# АНАЛИЗ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ В СТАБИЛЬНОЙ И НЕСТАБИЛЬНОЙ АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ БЛЯШКАХ МЕТОДОМ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ РНК: ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Иванощук Д. Е.[1,2,4], Рагино Ю. И.[1], Шахтшнейдер Е. В.[1,4], Михайлова С. В.[1], Фишман В. С.[2,4], Полонская Я. В.[1], Каштанова Е. В.[1], Чернявский А. М.[3], Мурашов И. С.[3], Воевода М. И.[1,2,4]

**Цель.** Выполнить анализ дифференциальной экспрессии генов металлопротеиназ, вовлеченных в процесс стабилизации/дестабилизации атеросклеротической бляшки методом полногеномного секвенирования РНК и определить уровень металлопротеиназ в гомогенатах атеросклеротических бляшек разного типа методом иммуноферментного анализа (ИФА).

**Материал и методы.** Исследование выполнено на образцах атеросклеротических бляшек пациентов 45-65 лет, жителей Западно-Сибирского региона с коронароангиографически документированным коронарным атеросклерозом без острого коронарного синдрома со стабильной стенокардией напряжения II-IV функционального класса. Забор тканей атеросклеротической бляшки проводился в ходе операции при наличии интраоперационных показаний. Выполнено гистологическое исследование бляшек. В гомогенатах фрагментов интима/медии методом ИФА с использованием наборов BCM Diagnostics определены уровни деструктивных биомаркеров MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-9, TIMP-1 на анализаторе Multiscan EX (Thermo Fisher Scientific, USA). Подготовка библиотек для полногеномного секвенирования РНК проведена с использованием набора Illumina's TruSeq RNA Sample Preparation Kit (Illumina, USA). Профиль экспрессии в тканях бляшек определен на приборе HiSeq 1500 (Illumina, USA).

**Результаты.** Отличия в экспрессии между типами бляшек были отмечены для генов матриксных металлопротеиназ *MMP2*, *MMP7*, *MMP8*, *MMP9*, *MMP12*, и *MMP14*. Наблюдалось 8-кратное статистически значимое увеличение уровня экспрессии *MMP9* ($p<0,001$) в нестабильной атеросклеротической бляшке дистрофически-некротического вида. Исследование методом ИФА содержания MMP-7, являющейся активатором про-MMP-9, а также содержания самой MMP-9, выявило их повышение в нестабильных бляшках в сравнении липидными пятнами (в 1,5 и 2,4 раза) и молодыми стабильными бляшками (в 1,4 и 2,1 раза).

**Заключение.** Для гена *MMP9* получены статистически значимые различия уровня экспрессии в стабильной атеросклеротической бляшке фиброзного вида и нестабильной атеросклеротической бляшки дистрофически-некротического вида. При проведении ИФА выявлено, что в липидных пятнах и молодых стабильных атеромах коронарных артерий повышена концентрация MMP-3 и снижена активность тканевого ингибитора металлопротеиназ. В нестабильных бляшках со склонностью к изъязвлению/разрыву повышены концентрации MMP-1, MMP-7, MMP-9.

**Российский кардиологический журнал. 2018;23(8):52–58**
http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2018-8-52-58

**Ключевые слова:** матриксные металлопротеиназы, атеросклеротические бляшки, РНК, полногеномное секвенирование РНК, транскриптом, атеросклероз.

**Конфликт интересов:** работа выполнена при поддержке РФФИ (№ 17-04-02120) и ГЗ 0324-2018-0001.

[1]Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины — филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск; [2]ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск; [3]ФГБУ НМИЦ им. акад. Е. Н. Мешалкина, Новосибирск; [4]ФГАОУ ВО Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия.

Иванощук Д. Е. — н.с. лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, м.н.с. лаборатории молекулярной генетики человека, м.н.с. лаборатории молекулярной эпидемиологии и биоинформатики, ORCID: 0000-0002-0403-545X, ResearcherID: N-2325-2018, Рагино Ю. И. — член-корр. РАН, д.м.н., профессор, зав. лабораторией клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний, ORCID: 0000-0002-4936-8362, Шахтшнейдер Е. В.* — к.м.н., в.н.с. лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, с.н.с. лаборатории молекулярной эпидемиологии и биоинформатики, ORCID: 0000-0001-6108-1025, ResearcherID: E-9453-2015, Михайлова С. В. — к.б.н., н.с. лаборатории молекулярной генетики человека, ORCID: 0000-0002-0897-5473, ResearcherID: N-2399-2018, Фишман В. С. — в.н.с. сектора геномных механизмов онтогенеза, преподаватель кафедры молекулярной биологии, ORCID: 0000-0002-5573-3100, ResearcherID: R-8892-2016, Полонская Я. В. — к.м.н., с.н.с. лаборатории клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний, ORCID: 0000-0002-3538-0280, ResearcherID: H-4397-2016, Каштанова Е. В. — д.б.н., с.н.с. лаборатории клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний, ORCID: 0000-0003-2268-4186, ResearcherID: J-4675-2016, Чернявский А. М. — д.м.н., профессор, руководитель Центра хирургии аорты, коронарных и периферических артерий, ORCID: 0000-0001-9818-8678, ResearcherID: I-9975-2014, Мурашов И. С. — н.с. лаборатории патоморфологии, ORCID: 0000-0002-3712-1258, ResearcherID: N-5706-2017, Воевода М. И. — академик РАН, д.м.н., профессор, руководитель института, зав. лабораторией молекулярной генетики человека, зав. лабораторией молекулярной эпидемиологии и биоинформатики, ORCID: 0000-0001-9425-413X, ResearcherID: N-6713-2015.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):
2117409@mail.ru

