

Экспрессия генов фиброгенеза в тканях больных атеросклерозом сонных артерий

Гончарова И.А., Слепцов А.А., Королева Ю.А., Назаренко М.С.

Научно-исследовательский институт медицинской генетики,
Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук
634050, г. Томск, ул. Набережная р. Ушайки, д. 10

У больных атеросклерозом сонных артерий проведен полногеномный сравнительный анализ экспрессии между клетками сонных артерий в области атеросклеротических бляшек (САБ, $n=3$) и интактными внутренними грудными артериями (ВГА, $n=2$) с использованием микрочипов HumanHT-12_V4 BeadChip (Illumina, США). Выполнена таргетная оценка экспрессии генов *ADAMDEC1*, *ITGB5*, *TIMP2* и *MMP3* в лейкоцитах крови пациентов с атеросклерозом сонных артерий ($n=21$). Выявлено что в САБ наблюдается существенное увеличение экспрессии генов внеклеточного матрикса (*CD44*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL5A2*, *FMOD*, *HAPLN1*, *ITGA11*, *ITGAV*, *SPARC*, *SPP1*, *SULF1*, *TIMP1*; $|FC| \geq 2$; $pFDR=1,44 \times 10^{-7}$). Гены *ADAMDEC1*, *ITGB5* и *TIMP2* характеризуются увеличением экспрессии в САБ по сравнению с ВГА ($pFDR=0,018$; $pFDR=0,011$; $pFDR=0,006$ соответственно). Гены *ADAMDEC1*, *ITGB5* и *TIMP2* экспрессируются в лейкоцитах периферической крови больных, где наибольший уровень экспрессии показан для гена *TIMP2*. Оценка изменения уровня экспрессии в зависимости от генотипов показала, что у носителей генотипа ТТ rs1007856 гена *ITGB5* наблюдается самый низкий уровень экспрессии гена по сравнению с носителями генотипов СС и СТ ($p=0,034$). Таким образом, атеросклероз сонных артерий связан с увеличением функциональной активности генов фиброгенеза в сосудах и лейкоцитах крови. Полиморфизм rs1007856 является eQTL для гена *ITGB5* в лейкоцитах крови пациентов.

Ключевые слова: атеросклероз сонных артерий, атеросклеротическая бляшка, экспрессия генов, гены фиброгенеза.

Для цитирования: Гончарова И.А., Слепцов А.А., Королева Ю.А., Назаренко М.С. Экспрессия генов фиброгенеза в тканях больных атеросклерозом сонных артерий. *Медицинская генетика* 2023; 22(1): 47-50.

Автор для корреспонденции: Гончарова И.А.; e-mail: irina.goncharova@medgenetics.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках Государственного задания Министерства науки и высшего образования №122020300041-7.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 27.12.2022

The expression of fibrogenesis genes in tissues of patients with carotid atherosclerosis

Goncharova I.A., Sleptcov A.A., Koroleva I.A., Nazarenko M.S.

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences
10, Nab. r. Ushaiki, Tomsk, 634050, Russian Federation

We performed a whole-genome comparative analysis of gene expression in tissues of patients with carotid artery atherosclerosis using HumanHT-12_V4 BeadChip (Illumina, USA) microarray. We compared the expression between cells of the carotid artery in the area of atherosclerotic plaques (CAP, $n=3$) and intact internal mammary arteries (IMA, $n=2$). The targeted expression assessment was performed for *ADAMDEC1*, *ITGB5*, *TIMP2*, and *MMP3* genes in blood leukocytes of patients ($n=21$). A significant increase in expression of extracellular matrix organization genes (*CD44*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL5A2*, *FMOD*, *HAPLN1*, *ITGA11*, *ITGAV*, *SPARC*, *SPP1*, *SULF1*, *TIMP1*; $|FC| \geq 2$; $pFDR=1,44 \times 10^{-7}$) was detected in CAP. The *ADAMDEC1*, *ITGB5*, and *TIMP2* genes, are characterized by increased expression in CAP, compared with IMA ($pFDR=0,018$; $pFDR=0,011$; $pFDR=0,006$, respectively). The *ADAMDEC1*, *ITGB5*, and *TIMP2* genes are also expressed in peripheral blood leukocytes of patients; the highest level of expression is shown for the *TIMP2* gene. Assessment of the expression level changes depending on genotypes showed that carriers of the TT genotype of rs1007856 in the *ITGB5* gene have the lowest level of gene expression compared to carriers of the CC and CT genotypes ($p=0,034$). Thus, carotid atherosclerosis is associated with an increase in the functional activity of fibrogenesis genes in vessels and blood leukocytes. The rs1007856 polymorphism is an eQTL for the *ITGB5* gene in patients' blood leukocytes.

