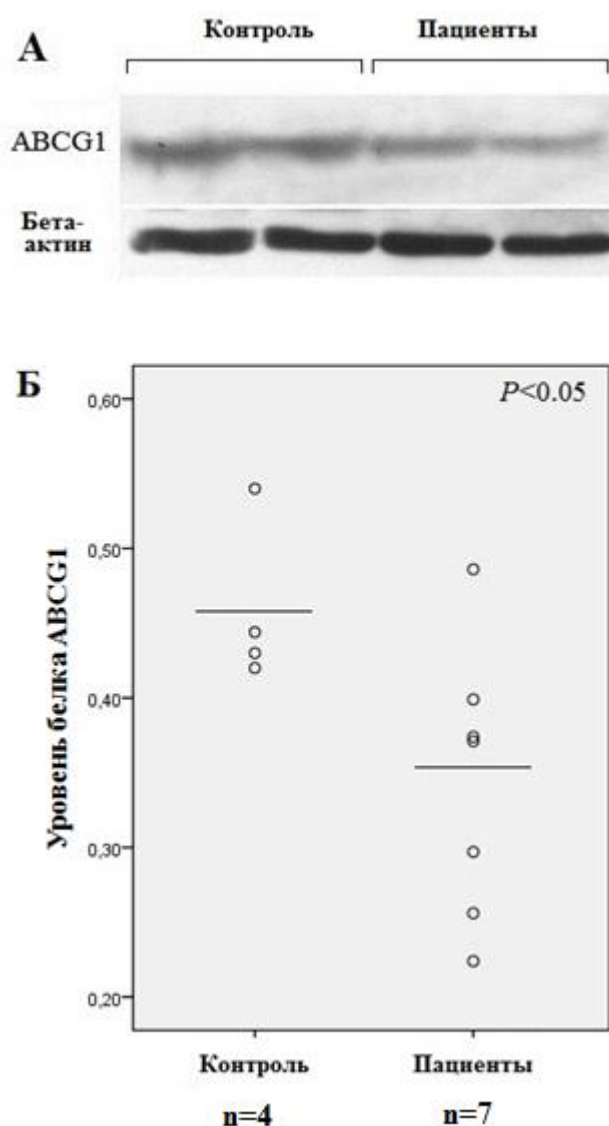


Рисунок 23. А. Вестерн-блоттинг анализ белка ABCG1 в макрофагах. Б. Относительные уровни белка ABCG1 в макрофагах пациентов и лиц из контрольной группы.

Мы оценили корреляцию уровня мРНК *ABCG1* в моноцитах со степенью тяжести атеросклеротических поражений сосудов. Уровень мРНК *ABCG1* в моноцитах негативно коррелировал со степенью тяжести заболевания ($r=-0.45$, $p=0.016$), в качестве критерия которой был взят показатель максимального артериального стеноза. Уровень мРНК *ABCG1* в моноцитах у пациентов с окклюзиями артерий различных отделов сердечно-сосудистой системы ($N=12$) был достоверно ниже по сравнению с пациентами, не имеющими окклюзий ($N=18$), и по сравнению контрольной группой ($N=29$) (Рисунок 24). При этом степень тяжести атеросклеротических повреждений у пациентов, отобранных для настоящего исследования, не коррелировала с длительностью заболевания (коэффициенты корреляции: между длительностью заболевания и показателем максимального артериального стеноза – $r=0.156$, $p=0.456$; между длительностью заболевания и количеством пораженных артерий – $r=0.161$, $p=0.443$).

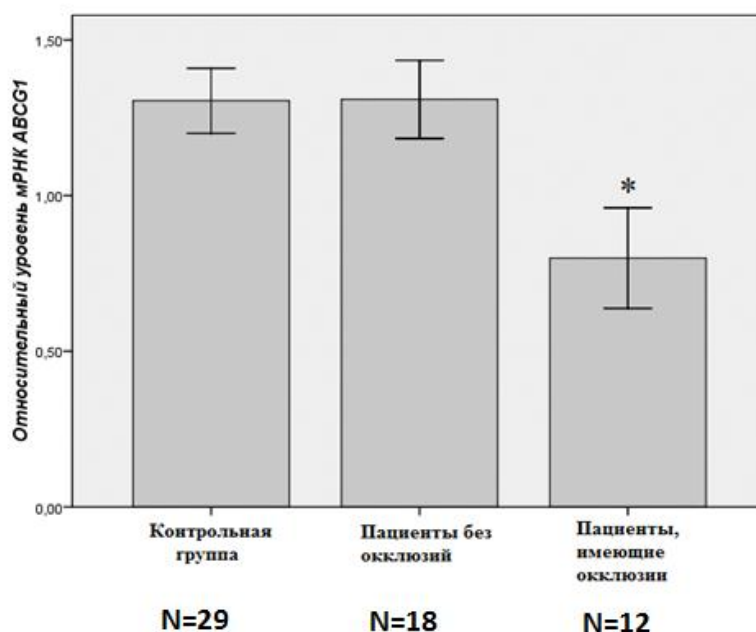


Рисунок 24. Относительный уровень мРНК *ABCG1* в моноцитах у пациентов с окклюзиями артерий, у пациентов, не имеющих окклюзий, и в контрольной группе; * $p<0.05$ по сравнению с контрольной группой и $p<0.05$ по сравнению с подгруппой пациентов, не имеющих окклюзий.

Оценить корреляцию уровня мРНК *ABCG1* в макрофагах со степенью тяжести атеросклеротического поражения не представилось возможным, так как данная группа пациентов была клинически однородной. Среди пациентов, которым выполнялось исследование экспрессии гена *ABCG1* в макрофагах, было только 2 человека с выявленной окклюзией.

Наше исследование не выявило корреляции уровня экспрессии гена *ABCG1* в моноцитах и макрофагах с измеренными показателями липидного спектра крови ни в группе пациентов, ни в контрольной группе.

Сопутствующая артериальная гипертензия была отмечена у 47% пациентов, вошедших в данное исследование (Таблица 6). Длительность заболевания артериальной гипертензией у пациентов составила 9 ± 2 лет. Уровень экспрессии гена *ABCG1* в моноцитах и макрофагах у пациентов с артериальной гипертензией не отличался от пациентов с нормальным артериальным давлением.

3.2 Анализ вклада полиморфных вариантов генов *ABCG1* и *APOA1* в формирование предрасположенности к атеросклерозу

В группе пациентов (N=222) с атеросклерозом, подтвержденным при ангиографическом исследовании, и в контрольной группе (N=382) было проведено определение полиморфных вариантов $(-134)T>G$, $(-204)A>C$ и $(-384)G>A$ гена *ABCG1* и $(-75)G>A$, $83C>T$ гена *APOA1*. Общая характеристика исследованных групп приведена в таблице 7.

Как видно из таблицы 7, средние уровни ОХС и Х-ЛПВП в плазме крови достоверно не различались между исследуемыми группами. Однако нужно отметить, что 37.7% лиц, вошедших в контрольную группу, курили. Известно, что курение может оказывать негативное влияние на липидный спектр плазмы крови. Действительно, проанализировав показатели липидов у курящих и некурящих представителей контрольной группы, мы выявили, что у курильщиков ОХС плазмы крови и коэффициент атерогенности достоверно выше, чем у некурящих (Таблица 7). Однако независимо от приверженности к курению у женщин, вошедших в состав контрольной группы, Х-ЛПВП плазмы крови был достоверно выше, чем у женщин в группе пациентов (1.25 ± 0.05 (95%ДИ: 1.15-1.35) против 1.01 ± 0.06 (95%ДИ: 0.89-1.13), $p < 0.05$). В целом, в группе пациентов 71% пациентов мужского пола и 67% пациентов женского пола имели Х-ЛПВП плазмы крови ниже нормы, то есть <1 ммоль/л и <1.2 ммоль/л, соответственно (Кухарчук и др., 2012). В то же время в контрольной группе только 31% мужчин и 36% женщин имели Х-ЛПВП плазмы крови ниже установленной нормы.

Таблица 7

Характеристика группы пациентов с атеросклерозом, подтвержденным методом ангиографии, и контрольной группы

Параметр	Группа пациентов с атеросклерозом	Контрольная группа
Курение, %	45.95	37.70
ОХС, ммоль/л	5.49±0.10	5.33±0.11
Курящие	5.47±0.14	5.59±0.14*
Некурящие	5.50±0.14	5.16±0.11
Х-ЛПВП, ммоль/л	1.18±0.03	1.16±0.02
Курящие	1.18±0.06	1.12±0.04
Некурящие	1.18±0.05	1.17±0.03
Коэффициент атерогенности	4.15±0.13	3.99±0.14
Курящие	3.91±0.29	4.37±0.21**
Некурящие	4.30±0.23	3.77±0.17
Коронарный атеросклероз, %	59.46	—
Церебральный атеросклероз, %	25.23	—
Атеросклероз сосудов нижних конечностей, %	33.33	—
Средняя степень стеноза артерий, баллы	3.27±0.08	—
Среднее число пораженных атеросклерозом артерий	5.38±0.40	—

* $p=0.023$ по сравнению с представителями контрольной группы, которые не курили, медианы равны 5.45 (3.64-8.99) и 5.07 (2.74-8.50), соответственно;

** $p=0.004$ по сравнению с представителями контрольной группы, которые не курили, медианы равны 4.10 (1.10-8.50) и 3.40 (1.30-11.40), соответственно.

3.2.1 Анализ вклада вариантов (-134)*T>G*, (-204)*A>C* и (-384)*G>A* гена *ABCG1* в развитие атеросклероза

Частоты генотипов полиморфных вариантов (-134)*T>G*, (-204)*A>C* и (-384)*G>A* гена *ABCG1* в группе пациентов с атеросклерозом и в контрольной группе представлены в таблице 8. В исследуемых группах распределение генотипов гена *ABCG1* находилось в соответствии с распределением Харди-Вайнберга. Различий в частотах вариантов (-134)*T>G*, (-204)*A>C* и (-384)*G>A* гена *ABCG1* между группой пациентов с атеросклерозом и контрольной группой обнаружено не было. Таким образом, исследованные варианты гена *ABCG1* не вносят вклад в риск развития атеросклероза у жителей Санкт-Петербурга.

Анализ сцепления полиморфных аллелей гена *ABCG1*, проведенный при генотипировании 604 индивидуумов (382 представителя контрольной группы и 222 пациента), продемонстрировал неравновесное сцепление вариантов (-134)*T>G* и (-204)*A>C* ($D'=0.93$, $r^2=0.51$, $p<0.0001$). Ранее неравновесное сцепление этих полиморфных вариантов было показано и для европейской популяции ($D'=0.96$, $r^2=0.68$) (Olivier et al, 2012). Сцепления вариантов (-384)*G>A* с вариантами (-134)*T>G* и (-204)*A>C* гена *ABCG1* не выявлено. Однако нужно учесть, что ввиду малой частоты редкой аллеля A(-384) размер нашей выборки может быть недостаточным для установления факта сцепления вариантов (-384)*G>A* с другими исследованными вариантами гена *ABCG1*.

Таблица 8

Частоты вариантов гена *ABCG1* в группе пациентов с атеросклерозом и в контрольной группе

Варианты гена <i>ABCG1</i>	Группа пациентов с атеросклерозом (N=222)	Контрольная группа (N=382)
<i>TT</i> n(%)	133 (59.9)	224 (58.6)
(-134) <i>T>G</i> <i>TG</i> n(%)	77 (34.7)	129 (33.8)
<i>GG</i> n(%)	12 (5.4)	29 (7.6)
<i>T</i> аллель	0.77	0.76
<i>G</i> аллель	0.23	0.24
<i>AA</i> n(%)	94 (42.3)	166 (43.5)
(-204) <i>A>C</i> <i>AC</i> n(%)	99 (44.6)	167 (43.7)
<i>CC</i> n(%)	29 (13.1)	49 (12.8)
<i>A</i> аллель	0.65	0.65
<i>C</i> аллель	0.35	0.35
<i>GG</i> n(%)	215 (96.8)	367 (96.1)
(-384) <i>G>A</i> <i>GA</i> n(%)	7 (3.2)	14 (3.7)
<i>AA</i> n(%)	0 (0)	1 (0.2)
<i>G</i> аллель	0.98	0.98
<i>A</i> аллель	0.02	0.02

3.2.2 Анализ ассоциации вариантов (-134)*T>G*, (-204)*A>C* и (-384)*G>A* гена *ABCG1* с концентрацией липидов в плазме крови

Среди больных атеросклерозом, которые не принимали статинов и других препаратов, которые могли бы повлиять на уровень липидов плазмы крови, и в контрольной группе был проведен сравнительный анализ содержания ОХС и Х-ЛПВП в плазме крови у носителей различных генотипов исследованных вариантов гена *ABCG1* (Таблицы 9 и 10).

Была выявлена корреляция вариантов (-134)*T>G* и (-204)*A>C* гена *ABCG1* с уровнем ОХС плазмы крови в контрольной группе (Таблица 9). Аллели *G*(-134) и *C*(-204) гена *ABCG1* были ассоциированы с повышением уровня ОХС плазмы крови у представителей контрольной группы.

Значения концентраций ОХС и Х-ЛПВП при носительстве различных генотипов полиморфных вариантов гена *ABCG1* в группе пациентов представлены в таблице 10. Среди пациентов носители генотипа *GG*(-134) *ABCG1* демонстрируют более высокий уровень ОХС плазмы крови по сравнению с носителями генотипов *TT*(-134) и *TG*(-134).

Ассоциации вариантов (-384)*G>A* гена *ABCG1* с уровнем ОХС и Х-ЛПВП плазмы крови в исследованных группах выявлено не было.

Содержание холестерина плазмы крови при различных генотипах полиморфных вариантов гена *ABCG1* в контрольной группе (N=160)

Варианты гена <i>ABCG1</i>		Общий холестерин, ммоль/л	Х-ЛПВП, ммоль/л	Коэффициент атерогенности
(-134)T>G	TT	5.12±0.11	1.12±0.03	3.96±0.20
	TG	5.61±0.16	1.20±0.05	3.94±0.21
	GG	5.63±0.34	1.16±0.06	4.49±0.45
(-134)T>G	TT	5.12±0.11	1.12±0.03	3.96±0.20
	TG+GG	5.62±0.15*	1.19±0.04	4.08±0.19
(-204)A>C	AA	5.06±0.14	1.14±0.03	3.85±0.20
	AC	5.50±0.14	1.11±0.03	4.27±0.22
	CC	5.49±0.24	1.29±0.09	4.00±0.39
(-204)A>C	AA	5.06±0.14	1.14±0.03	3.85±0.20
	AC+CC	5.50±0.12**	1.16±0.03	4.14±0.19
(-384)G>A	GG	5.38±0.10	1.13±0.02	3.89±0.14
	GA+AA	5.13±0.38	0.94±0.07	5.15±0.77

* p=0.015, медианы TT vs (TG+GG) равны: 5.01 (2.74-8.50) vs 5.36 (3.54-8.99)

** p=0.037, медианы AA vs (AC+CC) равны: 4.96 (2.74-7.70) vs 5.25 (3.51-8.99)

Содержание холестерина плазмы крови при различных генотипах вариантов гена *ABCG1* у пациентов, не принимающих статины (N=115)

Варианты гена <i>ABCG1</i>		Общий холестерин, ммоль/л	Х-ЛПВП, ммоль/л	Коэффициент атерогенности
(-134) <i>T>G</i>	<i>TT</i>	5.47±0.15	1.12±0.04	4.06±0.21
	<i>TG</i>	4.98±0.15	1.07±0.07	3.78±0.25
	<i>GG</i>	6.11±0.22*	1.30±0.19	4.25±0.79
(-134) <i>T>G</i>	<i>TT+TG</i>	5.30±0.11	1.11±0.04	3.97±0.16
	<i>GG</i>	6.11±0.22**	1.30±0.19	4.25±0.79
(-204) <i>A>C</i>	<i>AA</i>	5.56±0.18	1.20±0.05	3.70±0.20
	<i>AC</i>	5.11±0.14	1.06±0.05	4.23±0.25
	<i>CC</i>	5.75±0.27	1.16±0.13	4.09±0.53
(-204) <i>A>C</i>	<i>AA+AC</i>	5.28±0.11	1.12±0.04	3.98±1.46
	<i>CC</i>	5.75±0.27	1.16±0.13	4.09±0.53
(-384) <i>G>A</i>	<i>GG</i>	5.38±0.11	1.13±0.04	3.99±0.16
	<i>GA+AA</i>	5.13±0.66	0.94±0.01	3.90±0.69

*One-Way ANOVA $p=0.008$; $p=0.001$ для (*TG* vs *GG*), $p=0.060$ для (*TT* vs *TG*), $p=0.062$ для (*TT* vs *GG*), критерий парных сравнений Джеймса-Ховелла

** $p=0.014$ *GG* vs (*TG+TT*); для носителей генотипа *GG*(-134) (95%ДИ: 5.68-6.54); для носителей генотипов *TG+TT* (95%ДИ: 5.08-5.52).