ГМК — гладкомышечные клетки, ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, ИФА — иммуноферментный анализ, мРНК — матричная рибонуклеиновая кислота, кДНК — комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота, РНК — рибонуклеиновая кислота, рРНК — рибосомная рибонуклеиновая кислота, тРНК — транспортная рибонуклеиновая кислота, FDR — false discovery rate, средняя доля ложных отклонений гипотез, *MMP1/MMP26* — гены матриксных металлопротеиназ, MMP-1/MMP-26 — матриксные металлопротеиназы, RNA-seq — метод полногеномного секвенирования РНК.

Рукопись получена 28.06.2018
Рецензия получена 03.07.2018
Принята к публикации 11.07.2018

# ANALYSIS OF DIFFERENTIAL EXPRESSION OF MATRIX METALLOPROTEASES IN STABLE AND UNSTABLE ATHEROSCLEROTIC LESIONS BY A METHOD OF FULL GENOME SEQUENCING OF RNA: PILOT STUDY

Ivanoschuk D. E.[1,2,4], Ragino Yu. I.[1], Shakhtshneider E. V.[1,4], Mikhailova S. V.[1], Fishman V. S.[2,4], Polonskaya Ya. V.[1], Kashtanova E. V.[1], Chernyavsky A. M.[3], Murashov I. S.[3], Voevoda M. I.[1,2,4]

**Aim.** To analyze differential expression of metalloproteases genes, involved into the processes of stabilization/destabilization of atherosclerotic plaque, with the method of full genome sequencing of RNA, and to evaluate the level of metalloproteases in homogenates of plaques of various types by immune enzyme assay method (IEA).

**Material and methods.** The study has been conducted on the specimens of atherosclerotic plaques of patients aged 45-65 y.o., inhabitants of Western Siberia with angiographically proven coronary atherosclerosis and no acute coronary syndrome, with stable angina II-IV functional class. Specimens collection from the plaques was done during an operation if there were intraoperational indications. Histology performed. In intima/media homogenates by IEA method, with BCM Diagnostics assays the levels of destructive markers were measured: MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-9, TIMP-1 on the Multiscan EX (Thermo Fisher Scientific, USA). Libraries preparation for full genomic sequencing of RNA was done with Illumina's TruSeq RNA Sample Preparation Kit (Illumina, USA). Expression profile in tissues was done on HiSeq 1500 (Illumina, USA).

**Results.** There are differences in expression of the genes *MMP2*, *MMP7*, *MMP8*, *MMP9*, *MMP12*, и *MMP14* in different types of plaques. There was 8 times higher significant raise in increase of the expression level of *MMP9* (p<0,001) in unstable plaque of dystrophic-necrotic type. Study by IEA of MMP-7 content, which is an activator of pro-MMP-9, as well as the content of MMP-9 itself, showed their increased levels in unstable plaques comparing to fatty streaks (1,5 and 2,4 times) and young stable plaques (1,4 and 2,1 times).

**Conclusion.** For the gene *MMP9* there were significant differences obtained, of expression levels in stable atherosclerotic fibrous plaque and unstable plaque of dystrophic-necrotic type. With the IEA it was found that fatty streaks and young stable atheromas of coronary arteries have an increased concentration of MMP-3 and decreased activity of tissue inhibitor of metalloproteases. In unstable plaques with the tendency to rupture/ulceration there are increased levels of MMP-1, MMP-7, MMP-9.

**Russ J Cardiol. 2018;23(8):52–58**
http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2018-8-52-58

**Key words:** matrix metalloproteases, atherosclerotic plaques, RNA, full genomic sequencing of RNA, transcriptome, atherosclerosis.

**Conflicts of Interest:** supported by RFFR (№ 17-04-02120) and State Assignment 0324-2018-0001.

[1]Scientific Research Institute of Therapy and Prevention Medicine — branch of FRCCG SD RAS, Novosibirsk; [2]Federal Research Center for Cytology and Genetics (FRCCG) of SD RAS, Novosibirsk; [3]E.N. Meshalkin Novosibirsk National Medical Research Institute, Novosibirsk; [4]Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia.