Keywords: carotid atherosclerosis, atherosclerotic plaque, gene expression, fibrogenesis genes.

For citation: Goncharova I.A., Sleptcov A.A., Koroleva I.A., Nazarenko M.S. The expression of fibrogenesis genes in tissues of patients with carotid atherosclerosis. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]*. 2023; 22(1): 47-50 (In Russ.)

Corresponding author: Goncharova I.A.; e-mail: irina.goncharova@medgenetics.ru

Funding. The work was carried out according to the State Order of the Ministry of Science and Higher Education No. 122020300041-7.

Conflict of interest. The authors declare no conflicts of interest.

Accepted 27.12.2022

Введение

Процессы фиброгенеза, протекающие в сосудах, являются неотъемлемой частью прогрессирования атеросклероза, который связан с воспалением, накоплением липидов и, в конечном итоге, развитием сердечно-сосудистых заболеваний. Формирование атеросклеротической бляшки — это сложный многоступенчатый процесс, включающий в себя основные этапы, характерные для фиброгенеза в других органах. Одной из характерных особенностей атеросклероза является то, что интенсивные фибротические процессы, увеличивающие плотность фиброзной покрышки, снижают риск развития фатальных осложнений за счет большей стабильности атеросклеротических бляшек. Формирование и плотность фиброзной покрышки бляшки зависят, в том числе, и от функционирования генов, белковые продукты которых вовлечены в процессы фиброгенеза. В частности, повышение экспрессии металлопротеиназ приводит к истончению фиброзной покрышки, увеличению риска разрыва атеросклеротической бляшки, развитию инсульта или инфаркта миокарда (ИМ) [1].

Таким образом, целью настоящего исследования явилась оценка экспрессии генов фиброгенеза в различных тканях у больных атеросклерозом сонных артерий.

Методы

Проведен полногеномный сравнительный анализ экспрессии между клетками сонных артерий в области атеросклеротических бляшек (САБ, $n=3$) и интактными внутренними грудными артериями (ВГА, $n=2$) с использованием микрочипов HumanHT-12_V4 BeadChip (Illumina, США). Образцы САБ взяты во время проведения каротидной эндатерэктомии, а ВГА взяты при проведении аортокоронарного шунтирования. Образцы сосудов гомогенизировали с помощью TissueLyser (Qiagen, Германия) в Trizol (Thermo Scientific, США). Качество образцов оценивали с помощью системы капиллярного электрофореза Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, США) и спектрофотометрического измерения на приборе NanoDrop 8000 (Thermo Scientific, США). Биоинформатический анализ данных по уровню экспрессии генов осуществлен с помощью пакетов lumi, limma в программной среде R (Bioconductor). Дифференциально экспрессируемые считались гены с кратностью различий уровня экспрессии между группами образцов $|FC| \geq 2$ и $pFDR < 0,05$.

Оценка экспрессии генов *ADAMDEC1*, *TIMP2* и *ITGB5* дополнительно была выполнена в лейкоцитах крови пациентов с атеросклерозом сонных артерий ($n=21$). Для изучения экспрессии генов венозную кровь забирали в пробирки PAXgeneTM (Qiagen, Германия) и хранили в замороженном состоянии (-80°C) до проведения эксперимента. Выделение РНК проводили набором PAXgeneTM Blood RNA Kit (Qiagen). Измерение концентрации и оценку качества РНК выполняли на спектрофотометре NanoDrop 8000 и в 1% агарозном геле по соотношению интенсивности полос, соответствующих 18S и 28S рРНК. Уровень экспрессии генов измеряли методом капельной цифровой ПЦР (ddPCR) на приборе QX200 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad, США) по протоколу фирмы-производителя с праймерами и TaqMan-зондами производства Thermo Scientific (*ADAMDEC1* — Hs00936068_m1; *ITGB5* — Hs00174435_m1; *TIMP2* — Hs00234278_m1). Анализ экспрессии генов проводили путем оценки числа копий гена в микролитре. Во избежание влияния различного уровня белковых и химических примесей между образцами кДНК на конечный результат при оценке экспрессии генов с использованием технологии ddPCR по ранее предложенной рекомендации [2] была проведена нормализация экспрессии изученных генов по отношению к экспрессии гена *GAPDH* (Hs99999905_m1). Сравнение уровней экспрессии генов у носителей различных генотипов проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа. Статистическую значимость различий уровня экспрессии генов оценивали с помощью непараметрического критерия Вилкоксона. Для расчетов использовали пакет программ STATISTICA v. 10.0 (StatSoft Inc.).