3.2.3 Анализ влияния вариантов $(-134)T>G$ и $(-204)A>C$ на уровень экспрессии гена *ABCG1*

Мы провели сравнительный анализ содержания мРНК *ABCG1* только для полиморфных вариантов $(-134)T>G$ и $(-204)A>C$ гена *ABCG1* (Таблица 11), поскольку все лица, для которых проводился анализ экспрессии гена *ABCG1*, были носителями генотипа *GG* по варианту $(-384)G>A$ *ABCG1*. Согласно нашему исследованию варианты $(-134)T>G$ и $(-204)A>C$ не влияют на уровень экспрессии гена *ABCG1* в моноцитах и макрофагах, активированных фактором М-CSF.

Таблица 11

Относительный уровень мРНК *ABCG1* при различных генотипах полиморфных вариантов $(-134)T>G$ и $(-204)A>C$ гена *ABCG1* в исследованных группах

Генотип		Уровень мРНК <i>ABCG1</i> в группе пациентов		Уровень мРНК <i>ABCG1</i> в контрольной группе	
		моноциты	макрофаги	моноциты	макрофаги
$(-134)T>G$	$(-134)TT$	1.16±0.15	1.41±0.23	1.39±0.12	2.12±0.15
	$(-134)TG$	0.97±0.17	1.35±0.09	1.19±0.25	2.55±0.19
	$(-134)GG$	0.94	–	0.76±0.16	2.71±0.11
$(-204)A>C$	$(-204)AA$	1.37±0.18	1.65±0.52	1.22±0.11	2.10±0.20
	$(-204)AC$	1.02±0.15	1.33±0.07	1.64±0.34	2.13±0.23
	$(-204)CC$	0.81±0.18	1.07±0.16	1.22±0.23	2.64±0.10

3.2.4 Анализ вклада вариантов $(-75)G>A$ и $83C>T$ гена *APOA1* в развитие атеросклероза

Частоты полиморфных вариантов $(-75)G>A$ и $83C>T$ гена *APOA1* в группе пациентов с атеросклерозом и в контрольной группе представлены в таблице 12. В исследуемых группах распределение генотипов гена *APOA1* находилось в соответствии с распределением Харди-Вайнберга.

В группе пациентов с атеросклерозом наблюдалось достоверное снижение частоты аллеля *T83* гена *APOA1* по сравнению с контрольной группой (0.027 против 0.063 в контрольной группе, $p=0.004$, $df=1$). Таким образом, носительство аллеля *T83* гена *APOA1* (генотипы *TT83* и *CT83*) было ассоциировано со снижением относительного риска развития атеросклероза по сравнению с носителями генотипа *CC83* ($OR=0.44$ (95%ДИ: 0.29-0.66)).

Различий в частотах вариантов $(-75)G>A$ гена *APOA1* между группой пациентов с атеросклерозом и контрольной группой обнаружено не было.

Сцепления между вариантами $(-75)G>A$ и $83C>T$ гена *APOA1* не выявлено.

Частоты вариантов гена *APOA1* в группе пациентов с атеросклерозом и в контрольной группе.

Варианты гена <i>ABCG1</i>	Группа пациентов с атеросклерозом (N=222)	Контрольная группа (N=382)
<i>GG</i> n(%)	141 (63.5)	237 (62.0)
<i>(-75)G>A</i> <i>GA</i> n(%)	75 (33.8)	126 (33.0)
<i>AA</i> n(%)	6 (2.7)	19 (5)
<i>G</i> аллель	0.80	0.79
<i>A</i> аллель	0.20	0.21
<i>CC</i> n(%)	210 (94.6)	338 (88.5)
<i>83C>T</i> <i>CT</i> n(%)	12 (5.4)	40 (10.5)
<i>TT</i> n(%)	0 (0)	4 (1.0)
<i>C</i> аллель	0.973	0.937
<i>T</i> аллель	0.027	0.063*

* p=0.004

3.2.5 Анализ ассоциации вариантов $(-75)G>A$ и $83C>T$ гена *APOA1* с концентрацией липидов в плазме крови

Среди больных атеросклерозом, которые не принимали статинов и других препаратов и в контрольной группе был проведен сравнительный анализ уровня ОХС и Х-ЛПВП плазмы крови у носителей вариантов гена *APOA1* (Таблица 13 и 14).

В контрольной группе концентрация Х-ЛПВП в плазме крови у носителей аллеля *T83* (генотипы *CT83* и *TT83*) гена *APOA1* была достоверно выше, чем у носителей генотипа *CC83 APOA1* (Таблица 13). Коэффициент атерогенности K_a у носителей аллеля *T83*, напротив, был достоверно ниже, чем у носителей генотипа *CC83 APOA1* (Таблица 13). В то же время в группе пациентов варианты $83C>T$ гена *APOA1* не были ассоциированы с изменением показателей липидного спектра плазмы крови (Таблица 14).

Ассоциации полиморфных вариантов $(-75)G>A$ гена *APOA1* с показателями липидного спектра плазмы крови ни в группе пациентов, ни в контрольной группе выявлено не было.

Таблица 13

Содержание холестерина плазмы крови при различных генотипах полиморфных вариантов гена *APOA1* в контрольной группе (N=160)

Варианты гена <i>APOA1</i>		Общий холестерин, ммоль/л	Х-ЛПВП, ммоль/л	Коэффициент атерогенности
(-75) <i>G>A</i>	<i>GG</i>	5.38±0.13	1.14±0.03	4.03±0.18
	<i>GA+AA</i>	5.62±0.18	1.20±0.04	4.02±0.25
<i>83C>T</i>	<i>CC</i>	5.52±0.12	1.13±0.02	4.18±0.16
	<i>CT+TT</i>	5.15±0.19	1.33±0.08*	3.15±0.30**

* $p=0.017$; для носителей аллеля *T83* (95%ДИ: 1.18-1.48); для носителей генотипа *CC83* (95%ДИ: 1.09-1.17)

** $p=0.013$; для носителей аллеля *T83* (95%ДИ: 2.55-3.75); для носителей генотипа *CC83* (95%ДИ: 3.86-4.5)

Таблица 14

Содержание холестерина плазмы крови при различных генотипах вариантов гена *APOA1* у пациентов, не принимающих статины (N=115)

Варианты гена <i>APOA1</i>		Общий холестерин, ммоль/л	Х-ЛПВП, ммоль/л	Коэффициент атерогенности
(-75) <i>G>A</i>	<i>GG</i>	5.24±0.13	1.18±0.04	3.83±0.24
	<i>GA+AA</i>	5.46±0.18	1.10±0.05	4.15±0.25
<i>83C>T</i>	<i>CC</i>	5.32±0.11	1.16±0.03	3.93±0.19
	<i>CT+TT</i>	5.09±0.57	1.08±0.10	3.97±0.48

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что критическим моментом в развитии атеросклероза является нарушение ОТХ из моноцитов и макрофагов интимы, приводящее к накоплению липидов в сосудистой стенке (Cuchel, Rader, 2006). Антиатерогенные ЛПВП обладают способностью удалять избыточный ХС из периферических тканей (Kontush, Chapman, 2006). Ключевую роль в элиминации ХС из периферических клеток играют аполипопротеин А-I и АТФ-связывающие кассетные транспортеры семейства ABC (Zhang et al., 2003; Vaughan et al, 2006; Gelissen et al, 2006). Скорость ОТХ из сосудистой стенки при этом определяется концентрацией Апо А-I и ЛПВП в плазме крови с одной стороны и элиминацией ХС из моноцитов-макрофагов интимы с другой стороны. Учитывая существенный вклад генетических факторов в развитие атеросклероза, мы предположили генетические детерминанты, которые могут вносить вклад в способность ЛПВП к эффективной мобилизации ХС из макрофагов и предотвращение их трансформации в пенистые клетки. В настоящем работе нами было проведено исследование вклада уровня экспрессии гена *ABCG1* в моноцитах и макрофагах и полиморфных вариантов в регуляторных областях генов *ABCG1* и *APOA1* в формирование предрасположенности к атеросклерозу.

Действительно, эпидемиологические исследования показывают, что вариации генной экспрессии вносят существенный вклад в развитие атеросклероза (Seo et al, 2004; Sinnaeve et al, 2009; Щелкунова и др., 2013). Эксперименты с трансгенными животными продемонстрировали, что изменение уровня экспрессии *ABCG1* в макрофагах может быть фактором, оказывающим влияние на скорость элиминации ХС из макрофагов (Kennedy et al, 2005; Out et al, 2006; Lammers et al, 2009). В целом, анализ литературы дает основание предполагать, что снижение уровня экспрессии гена *ABCG1* в моноцитах и макрофагах может вносить вклад в развитие атеросклероза (Mauldin et al, 2008; Konkor et al, 2011; Sivapalaratnam et al, 2012).

Исходя из анализа литературы, статины, которые часто применяются для коррекции липидного спектра при атеросклерозе, имеют выраженный эффект на экспрессию гена *ABCG1*. В исследовании Sivapalaratnam et al было продемонстрировано снижение уровня экспрессии гена *ABCG1* в циркулирующих моноцитах у пациентов с атеросклерозом коронарных артерий, перенесших ИМ, которые получали симвастатин (Sivapalaratnam et al, 2012). В то же время известно, что статины снижают экспрессию гена *ABCG1* в моноцитах и макрофагах *in vitro* (Wong et al, 2008; Genvigir et al., 2010; Wang et al, 2013). Такой эффект применения статинов может быть обусловлен ингибированием синтеза оксистеролов, которые являются лигандами транскрипционных факторов, регулирующих экспрессию гена *ABCG1* (Wong et al, 2004). Логично предположить, что наблюдаемое в исследовании Sivapalaratnam et al снижение уровня экспрессии гена *ABCG1* может быть связано с применением статинов. Более того, после назначения статинов в контрольной группе также происходило снижение экспрессии гена *ABCG1* в моноцитах периферической крови (Sivapalaratnam et al, 2012). Уровень экспрессии гена *ABCG1* в биоптатах атеросклеротических бляшек, полученных от пациентов, принимающих статины, также ниже, чем у пациентов, не проходящих лечение статинами (Marcantonio et al, 2012). В то же время показано, что в клетках печени статины, напротив, повышают экспрессию гена *ABCG1*, что может способствовать повышению уровня Х-ЛПВП плазмы крови, наблюдаемому при применении этих препаратов, и таким образом отражает атеропротективный механизм их действия (Brown, Chiacchia, 2008). Поэтому для адекватной оценки возможной ассоциации экспрессии гена *ABCG1* с атеросклерозом, для данного исследования были отобраны пациенты, которые не принимали статины либо другие гиполипидемические препараты.

Необходимо отметить, что популяция макрофагов в организме человека отличается гетерогенностью, и не все макрофаги одинаково активно накапливают холестерин (Waldo et al, 2008). Поэтому циркулирующие

лейкоциты и моноциты периферической крови, использованные в работах (Konkor et al, 2011; Sivapalaratnam et al, 2012) по изучению экспрессии гена *ABCG1*, могут не отражать патологических процессов, происходящих в атеросклеротической интиме. В нашем исследовании мы впервые провели сравнение экспрессии гена *ABCG1* в моноцитах и макрофагах, стимулированных колоние-стимулирующим фактором макрофагов M-CSF, в группе пациентов с атеросклерозом и в контрольной группе. Использование фактора макрофагов M-CSF позволяет получить макрофаги с проатерогенным фенотипом, которые преимущественно присутствует в атеросклеротических бляшках (Waldo et al, 2008; Irvine et al, 2009). Поэтому в настоящее время макрофаги, полученные при дифференцировке моноцитов в присутствие фактора M-CSF, считаются наиболее подходящей моделью для изучения патологических процессов, происходящих при развитии атеросклероза в клетках интимы *in vivo* (Kockx et al, 2004; Mauldin et al, 2008; Dickhout et al, 2011).

Наше исследование не показало различий в уровне мРНК *ABCG1* и содержании белка *ABCG1* в моноцитах, культивированных в присутствие фактора M-CSF в течение суток, между группой пациентов и контрольной группой. В то же время, мы продемонстрировали, что уровень мРНК *ABCG1* и содержание белка *ABCG1* были снижены в дифференцированных макрофагах у пациентов с атеросклерозом. Это может свидетельствовать о нарушении элиминации ХС из макрофагов сосудистой стенки при атеросклерозе.

Дополнительно, мы провели анализ корреляции уровня мРНК *ABCG1* со степенью тяжести атеросклеротических повреждений, взяв в качестве критерия показатель максимального артериального стеноза. Максимальный стеноз оценивался по данным ангиографического исследования как максимальная степень (в %) перекрытия артерии атеросклеротической бляшкой. Данная величина зависит от размера атеросклеротической бляшки. Оклюзия артерии,

т.е. 100% перекрытие (закупорка) просвета артерии, является наиболее тяжелым случаем атеросклеротического повреждения. Уровень мРНК *ABCG1* в моноцитах у пациентов с окклюзиями артерий различных отделов сердечно-сосудистой системы был достоверно ниже по сравнению с пациентами, не имеющими окклюзий, и контрольной группой. Следует заметить, что размер бляшки зависит от темпа накопления липидов в стенке артерии, но далеко не всегда от длительности заболевания (Липовецкий, 2000). Действительно, степень тяжести атеросклеротических повреждений у данных пациентов не коррелировала с длительностью заболевания. Это, в свою очередь, указывает на возможное влияние уровня экспрессии гена *ABCG1* на скорость формирования атеросклеротических бляшек.

Артериальная гипертензия является фактором высокого риска развития атеросклероза и отягощает течение сердечно-сосудистых заболеваний. Ранее в исследовании (Xu et al, 2009) было продемонстрировано снижение уровня экспрессии гена *ABCG1* в моноцитах у пациентов с первично диагностированной артериальной гипертензией. Авторы данной работы отмечают, что после лечения уровень мРНК *ABCG1* в моноцитах у пациентов не отличался от контрольной группы. В нашем исследовании мы не выявили различий в уровне экспрессии гена *ABCG1* в зависимости от наличия у пациентов сопутствующего диагноза артериальной гипертензии. Однако нужно отметить, что наши пациенты имели достаточно длительный период лечения данного заболевания.