Ivanoschuk D. E. ORCID: 0000-0002-0403-545X, Ragino Yu. I. ORCID: 0000-0002-4936-8362, Shakhtshneider E. V. ORCID: 0000-0001-6108-1025, Mikhailova S. V. ORCID: 0000-0002-0897-5473, Fishman V. S. ORCID: 0000-0002-5573-3100, Polonskaya Ya. V. ORCID: 0000-0002-3538-0280, Kashtanova E. V. ORCID: 0000-0003-2268-4186, Chernyavsky A. M. ORCID: 0000-0001-9818-8678, Murashov I. S. ORCID: 0000-0002-3712-1258, Voevoda M. I. ORCID: 0000-0001-9425-413X.

В клинической картине атеросклероза важно своевременно диагностировать признаки дестабилизации атеросклеротической бляшки, т.к. нестабильные бляшки подвержены разрыву, что может привести к развитию осложнений (инсульт, инфаркт и т.д.). Актуален поиск и выявление молекулярных факторов, отражающих процессы, связанные с дестабилизацией бляшек, особенно для пациентов с бессимптомным течением заболевания. Согласно литературным данным, существует положительная корреляция риска деструкции атеросклеротической бляшки с изменением уровня экспрессии ряда матриксных металлопротеиназ [1, 2].

Матриксные металлопротеиназы (MMP) принадлежат к семейству эндопептидаз, которые содержат цинк-связывающий консервативный мотив на сайте, отвечающем за каталитическую активность белка. Известно, более 20 членов этого семейства, разделенные на 5 основных групп, исходя из их субстратной специфичности. Секретируемые тканевые пептидазы: коллагеназы (MMP-1, MMP-8 и MMP-13), желатиназы (MMP-2 и MMP-9), стромелизины (MMP-3, MMP-10 и MMP-11), мальтризин (MMP-7), макрофагальная металлоэластаза (MMP-12) и мембранно-связанные эндопротеиназы MMP-14, MMP-17, MMP-25 и MMP-26 [3]. Помимо разрушения внеклеточных компонентов, MMP участвуют во многих физиологических процессах, таких как органогенез, ремоделирование тканей, ангиогенез, апоптоз, иммунный ответ и процессы заживления ран. Активность данного семейства протеаз регулируется на транскрипционном уровне, на стадии процессинга белка, а также контролируется рядом тканеспецифичных ингибиторов — tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) — для внеклеточных MMP и α2-макроглобулином для плазма-ассоциированных MMP [4]. Смещение равновесия между образованием активной формы MMP и ингибиторами приводит к развитию патологических состояний, связанных с воспалением, нарушением пролиферации и миграции клеток. Известно четыре ингибитора семейства TIMP (TIMP1-TIMP4), которые селективно подавляют активность матриксных металлопротеиназ через связывание N-терминального конца ингибитора с каталитическим центром металлопротеиназы. TIMP-1 ингибирует MMP-7, MMP-9, MMP-1 и MMP-3, TIMP-2 — эффективный ингибитор для MMP-2, TIMP-3 может ингибировать MMP-2 и MMP-9, в то время как TIMP-4 подавляет активность MMP-14 и MMP-2 [5].

Повышенная экспрессия и протеолитическая активность желатиназы B (MMP-9) обнаружена в гладкомышечных клетках атеросклеротической бляшки, эндотелиальных клетках, макрофагах и микрососуди-

стом эндотелии артерий с атеросклеротическим повреждением. В экспериментах на модельных объектах было показано влияние MMP-9 на миграцию гладкомышечных клеток (ГМК) к месту повреждения стенки сосуда и обусловленное этим утолщение интимы и, как следствие, стабилизацию бляшек. В этом же эксперименте была установлена зависимость активации про-MMP-9 от стромелизина 1 (MMP-3) [2]. Миграция гладкомышечных клеток на участках повреждения сосудов наблюдалась также при повышенной экспрессии MMP-9 и MMP-2 [6]. При миграции и пролиферации гладкомышечных клеток из стенки сосудов в область атеросклеротической бляшки происходит формирование и укрепление фиброзной капсулы бляшки. Поскольку этот процесс происходит при участии желатиназы B (MMP-9), желатиназы A (MMP-2) и стромелизина 1 (MMP-3), было выдвинуто предположение об участии этих пептидаз в стабилизации бляшек [2]. Существующие данные дифференцируют роль MMP-9 на различных стадиях атерогенеза: в зависимости от стадии заболевания, повышенная экспрессия MMP-9 обладает различным эффектом. На ранних стадиях высокий уровень MMP-9 вызывает внешнее ремоделирование бляшки и морфологические признаки дестабилизации, но не коррелирует с частотой осложнений, таких как разрыв бляшки или тромбоз. В случае зрелых бляшек, высокий уровень MMP-9 ассоциирован с повышением частоты внутрибляшечных кровоизлияний, способствуя ее надрыву/разрыву [7].

Повышенный уровень матрилизина 7 (MMP-7) наблюдался в плазме крови у пациентов с атеросклерозом по сравнению со здоровым контролем [8].