Результаты

Выявлено что в САБ наблюдается существенное увеличение экспрессии генов, белковые продукты которых обеспечивают организацию внеклеточного матрикса (GO:0030198; *CD44*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL5A2*, *FMOD*, *HAPLN1*, *ITGA11*, *ITGAV*, *SPARC*, *SPPI1*, *SULF1*, *TIMP1*; $pFDR=1,44 \times 10^{-7}$). Вместе с тем, гены *ADAMDEC1*, *ITGB5* и *TIMP2*, полиморфизм которых ранее показал ассоциации с атеросклерозом коронарных артерий, его осложнениями и коморбидными фенотипами [3, 4], также характеризуются увеличением экспрессии в САБ по сравнению с ВГА ($pFDR=0,018$; $pFDR=0,011$ и $pFDR=0,006$ соответственно).

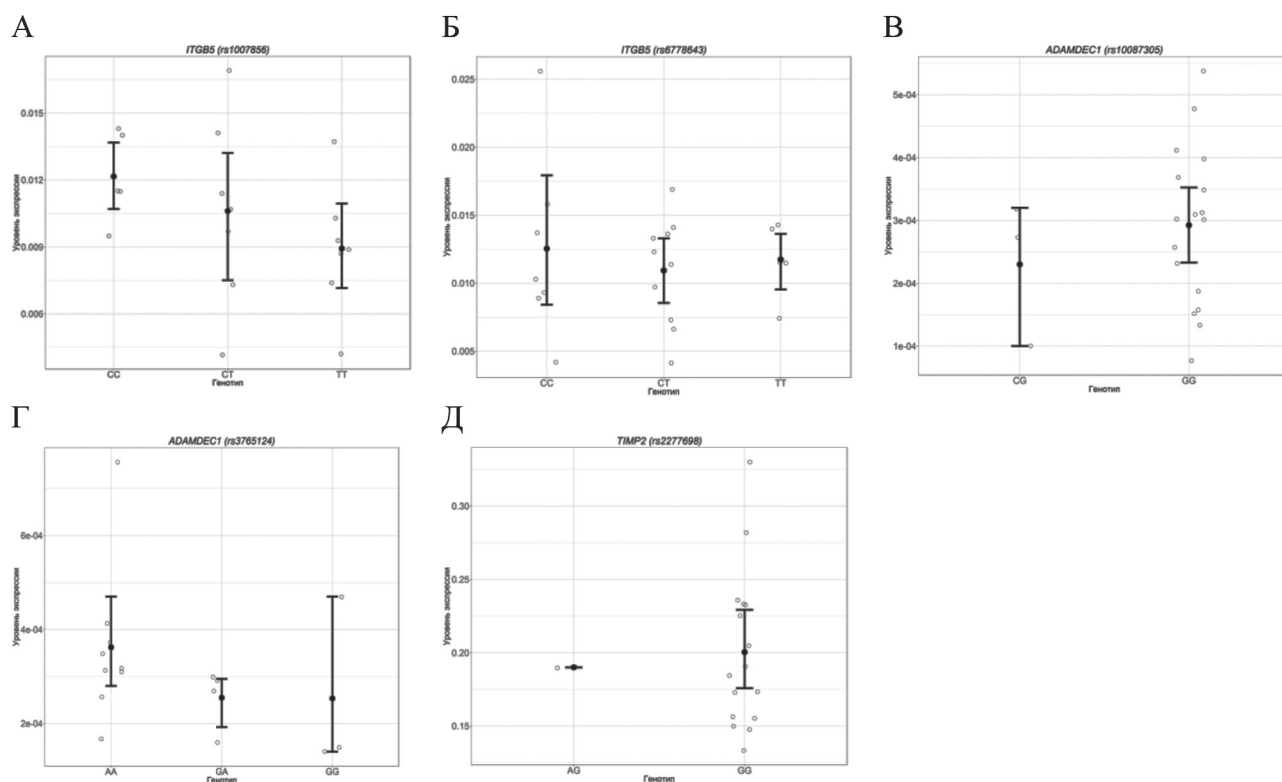
Гены *ADAMDEC1*, *ITGB5* и *TIMP2* экспрессируют и в лейкоцитах периферической крови пациентов

с атеросклерозом сонных артерий. Также как и САБ, в лейкоцитах периферической крови наибольший уровень экспрессии среди изученных генов показан для гена *TIMP2*, полиморфный вариант rs2277698 которого ассоциирован с «синтропией» сердечно-сосудистого континуума и эхокардиографическими параметрами у больных атеросклерозом коронарных артерий [5, 6].