Наше исследование не продемонстрировало корреляции уровня мРНК *ABCG1* в моноцитах и макрофагах с уровнем Х-ЛПВП плазмы крови ни в группе пациентов, ни в контрольной группе. В целом, наши результаты согласуются с данными, полученными ранее и указывающими на то, что опосредованный транспортером *ABCG1* отток холестерина из макрофагов может не вносить существенного вклада в концентрацию Х-ЛПВП в плазме крови (Nakanishi et al, 2008). В то же время есть данные, что уровень мРНК

ABCG1 в моноцитах отличается у людей с экстремально низкими и экстремально высокими уровнями Х-ЛПВП плазмы крови (Holven et al, 2013). Лица с высоким уровнем Х-ЛПВП плазмы крови (более 1.6 ммоль/л у мужчин, более 1.9 ммоль/л у женщин) характеризуются повышенным уровнем экспрессии гена *ABCG1* в моноцитах (Holven et al, 2013). Наблюдаемое в нашем исследовании отсутствие корреляции уровня экспрессии гена *ABCG1* и Х-ЛПВП плазмы крови можно объяснить тем фактом, что в наших выборках не было представлено людей с очень высоким уровнем Х-ЛПВП и большинство имело среднестатистические показатели.

Известно, что атеросклероз нередко развивается у лиц с нормальным уровнем Х-ЛПВП (Вельков, 2010). Таким образом, концентрация Х-ЛПВП в плазме крови не всегда адекватно отражает антиатерогенную функцию ЛПВП, которая лучше характеризуется скоростью оттока ХС из макрофагов сосудистой стенки (Navab et al, 2009). Кроме того в мировой литературе есть данные, указывающие на то, что ОТХ из макрофагов может быть основным средством реализации противовоспалительного потенциала ЛПВП (Yvan-Charvet et al, 2008; Yvan-Charvet et al, 2010). Поскольку *ABCG1* является одним из ключевых белков ОТХ, можно предположить, что повышенный уровень экспрессии гена *ABCG1* в макрофагах должен увеличивать скорость ОТХ из сосудистой стенки и снижать активность воспалительных процессов при атеросклерозе. Поэтому проведение дальнейших исследований механизмов тканеспецифичной активации экспрессии гена *ABCG1* в макрофагах может быть перспективным направлением в разработке новых фармакологических подходов к лечению атеросклероза.

Наше исследование продемонстрировало, что уровень экспрессии гена *ABCG1* в М-CSF макрофагах снижен у пациентов с атеросклерозом. Также мы наблюдали сниженный уровень мРНК *ABCG1* в моноцитах пациентов с окклюзиями артерий по сравнению с пациентами, имеющими менее выраженные атеросклеротические повреждения. Суммируя результаты, можно

заклучить, что снижение уровня экспрессии гена *ABCG1* в моноцитах и макрофагах может являться значимым фактором в развитии и прогрессировании атеросклеротического процесса.

Было бы логично предположить, что варианты с заменами в последовательности в регуляторных областях гена *ABCG1* могут оказывать влияние на уровень экспрессии гена и вносить вклад в формирование предрасположенности к атеросклерозу. В нашей работе мы исследовали полиморфные варианты $(-134)T>G$, $(-204)A>C$ и $(-384)G>A$ гена *ABCG1* в отношении их вклада в риск развития атеросклероза и влияния на липидный профиль плазмы крови. Вклад данных вариантов гена *ABCG1* в развитие атеросклероза ни в популяции Санкт-Петербурга, ни в других регионах России ранее не был исследован. Таким образом, частоты аллелей исследуемых вариантов гена *ABCG1* были определены в России впервые. Частоты редких аллелей вариантов $(-134)T>G$ и $(-204)A>C$ гена *ABCG1* были выше, чем в европейской популяции (для аллеля $G(-134)$ – 24% против 20%, для аллеля $C(-204)$ – 35% против 26%) (Olivier et al, 2012). Вариант $(-384)G>A$ гена *ABCG1* встречался в популяции Санкт-Петербурга крайне редко – с частотой 2%. Однако, как оказалось, исследованные варианты не влияют на риск развития атеросклероза в популяции Санкт-Петербурга.

В то же время аллели $G(-134)$ и $C(-204)$ гена *ABCG1* были ассоциированы с повышением концентрации ОХС плазмы крови в контрольной группе. Нужно отметить, что данные варианты находятся в неравновесном сцеплении, поэтому эффект на концентрацию ОХС плазмы крови одного из полиморфных вариантов может объясняться влиянием второго варианта. Так, в группе пациентов ассоциация с уровнем ОХС плазмы крови наблюдалась только в случае вариантов $(-134)T>G$ гена *ABCG1*. Среди больных атеросклерозом носительство генотипа $GG(-134)$ *ABCG1* было ассоциировано с более высоким уровнем ОХС плазмы крови по сравнению с носителями генотипов $TT(-134)$ и $TG(-134)$. Нужно отметить, что среди пациентов все носители генотипа

GG(-134) ABCG1 являлись носителями генотипа *CC(-204) ABCG1*, тогда как среди пациентов-носителей генотипа *CC(-204) ABCG1* были носители различных генотипов *(-134)T>G ABCG1*. Таким образом, самый высокий уровень ОХС плазмы крови среди пациентов наблюдался при носительстве сочетанного генотипа *GG(-134)CC(-204) ABCG1*.

Механизм влияния полиморфных вариантов *(-134)T>G* и *(-204)A>C* гена *ABCG1* на концентрацию ОХС в плазме крови неизвестен. Однако он может быть связан с возможным влиянием исследованных вариантов на уровень экспрессии гена *ABCG1* (Olivier et al, 2012). Эти вариации представляют собой однонуклеотидные замены в промоторной области гена *ABCG1* в позициях *(-134)* и *(-204)* от сайта начала транскрипции и могут затрагивать сайты посадки транскрипционных факторов. Ранее для вариантов *(-134)T>G* и *(-204)A>C* гена *ABCG1* было показано снижение уровня транскрипции гена *ABCG1* (Furuyama et al, 2009; Olivier et al, 2012). Однако наше исследование не продемонстрировало влияния этих вариантов на уровень экспрессии гена *ABCG1* в моноцитах и макрофагах человека. С другой стороны, не исключено тканеспецифичное влияние этих вариантов на экспрессию гена. Например, более высокий уровень ОХС плазмы крови может быть связан со снижением клиренса ХС клетками печени в результате снижения экспрессии гена *ABCG1*. Нужно отметить, что тканеспецифичная регуляция экспрессии данного гена действительно имеет место, поскольку показано, что соотношение двух известных изоформ белка *ABCG1* различается в различных органах и тканях человека (Gelissen et al, 2010).

Несмотря на то, что наше исследование показало, что варианты *(-134)T>G*, *(-204)A>C* и *(-384)G>A* не определяют предрасположенность к развитию атеросклероза в популяции Санкт-Петербурга, это не исключает влияние этих или других вариантов гена *ABCG1* на риск развития атеросклероза в других популяциях. В частности, исследование, проведенное в Дании, продемонстрировало ассоциацию варианта *(-376)C>T* гена *ABCG1* с

повышенным риском развития ИБС и ИМ (Schou et al, 2012). При этом варианты $(-376)C>T$ гена *ABCG1* не влияли на концентрацию липидов в плазме крови. Таким образом, можно заключить, что вариации экспрессии гена *ABCG1* могут вносить вклад в формирование предрасположенности к атеросклерозу независимо от уровня липидов в плазме крови.

В клинической практике атеросклероз нередко развивается у лиц с нормальным уровнем Х-ЛПВП плазмы крови. Следует отметить, что показатель Х-ЛПВП не отражает соотношение субклассов ЛПВП, а именно ЛПВП₂ и ЛПВП₃. Исследования показали, что атерогенным эффектом часто обладает нарушение обмена ЛПВП, характеризующееся сдвигом в сторону преобладания ЛПВП₃ над ЛПВП₂ (Asztalos et al, 2004; Tian, Fu, 2010). Нужно отметить, что насыщение ХС частиц ЛПВП, в результате которого ЛПВП₃ трансформируются в ЛПВП₂, зависит в том числе от активности транспортера *ABCG1*. Таким образом, снижение экспрессии гена *ABCG1* может оказывать влияние на распределение ХС между двумя субклассами ЛПВП, не обязательно влияя на общий уровень ЛПВП в плазме крови. Поэтому сниженный уровень экспрессии гена *ABCG1* может быть фактором риска развития атеросклероза.

Одновременно с изучением экспрессии гена *ABCG1* мы провели анализ вклада полиморфных вариантов *APOA1* в формирование предрасположенности к атеросклерозу. Исследования показывают, что уровень экспрессии гена *APOA1* также может влиять на скорость элиминации ХС из макрофагов сосудистой стенки, как фактор, модулирующий акцепторную активность ЛПВП плазмы крови (Mukhamedova et al, 2008). В настоящей работе мы впервые оценили вклад вариантов $(-75)G>A$ и $83C>T$ гена *APOA1* в развитие атеросклероза у жителей Санкт-Петербурга.

В группе пациентов с атеросклерозом наблюдалось достоверное снижение частоты аллеля *T83* гена *APOA1* по сравнению с контрольной группой (0.027 против 0.063 в контрольной группе; $p=0.004$). Таким образом, носительство аллеля *T83* гена *APOA1* было ассоциировано со снижением

относительного риска развития атеросклероза по сравнению с носителями генотипа *CC83*.

Было показано, что в контрольной группе концентрация Х-ЛПВП в плазме крови у носителей аллеля *T83* гена *APOA1* выше, чем у носителей генотипа *CC83 APOA1*. При этом коэффициент атерогенности K_a у здоровых лиц-носителей аллеля *T83*, напротив, был ниже, чем у носителей генотипа *CC83 APOA1*. Следует отметить, что ассоциация аллеля *T83* гена *APOA1* с увеличением концентрации Апо А-I и Х-ЛПВП плазмы крови ранее была также показана среди белого населения США и Европы, а также в китайской популяции (Kamboh et al, 1996; Wang et al, 1996; Pulkkinen et al, 2000; Larson et al, 2002; Zou et al, 2003; Haase et al, 2012). Анализ данных, полученных при масштабных проспективных исследованиях, показал, что повышение уровня Х-ЛПВП на 0.03 ммоль/л снижает риск развития сердечно сосудистых заболеваний на 2-3% (Barter et al, 2007). Если применить эту оценку к нашим результатам, исходя из значений Х-ЛПВП плазмы крови при носительстве различных генотипов *83C>T* гена *APOA1*, риск развития атеросклероза у носителей аллеля *T83* должен быть снижен на 13-20% по сравнению с носителями генотипа *CC83 APOA1*. Таким образом, атеропротективный эффект аллеля *T83* гена *APOA1* в популяции Санкт-Петербурга объясняется влиянием данного варианта на уровень антиатерогенных ЛПВП в плазме крови.

На концентрацию ОХС и Х-ЛПВП у больных атеросклерозом существенное влияние также могут оказывать статины и другие гиполипидемические препараты, направленные на коррекцию липидного спектра плазмы крови (Schmitz G., Langmann T, 2006). Поэтому анализ корреляции полиморфных вариантов гена *ABCG1* с концентрацией ОХС и Х-ЛПВП был проведен в группе пациентов с атеросклерозом, не принимающих статины. Однако в этой группе пациентов мы не выявили ассоциации варианта *83C>T* гена *APOA1* с уровнем липидов в плазме крови. Ранее в исследовании Wang et al также было показано влияние варианта на концентрацию Апо А-I и

Х-ЛПВП плазмы крови только у здоровых лиц, но не у пациентов (Wang et al, 1998). Нужно учитывать, что при заболевании атеросклерозом липидный спектр крови может претерпевать существенные изменения (Gardner et al, 2013). Поэтому эффекты генотипа, обнаруживаемые в популяции, могут не наблюдаться при развитии данной патологии.

Мы не обнаружили достоверных различий в частотах вариантов $(-75)G>A$ гена *APOA1* между группой пациентов с атеросклерозом и контрольной группой. Также не было выявлено влияния вариантов $(-75)G>A$ гена *APOA1* на концентрацию липидов в плазме крови ни в группе пациентов, ни в контрольной группе. В целом, в литературе данные как о влиянии вариантов на липидный спектр плазмы крови, так и об ассоциации полиморфных вариантов $(-75)G>A$ гена *APOA1* с развитием атеросклероза, носят противоречивый характер (Kamboh et al, 1996; Juo et al, 1999; Chhabra et al, 2005; Al-Bustan et al, 2013). Противоречивость представленных результатов можно объяснить их зависимостью от этнических, гендерных и возрастных особенностей выборок исследуемых популяций (Larson et al, 2002; Ding et al, 2012). Ряд работ указывает на связь между потреблением насыщенных и полиненасыщенных жирных кислот и эффектом полиморфных вариантов $(-75)G>A$ гена *APOA1* на обмен липидов (Marin et al, 2002; Ordovas et al, 2002; Masson et al, 2003; Gomez et al, 2010). Таким образом, особенности рациона, характерные для различных регионов, могут также определять популяционно-зависимый эффект влияния данного варианта на липидный спектр плазмы крови. Это в свою очередь объясняет отсутствие ассоциации варианта $(-75)G>A$ гена *APOA1* с риском развития атеросклероза у жителей Санкт-Петербурга.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании у пациентов с атеросклерозом и в контрольной группе была исследована экспрессия гена транспортера *ABCG1* в моноцитах и макрофагах, стимулированных фактором М-CSF. Впервые было продемонстрировано, что уровень экспрессии гена *ABCG1* в макрофагах снижен у пациентов с атеросклерозом. Также мы наблюдали сниженный уровень мРНК гена *ABCG1* в моноцитах пациентов с окклюзиями артерий по сравнению с пациентами, имеющими менее выраженные атеросклеротические повреждения. Таким образом, можно заключить, что снижение уровня экспрессии гена *ABCG1* в моноцитах и макрофагах может являться значимым фактором в развитии и прогрессировании атеросклеротического процесса. Также в данном исследовании была продемонстрирована протективная роль аллеля *T83* гена *APOA1* в формировании предрасположенности к атеросклерозу. Полученные в настоящем исследовании данные могут быть также использованы для формирования групп повышенного риска развития атеросклероза.