Перспективным маркером развития атеросклеротического процесса является коллагеназа-2 (MMP-8) — один из распространённых белков внеклеточного матрикса. Экспрессия гена *MMP-8* показана в гладкомышечных, эндотелиальных клетках и макрофагах атеросклеротической бляшки. MMP-8 эффективнее расщепляет коллаген первого типа по сравнению с другими членами этой группы: MMP-1 и MMP-13. MMP-8 способна активировать MMP-2, MMP-3 и MMP-9 и инактивировать TIMP-1. По сравнению со здоровым сосудом, 8-кратное увеличение активной формы MMP-8 было зафиксировано в нестабильных бляшках и лишь 3-кратное — в фиброзных по сравнению со здоровым сосудом, из чего было выдвинуто предположение, что MMP-8 может играть важную роль в ремоделировании или созревании бляшки [9].

Биомеханическая прочность бляшки зависит от баланса между синтезом коллагена и его деградацией. Накопление коллагена в фиброзной покрышке атеросклеротической бляшки наблюдалось в эксперименте на мышах при селективном ингибировании MMP-13, что способствовало стабилизации бляшки [10]. Исследование пациентов с атеросклерозом разной степени выраженности показало повышенную экспрессию MMP-13 и MMP-1 клетками макрофагов в атероматозных бляшках по сравнению со зрелыми бляшками. Было выдвинуто предположение, что атероматозные бляшки (не фиброзные) могут быть больше подвержены разрыву из-за повышенного коллагенолиза [2].

Мембранная эндопептидаза MMP-14 известна своей способностью секретироваться в активной форме, участвовать в деградации компонентов внеклеточного матрикса при деструкции бляшки и специфической активации прожелатиназы A (MMP-2) и коллагеназы-3 (MMP-13). Высокий уровень экспрессии белка MMP-14 наблюдался в гладкомышечных клетках и пенистых клетках атеросклеротической бляшки [2, 11].

Еще одним потенциальным участником, вовлеченным в процесс дестабилизации бляшки, может являться макрофагальная металлоэластаза (MMP-12). Основной ее функцией является гидролиз эластина и компонентов внеклеточного матрикса. Недавние исследования среди лиц с высоким риском сердечно-сосудистых заболеваний показали ассоциацию повышенной плазменной концентрации MMP-12 с цереброваскулярными и сердечно-сосудистыми осложнениями. Было установлено, что MMP-12 вовлечена в развитие атеросклеротического повреждения крупных сосудов через повышение деградации эластина и инвазию макрофагов [12].

Метод полногеномного секвенирования РНК (RNA-seq) позволяет идентифицировать полный набор транскрипционных единиц (малые РНК, мРНК, рРНК, тРНК, некодирующие РНК) и продукты их альтернативного сплайсинга (тканеспецифические транскрипты), которые экспрессируются при определенных условиях в разных клетках или тканях. Данный метод позволяет выявлять паттерны совместно экспрессирующихся генов и выделять функционально связанные единицы. В представленной работе мы использовали метод RNA-seq для проведения пилотного исследования по изучению транскриптомов двух типов бляшек — стабильной атеросклеротической бляшки фиброзного вида и нестабильной атеросклеротической бляшки дистрофически-некротического вида.

Цель исследования — выполнить анализ дифференциальной экспрессии генов металлопротеиназ, вовлеченных в процесс стабилизации/дестабилизации атеросклеротической бляшки, методом полногеномного секвенирования РНК и определить уровень металлопротеиназ в гомогенатах атеросклеротических бляшек разного типа методом ИФА.

## Материал и методы

Сбор образцов атеросклеротических бляшек проводился в ФГБУ НМИЦ им. академика Е. Н. Мешал-

кина Министерства Здравоохранения РФ. Исследование одобрено Этическим комитетом НИИТПМ — филиала ИЦиГ СО РАН. В исследование были включены мужчины (возраст 45-65 лет), жители Западно-Сибирского региона с диагнозом коронарный атеросклероз без острого коронарного синдрома со стабильной стенокардией напряжения II-IV функционального класса (ФК), подтвержденный данными коронароангиографии. Для каждого пациента заполнялся протокол исследования, проводился забор крови и тканей атеросклеротической бляшки в ходе операции при наличии интраоперационных показаний. У лиц, включенных в исследование, эндартериоэктомия выполнена на коронарных артериях, от каждого пациента получены образцы атеросклеротических бляшек. Каждый фрагмент полученного материала атеросклеротических бляшек симметрично разделен на 3 части для гистологического, биохимического и молекулярно-генетического исследований.

Исследование соответствует стандартам надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice) и принципами Хельсинской декларации. Все пациенты были ознакомлены с целями и основными положениями исследования, дали информированное согласие на участие в исследовании.