Проведена оценка уровня экспрессии генов *ADAMDEC1*, *ITGB5* и *TIMP2* в лейкоцитах периферической крови больных атеросклерозом сонных артерий в зависимости от генотипов по их полиморфным вариантам *ADAMDEC1* (rs10087305; rs3765124), *ITGB5* (rs6778643, rs1007856) и *TIMP2* (rs2277698; рисунок). Показано, что только для rs1007856 гена *ITGB5* наблюдается изменение уровня экспрессии у носителей разных генотипов ($p=0,034$; рисунок, А). У носителей генотипа AA наблюдается самый низкий уровень экспрессии данного гена по сравнению с носителями

генотипов GA и GG. Вместе с тем, ранее было показано, что генотип TT гена *ITGB5* (rs1007856) предрасполагает к развитию атеросклероза коронарных артерий ($p=0,015$) [4].

Полученные результаты согласуются с данными GTexPortal, где показано, что генотип TT rs1007856 также связан с более низкой экспрессией гена *ITGB5* в тканях коронарной, большеберцовой артерий и аорте, но не в тканях сонной артерии и клетках крови. Кроме этого, данный SNP влияет на изменение экспрессии других генов (*TYSND1*, *ADCY5*, *MBD4*), которые косвенно могут быть связаны с развитием патологических состояний. В частности, ген *ADCY5* активно экспрессируется в поджелудочной железе у больных сахарным диабетом 2 типа, и его полиморфный вариант rs11708067 ассоциирован с повышением уровня глюкозы в сыворотке индивидов натошак [7]. Ген *MBD4* может быть вовлечен в патогенез различных заболеваний,



Изменение экспрессии генов *ITGB5* (rs1007856:C>T, rs6778643:C>T), *ADAMDEC1* (rs10087305:G>C; rs3765124:A>G), *TIMP2* (rs2277698:C>T) в лейкоцитах периферической крови больных атеросклерозом сонных артерий в зависимости от генотипа по указанным полиморфным маркерам.

Changes in the expression of *ITGB5* (rs1007856:C>T, rs6778643:C>T), *ADAMDEC1* (rs10087305:G>C; rs3765124:A>G), *TIMP2* (rs2277698:C>T) genes in peripheral blood leukocytes of patients with carotid atherosclerosis in depending on the genotype for the specified polymorphic markers.

так как его белковый продукт участвует в эксцизионной репарации, катализирует удаление тимина и урацила в несовпадающих парах с гуанином в CpG-метилованных регионах, выполняет функции деметилазы, контролирует экспрессию генов, мутагенез, канцерогенез и играет важную роль в поддержании стабильности генома [8]. При аневризме брюшной аорты зарегистрировано увеличение уровня экспрессии гена *MBD4* в регуляторных Т-клетках периферической крови больных по сравнению со здоровыми донорами [9].

Для остальных полиморфных вариантов не было показано изменения уровня экспрессии генов в зависимости от генотипов: *ADAMDEC1* (rs3765124) $p = 0,179$; *ADAMDEC1* (rs10087305) $p = 0,525$; *TIMP2* (rs2277698) $p = 1$; *ITGB5* (rs6778643) - $p = 0,835$ (рисунки Б, В, Г, Д).

Таким образом, на поздних стадиях патологического процесса формирование атеросклеротических поражений сонных артерий связано с увеличением функциональной активности генов, белковые продукты которых принимают участие в процессах фиброгенеза (*CD44*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL5A2*, *FMOD*, *HAPLN1*, *ITGA11*, *ITGAV*, *SPARC*, *SPP1*, *SULF1*, *TIMP1*, *ADAMDEC1*, *ITGB5* и *TIMP2*). Полиморфизм rs1007856, расположенный в интроне 1 гена *ITGB5*, является eQTL в лейкоцитах крови пациентов с атеросклерозом сонных артерий.