ВЫВОДЫ

1. В макрофагах, полученных при дифференцировке моноцитов в присутствии колоние-стимулирующего фактора макрофагов M-CSF, у пациентов с атеросклерозом снижен уровень мРНК гена *ABCG1* и белка *ABCG1*.
2. Уровень мРНК гена *ABCG1* в моноцитах снижен у пациентов с окклюзиями артерий по сравнению с пациентами, не имеющими окклюзий, и по сравнению с контрольной группой.
3. Для вариантов *G(-134)* и *C(-204)* гена *ABCG1* характерны более высокие значения концентрации ОХС плазмы крови.
4. Носительство варианта *T83* гена *APOA1* снижает риск развития атеросклероза и ассоциировано с повышением концентрации Х-ЛПВП плазмы крови у жителей Санкт-Петербурга.
5. Варианты *(-134)T>G*, *(-204)A>C* и *(-384)G>A* гена *ABCG1* и *(-75)G>A* гена *APOA1* не влияют на риск развития атеросклероза в популяции Санкт-Петербурга.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Мирошникова В.В.**, Родыгина Т.И., Демина Е.П., Курьянов П.С., Уразгильдеева С.А., Гуревич В.С., Шварцман А.Л. Ассоциации генетических вариантов апопротеина А-1 с развитием атеросклероза у жителей Санкт-Петербурга // Экологическая генетика. – 2010. – Т.8. – №2. – С.24–28.
2. **Мирошникова В.В.**, Пантелеева А.А., Демина Е.П., Курьянов П.С., Вавилов В.Н., Уразгильдеева С.А., Гуревич В.С., Сироткина О.В., Шварцман А.Л. Ассоциация полиморфных вариантов гена транспортера ABCG1 с концентрацией холестерина плазмы крови при атеросклерозе // Медицинская генетика. – 2013. – Т.12. – №10. – С.23–28.
3. **Мирошникова В.В.**, Пантелеева А.А., Пчелина С.Н., Шварцман А.Л. Влияние полиморфных вариантов гена аполипопротеина А-I на липидный спектр плазмы крови в популяции Санкт-Петербурга // Ученые записки СПбГМУ им. ак. И.П.Павлова. – 2014. – Т.21. – №1. – С.57–59.
4. **Мирошникова В.В.**, Демина Е.П., Майоров Н.В., Давыденко В.В., Курьянов П.С., Вавилов В.Н., Виноградов А.Г., Денисенко А.Д., Шварцман А.Л. Особенности экспрессии гена транспортера ABCG1 в мононуклеарных клетках периферической крови у пациентов с атеросклерозом // Цитология. – 2014. – Т.56. – №3. – С.234–240.
5. **Зверева В.В. (Мирошникова)**, Демина Е.П., Курьянов П.С., Родыгина Т.И., Шварцман А.Л. Влияние вариантов гена аполипопротеина А1 на риск развития атеросклероза // Материалы Российского национального конгресса кардиологов. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2008. – Т.7. – №6. – С.149.
6. Демина Е.П., Курьянов П.С., **Зверева В.В. (Мирошникова)**, Виноградов А.Г., Шварцман А.Л. Обратный транспорт холестерина и развитие атеросклероза // Материалы V Съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров. – 2009. – С.413.

7. **Miroshnikova V.**, Demina E., Rodygina T., Kurjanov P., Vinogradov A., Denisenko A., Schwarzman A. ABCG1 transporter in atherosclerosis development // European Journal of human genetics. – 2010. – V.18. – Suppl.1. – P.218.
8. **Miroshnikova V.**, Demina E., Rodygina T., Kurjanov P., Vinogradov A., Denisenko A., Schwarzman A. Expression of ABCG1 transporter gene in macrophages from atherosclerotic patients // Abstract book: 7 International PhD student symposium "Horizons in Molecular Biology". – 2010. – P.98.
9. **Мирошникова В.В.**, Демина Е.П., Родыгина Т.И., Курьянов П.С., Виноградов А.Г., Денисенко А.Д., Шварцман А.Л. Экспрессия гена ABCG1 транспортера у больных атеросклерозом // Материалы Всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия». Медицинский академический журнал. – 2010. – Т.10. – №5. – С.126.
10. **Мирошникова В.В.**, Курьянов П.С., Демина Е.П., Родыгина Т.И., Денисенко А.Д., Шварцман А.Л. Снижение уровня экспрессии гена ABCG1 в макрофагах больных атеросклерозом // Материалы международного конгресса «Актуальные проблемы современной медицины». Украинский научно-медицинский молодежный журнал. – 2011. – №1. – С.260–261.
11. **Miroshnikova V.**, Demina E., Rodygina T., Kurjanov P.S., Denisenko A.D., Schwarzman A. The role of ABCG1 gene expression in atherosclerosis development // Cardiovascular Research. – 2012. – V.93. – Suppl.1. – P.271.
12. **Miroshnikova V.**, Zaharchuk A., Sirotkina O., Taraskina A., Pchelina S. Association of PON1 and APOA1 genes polymorphism with men's life expectancy in Russian population // European Journal of human genetics. – 2012. – V.20. – Suppl.1. – P.241.
13. **Мирошникова В.В.**, Курьянов П.С., Майоров Н.В., Демина Е.П., Шварцман А.Л. Экспрессия гена транспортера ABCG1 при развитии

- атеросклероза // Сборник тезисов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы медицинской науки». – 2013. – С.121–122.
14. **Miroshnikova V.**, Demina E., Mayorov N., Davydenko V., Kurjanov P., Vavilov V., Denisenko A., Schwarzman A. Influence of promoter SNPs on the ABCG1 transporter gene expression level // European Journal of human genetics. – 2013. – V.21. – Suppl.2. – P.69.
15. **Мирошникова В.В.**, Пантелеева А.А., Курьянов П.С., Демина Е.П., Вавилов В.Н., Уразгильдеева С.А., Гуревич В.С., Сироткина О.В., Шварцман А.Л. Влияние полиморфных вариантов в промоторной области гена *ABCG1* на риск развития атеросклероза // Материалы Российского национального конгресса кардиологов. – 2013. – С.379.
16. Пантелеева А.А., **Мирошникова В.В.**, Шварцман А.Л. Полиморфизм гена *ABCG1* и его влияние на уровень холестерина плазмы крови и развитие атеросклероза // Материалы международного конгресса «Актуальные проблемы современной медицины». Украинский научно-медицинский молодежный журнал. – 2013. – №4(74). – С.149–150.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Бодрова О.В., Ларионова Н.П. Атеросклероз. – М.: Крон-пресс, 2000. – 407с.

Бокерия Л.А., Ступаков Н.Н., Самородская И.В., Ботнарь Ю.М. Сердечно-сосудистые заболевания в Российской Федерации на рубеже веков: смертность, распространенность, факторы риска // Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. – 2007. – Т.8. – N.5. – С.5–11.

Быстрова А.А. Генетические аспекты атерогенных дислипидемий у больных сахарным диабетом 2 типа // Автореф. диссертации на соискание к-та мед. наук. – Санкт-Петербург. 2009. – 22с.

Вельков В.В. Новые маркёры для диагностики сердечно-сосудистых заболеваний и стратификации коронарных рисков // Лабораторная медицина. – 2010. – №1. – С.11–17.

Душкин М.И. Макрофаги и атеросклероз: патофизиологические и терапевтические аспекты // Бюллетень СО РАМН. – 2006. – Т.2. – №120. – С.47–55.

Карпов Р.С., Дудко В.А. Атеросклероз: патогенез, клиника, функциональная диагностика, лечение. – Томск: СТУ, 1998. – 672с.

Каюмова Р.Д., Каюмова Л.Р., Воробьева Е.В., Горбунова В.Ю. Изучение вклада генов аполипопротеина А-1 (АРОА-1) и аполипопротеина С-3 (АРОС-3) в состояние липидного спектра крови человека // Известия Самарского научного центра РАН. – 2011. – Т.13. – №5(3). – С.245–247.

Кисляк О.А., Мышляева Т.О., Малышева Н.В. Сахарный диабет 2 типа, артериальная гипертензия и риск сердечно-сосудистых осложнений // Сахарный диабет. – 2008. – Т.1. – С.45–49.

Климов А.Н., Никульчева Н.Г. Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения. – СПб.: Питер, 1999. – 432с.

Климов А.Н., Никифорова А.А., Кузьмин А.А. Как «хорошие» липопротеиды задерживают образование в крови «плохих» липопротеидов,

защищая нас от атеросклероза // Научно-практический журнал. – 2000. – Т.2. – №12. – С.37-41.

Кухарчук В.В., Коновалов Г.А., Галявич А.С., Сусеков А.В., Сергиенко И.В., Ежов М.В., Семенова А.Е., Соловьева Е.Ю. Диагностика и коррекция нарушений липидного обмена с целью профилактики и лечения атеросклероза. Российские рекомендации, V пересмотр // Атеросклероз. – 2012. – №2. – С.61–94.

Липовецкий Б.М. Клиническая липидология. – СПб.: Наука, 2000. – 119с.

Липовецкий Б.М. Дислипидемии, атеросклероз и их связь с ишемической болезнью сердца и мозга. – М.: Эко-Вектор, 2012. – 65с.

Маниатис Т. и др. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. – М.:Мир, 1984. – 480с.

Натвиг Дж.Б., Перлманн П., Визгель Х. Лимфоциты: выделение, фракционирование и характеристика. – М.: Медицина, 1980. – 280с.

Никифоров Н.Г., Грачев А.Н., Собенин И.А., Орехов А.Н., Кжышковска Ю.Г. Макрофаги и метаболизм липопротеидов в атеросклеротическом поражении // Патологическая физиология. – 2012. – Т.13. – С.900–922.

Перова Н.В., Озерова И.Н., Метельская В.А. Метаболическая система выведения холестерина из тканей. Возможность активации ее ключевых звеньев // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2006. – Т.2. – №2. – С.49–56.

Торховская Т.И., Ипатова О.М., Медведева Н.В., Захарова Т.С., Халилов Э.М. Мембранные белки и фосфолипиды как эффекторы обратного транспорта холестерина // Биомедицинская химия. – 2006. – Т.52. – №2. – С.113–123.

Щелкунова Т.А., Морозов И.А., Рубцов П.М., Самоходская Л.М., Андрианова И.В., Собенин И.А., Орехов А.Н., Смирнов А.Н. Изменения в уровне экспрессии генов в интиме аорты в ходе атерогенеза // Биохимия. – 2013. – №5. – С.610–619.

Abellan R., Mansego M.L., Martinez-Hervas S. et al. Association of selected ABC gene family single nucleotide polymorphisms with postprandial lipoproteins: Results from the population-based Hortega study // *Atherosclerosis*. – 2010. – V.211. – P.203–209.

Abellan R., Mansego M.L., Martinez-Hervas S. et al. Dietary polyunsaturated fatty acids may increase plasma LDL-cholesterol and plasma cholesterol concentrations in carriers of an ABCG1 gene single nucleotide polymorphism: Study in two Spanish populations // *Atherosclerosis*. – 2011. – V.219. – P.900–906.

Adlakha Y.K., Khanna S., Singh R., Singh V.P., Agrawal A., Saini N. Pro-apoptotic miRNA-128-2 modulates ABCA1, ABCG1 and RXRaexpression and cholesterol homeostasis // *Cell Death and Disease*. – 2013. – V.4. – e780.

Akita H, Chiba H, Tsuji M, Hui SP, Takahashi Y, Matsuno K, Kobayashi K. Evaluation of G-to-A substitution in the apolipoprotein A-I gene promoter as a determinant of highdensity lipoprotein cholesterol level in subjects with and without cholesteryl ester transfer protein deficiency // *Human Genetics*. – 1995. – V.96. – P.521–526.

Angotti E., Mele E., Costanzo F., Avvedimento E.V., A polymorphism (G→A transition) in the -78 position of the apolipoprotein A-I promoter increases transcription efficiency // *The Journal of biological chemistry*. – 1994. – V.269. – N.26. – P.17371–17374.

Albahrani A.I., Usher J.J., Alkindi M., Marks E., Ranganath L., Al-yahyaee S. ApolipoproteinA1-75 G/A (M1) polymorphism and Lipoprotein(a); Anti- vs. Pro-Atherogenic properties // *Lipids in Health and Disease*. – 2007. – N.6. –P.19–25.

Alexander E.T., Tanaka M., Kono M., Saito H., Rader D. J., Phillips M.C. Structural and functional consequences of the Milano mutation (R173C) in human apolipoprotein A-I // *The Journal of Lipid Research*. – 2009. – V.50. – P.1409–1419.

Al-Bustan S.A., Al-Serri E.A., Annice B.G., Alnaqeeb M.A., Ebrahim G.A. Re-sequencing of the APOAI promoter region and the genetic association of the -75G>A polymorphism with increased cholesterol and low density lipoprotein levels

among a sample of the Kuwaiti population // BMC Medical Genetics. – 2013. – V.14(1). – P.90.

Al-Yahyaee S.A., Al-Kindi M.N., Al-Bahrani A.I. Apolipoprotein A1 gene polymorphisms at the –75 bp and +83/84 bp polymorphic sites in healthy Omanis compared with world populations // Human Biology. – 2004. – V.76(2). – P.307–312.

Angotti E., Mele E., Costanzo F., Avvedimento E.V. A polymorphism (G→A transition) in the –78 position of the apolipoprotein A-I promoter increases transcription efficiency // The Journal of biological chemistry. – 1994. – V.269. – N26. – P.17371–17374.

Asztalos B.F., Cupples L.A., Demissie S., Horvath K.V., Cox C.E., Batista M.C., Schaefer E.J. High-density lipoprotein subpopulation profile and coronary heart disease prevalence in male participants of the Framingham Offspring Study // Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology. – 2004. – V.24. – P.2181–2187.

Atmeh R.F., Abd Elrazeq I.O. Small high density lipoprotein subclasses: some of their physico-chemical properties and stability in solution // Acta Biochimica. – 2005. – V.52. – P.515–525.

Bai H., Saku K., Liu R., Jimi S., Arakawa K. Analysis of a new polymorphism in the human apolipoprotein A-I gene: association with serum lipoprotein levels and coronary heart disease // The Journal of Cardiology. – 1996. – V.28. – P.207–212.

Baker A.D., Malur A., Barna B.P., Kavuru M.S., Malur A.G., Thomassen M.J.. Biochem Biophys Res Commun. PPARgamma regulates the expression of cholesterol metabolism genes in alveolar macrophages // Biochemical and Biophysical Research Community. – 2010. – V.393(4). – P.682–687.

Baldan A., Pei L., Lee R., Tarr P., Tangirala R.K., Weinstein M.M., Frank J., Li A.C., Tontonoz P., Edwards P.A. Impaired development of atherosclerosis in hyperlipidemic Ldlr^{-/-} and ApoE^{-/-} mice transplanted with Abcg1^{-/-} bone marrow // Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology. – 2006. – V.26. – P.2301–2307.

Bandarian F., Hedayati M., Daneshpour M.S., Naseri M., Azizi F. Genetic Polymorphisms in the APOA1 Gene and their Relationship with Serum HDL Cholesterol Levels // *Lipids*. – 2013. – V.48. – P.1207–1216.

Baroni M.G., Berni A., Romeo S., Arca M., Tesorio T., Sorropago G., Di Mario U., Galton D.J. Genetic study of common variants at the Apo E, Apo AI, Apo CIII, Apo B, lipoprotein lipase (LPL) and hepatic lipase (LIPC) genes and coronary artery disease (CAD): variation in LIPC gene associates with clinical outcomes in patients with established CAD // *BMC Medical Genetics*. – 2003. – V.4. – P.8–15.

Barter P., Gotto A.M., LaRosa J.C. et al. HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular events // *New England Journal of Medicine*. – 2007. – V.357. – N13. – P.1301–1310.

Basso F., Amar M.J., Wagner E.M., Vaisman B., Paigen B., Santamarina-Fojo S., Remaley A.T. Enhanced ABCG1 Expression Increases Atherosclerosis in LDLrKO Mice on a Western Diet // *Biochemical and Biophysical Research Community*. – 2006. – V.351(2). – P.398–404.

Bekmetova F., Kurbanov R., Shek A., Kan L., Hashimov S. Features of gene polymorphisms regulating lipid metabolism and ID polymorphism of ace gene in uzbek patients with unstable angina with a family history of coronary heart disease // *Medical and Health Science Journal*. – 2012. – V.11. – P.14–22.

Belalcazar L.M., Merched A., Carr B., Oka K., Chen K., Pastore L., Beaudet A., Chan L. Long-Term Stable Expression of Human Apolipoprotein A-I Mediated by Helper-Dependent Adenovirus Gene Transfer Inhibits Atherosclerosis Progression and Remodels Atherosclerotic Plaques in a Mouse Model of Familial Hypercholesterolemia // *Circulation*. – 2003. – V.107. – P.2726–2732.

Benoit P., Emmanuel F., Caillaud JM, Bassinet L, Castro G, Gallix P, Fruchart JC, Branellec D, Deneffe P, Duverger N. Somatic gene transfer of human ApoA-I inhibits atherosclerosis progression in mouse models // *Circulation*. – 1999. – V.99. – P.105–110.