Гистологическое исследование всех образцов выполнено в патоморфологической лаборатории ФГБУ НМИЦ им. акад. Е. Н. Мешалкина Минздрава России (рук. лаборатории д.м.н. профессор Волков А. М.). После макроскопического описания образцов, включающего описание степени распространенности бляшки, уровня стенозирования просвета артерии, наличия кровоизлияния в структуры бляшки, участков обызвествления, тромбов и окрашивания образцов гематоксилин-эозином и Ван Гизон, проводился гистологический анализ фрагментов интимы/медии коронарных артерий на бинокулярном микроскопе с цифровым фотовыходом Axiostar Plus (Carl Zeiss, Германия). В ходе гистологического анализа определяли разные стадии формирования бляшки, с подробным описанием состояния покрышки бляшки, её эндотелиальной поверхности, ядра бляшки, периферии бляшки/очага, клеточно-элементного состава всех компонентов атеросклеротического очага.

Из 144 образцов в 15 случаях определена стадия липидных пятен/полосок, в 58 случаях нестабильные бляшки, в 71 — стабильные атеросклеротические бляшки (из них атероматозная бляшка стабильная молодая — 24 образца, атероматозная бляшка с фиброзом/кальцинозом стабильная — 47 образцов).

Нестабильная атеросклеротическая бляшка определялась как повреждённая бляшка с толщиной фиброзной покрышки менее 65 мкм, инфильтрированная макрофагами и Т-лимфоцитами (более 25 клеток в поле зрения диаметром 0,3 мм), с крупным липидным ядром (>40%). Был определен тип нестабильных бляшек [13]: 1) липидный тип — фиброатерома с тонкой фиброзной покрышкой; 2) воспалительно-эрозивный тип — бляшка с повышенным содержанием протеогликанов или воспалением, приводящим к эрозии и тромбозу; 3) дистрофически-некротический тип — бляшка с кальцинированным ядром. Из 58 образцов нестабильных бляшек было 12 бляшек липидного типа, 4 бляшки с воспалением/эрозией и 42 бляшки дистрофически-некротического типа.

Фрагменты образцов замораживали в жидком азоте и гомогенизировали в растворе фосфатно-солевого буфера (pH 7,4) для проведения биохимических исследований.

В гомогенатах фрагментов интима/медии методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием наборов BCM Diagnostics определяли уровни деструктивных биомаркеров MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-9, TIMP-1 на анализаторе Multiscan EX (Thermo Fisher Scientific, США).

После проведения гистологического исследования и определения типов бляшек было выполнено полногеномное секвенирование РНК для двух образцов атеросклеротических бляшек в двух повторах: стабильной атеросклеротической бляшки фиброзного вида и нестабильной атеросклеротической бляшки дистрофически-некротического вида. Пациенты для включения в исследование транскриптома были выбраны по следующим критериям: оба пациента мужского пола, близкого возраста (61 год и 64 года); диагноз (Ишемическая болезнь сердца. Стенокардия напряжения III функциональный класс. ПИКС. ХСН IIA ст. ФК III NYHA); во всех трех образцах атеросклеротических бляшек, полученных от каждого пациента, тип и вид бляшек был однороден для каждого из пациентов по результатам гистологического исследования.

Для предотвращения деградации РНК, пробы ткани атеросклеротических бляшек помещались в стабилизирующий раствор RNAlater (QIAGEN, Германия) и замораживались для последующей транспортировки. Выделение РНК из образцов проводили при помощи набора РеалБест экстракция 100 (АО Вектор Бест, Новосибирск, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Для детекции выделенной РНК выполнялась реакция обратной транскрипции кДНК с последующей постановкой ПЦР на кДНК гена альфа актина. Подтверждение наличия РНК, качество и количество полученных проб тотальной РНК проверялось методом УФ-спектроскопии на приборе “Epoch” (BioTek, США). Перед приготовлением библиотек, примеси геномной ДНК удалялись с использованием набора DNA free kit (Ambion, США). Качество извлеченной РНК конт-

**Таблица 1**

**Дифференциальная экспрессия металлопротеиназ нестабильной атеросклеротической бляшки дистрофически-некротического вида и стабильной атеросклеротической бляшки фиброзного вида**

| Название гена | Продукт гена | Позиция в хромосоме | Идентификационный номер белковой последовательности | Изменение уровня экспрессии (Fold change) Нестабильная vs стабильная бляшки | P значение |
|---|---|---|---|---|---|
| MMP2 | Желатиназа A | chr16:55514444-55540603 | NM_001302509 | 2.095 | <0,000 |
| | | chr16:55515468-55540603 | NM_001127891 | 2.095 | <0,000 |
| | | chr16:55513909-55540603 | NM_001302510 | 2.095 | <0,000 |
| | | chr16:55512741-55540603 | NM_001302508 | 1.963 | <0,000 |
| | | chr16:55513080-55540603 | NM_004530 | 1.963 | <0,000 |
| MMP3 | Стромелизин -1 | chr11:102706527-102714420 | NM_002422 | 0.496 | <0,253 |
| MMP7 | Матрилизин | chr11:102391238-102401484 | NM_002423 | 21.915 | <0,000 |
| MMP8 | Коллагеназа 2 | chr11:102582525-102595685 | NM_002424 | 11.883 | <0,000 |
| MMP9 | Желатиназа B | chr20:44637546-44645200 | NM_004994 | 8.253 | <0,000 |
| MMP12 | Макрофагальная металлоэластаза | chr11:102733459-102745764 | NM_00242 | 8.155 | <0,000 |
| MMP13 | Коллагеназа 3 | chr11:102813720-102826463 | NM_002427 | 2.260 | <0,218 |
| MMP14 | Матриксная металлопротеиназа мембранного типа 1 | chr14:23305741-23316808 | NM_004995 | 0.897 | <0,029 |