Литература

1. Palm F., Pussinen P.J., Safer A. et al. Serum matrix metalloproteinase-8, tissue inhibitor of metalloproteinase and myeloperoxidase in ischemic stroke. *Atherosclerosis*. 2018; 271:9-14. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.02.012.
2. Taylor S.C., Laperriere G., Germain H. Droplet Digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: from variable nonsense to publication quality data. *Sci Rep*. 2017;7(1):2409. doi: 10.1038/s41598-017-02217-x.
3. Гончарова И.А., Назаренко М.С., Бабушкина Н.П., и др. Генетическая предрасположенность к инфаркту миокарда в разных возрастных группах. *Молекулярная биология*. 2020;54(2):224-232. doi: 10.31857/S0026898420020044.
4. Гончарова И.А., Печерина Т.Б., Марков А.В., и др. Роль генов фиброгенеза в формировании подверженности к коронарному атеросклерозу. *Кардиология*. 2018;58(8):33-44. <https://doi.org/10.18087/cardio.2018.8.10160>
5. Гончарова И.А., Печерина Т.Б., Марков А.В., и др. Вклад генов фиброгенеза в изменчивость эхокардиографических параметров миокарда у больных ибс в зависимости от тяжести течения заболевания. В сборнике: *Генетика человека и патология. Сборник научных трудов. Выпуск 11. Под редакцией В.А. Степанова*. 2017:77-78.
6. Гончарова И.А., Макеева О.А., Голубенко М.В., и др. Гены фиброгенеза в детерминации предрасположенности к инфаркту миокарда. *Молекулярная биология*. 2016;50(1):94-105. doi: 10.7868/S0026898415060099.
7. Bysani M., Agren R., Davegårdh C. et al. ATAC-seq reveals alterations in open chromatin in Pancreatic Islets from subjects with type 2 diabetes // *Sci Rep*. — 2019. — Vol. 9(1): 7785.
8. Koliadenko V., Wilanowski T. Additional functions of selected proteins involved in DNA repair. *Free Radic. Biol. Med*. 2020;146:1-15. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.10.010.
9. Xia Q., Zhang J., Han Y. et al. Epigenetic regulation of regulatory T cells in patients with abdominal aortic aneurysm. *FEBS Open Bio*. 2019;9(6):1137-1143.

References

1. Palm F., Pussinen P.J., Safer A. et al. Serum matrix metalloproteinase-8, tissue inhibitor of metalloproteinase and myeloperoxidase in ischemic stroke. *Atherosclerosis*. 2018; 271:9-14. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.02.012.
2. Taylor S.C., Laperriere G., Germain H. Droplet Digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: from variable nonsense to publication quality data. *Sci Rep*. 2017;7(1):2409. doi: 10.1038/s41598-017-02217-x.
3. Goncharova I.A., Nazarenko M.S., Babushkina N.P., et al. Geneticheskaya predispozitsionnaya k infarktu miokarda v raznykh vozrastnykh gruppakh [Genetic predisposition to an early myocardial infarction]. *Molekulyarnaya biologiya [Molecular biology]*. 2020;54(2):224-232. doi: 10.31857/S0026898420020044. (In Russ.)
4. Goncharova I.A., Pecherina T.B., Markov A.V., et al. Rol' genov fibrogeza v formirovaniy podverzhennosti k koronarnomu aterosklerozu [Fibrogenesis Genes and Susceptibility to Coronary Atherosclerosis]. *Kardiologiya [Cardiology]*. 2018;58(8):33-44. (In Russ.) <https://doi.org/10.18087/cardio.2018.8.10160>
5. Goncharova I.A., Pecherina T.B., Markov A.V., et al. Vklad genov fibrogeza v izmenchivost' ekhokardiograficheskikh parametrov miokarda u bol'nykh ibs v zavisimosti ot tyazhesti techeniya zabolevaniya. V sbornike: *Genetika cheloveka i patologiya. Sbornik nauchnykh trudov. Vypusk 11. Pod redaktsiyey V.A. Stepanova [The contribution of fibrogenesis genes to the variability of echocardiographic parameters of the myocardium in patients with coronary heart disease depending on the severity of the course of the disease. In: Human genetics and pathology. Issue 11. Ed. by V.A. Stepanov]*. 2017:77-78. (In Russ.)
6. Goncharova I.A., Makeeva O.A., Golubenko M.V., et al. Geny fibrogeza v determinatsii predispozitsionnosti k infarktu miokarda [Genes for fibrogenesis in the determination of susceptibility to myocardial infarction]. *Molekulyarnaya biologiya [Molecular biology]*. 2016;50(1):94-105. doi: 10.7868/S0026898415060099. (In Russ.)
7. Bysani M., Agren R., Davegårdh C. et al. ATAC-seq reveals alterations in open chromatin in Pancreatic Islets from subjects with type 2 diabetes // *Sci Rep*. — 2019. — Vol. 9(1): 7785.
8. Koliadenko V., Wilanowski T. Additional functions of selected proteins involved in DNA repair. *Free Radic. Biol. Med*. 2020;146:1-15. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.10.010.
9. Xia Q., Zhang J., Han Y. et al. Epigenetic regulation of regulatory T cells in patients with abdominal aortic aneurysm. *FEBS Open Bio*. 2019;9(6):1137-1143.