Brouillette C.G., Anantharamaiah G.M., Engler J.A., Borhani D.W. Structural models of human apolipoprotein A-I: a critical analysis and review // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2001. – V.1531. – P.4–46.

Brown W.M., Chiacchia F.S. Therapies to Increase ApoA-I and HDL-Cholesterol Levels // *Drug Target Insights*. – 2008. – V.3. – P.45–54.

Bruckert E., von Eckardstein A., Funke H., Beucler I., Wiebusch H., Turpin G., Assmann G. The replacement of arginine by cysteine at residue 151 in apolipoprotein A-1 Milano produces a phenotype similar to that of apolipoprotein A-1 // *Atherosclerosis*. – 1997. – V.128. – P.121–128.

Burgess B., Naus K., Chan J., Hirsch-Reinshagen V., Tansley G., Matzke L., Chan B., Wilkinson A., Fan J., et al. Overexpression of Human ABCG1 Does Not Affect Atherosclerosis in Fat-Fed ApoE-Deficient Mice // *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. – 2008. – V.29. – P.1731–1737.

Carmena-Ramon R.F., Ordovas J.M., Ascaso J.F., Real J., Priego M.A., Carmena R. Influence of genetic variation at the apo A-I gene locus on lipid levels and response to diet in familial hypercholesterolemia // *Atherosclerosis*. – 1998. – V.139. – P.107–113.

Chan D.C., Watts G.F. Apolipoproteins as markers and managers of coronary risk // *An International Journal of Medicine*. – 2006. – V.99. – P.277–287.

Chawla A., Boisvert W.A., Lee C.H., Laffitte B.A., Barak Y., Joseph S.B., Liao D., Nagy L., Edwards P.A., Curtiss L.K., Evans R.M., Tontonoz P.A. PPAR γ -LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis // *Molecular Cell*. – 2001. – V.7. – P.161–171.

Chen E.S., Mazotti D.R., Furuya T.K. et al. Apolipoprotein A1 gene polymorphisms as risk factors for hypertension and obesity // *Clinical and Experimental Medicine*. – 2009. – V. 9. – N4. – P.319–325.

Chetty P.S., Ohshiro M., Saito H., Dhanasekaran P., Lund-Katz S., Mayne L., Englander W., Phillips M.C. Effects of the Iowa and Milano Mutations on

Apolipoprotein A-I Structure and Dynamics Determined by Hydrogen Exchange and Mass Spectrometry // *Biochemistry*. – 2012. – V.51(44). – P.8993–9001.

Chhabra S., Narang R., Lakshmy R., Das N. APOA1 -75 G to A substitution associated with severe forms of CAD, lower levels of HDL and apoA-I among northern Indians // *Disease Markers*. – 2005. – V.21. – N4. – P.169–174.

Cho K.H., Durbin D.M., Jonas A. Role of individual amino acids of apolipoprotein A-I in the activation of lecithin:cholesterol acyltransferase and in HDL rearrangements // *The Journal of Lipid Research*. – 2001. – V.42. – P.379–389.

Civeira F., Pocovi M., Cenarro A., Garces C., Ordovas J.M. Adenine for Guanine substitution -78 base pairs 5' to the apolipoprotein (APO) A-I gene: relation with high density lipoprotein cholesterol and APO A-I concentrations // *Clinical Genetics*. – 1993. – V.44. – P.307–312.

Cohen J.C., Kiss R.S., Pertsemlidis A., Marcel Y.L., McPherson R., Hobbs H.H.. Multiple rare alleles contribute to low plasma levels of HDL cholesterol // *Science*. – 2004. – V.305(5685). – P.869–872.

Cuchel M., Rader D.J. Macrophage Reverse Cholesterol Transport Key to the Regression of Atherosclerosis // *Circulation*. – 2006. – V.113. – P.2548–2555.

Daneshpour M.S., Faam B., Mansournia M.A., Hedayati M., Mesbah-Namin S.A., Shojaei S., Zarkesh M., Azizi F. Haplotype analysis of ApoAI-CIII-AIV gene cluster and lipids level: tehran lipid and glucose study // *Endocrine*. – 2012. – V.41(1). – P.103–110.

Daum U., Leren T.P., Langer C., Chirazi A., Cullen P., Pritchard P.H., Assmann G., von Eckardstein A. Multiple dysfunctions of two apolipoprotein A-I variants, apoA-I(R160L)Oslo and apoA-I(P165R), that are associated with hypoalphalipoproteinemia in heterozygous carriers // *The Journal of Lipid Research*. – 1999. – V.40. – P.486–494.

Davidson W.S., Thompson T.M. The Structure of Apolipoprotein A-I in High Density Lipoproteins // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2007. – V.282. – N.31. – P.22249–22253.

Dawar R., Gurtoo A., Singh R. Apolipoprotein A1 Gene Polymorphism (G-75A and C+83T) in Patients With Myocardial Infarction // American Journal of Clinical Pathology. – 2010. – V.134. – P.249–255.

De Franca E., Alves J.G.B., Hutz M.H. APOA1/C3/A4 gene cluster variability and lipid levels in Brazilian children // Brazilian Journal of Medical and Biological Research. – 2005. – V.38. – P.535–541.

Demarchi D.A., Mosher M.J., Crawford M.H. Apolipoproteins (Apoproteins) and LPL Variation in Mennonite Populations of Kansas and Nebraska American // The Journal of Human Biology. – 2005. – V.17. – P.593–600.

Denis M., Haidar B., Marcil M., Bouvier M., Krimbou L., Genest J. Jr. Molecular and Cellular Physiology of Apolipoprotein A-I Lipidation by the ATP-binding Cassette Transporter A1 (ABCA1) // Journal of Biological Chemistry. – 2004. – V.279. – N.9. – P.7384–7394.

Devlin B., Risch N. A Comparison of Linkage Disequilibrium Measures for Fine-Scale Mapping // Genomics. – 1995. – V.29. – P.311–322.

Dickhout J.G., Lhoták Š., Hilditch B.A., Basseri S., Colgan S.M., Lynn E.G., Carlisle R.E., Zhou J., Sood S.K., Ingram A.J., Austin R.C. Induction of the unfolded protein response after monocyte to macrophage differentiation augments cell survival in early atherosclerotic lesions // The FASEB Journal. – 2011. – V.25. – N2. – P.576 – 589.

Ding Y., Zhu M.A., Wang Z.X., Zhu J., Feng J.B., Li D.S. Associations of Polymorphisms in the Apolipoprotein APOA1-C3-A5 Gene Cluster with Acute Coronary Syndrome // Journal of Biomedicine and Biotechnology. – 2012. – Article ID 509420

Edmondson A.C., Braund P.S., Stylianou I.M. et al. Dense genotyping of candidate gene loci identifies variants associated with high-density lipoprotein cholesterol // Circulation Cardiovascular Genetics. – 2011. – V.4. – P.145–155.

Engel T., Bode G., Lueken A., Knop M., Kannenberg F., Nofer J-R, Assmann G., Seedorf U. Expression and functional characterization of ABCG1 splice variant ABCG1(666) // FEBS Letters. – 2006. – V.580. – P.4551–4559.

Engel T., Kannenberg F., Fobker M., Nofer J.R., Bode G., Lueken A., Assmann G., Seedorf U. Expression of ATP binding cassette-transporter ABCG1 prevents cell death by transporting cytotoxic 7beta- hydroxycholesterol // FEBS Letters. – 2007. – V.581. – P.1673–1680.

Escola-Gil J. C., Cample-Berdiel L., Palomer X. Ribas V., Ordonez-Llanos J., Blanco-Vaca F. Antiatherogenic role of high-density lipoproteins: insights from genetically engineered-mice // Frontiers in Biosciences. - 2006. – V.11. – P.1328–1348.

Fang Y., Gursky O., Atkinson D. Structural studies of N- and C-terminally truncated human apolipoprotein A-I // Biochemistry. – 2003. – V.42. – P.6881–6890.

Franceschini G., Calabresi L., Chiesa G., et al. Increased cholesterol efflux potential of sera from apoA-I Milano carriers and transgenic mice // Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology. – 1999. – V.19. – P.1257–1262.

Franceschini G., Sirtori C.R., Capurso A., Weisgraber K.H., Mahley R.W. A-I Milano Apoprotein-decreased high density lipoprotein cholesterol levels with significant lipoprotein modifications and without clinical atherosclerosis in an Italian family // The Journal of Clinical Investigations. – 1980. – V.66. – P.892–900.

Frank P.G., Marcel Y.L. Apolipoprotein A-I: Structure-function relationships // The Journal of Lipid Research. – 2000. – V.41. – P.853 – 872.

Fredenrich A., Bayer P. Reverse cholesterol transport, high density lipoproteins and HDL cholesterol: recent data // Diabetes & Metabolism. – 2003. – V.29. – P.201 – 205.

Freeman S.R., Jin X., Anzinger J.J., Xu Q., Purushothaman S., Fessler M.B., Addadi L., Kruth H.S. ABCG1-mediated generation of extracellular cholesterol microdomains // The Journal of Lipid Research. – 2014. – V.55(1). – P.115–27.

Frenais R., Ouguerram K., Maugeais C., Marchini J.S., Benlian P., Bard J.M., Magot T., and Krempf M. Apolipoprotein A-I kinetics in heterozygous familial hypercholesterolemia: a stable isotope study // *The Journal of Lipid Research*. – 1999. – V.40. – P.1506 – 1511.

Fu X., Menke J.G., Chen Y, Zhou G., MacNaul K.L., Wright S.D., Sparrow C.P., Lund E.G. 27-Hydroxycholesterol Is an Endogenous Ligand for Liver X Receptor in Cholesterol-loaded Cells // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – V.276. – P.38378 – 38387.

Furuyama S., Uehara Y., Zhang B. et al. Genotypic effect of ABCG1 gene promoter -257T>G polymorphism on coronary artery disease severity in Japanese men // *The Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. – 2009. – V.16(3). – P.194 – 200.

Gardner A.W., Alaupovic P., Parker D.E., Montgomery P.S., Esponda O.L., Casanegra A.I. Influence of Peripheral Artery Disease and Statin Therapy on Apolipoprotein Profiles // *International Journal of Vascular Medicine*. – 2013. – Article ID 548764

Gelissen I.C., Harris M., Rye K-A, Quinn C., Brown A.J., Kockx M., Cartland S., Packianathan M., Kritharides L., Jessup W. ABCA1 and ABCG1 Synergize to Mediate Cholesterol Export to ApoA-I // *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. – 2006. – V.26. – P.534 – 540.

Gelissen I.C., Cartland S., Brown A.J., Sandoval C., Kim M., Dinnes D.L., Lee Y., Hsieh V., Gaus K., Kritharides L., Jessup W. Expression and stability of two isoforms of ABCG1 in human vascular cells // *Atherosclerosis*. – 2010. – V.208. – P.75 – 82.

Gelissen I.C., Sharpe L.J., Sandoval C., Rao G., Kockx M., Kritharides L., Jessup W., Brown A.J. Protein kinase A modulates the activity of a major human isoform of ABCG1 // *The Journal of Lipid Research*. – 2012. – V.53(10). – P.2133 - 2140

Genvigir F.D., Rodrigues A.C., Cerda A., Arazi S.S., Willrich M.A., Oliveira R., Hirata M.H., Dorea E.L., Bernik M.M., Curi R., Hirata R.D.. Effects of lipid-lowering drugs on reverse cholesterol transport gene expressions in peripheral blood mononuclear and HepG2 cells // *Pharmacogenomics*. – 2010. – V.11(9). – P.1235 – 1246.

Gomez P., Perez-Martinez P., Marin C. et al. APOA1 and APOA4 gene polymorphisms influence the effects of dietary fat on LDL particle size and oxidation in healthy young adults // *The Journal of Nutrition*. – 2010. – V.140. – P.773 – 778.

Grundtman G., Wick G. The autoimmune concept of atherosclerosis // *Current Opinion in Lipidology*. – 2011. – V.22(5). – P.327 – 334.

Gu H.M., Li G., Gao X., Berthiaume L.G., Zhang D.W. Characterization of palmitoylation of ATP binding cassette transporter G1: effect on protein trafficking and function // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2013. – V.1831(6). – P.1067 – 1078.

Gursky O., Jones M.K., Mei X., Segrest J.P., Atkinson D. Structural basis for distinct functions of the naturally occurring Cys mutants of human apolipoprotein A-I // *The Journal of Lipid Research*. – 2013. – V.54(12). – P.3244 – 3257.

Haase C.L., Frikke-Schmidt R., Nordestgaard B.G., Tybjaerg-Hansen A. Population-Based Resequencing of APOA1 in 10,330 Individuals: Spectrum of Genetic Variation, Phenotype, and Comparison with Extreme Phenotype Approach // *PLoS Genetics*. – 2012. – V.8(11). – e1003063.

Haase C.L., Frikke-Schmidt R., Nordestgaard B.G., Kateifides A.K., Kardassis D., Nielsen L.B., Andersen C.B., Kober L., Johnsen A.H., Grande P., Zannis V.I., Tybjaerg-Hansen A. Mutation in APOA1 predicts increased risk of ischaemic heart disease and total mortality without low HDL cholesterol levels // *The Journal of Internal Medicine*. – 2011. – V.270(2). – P.136 – 146.

Halley P., Kadakkuzha B.M., Faghihi M.A., Magistri M., Zeier Z., Khorkova O., Coito C., Hsiao J., Lawrence M., Wahlestedt C. Regulation of the Apolipoprotein

Gene Cluster by a Long Noncoding RNA // *Cell Reports*. – 2013. – V.6. – P.222 – 230.

Holven K.B., Retterstol K., Ueland T., Ulven S.M., Nenseter M.S., Sandvik M., Narverud I., Berge K.E., Ose L., Aukrust P., Halvorsen B. Subjects with Low Plasma HDL Cholesterol Levels Are Characterized by an Inflammatory and Oxidative Phenotype // *PLoS One*. – 2013. – V.8(11). – e78241.

Hovingh G.K., Brownlie A., Bisioendial R.J., Dube M.P., Levels J.H., Petersen W., Dullaart R.P., Stroes E.S., Zwinderman A.H., de Groot E. et al. A novel apoA-I mutation (L178P) leads to endothelial dysfunction, increased arterial wall thickness and premature coronary artery disease // *The Journal of American College of Cardiology*. – 2004. – V.44. – P.1429 – 1435.

Hovingh G.K., de Groot E., van der Steeg W. et al. Inherited disorders of HDL metabolism and atherosclerosis // *Current Opinion in Lipidology*. – 2005. – V.16(2). – P.139–145.

Hu Y.W., Wang Q., Ma X., Li X.X., Liu X.H., Xiao J., Liao D.F., Xiang J., Tang C.K. TGF-beta1 up-regulates expression of ABCA1, ABCG1 and SR-BI through liver X receptor alpha signaling pathway in THP-1 macrophage-derived foam cells // *The Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. – 2010. – V.17(5). – P.493 – 502.

Huang R., Gangani R.A., Silva D., Jerome W.J., Kontush A., Chapman J., Curtiss L.K., Hodges T.J., Davidson W.S. Apolipoprotein A-I structural organization in high density lipoproteins isolated from human plasma // *Nature Structural and Molecular Biology*. – 2011. – V.18(4). – P.416 – 422.

Huang W., Sasaki J., Matsunaga A., Nanimatsu H., Moriyama K., Han H., Kugi M., Koga T., Yamaguchi K., Arakawa K. A novel homozygous missense mutation in the apo A-I gene with apo A-I deficiency // *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. – 1998. – V.18. – P.389 – 396.

Hirayama H., Kimura Y., Kioka N., Matsuo M., Ueda K. ATPase activity of human ABCG1 is stimulated by cholesterol and sphingomyelin // *The Journal of Lipid Research*. – 2013. – V.54(2). – P.496 – 502.