ролировалось с помощью системы капиллярного электрофореза Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Tec. Inc., США). Подготовка библиотек для секвенирования проводилась с использованием набора Illumina's TruSeq RNA Sample Preparation Kit (Illumina, США). Количественный анализ библиотек выполнялся на флуориметре Qubit® 2.0 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США), качество библиотек контролировалось с использованием системы капиллярного электрофореза Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Tec. Inc., США). Полногеномный профиль экспрессии в тканях бляшек определялся с помощью высокопроизводительного секвенирования на приборе HiSeq 2000 (Illumina, США).

Анализ данных секвенирования включал картирование данных на геном человека версии GRCh38 с помощью программы BWA 0.7.12, расчет RPKM (reads per kilobase per million mapped reads) для всех генов, присутствующих в аннотации используемой версии генома человека.

Для выявления транскриптов генов со статистически значимыми различиями в экспрессии между типами бляшек, использовали следующие параметры: FDR <0,05, более чем 8-кратные различия (-3<log2 fold_change <+3), экспрессия одного и того же гена в одном из типов бляшек на уровне более 50 RPKM. Сравнительный анализ белковых взаимодействий выполнялся при помощи программы STRING 10.5 (http://string-db.org).

Статистическую обработку результатов проводили в программе SPSS (13.0). Значения в таблицах представлены как M±m, где M — среднее арифметическое значение, m — ошибка среднего. Для оценки формы распределения признаков использовали тест Колмогорова-Смирнова, при p>0,05 распределение считалось нормальным. Достоверность различий между средними значениями оценивали с использованием t-критерия Стьюдента (для признаков с нормальным распределением) или критерия Манна-Уитни (для признаков с не нормальным распределением). Множественное сравнение между группами проводили методом дисперсионного анализа с использованием критерия Bonferroni для нормального распределения и методом Краскела-Уоллиса для ненормального. Различия считались статистически значимыми при p<0,05.

## Результаты

Было проведено транскриптомное профилирование двух типов бляшек — стабильной атеросклеротической бляшки фиброзного вида и нестабильной атеросклеротической бляшки дистрофически-некротического вида — у двух неродственных пациентов, с последующим анализом дифференциально экспрессирующихся генов. Результаты исследования представлены в таблице 1.

Пациент 1 (61 год) — стабильные атеросклеротические бляшки фиброзного вида в трех образцах коронарных сосудов. По результатам гистологического исследования образцы представлены резко стенозирующими просвет сосуда бляшками (70-75%) из плотной соединительной ткани, состоящей из коллагеновых и эластических пучков волокон, с крупным формирующимся кальцификатом. Без клеточной активности. Стадия фиброза и кальциноза.

Пациент 2 (64 года) — нестабильные атеросклеротические бляшки дистрофически-некротического вида в трех образцах коронарных сосудов. По резуль-

**Таблица 2**

**Содержание матриксных металлопротеиназ в атеросклеротических очагах разных стадий развития (M±m)**

| Гомогенаты / Показатели | 1. Липидное пятно/ полоска | 2. Бляшка стабильная молодая | 3. Бляшка стабильная фиброзная | 4. Бляшка нестабильная | * — p<0,05 |
|---|---|---|---|---|---|
| TIMP-1, нг/мг белка | 203,4±20,1 | 92,5±8,8 | 120,1±19,9 | 117,2±11,3 | 1-2,3,4 |
| MMP-1, пг/мг белка | 91,45±27,6 | 104,6±21,4 | 111,33±23,7 | 208,6±41,8 | 4-1,2,3 |
| MMP-3, нг/мг белка | 4,0±0,4 | 4,6±0,5 | 3,2±0,3 | 1,9±0,2 | 2-4 |
| MMP-7, нг/мг белка | 1,53±0,1 | 1,74±0,1 | 1,69±0,1 | 2,31±0,2 | 4-1,2,3 |
| MMP-9, нг/мг белка | 2,6±0,4 | 2,9±0,4 | 3,8±0,4 | 6,2±0,6 | 4-1,2,3 |

татам гистологического исследования образцы представлены резко стенозирующими просвет сосуда бляшками (70-80%), с участками рыхлой и плотной фиброзной ткани с очаговыми некрозами и отложениями солей кальция, содержащими небольшие ядра из аморфных масс и пенистых клеток с умеренной мононуклеарной инфильтрацией. Толстая покрышка представлена плотной фиброзной тканью с разрывами. Интима сосуда умеренно утолщена за счет плотной фиброзной ткани с инфильтрацией пенистыми клетками и плотно соединена с покрышкой бляшки.