Iida A., Saito S., Sekine A. et al. Catalog of 605 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) among 13 genes encoding human ATP-binding cassette transporters: ABCA4, ABCA7, ABCA8, ABCD1, ABCD3, ABCD4, ABCE1, ABCF1, ABCG1, ABCG2, ABCG4, ABCG5, and ABCG8 // *The Journal of Human Genetics*. – 2002. – V.47. – P.285 – 310.

Iizuka M, Ayaori M, Uto-Kondo H, Yakushiji E, Takiguchi S, Nakaya K, Hisada T, Sasaki M, Komatsu T, Yogo M, Kishimoto Y, Kondo K, Ikewaki K. Astaxanthin enhances ATP-binding cassette transporter A1/G1 expressions and cholesterol efflux from macrophages // *Journal of Nutritional Sciences and Vitaminology (Tokyo)*. – 2012 – V.58(2) – P.96–104.

Irvine K.M., Andrews M.R., Fernandez-Rojo M.A., Schroder K., Burns C.J., Su S., Wilks A.F., Parton R.G., Hume D.A., Sweet M.J. Colony-stimulating factor-1 (CSF-1) delivers a proatherogenic signal to human macrophages // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2009. – V.85(2). – P.278 – 288.

Jakobsson T., Venteclef N., Toresson G., Damdimopoulos A.E., Ehrlund A., Lou X., Sanyal S., Steffensen K.R., Gustafsson J.A., Treuter E. GPS2 is required for cholesterol efflux by triggering histone demethylation, LXR recruitment, and coregulator assembly at the ABCG1 locus // *Molecular Cell*. –2009. – V.34(4). – P.510-518.

Jeenah M., Kessling A., Millers N., Humphries S. G to A Substitution in the promoter region of the apolipoprotein AI gene is associated with elevated serum apolipoprotein AI and high density lipoprotein cholesterol concentrations // *Molecular Biology and Medicine*. – 1990. – V.7. – P.233 – 241.

Jessup W., Gelissen I.C., Gaus K., Kritharides L. Roles of ATP binding cassette transporters A1 and G1, scavenger receptor BI and membrane lipid domains

in cholesterol export from macrophages // *Current Opinion in Lipidology*. – 2006. – V.17 – P.247–257.

Jiang Y.J., Lu B., Tarling E.J., Kim P., Man M-Q., Crumrine D., Edwards P.A., Elias P.M., Feingold K.R. Regulation of ABCG1 expression in human keratinocytes and murine epidermis // *The Journal of Lipid Research*. – 2010. – V.51. – P.3185 – 3195.

Juo S.H., Wyszynski D.F., Beaty T.H. et al., Mild association between the A/G polymorphism in the promoter of apolipoprotein A-I gene and apolipoprotein A-I levels: a meta-analysis // *American Journal of Medical Genetics*. – 1999. – V.82. – N3. – P.235 – 241.

Kamboh M.I., Bunker C.H., Aston C.E., Nestlerode C.S., McAllister A.E., Ukoli F.A. Genetic association of five apolipoprotein polymorphisms with serum lipoprotein-lipid levels in African blacks // *Genetic Epidemiology*. – 1999. – V.16. – P.205 – 222.

Kamboh M.I., Aston C.E., Nestlerode C.M. et al. Haplotype analysis of two APOA1/MspI polymorphisms in relation to plasma levels of apo A-I and HDL-cholesterol // *Atherosclerosis*. – 1996. – V.127. – N.2. – P.255 – 262.

Kennedy M.A., Venkateswaran A., Tarr P.T., Kudoh I.X.J., Shimizu N., and Peter A. Edwards Characterization of the Human ABCG1 Gene // *Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – V.276. – N42. – P.39438 – 39447.

Kennedy M.A., Barrera G.C., Nakamura K., Baldán A., Tarr P., Fishbein M.C., Frank J., Francone O.L., Edwards P.A. ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation // *Cell Metabolism*. – 2005. – V.1. – P.121 – 131.

Klon A.E., Jones M.K., Segrest J.P., Harvey S.C. Molecular Belt Models for the Apolipoprotein A-I Paris and Milano Mutations // *Biophysical Journal*. – 2000. – V.79. – P.1679 – 1685.

Klucken J., Buchler C., Orso E., Kaminski W., Porsch-Ozcurumez M., Liebisch, Kapinsky M., Diederich W., Drobnik W., Dean M., Allikmets R.,

Schmitz G. ABCG1 (ABC8), the human homolog of the *Drosophila* white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 2000. – Vol.97. – P.817 – 822.

Kockx M., Rye K-A., Gaus K., Quinn C.M., Wright J., Sloane T., Sviridov D., Fu Y., Sullivan D., Burnett J.R., Rust S., Assmann G., Anantharamaiah G.M., Palgunachari M.N., Katz S.L., Phillips M.C., Dean R.T., Jessup W., Kritharides L. Apolipoprotein A-I-stimulated Apolipoprotein E Secretion from Human Macrophages Is Independent of Cholesterol Efflux // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol.279.N25. – P.25966 – 25977.

Kontush A., Chapman M.J. Functionally Defective High-Density Lipoprotein: A New Therapeutic Target at the Crossroads of Dyslipidemia, Inflammation, and Atherosclerosis // *Pharmacology*. – 2006. – Vol.58. – P.342 – 374.

Korkor M.T., Meng G.B., Xing S.Y., Zhang M.C., Guo J.R., Zhu X.X., Yang P. Microarray Analysis of Differential Gene Expression Profile in Peripheral Blood Cells of Patients with Human Essential Hypertension // *International Journal of Medical Sciences*. – 2011. – V.8(2). – P.168 – 179.

Koukos G., Chroni A., Duka A., Kardassis D., Zannis V.I. Naturally occurring and bioengineered apoA-I mutations that inhibit the conversion of discoidal to spherical HDL: the abnormal HDL phenotypes can be corrected by treatment with LCAT // *Biochemical Journal*. – 2007. – V.406(1). – P.167 – 174.

Ku C.S., Park Y., Coleman S.L., Lee J. Unsaturated fatty acids repress expression of ATP binding cassette transporter A1 and G1 in RAW 264.7 macrophages // *Journal of Nutritional Biochemistry*. – 2012. – V.23(10). – P.1271 – 1276.

Lagerstedt J.O., Cavigliolo G., Roberts L.M., Hong H-S, Jin L-W, Fitzgerald P., Oda M.N., Voss J.C. Mapping the structural transition in an amyloidogenic apolipoprotein A-I // *Biochemistry*. – 2007. – V.46(34). – P.9693 – 9699.

Lahiri D.K., Bye S., Nurnberger J.I., Hodes M.E., Crisp M. A non-organic and non-enzymatic extraction method gives higher yeilds of genomic DNA from whole-

blood samples then do nine other methods tested // *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. – 1992. V.25. – P.193–205.

Lai C.Q., Parnell L.D., Ordovas J.M. The APOA1/C3/A4/A5 gene cluster, lipid metabolism and cardiovascular disease risk // *Current Opinion in Lipidology*. – 2005. – V.16. – P.153 – 166.

Lamarche B., Moorjani S., Lupien P.J., et al. Apolipoprotein A-1 and B levels and the risk of ischemic heart disease during a five-year follow-up of men in the Quebec Cardiovascular Study // *Circulation*. – 1996. – V.94. – P.273 – 280.

Lammers B., Out R., Hildebrand R.B., et al. Independent protective roles for macrophage Abcg1 and Apoe in the atherosclerotic lesion development // *Atherosclerosis*. – 2009. – V.205. – P.420 – 426.

Lamon-Fava S., Ordovas J.M., Schaefer E.J. Estrogen Increases Apolipoprotein (Apo) A-I Secretion in Hep G2 Cells by Modulating Transcription of the Apo A-I Gene Promoter // *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. – 1999. – V.19. – P.2960 – 2965.

Langmann T., Porsch-Ozcürümez M., Unkelbach U., Klucken J., Schmitz G. Genomic organization and characterization of the promoter of the human ATP-binding cassette transporter-G1 (ABCG1) gene // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2000. – V.1494. – P.175 – 80.

Larson I.A., Ordovas J.M., Barnard J.R., Hoffmann M.M., Feussner G., Lamon-Fava S., et. al. Effects of apolipoprotein A-I genetic variations on plasma apolipoprotein, serum lipoprotein and glucose levels // *Clinical Genetics*. – 2002. – V.61. – P.176 – 184.

Leren T.P., Bakken K.S., Daum U., Ose L., Berg K., Assmann G., von Eckardstein A. Heterozygosity for apolipoprotein A-I(R160L)Oslo is associated with low levels of high density lipoprotein cholesterol and HDL-subclass LpA-I/A-II but normal levels of HDL-subclass LpA-I // *The Journal of Lipid Research*. – 1997. – V.38(1). – P.121 – 131.

Levitan I., Volkov S., Papasani V. Subbaiah Oxidized LDL: Diversity, Patterns of Recognition, and Pathophysiology // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2010. – V.13. – P.39 – 75.

Lewis G.F., Rader D.J. New Insights Into the Regulation of HDL Metabolism and Reverse Cholesterol Transport // *Circulation Research*. – 2005. – V.96. – P.122 – 132.

Li Y., Yin R., Zhou Y., Deng Y., Yang D., Pan S., Lin W. Associations of the apolipoprotein A-I gene polymorphism and serum lipid levels in the Guangxi Hei Yi Zhuang and Han populations // *International Journal of Molecular Medicine*. – 2008. – V.21(6). – P.753 – 764.

Liu A.C., Lawn R.M., Verstuyft J.G., Rubin E.M.. Human apolipoprotein A-I prevents atherosclerosis associated with apolipoprotein[a] in transgenic mice // *The Journal of Lipid Research*. – 1994. – V.35. – P.2263 – 2267.

Liu Z.K., Hu M., Baum L., Thomas G.N., Tomlinson B. Associations of polymorphisms in the apolipoprotein A1/C3/A4/A5 gene cluster with familial combined hyperlipidaemia in Hong Kong Chinese // *Atherosclerosis* – 2010. – V.208(2). – P.427 – 432.

Lopez-Miranda J., Ordovas J.M., Espino A., Marin C., Salas J., Lopez-Segura F., Jimenez-Perez J., Perez-Jimenez F. Influence of mutation in human apolipoprotein A-I gene promoter on plasma LDL cholesterol response to dietary fat // *Lancet*. – 1994. – V.343. – P.1246 – 1249.

Lorkowski S., Rust S., Engel T., Jung E., Tegelkamp K., Galinski E.A., Assmann G., Cullen P. Genomic Sequence and Structure of the Human ABCG1 (ABC8) Gene // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2001. – V.280. – P.121 – 131.

Lorkowski S., Cullen P. ABCG subfamily of human ATP-binding cassette proteins // *Pure and Applied Chemistry*. – 2002. – V.74. – N11. – P.2057–2081.

Lozano R., Naghavi M., Foreman K., Lim S., Shibuya K., Aboyans V., Abraham J., Adair T., Aggarwal R., Ahn S.Y., et. al. Global and regional mortality

from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study // *Lancet*. – 2010. – V.380(9859). – P.2095 – 2128.

Lund-Katz S., Phillips M.C. High Density Lipoprotein Structure–Function and Role in Reverse Cholesterol Transport // *Subcellular Biochemistry*. – 2010. – V.51. – P.183 – 227.

Lund-Katz S., Liu L., Thuahnai S.T., Phillips M.C. High density lipoprotein structure // *Frontiers in Biosciences*. – 2003. – V.8. – P.1044 – 1054.

Luoma P.V. Gene Activation, Apolipoprotein A-I/High Density Lipoprotein, Atherosclerosis Prevention and Longevity // *Pharmacology and Toxicology*. – 1997. – V.81 – P.57-64.

Luoma P.V. Cytochrome P450 and gene activation--from pharmacology to cholesterol elimination and regression of atherosclerosis // *European Journal of Clinical Pharmacology*. – 2008. – V.64(9). – P.841 – 850.

Ma Y.Q., Thomas G.N., Tomlinson B. Association of two apolipoprotein A-I gene MspI Polymorphisms with lipid and blood pressure levels // *International Journal of Cardiology*. – 2005. – V.102. – P.309 – 314.

Maesh M., Sendelbach S., Lorkowski S. Selection of reliable reference genes during THP-1 monocyte differentiation into macrophages // *BMC Molecular Biology*. – 2010. – V.11. – P.90.

Majdalawieh A., Ro H.S. PPAR γ 1 and LXR α face a new regulator of macrophage cholesterol homeostasis and inflammatory responsiveness, AEBP1 // *Nuclear Receptor Signaling*. – 2010. – V.8. – P.1 – 17.

Marcantonio P., Desideri G., Santovito D., Mandolini C., Mastroiacovo D., De Nardis V., De Blasis G., Mezzetti A., Cipollone F. Effect of rosuvastatin on ABCA1 and ABCG1 expression in human atherosclerotic plaques: results from the QUASAR study // *EAS congress abstract book*. – 2012. – P.1306.

Marín C., López-Miranda J., Gómez P., Paz E., Pérez-Martínez P., Fuentes F., Jiménez-Perepérez J.A., Ordovás J.A., Pérez-Jiménez Am F. Effects of the human

apolipoprotein A-I promoter G-A mutation on postprandial lipoprotein metabolism // *Journal of Clinical Nutrition*. – 2002. – V.76. – P.319 – 325.

Masson L.F., Neill G.M., Avenell A. Genetic variation and the lipid response to dietary intervention: a systematic review // *American Journal of Clinical Nutrition*. – 2003. – V.77. – P.1098 – 1111.

Matsunaga T., Hiasa Y., Yanagi H. et al. Apolipoprotein A-I deficiency due to a codon 84 nonsense mutation of apolipoprotein A-I gene // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 1991. – V.88. – P.2793 – 2797.

Matsunaga A., Sasaki J., Han H., Huang W., Kugi M., Koga T., Ichiki S., Shinkawa T., Arakawa K. Compound heterozygosity for an apolipoprotein A1 gene promoter mutation and a structural nonsense mutation with apolipoprotein A1 deficiency // *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. – 1999. – V.19(2). – P.348 – 355.

Matsuo M. ATP-binding cassette proteins involved in glucose and lipid homeostasis // *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. – 2010. – V.74(5). – P.899 – 907.

Mauldin J.P., Nagelin M.H., Wojcik A.J., Srinivasan S., Skaflen M.D., Ayers C.R., McNamara C.A., Hedrick C.C. Reduced expression of ABCG1 increases cholesterol accumulation in macrophages of patients with type 2 diabetes // *Circulation*. – 2008. – V.117. – P. 2785–2792.

Mei X., Atkinson D. Crystal Structure of C-terminal Truncated Apolipoprotein A-I Reveals the Assembly of High Density Lipoprotein (HDL) by Dimerization // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – V.286. – P.38570 – 38582.

Meng Q.H., Pajukanta P., Valsta L., Aro A., Pietinen P., Tikkanen M.J. Influence of apolipoprotein A-I promoter polymorphism on lipid levels and responses to dietary change in Finnish adults // *Journal of International Medicine*. – 1997. – V.241. – P.373 – 378.

Meurs I., Lammers B., Zhao Y., Out R., Hildebrand R. B., Hoekstra M., Van Berkel T. J. C., Van Eck M. The effect of ABCG1 deficiency on atherosclerotic

lesion development in LDL receptor knockout mice depends on the stage of atherogenesis // *Atherosclerosis*. – 2012. – V.221(1). – P.41–47.

Miccoli R., Bertolotto A., Navalesi R., Odoguardi L., Boni A., Wessling J., Funke H., Wiebusch H., Eckardstein A., Assmann, G. Compound heterozygosity for a structural apolipoprotein A-I variant, apo A-I(L141R)Pisa and an apolipoprotein A-I null allele in patients with absence of HDL cholesterol, corneal opacifications and coronary heart disease // *Circulation*. – 1996. – V.94. – P.1622 – 1628.

Mukhamedova N., Escher G., Souza W.D., Tchoua U., Grant A., Krozowski Z., Bukrinsky M., Sviridov D. Enhancing apolipoprotein A-I-dependent cholesterol efflux elevates cholesterol export from macrophages in vivo // *The Journal of Lipid Research*. – 2008. – V.49. – P.2312 – 2322.

Minnich A., DeLangavant G., Lavigne J., Roederer G., Lussier-Cacan S., Davignon J.A. G>A substitution at position -75 of the apolipoprotein A-I gene promoter. Evidence against a direct effect on HDL cholesterol levels // *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. – 1995. – V.15. – P.1740 – 1745.

Miller M., Rhyne J., Hamlette S., Birnbaum J., Rodriguez A. Genetics of HDL regulation in humans // *Current Opinion in Lipidology*. – 2003. – V.14. – P.273 – 279.

Mishiro T., Ishihara K., Hino S., Tsutsumi S., Aburatani H., Shirahige K., Kinoshita Y., Nakao M. Architectural roles of multiple chromatin insulators at the human apolipoprotein gene cluster // *EMBO Journal*. – 2009. – V.28. – P.1234 – 1245.

Miyazaki O, Ogihara J, Fukamachi I, Kasumi T. Evidence for the presence of lipid-free monomolecular apolipoprotein A-1 in plasma // *The Journal of Lipid Research*. – 2014. – V.55(2). – P.214-25.

Moore R.E., Navab M., Millar J.S., Zimetti F., Hama S., Rothblat G.H., Rader D.J. Increased Atherosclerosis in Mice Lacking Apolipoprotein A-I Attributable to Both Impaired Reverse Cholesterol Transport and Increased Inflammation // *Circulation Research*. – 2005. – V.97. – P.763 – 771.

Moore K.J., Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis // *Cell*. 2011. – V.145(3). – P.341–55

Moradian A.D., Haas M.J., Wong N.C.W. Transcriptional Control of Apolipoprotein A-I Gene Expression in Diabetes // *Diabetes*. – 2004. – V.53. – P.513 – 520.

Morcillo S., Cardona F., Rojo-Martinez G., Esteva I., Ruiz-de-Adana M.S., Tinahones F., Gomez-Zumaquero J.M., Soriguer F. Association between MspI polymorphism of the APO AI gene and type 2 diabetes mellitus // *Diabetic Medicine*. – 2005. – V.22. – P.782 – 788.

Münch G., Bültmann A., Li Z., Holthoff H.P., Ullrich J., Wagner S., Ungerer M. Overexpression of ABCG1 protein attenuates arteriosclerosis and endothelial dysfunction in atherosclerotic rabbits // *Heart International*. – 2012. – V.7. – e12.

Munday A.D., López J.A. Posttranslational Protein Palmitoylation Promoting Platelet Purpose // *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. – 2007. – V.27. – P.1496 – 1499.

Murthy S., Born E., Mathur S.N., Field F.J. LXR/RXR activation enhances basolateral efflux of cholesterol in CaCo-2 cells // *The Journal of Lipid Research*. – 2002. – V.43. – P.1054 – 1064.

Nagae G., Isagawa T., Shiraki N., Fujita T., Yamamoto S., Tsutsumi S., Nonaka A., Yoshida S., Matsusaka K., Midorikawa Y., Ishikawa S., Soejima H., Fukayama M., Suemori H., Nakatsuji N., Kume S., Aburatani H. Tissue-specific demethylation in CpG-poor promoters during cellular differentiation // *Human Molecular Genetics*. – 2011. – V.20(14). – P.2710 – 2721.

Nakanishi S., Vikstedt R., Söderlund S., Lee-Rueckert M., Hiukka A., Ehnholm C., Muilu M., Metso J., Naukkarinen J., Palotie L., Kovanen P. T., Jauhiainen M., Taskinen M.R. Serum, but not monocyte macrophage foam cells derived from low HDL-C subjects, displays reduced cholesterol efflux capacity // *The Journal of Lipid Research*. – 2009. – V.50. – P.183–192.

Navab M. Anantharamaiah G.M., Reddy S.T., Van Lenten B.J., Fogelman A.M. HDL as a biomarker, potential therapeutic target, and therapy // *Diabetes*. – 2009. – V.58. – P.2711–2717.

Olivier M., Tanck M.W., Out R. et al. Human ATP-binding cassette G1 controls macrophage lipoprotein lipase bioavailability and promotes foam cell formation // *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. – 2012. – V.32. – P.2223-2231.

Oram J.F., Vaughan A.M. ATP-Binding Cassette Cholesterol Transporters and Cardiovascular Disease // *Circulation Research*. – 2006. – V.99. – P.1031–1043.

Ordovas J.M., Corella D., Cupples L.A., Demissie S., Kelleher A., Coltell O., Wilson P.W.F., Schaefer E.J., Tucker K. Polyunsaturated fatty acids modulate the effects of the APOA1 G-A polymorphism on HDL-cholesterol concentrations in a sex-specific manner: the Framingham Study // *American Journal of Clinical Nutrition*. – 2002. – V.75. – P.38 – 46.

Ordovas J. M., Schaefer E., Salem D., Ward R., Glueck C., Vergani C., Wilson P., Karathanasis S. Apolipoprotein A-I gene polymorphism associated with premature coronary artery disease and familial hypoalphalipoproteinemia // *New England Journal of Medicine*. – 1986. – V.314. – P.671 – 677.

Out R., Hoekstra M., Hildebrand R.B., Kruit J.K., Meurs I., Li Z., Kuipers F., Van Berkel T.J., Van Eck M. Macrophage ABCG1 deletion disrupts lipid homeostasis in alveolar macrophages and moderately influences atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice // *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. – 2006. – V.26. – P.2295 – 2300.

Out R., Hoekstra M., Meurs I., de Vos P., Kuiper J., Van Eck M., Van Berkel T.J.C. Total Body ABCG1 Expression Protects Against Early Atherosclerotic Lesion Development in Mice // *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. – 2007. – V.27. – P.594 – 599.

Out R., Hoekstra M., Habets K., Meurs I., de Waard V., Hildebrand R.B., Wang Y., Chimini G., Kuiper J., Van Berkel T.J.C., Van Eck M. Combined Deletion of

Macrophage ABCA1 and ABCG1 Leads to Massive Lipid Accumulation in Tissue Macrophages and Distinct Atherosclerosis at Relatively Low Plasma Cholesterol Levels // *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. – 2008. – V.28. – P.258 – 264.

Padmaja N., Ravindra Kumar M., Adithan C. Association of polymorphisms in apolipoprotein A1 and apolipoprotein B genes with lipid profile in Tamilian population // *Indian Heart Journal*. – 2009. – V.61. – P.51 – 54.

Pagani F., Sidoli A., Giudici G.A., Baenghi L., Vergani C., Barralle F.E. Human apolipoprotein A-I gene promoter polymorphism: association with hyperalphalipoproteinemia // *The Journal of Lipid Research*. – 1990. – V.31. – P.1371 – 1377.

Palgunachari M.N., Mishra V.K., Lund-Katz S., Phillips M.C., Adeyeye S.O., Alluri S., Anantharamaiah G.M., Segrest J.P. Only the two end helices of eight tandem amphipathic helical domains of human apo A-I have significant lipid affinity // *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. – 1996. – V.16. – P.328–338.

Park Y., Pham T.X., Lee J. Lipopolysaccharide represses the expression of ATP-binding cassette transporter G1 and scavenger receptor class B, type I in murine macrophages // *Inflammation Research*. – 2012. – V.61(5). – P.465–472.

Porsch-Ozcurumez M., Langmann T., Heimerl S., Borsukova H., Kaminski W.E., Drobnik W., Honer C., Schumacher C., Schmitz G. The zinc finger protein 202 (ZNF202) is a transcriptional repressor of ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) and ABCG1 gene expression and a modulator of cellular lipid efflux // *Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – V.276(15). – P.12427 – 12433.

Pulkkinen A., Viitanen L., Kareinen A. et al. MspI polymorphism at +83 bp in intron 1 of the human apolipoprotein A1 gene is associated with elevated levels of HDL cholesterol and apolipoprotein A1 in nondiabetic subjects but not in type 2 diabetic subjects with coronary heart disease // *Diabetes Care*. – 2000. – Vol.23. – N6. – P.791 – 795.

Ranalletta M., Wang N., Han S., Yvan-Charvet L., Welch C., Tall A.R. Decreased Atherosclerosis in Low-Density Lipoprotein Receptor Knockout Mice Transplanted With *Abcg1* $-/-$ Bone Marrow // *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. – 2006. – V.26 – P.2308 – 2315.

Reguero J.R., Cubero G.I., Batalla A., Alvarez V., Hevia S., Cortina A., Coto E. Apolipoprotein A1 gene polymorphisms and risk of early coronary disease // *Cardiology*. – 1998. – V.90(3). – P.231 – 235.

Rizzo M., Bernies K. Low-density lipoprotein size and cardiovascular risk assessment // *International Journal of Medicine*. – 2006. – V.99. – P.1 – 14.

Roeters van Lennep J.E., Westerveld H.T., van Roeters Lennep H.W.O., et al. Apolipoprotein concentrations during treatment and recurrent coronary artery disease events // *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. – 2000. – V.20. – P.2408 – 2413.

Rosenson R.S., Brewer H.B. Jr., Davidson W.S., Fayad Z.A., Fuster V., Goldstein J., Hellerstein M., Jiang X-C., Phillips M.C., Rader D.J., Remaley A.T., Rothblat G.H., Tall A.R., Yvan-Charvet L. Cholesterol Efflux and Atheroprotection Advancing the Concept of Reverse Cholesterol Transport // *Circulation*. – 2012. – V.125. – P.1905 – 1919.

Ruano G., Seip R.L., Windemuth A., Zöllner S., Tsongalis G.J., Ordovas J., Otvos J., Bilbie C., Miles M., Zoeller R., Visich P., Gordon P., Angelopoulos T.J., Pescatello L., Moyna N., Thompson P.D. . Apolipoprotein A1 genotype affects the change in high density lipoprotein cholesterol subfractions with exercise training // *Atherosclerosis*. – 2006. – V.185(1). – P.65 – 69.

Sabol S.L. Brewer H.B., Santamarina-Fojo S. The human ABCG1 gene: identification of LXR response elements that modulate expression in macrophages and liver // *The Journal of Lipid Research*. – 2005. – V.46. – P.2151 – 2167.

Saha N., Tay J.S., Low P.S., Basair J., Hong S. Five restriction fragment length polymorphisms of the APOA1-C3 gene and their influence on lipids and apolipoproteins in healthy Chinese // *Human Heredity*. – 1995. – V.45. – P.303–310.

Saito H., Dhanasekaran P., Nguyen D., Holvoet P., Lund-Katz S., Phillips M.C. Domain structure and lipid interaction in human apolipoproteins A-I and E: A general model // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – V.278. – P.23227 – 23232.

Saito H., Lund-Katz S., Phillips M.C. Contributions of domain structure and lipid interaction to the functionality of exchangeable human apolipoproteins // *Progress in Lipid Research*. – 2004. – V.43. – P.350 – 380.

Sankaranarayanan S., Oram J.F., Asztalos B.F., Vaughan A.M., Lund-Katz S., Adorni M.P., Phillips M.C., Rothblat G.H. Effects of acceptor composition and mechanism of ABCG1-mediated cellular free cholesterol efflux // *The Journal of Lipid Research*. – 2009. – V.50. – P.275 – 284.

Sarabi M.M., Einollahi N., Doosti M., Hesami S.S., Dashti N. Study of eicosapentaenoic acid (EPA) effect on the expression of ABCG1 gene in the human monocyte THP-1 cells by real-time PCR // *British Journal of Medical and Health Sciences*. – 2013. – V.1. – N4. – P.58 – 71.

Schaefer J.R., Rader D.J., Ikewaki K., Fairwell T., Zech L.A., Kindt M.R., Davignon J., Gregg R.E., Brewer H.B. In vivo metabolism of apolipoprotein A-I in a patient with homozygous familial hypercholesterolemia // *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. – 1992. – V.12. – P.843–848.

Schmitz G., Langmann T., Heimerl S. Role of ABCG1 and other ABCG family members in lipid metabolism // *The Journal of Lipid Research*. – 2001. – V.42. – P.1513 – 1520.

Schmitz G., Langmann T. Pharmacogenomics of cholesterol-lowering therapy // *Vascular Pharmacology*. – 2006. – V.44. – P.75 – 89.

Schou J., Jensen G., Frikke-Schmidt R. et al. Genetic variation in ABCG1 and risk of myocardial infarction and ischemic heart disease // *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. – 2012. – V.32. – P.506 – 515.

Segrest J.P., Jones M.K., De Loof H., Brouillette C.G., Venkatachalapathi Y.V., Anantharamaiah G.M. The amphipathic helix in the exchangeable

apolipoproteins: a review of secondary structure and function // *The Journal of Lipid Research*. – 1992. – V.33. – P.141 – 166.

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. Gene expression phenotypes of atherosclerosis // *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. – 2004. – V.24. – P.1922–1927.

Seo J.M., Lee J.Y., Ji G.E., You J.C. Down-regulation of ATP-binding cassette transporter G1 expression by unmethylated CpG oligodeoxynucleotides in RAW 264.7 macrophages // *Experimental and Molecular Medicine*. – 2011. – V.43(9). – P.510 – 516.

Seres L., Cserepes J., Elkind N.B., Töröcsik D., Sarkadi L.N.B., Homolya L. Functional ABCG1 expression induces apoptosis in macrophages and other cell types // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2008. – V.1778. – P.2378 – 2387.

Shanker J., Perumal G., Rao V.S. et al. Genetic studies on the APOA1-C3-A5 gene cluster in Asian Indians with premature coronary artery disease // *Lipids in Health and Disease*. – 2008. – V.7. – P.33 – 46.

Shemer R., Kafri T., O'Connell A., Eisenberg S., Breslow J.L., Razin A. Methylation changes in the apolipoprotein A1 gene during embryonic development of the mouse // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1991. – V.88. – P.11300 – 11304.

Shioji K., Mannami T., Kokubo Y., Goto Y., Nonogi H., Iwai N. An association analysis between ApoA1 polymorphisms and the high-density lipoprotein (HDL) cholesterol level and myocardial infarction (MI) in Japanese // *Journal of Human Genetics*. – 2004. – V.49(8). – P.433 – 439.

Sigurdsson G. Jr., Gudnason V., Sigurdsson G., Humphries S.E. Interaction between a polymorphism of the apo A-I promoter region and smoking determines plasma levels of HDL and apo A-I // *Journal of Arteriosclerosis and Thrombosis*. – 1992. – V.12. – P.1017 – 1022.

Sinnaeve P.R., Donahue M.P., Grass P., Seo D., Vonderscher J.V., Chibout S.D., Kraus W.E., Sketch M., Nelson C., Ginsburg G.S., Goldschmidt-Clermont P.J., Granger C.B. Gene expression patterns in peripheral blood correlate with the extent of coronary artery disease // PLoS ONE. – 2009. – V.4(9). – e7037.