Разница в экспрессии между типами бляшек была отмечена в генах матриксных металлопротеиназ: *MMP2, MMP3, MMP7, MMP8, MMP9, MMP12, MMP13* и *MMP14*.

Наблюдалось 8-кратное статистически значимое увеличение уровня экспрессии *MMP9* (p<0,001) в нестабильных атеросклеротических бляшках дистрофически-некротического вида.

Для *MMP1*, экспрессия которой ранее была показана в атеросклеротических бляшках [14], нами не было выявлено достоверных различий в уровне транскрипции между двумя изученными типами бляшек (p=0,565). Анализ транскриптов показал присутствие обеих из известных изоформ гена *MMP1*.

Не было получено статистически значимых различий в изменении уровнях экспрессии генов *MMP3* (p=0,253), *MMP13* (p=0,218).

Уровень экспрессии менее 50 RPKM и менее чем 8-кратные различия получены для генов *MMP2*, *MMP7*, *MMP8*, *MMP12* и *MMP14*. Уровень экспрессии *MMP2*, *MMP7*, *MMP8*, *MMP12* в нестабильной бляшке в 2, 21, 11 и 8 раз, соответственно, выше, чем в стабильной. Для *MMP2* выявлены все пять известных изоформ, различающиеся местом старта транскрипции. Для *MMP14*, напротив, выявлен сниженный уровень экспрессии в нестабильной бляшке по сравнению со стабильной.

Результаты ИФА-анализа изменения активности деструктивных MMP-1, 3, 7, 9 и их тканевого ингибитора TIMP-1 при формировании атеросклеротического очага в зависимости от стадии липидного пятна/полоски до нестабильной бляшки в гомогенатах фрагментов интима/медии для 144 образцов представлены в таблице 2.

Уровень TIMP-1 в стабильных молодых и фиброзных бляшках, и в нестабильных бляшках был ниже, чем в липидных пятнах (в 2,2, 1,7 и 1,7 раза), не достигая при этом уровня статистической значимости. TIMP-1, являясь ингибитором MMP-1, MMP-3, MMP-9 и связываясь с активным каталитическим центром MMP, блокирует их активность, образуя нековалентные комплексы (например, комплекс TIMP-1/MMP-3) [14]. Сниженное содержание TIMP-1 в сформированных атеросклеротических бляшках (и стабильных, и нестабильных) свидетельствует о потенциально повышенной ферментативной активности в них деструктивных MMP.

Исследование содержания MMP-7, которая, кроме собственной активности еще является активатором про-MMP-9, а также содержания самой MMP-9, выявило их повышение в нестабильных бляшках в сравнении с липидными пятнами (в 1,5 и 2,4 раза) и молодыми стабильными бляшками (в 1,4 и 2,1 раза). Таким образом, по мере развития атеросклеротического очага до стадии нестабильной бляшки в нем снижается активность TIMP-1 и повышаются уровни MMP-7 и MMP-9, что отражает наиболее выраженные процессы деструкции соединительнотканного матрикса в нестабильной бляшке, в ее фиброзной покрышке, что приводит к ее истончению, иссечению, надрыву/разрыву.

## Обсуждение

В данном исследовании выявлена повышенная экспрессия гена *MMP9* в нестабильной атеросклеротической бляшке. Высокая концентрация MMP-9 наблюдалась у пациентов с выраженными изменениями структуры бляшек, гистологически доказанным разрывом бляшки, внутрибляшечными кровоизлияниями, спонтанной эмболизацией по сравнению с бляшками у пациентов с менее выраженной симптоматикой атеросклероза [2, 6, 7]. Таким образом, полученные ранее данные изменения концентрации белка MMP-9 в процессе дестабилизации бляшки были нами подтверждены при транскриптомном профилировании на материале атеросклеротических

бляшек. MMP-9 может быть рассмотрена как наиболее перспективный маркер процесса дестабилизации бляшки.

Результаты, полученные для генов *MMP2*, *MMP7*, *MMP8*, *MMP12*, *MMP13* и *MMP14* могут быть обусловлены индивидуальными различиями обследованных пациентов и требуют дальнейшего изучения транскриптов данных генов на расширенной выборке пациентов.

Результаты ИФА позволили выявить особенности, характерные для нестабильной бляшки: повышение уровней деструктивных металлопротеиназ MMP-7 и MMP-9 и снижение уровня их ингибитора TIMP-1. В результате инфильтрации покрышки атеросклеротической бляшки макрофагами и Т-лимфоцитами увеличивается продукция в ней воспалительных цитокинов, ингибирующих пролиферацию ГМК и синтез ими коллагена, а также индуцирующих апоптоз ГМК и протеолитическую активность макрофагов. В результате макрофаги и ГМК начинают секретировать протеолитические MMP, разрушающие коллагены и эластин покрышки бляшки, что приводит к ее истончению/иссечению, изъязвлению, тромбозу и соответствующим клиническим проявлениям острого коронарного синдрома [11, 15].