Sivapalaratnam S., Basart H., Watkins N.A., Maiwald S., Rendon A., Krishnan U., Sondermeijer B.M., Creemers E.E., Pinto-Sietsma S.J., Hovingh K., Ouwehand W.H., Kastelein J.J., Goodall A.H., Trip M.D. Monocyte gene expression signature of patients with early onset coronary artery disease // PLoS ONE. – 2012. – V.7. – e32166.

Sivapalaratnam S., Motazacker M.M., Maiwald S., Hoving G.K., Kastelein J.J.P., Levi M., Trip M.D., Dallinga-Thie G.M. Genome-Wide Association Studies in Atherosclerosis // Current Atherosclerosis Reports. – 2011. – V.13. – P.225 – 232.

Smith J.D., Brinton E.A., Breslow J.L. Polymorphism in the human apolipoprotein A-1 gene promoter region // The Journal of Clinical Investigation. – 1992. – V.89. – P.1976 – 1800.

Souverein O.W., Jukema J.W., Boekholdt S.M., Zwinderman A.H., Tanck M.W.T. Polymorphisms in APOA1 and LPL genes are statistically independently associated with fasting TG in men with CAD // European Journal of Human Genetics. – 2005. – V.13. – P.445 – 451.

Soxi-Thomas M., Prack M.M., Dashti N., Johnson F., Rudel L.L., Williams D.L.. Differential effects of dietary fat on the tissue-specific expression of the apolipoprotein A-I gene: relationship to plasma concentration of high-density lipoproteins // The Journal of Lipid Research. – 1989. – V.30. – P.1397 – 1403.

Stampfer M.J., Sacks F.M., Salvini S. et al. A prospective study of cholesterol, apolipoproteins, and the risk of myocardial infarction // The New England Journal of Medicine. – 1991. – V.325. – P.373 – 381.

Steinberg D. The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update // The Journal of Lipid Research. – 2009. – V.50. – P.376 – 381.

Sturek J.M., Castle J.D., Trace A.P., Page L.C., Castle A.M., Evans-Molina C., Parks J.S., Mirmira R.G., Hedrick C.C. An intracellular role for ABCG1-mediated cholesterol transport in the regulated secretory pathway of mouse pancreatic β cells // *Journal of Clinical Investigation*. – 2010. – V.120(7). – P.2575 – 2589.

Su Y.R., Blakemore J.L., Zhang Y., Linton M.F., Fazio S. Lentiviral Transduction of ApoAI Into Hematopoietic Progenitor Cells and Macrophages Applications to Cell Therapy of Atherosclerosis // *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. – 2008. – V.28. – P.1439 – 1446.

Talmud P.J., Ye S., Humphries S.E. Polymorphism in the promoter region of the apolipoprotein AI gene associated with differences in apolipoprotein AI levels: the European Atherosclerosis Research Study // *Genetic Epidemiology*. – 1994. – V.11. – N3. – P.265 – 280.

Talmud P.J., Hawe E., Miller G.J., Humphries S.E. Non-fasting apoB and triglyceride levels as a useful predictor of coronary heart disease risk in middle-aged UK men // *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. – 2002. – V.22. – P.1918 – 1923.

Tarling E.J., Bojanic D.D., Tangirala R.K., et al. Impaired development of atherosclerosis in *Abcg1*^{-/-}-*ApoE*^{-/-} mice: identification of specific oxysterols that both accumulate in *Abcg1*^{-/-}-*ApoE*^{-/-} tissues and induce apoptosis // *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. – 2010. – V.30. – P.1174–1180.

Tarling E.J. Expanding roles of ABCG1 and sterol transport // *Current Opinion in Lipidology*. – 2013. – V.24 – P.138–46.

Tarr P.T., Tarling E.J., Bojanic D.D., et al. Emerging new paradigms for ABCG transporters // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2009. – V.1791(7). – P.584 – 593.

Tanaka A. Postprandial Hyperlipidemia and Atherosclerosis // *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. – 2004. – V.11. – P.322 – 329.

Terasaka N., Wang N., Yvan-Charvet L., Tall A.R. High-density lipoprotein protects macrophages from oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis by

promoting efflux of 7-ketocholesterol via ABCG1 // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 2007. – V.104. – P.15093 – 15098.

Terasaka N., Yu S., Yvan-Charvet L., Wang N., Mzhavia N., Langlois R., Pagler T., Welch C.L., Goldberg I.J., Tall A.R. ABCG1 and HDL protect against endothelial dysfunction in mice fed a high-cholesterol diet // *Journal of Clinical Investigation*. – 2008. – V.118. – P.3701–3713.

Teslovich T.M., Musunuru K., Smith A.V., Edmondson A.C., Stylianou I.M., Koseki M., Pirruccello J.P., Ripatti S., Chasman D.I., Willer C.J., Johansen C.T., et al. Biological, Clinical, and Population Relevance of 95 Loci for Blood // *Lipids Nature*. – 2010. – V.466(7307). – P.707 – 713.

Tian L., FuM. The relationship between high density lipoprotein subclass profile and plasma lipids concentrations // *Lipids in Health and Disease*. – 2010 – V.9. – P.118

Toptas B., Görmüş U., Ergen A., Gürkan H., Keleşoğlu F., Darendeliler F., Bas F., Dalan A.B., Izbirak G., Isbir T. Comparison of lipid profiles with APOA1 MspI polymorphism in obese children with hyperlipidemia // *In Vivo*. – 2011. – V.25(3). – P.425 – 430.

Tricerri M.A., Behling Agree A.K., Sanchez S.A., Jonas A. Characterization of apolipoprotein A-I structure using a cysteine-specific fluorescence probe // *Biochemistry*. – 2000. – V.39. – P.14682 – 14691.

Tushuizen M.E., Diamant M., Heine R.J. Postprandial dysmetabolism and cardiovascular disease in type 2 diabetes // *Postgraduate Medical Journal*. – 2005. – V.81(951). – P.1 – 6.

Uehara Y., Miura S., von Eckardstein A., Abe S., Fujii A., Matsuo Y., Rust S., Lorkowski S., Assmann G., Yamada T., Saku R. Unsaturated fatty acids suppress the expression of the ATP-binding cassette transporter G1 (ABCG1) and ABCA1 genes via an LXR/RXR responsive element // *Atherosclerosis*. – 2007. – V.191. – P.11 – 21.

Vedhachalam C., Duong P.T., Nickel M., Nguyen D., Dhanasekaran P., Saito H., et al. Mechanism of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular lipid

efflux to apolipoprotein A-I and formation of high density lipoprotein particles // *Journal of Biological Chemistry*. – 2007. – V.282. – P.25123 – 25130.

Venkateswaran A., Repa J.J., Lobaccaro J-M.A., Bronson A., Mangelsdorf D.J., Edwards P.A. Human White/Murine ABC8 mRNA Levels Are Highly Induced in Lipid-loaded Macrophages. A transcriptional role for specific oxysterols // *Journal of Biological Chemistry*. – 2000. – V.275. – P.14700 – 14707.

Waldo S.W., Li Y., Buono C., Zhao B., Billings E.M., Chang J., Kruth H.S. Heterogeneity of Human Macrophages in Culture and in Atherosclerotic Plaques // *American Journal of Pathology*. – 2008. – V.172. – P.1112 – 1126.

Walldius, Jungner I., Holme I., et al. High apolipoprotein B, low apolipoprotein A-I, and improvement in the prediction of fatal myocardial infarction (AMORIS study): a prospective study // *Lancet*. – 2001. – V.358. – P.2026–2033.

Wang N, Lan D., Chen W., Matsuura F., Tall A.R. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 2004. – V.101. – N26. – P.9774 – 9779.

Wang N, Ranalletta M., Matsuura F., Peng F., Tall A.R. LXR-Induced redistribution of ABCG1 to Plasma Membrane in Macrophages Enhances Cholesterol Mass Efflux to HDL // *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. – 2006. – V.26. – P.1310 – 1316.

Wang W., Song W., Wang Y., Chen L., Yan X. HMG-CoA reductase inhibitors, simvastatin and atorvastatin, downregulate ABCG1-mediated cholesterol efflux in human macrophages // *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. – 2013. – V.62. – P.90 – 98.

Wang X.L., Badenhop R., Humphrey K.E., Wilcken D.E. C to T and/or G to A transitions are responsible for loss of a MspI restriction site at the 5'-end of the human apolipoprotein AI gene // *Human Genetics*. – 1995. – V.95. – N4. – P.473 – 474.

Wang X.L., Liu S-X, McCredie R.M., and Wilcken D.E.L. Polymorphisms at the 5'-end of the apolipoprotein AI gene and severity of coronary artery disease // *Journal of Clinical Investigation*. – 1996. – V.98. – P.372 – 377.

Wang X.L., Badenhop R., Humphrey K.E., Wilcken D.E. New MspI polymorphism at +83 bp of the human apolipoprotein AI gene: association with increased circulating high density lipoprotein cholesterol levels // *Genetic Epidemiology*. – 1996. – V.13. – P.1 – 10.

Wang X.L., Badenhop R.B., Sim A.S., Wilcken D.E. The effect on transcription efficiency of the apolipoprotein AI gene of DNA variants at the 5' untranslated region // *International Journal of Clinical and Laboratory Research*. – 1998. – V.28. – N4. – P.235 – 241.

Wang X., Li X., Zhang Y-B., Zhang F., Sun L., Lin J., Wang D-M., Wang L-Y. Genome-Wide Linkage Scan of a Pedigree with Familial Hypercholesterolemia Suggests Susceptibility Loci on Chromosomes // *PLoS ONE*. – 2011. – V.6(10). – e24838.

Weisgraber K.H., Rall S.C. Jr., Bersot T.P., Mahley R.W., Franceschini G., Sirtori C.R. Apolipoprotein A-I Milano // *Journal of Biological Chemistry*. – 1983. – V.258. – P.2508 – 2513.

Westerterp M., Koetsveld J., Yu S., Han S., Li R., Goldberg I.J., Welch C.L., Tall A.R. Increased atherosclerosis in mice with vascular ABCG1 deficiency // *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. – 2010. V.30. – P.2103–2105.

Westerterp M., Murphy A.J., Wang M., Pagler T.A., Vengrenyuk Y., Kappus M.S., et al. Deficiency of ATP-Binding Cassette Transporters A1 and G1 in Macrophages Increases Inflammation and Accelerates Atherosclerosis in Mice // *Circulation Research*. – 2013. – V.112(11). – 1456–1465.

Whetzel A.M., Sturek J.M., Nagelin M.H., Bolick D.T., Gebre A.K., Parks J.S., Bruce A.C., Skafien M.D., Hedrick C.C. ABCG1 deficiency in mice promotes endothelial activation and monocyte-endothelial interactions // *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. – 2010. – V.30(4). – P.809 – 817.

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

Wong J., Quinn C.M., Brown A.J. Statins Inhibit Synthesis of an Oxysterol Ligand for the Liver X Receptor in Human Macrophages With Consequences for Cholesterol Flux // *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. – 2004. – V.24. – P.2365 – 2371.

Wu J.H., Kao J.T., Wen M.S., Lo S.K. DNA polymorphisms at the apolipoprotein A1-CIII loci in Taiwanese: correlation of plasma APOCIII with triglyceride level and body mass index // *Journal of the Formosan Medical Association*. – 2000. – V.99. – P.367 – 374.

Xu C.F., Talmud P., Schuster H., Houlston R., Miller G., Humphries S. Association between genetic variation at the APO A1-CIII-AIV gene cluster and familial combined hyperlipidaemia // *Clinical Genetics*. – 1994. – V.46. – P.385 – 397.

Xu M., Zhou H., Gu Q., Li C. The expression of ATP-binding cassette transporters in hypertensive patients // *Hypertension Research*. – 2009. V.32. –P.455–461.

Xu Y., Wang W., Zhang L. et al. A polymorphism in the ABCG1 promoter is functionally associated with coronary artery disease in a Chinese Han population // *Atherosclerosis*. – 2011. – V.219. – P.648 – 654.

Xue J. Increased ABCG1 expression protects against endothelial injury induced by TNF α // *Heart*. – 2012. – V.98. – E37.

Xue J., Wang C., Zhu C., Li Y. ATP-binding cassette transporter G1 protects against endothelial dysfunction induced by high glucose // *Diabetes Research and Clinical Practice*. – 2013. – V.101(1). – P.72-80.

Yamakawa-Kobayashi K., Yanagi H., Fukayama H., Hirano C., Shimakura Y., Yamamoto N., Arinami T., Tsuchiya S., Hamaguchi H. Frequent occurrence of

hypoalphalipoproteinemia due to mutant apolipoprotein A-I gene in the population: a population-based survey // *Human Molecular Genetics*. – 1999. – V.8. – P.331 – 336.

Yamamoto M., Morita SY., Kumon M., Kawabe M., Nishitsuji K., Saito H., Vertut-Doi A., Nakano M., Handa T. Effects of plasma apolipoproteins on lipoprotein lipase-mediated lipolysis of small and large lipid emulsions // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2003. – V.1632. – P.31 – 39.

Yancey P.G., Bortnick A.E., Kellner-Weibel G., de la Llera-Moya M., Phillips M.C., Rothblat G.H. Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux // *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. – 2003. – 23. – V.712–719.

Yin R.X., Li Y.Y., Liu W.Y., Lai C.Q. Apolipoprotein AI/C3/A5 haplotypes and serum lipid levels // *Lipids in Health and Disease*. – 2011. – V.10. – P.140

Ying R., Yuan ., Qin Y-F., Tian D., Feng L., Guo Z-G., Sun Y-X., Yinget M-X. L., et al. The combination of L-4F and simvastatin stimulate cholesterol efflux and related proteins expressions to reduce atherosclerotic lesions in apoE knockout mice // *Lipids in Health and Disease*. – 2013. – Vol.12. – P.180.

Yokoyama S. ABCA1 and Biogenesis of HDL // *Journal of Atherosclerosis and Trombosis*. – 2006. – V.13. – P.1–15.

Yvan-Charvet L., Ranalletta M., Wang N., Han S., Terasaka N., Li R., Welch R., Tall A.R. Combined deficiency of ABCA1 and ABCG1 promotes foam cell accumulation and accelerates atherosclerosis in mice // *Journal of Clinical Investigation*. – 2007. – V.117. – P.3900 – 3908.

Yvan-Charvet L., Welch C., Pagler T.A., Ranalletta M., Lamkanfi M., Han S., Ishibashi M., Li R., Wang N., Tall A.R. Increased Inflammatory Gene Expression in ABC Transporter–Deficient Macrophages Free Cholesterol Accumulation, Increased Signaling via Toll-Like Receptors, and Neutrophil Infiltration of Atherosclerotic Lesions // *Circulation*. – 2008. – V.118. – P.1837–1847.

Yvan-Charvet L., Wang N., Tall A.R. Role of HDL, ABCA1, and ABCG1 Transporters in Cholesterol Efflux and immune responses // *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. – 2010. – V.30. – P.139 – 143.

Zannis V.I., Kan H.Y., Kritis A., Zanni E., Kardassis D. Transcriptional regulation of the human apolipoprotein genes // *Frontiers in Biosciences*. – 2001. – V.1. – P.456 – 504.

Zannis V.I., Chroni A. Monty Krieger Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL // *Journal of Molecular Medicine*. – 2006. – V.84. – P.276 – 294.

Zhang Y., Zanutti I., Reilly M.P., Glick J.M., Rothblat G.H., Rader D.J. Overexpression of apolipoprotein A-I promotes reverse transport of cholesterol from macrophages to feces in vivo // *Circulation*. – 2003. – V.108. – P.661 – 663.

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

Zou Y., Hu D., Yang X., et al. Relationships among apolipoprotein A1 gene polymorphisms, lipid levels and coronary atherosclerosis disease // *Chinese Medical Journal*. – 2003. – V.116. – N5. – P.665 – 668.