## Заключение

Для гена *MMP9* получены статистически значимые различия уровня экспрессии в стабильной атеросклеротической бляшке фиброзного вида и нестабильной атеросклеротической бляшки дистрофически-некротического вида.

При проведении иммуноферментного анализа выявлено, что в липидных пятнах и молодых стабильных атеромах коронарных артерий повышена концентрация матриксной металлопротеиназы 3 типа (MMP-3) и снижена активность тканевого ингибитора металлопротеиназ (TIMP-1). В нестабильных бляшках со склонностью к изъязвлению/разрыву повышены концентрации MMP-1, MMP-7, MMP-9.

**Конфликт интересов.** Работа выполнена при поддержке РФФИ (№ 17-04-02120) и ГЗ 0324-2018-0001.

## Литература


1. Roth GA, Johnson C, Abajobir A, Abd-Allah F, et al. Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. J Am Coll Cardiol. 2017 Jul 4;70(1):1-25. doi:10.1016/j.jacc.2017.04.052.
2. Johnson JL. Metalloproteinases in atherosclerosis. European Journal of Pharmacology. 2017;816:93-106. doi:10.1016/j.ejphar.2017.09.007.
3. Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. Seminars in Cancer Biology. 2010;3:161-8. doi:10.1016/j.semcancer.2010.05.002.
4. Löffek S, Schilling O, Franzke C-W. Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. European Respiratory Journal. 2011;38:191-208. doi:10.1183/09031936.00146510.
5. Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. Biochimica et Biophysica Acta. 2010;1803(1):55-71. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.01.003.
6. Newby AC. Metalloproteinase production from macrophages — a perfect storm leading to atherosclerotic plaque rupture and myocardial infarction. Experimental physiology. 2016;1:1327-37. doi:10.1113/EP085567.
7. de Nooijer R, Verkleij CJ, von der Thuesen JH, et al. Lesional overexpression of matrix metalloproteinase-9 promotes intraplaque hemorrhage in advanced lesions, but not at earlier stages of atherogenesis. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2006;26:340-6. doi:10.1161/01.ATV.0000197795.56960.64.
8. Abbas A, Aukrust P, Russell D, et.al. Matrix metalloproteinase 7 is associated with symptomatic lesions and adverse events in patients with carotid atherosclerosis. PLoS One. 2014;9(1):e84935. doi:10.1371/journal.pone.0084935.
9. Lenglet S, Mach F, Montecucco F. Role of matrix metalloproteinase-8 in atherosclerosis. Mediators of Inflammation. 2013;2013:659282. doi:10.1155/2013/659282.
10. Quillard T, Tesmenitsky Y, Croce K, et al. Selective inhibition of matrix metalloproteinase-13 increases collagen content of established mouse atherosclerosis. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2011;31(11):2464-72. doi:10.1161/ATVBAHA.111.231563.
11. Johnson JL, Jenkins NP, Huang WC, et al. Relationship of MMP-14 and TIMP-3 expression with macrophage activation and human atherosclerotic plaque vulnerability. Mediators Inflamm. 2014;2014:276457. doi:10.1155/2014/276457.
12. Mahdessian H, Perisic Matic L, Lengquist M, et al. Integrative studies implicate matrix metalloproteinase-12 as a culprit gene for large-artery atherosclerotic stroke. Journal of Internal Medicine. 2017;282(5):429-44. doi:10.1111/joim.12655.
13. Ragino Yul, Volkov AM, Chernyavskyi AM. Stages of atherosclerotic plaque development and unstable plaque types: pathophysiologic and histologic characteristics. Russ J Cardiol. 2013;18(5):88–95. (In Russ). Рагино Ю. И., Волков А. М., Чернявский А. М. Стадии развития атеросклеротического очага и типы нестабильных бляшек: патофизиологическая и гистологическая характеристика. Российский кардиологический журнал. 2013;18(5):88-95. doi:10.15829/1560-4071-2013-5.
14. Lin J, Kakkar V, Lu X. Impact of matrix metalloproteinases on atherosclerosis. Curr Drug Targets. 2014 Apr;15(4):442-53. doi:10.2174/1389450115666140211115805.
15. Ragino Yul, Chernyavsky AM, Volkov AM, Voevoda MI. Factors and mechanisms of instability of atherosclerotic plaque. Novosibirsk: Science. 2008, 41-49 p. (In Russ). Рагино Ю. И., Чернявский А. М., Волков А. М., Воевода М. И. Факторы и механизмы нестабильности атеросклеротической бляшки. Новосибирск: Наука. 2008, 41-49 с. ISBN 978-5-02-023256-3.