

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
КАРДИОЛОГИИ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Никифоров Никита Геннадьевич

**ИЗУЧЕНИЕ ПРОФИЛЯ АКТИВАЦИИ МОНОЦИТОВ/МАКРОФАГОВ
ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ЛИПОПРОТЕИДАМИ НИЗКОЙ
ПЛОТНОСТИ**

03.01.04 Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук
Собенин Игорь Александрович

Москва

2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1. Понятие атеросклероза, типы поражений	9
1.2. Активация макрофагов при атеросклерозе.....	12
1.3. Метаболизм ЛНП и активация макрофагов	18
1.4. Транскриптомный анализ.....	22
1.5. Влияние факторов транскрипции на фенотип макрофагов	24
1.6. Заключение	27
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	29
2.1. Доноры	29
2.2. Получение плазмы и сыворотки крови	30
2.3. Выделение суммарной фракции ЛНП из плазмы крови	30
2.4. Определение концентрации белка в препаратах ЛНП	31
2.5. Получение ацетилированных ЛНП	31
2.6. Получение препаратов окисленных ЛНП.....	32
2.7. Выделение и культивирование макрофагов человека.....	32
2.8. Определение содержания внутриклеточного холестерина	33
2.9. Определение клеточного белка.....	34
2.10. Фиксация клеток для конфокальной микроскопии	34
2.11. Конфокальная микроскопия.....	35
2.12. Правила забора и подготовки аутопсийного материала	35
2.13. Иммуногистохимическое окрашивание.....	35
2.14. Выделение РНК	36
2.15. Метод ПЦР в реальном времени	37

2.16. Секвенирование РНК	37
2.17. Анализ качества чтений и их предобработка	38
2.18. Картирование чтений на геном <i>H. sapiens</i>	40
2.19. Подсчет числа ридкаунтов	41
2.20. Поиск дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ)	41
2.21. Функциональный анализ ДЭГ	42
2.22. Анализ сайтов связывания транскрипционных факторов	43
2.23. Прогноз образования комплексов сайтов связывания факторов транскрипции	43
2.24. Поиск мастер-регуляторов	44
2.25. Статистическая обработка	44
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	46
3.1. Оценка атерогенных свойств сыворотки крови больных ишемической болезнью сердца	46
3.2. Внутриклеточное распределение липидов при взаимодействии нативных и атерогенных ЛНП с макрофагами человека	48
3.3. Исследование экспрессии TNF и CCL18 в пораженной и непораженной интиме аорты человека	51
3.4. Исследование активации макрофагов при взаимодействии с атерогенными ЛНП	59
3.5. Исследование транскриптома нагруженных холестерином макрофагов: поиск генов, экспрессия которых меняется вследствие накопления холестерина	60
3.6. Исследование транскриптома нагруженных холестерином макрофагов: поиск генов, ответственных за накопление холестерина	66
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	78

4.1. Заключение	84
ВЫВОДЫ	86
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	87
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	88
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА	102
ПРИЛОЖЕНИЕ	105

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы и степень ее разработанность. Атеросклероз является причиной половины всех случаев смерти в мире. Еще в 1913 году академик Н.Н. Аничков предложил инфильтративную теорию атеросклероза, согласно которой ускоренное проникновение липидов из крови в ткань сосудистой стенки индуцирует атерогенез. В последующие годы эта теория подверглась значительным модификациям вследствие новых данных о роли липид-транспортирующих частиц – липопротеидов. Была выявлена взаимосвязь между концентрацией в крови липопротеидов низкой плотности (ЛНП) и риском развития атеросклероза. Однако, с точки зрения гипотезы, нельзя объяснить тот факт, что атеросклеротическое поражение возникает локально, а также объяснить последовательность его формирования. Впоследствии появились данные о том, что в атеросклеротическом поражении присутствуют клетки и молекулы, обычно сопровождающие воспаление, а прогрессирование атеросклеротической бляшки стали рассматривать как процесс, сопровождаемый локальным хроническим воспалением. Не смотря на то, что получено обширное количество данных о роли воспаления в развитии атеросклероза, до сих пор неизвестно, является ли реакция врожденного иммунитета причиной или лишь следствием накопления липидов в сосудистой стенке. Установление причинно-следственных связей между накоплением внутриклеточных липидов и воспалением в настоящее время является принципиально важным для понимания возникновения и развития атеросклероза, а также его лечения.

Цель исследования: Изучить характер взаимодействия модифицированных атерогенных липопротеидов низкой плотности с макрофагами (одим из важнейших клеточных типов, участвующих в атерогенезе), а также оценить последствия этого взаимодействия.

Задачи исследования:

1. Оценка способности сыворотки крови больных ИБС с документированным атеросклерозом вызывать накопление внутриклеточного холестерина;
2. Анализ характера накопления липидов в клетке с помощью фазово-контрастной и конфокальной микроскопии;
3. Оценка экспрессии генов воспаления в атеросклеротическом поражении;
4. Исследование влияния модифицированных ЛНП на активацию макрофагов;
5. Транскриптомный анализ и выявление важнейших генов, ассоциированных с накоплением липидов в клетке;
6. Выявление генов, тесно связанных с накоплением холестерина макрофагами, с использованием методов биоинформатики.

Научная новизна. Впервые было визуализировано внутриклеточное распределение липидов при взаимодействии макрофагов человека и атерогенных ЛНП, выделенных из крови больных ИБС с документированным атеросклерозом. Впервые было проведено двойное иммуногистохимическое окрашивание непораженной интимы аорты человека, жировой полосы и липофиброзной бляшки человека на провоспалительный цитокин TNF и противовоспалительный хемокин CCL18, охарактеризовано их взаимное распределение, а также оценена экспрессия соответствующих генов в ткани. Впервые было показано, что взаимодействие атерогенных ЛНП с макрофагами человека, приводит к увеличению экспрессии TNF и CCL18. Анализ транскриптома нагруженных холестерином макрофагов показал, что большинство генов, экспрессия которых меняется при накоплении холестерина клетками, относятся к генам врожденного иммунитета. С помощью методов биоинформатики было выявлено десять генов потенциально ответственных за накопление холестерина.

Теоретическая и практическая значимость. Идентифицированные в ходе работы потенциальные мастер-регуляторы, ответственные за накопление холестерина макрофагами человека, представляют значительный интерес для раскрытия механизмов патогенеза атеросклероза и в дальнейшем могут быть использованы в качестве терапевтических мишеней.

Методология и методы исследования. В работе использовали плазму и сыворотку крови от практически здоровых лиц, которые не имели анамнеза сердечно-сосудистых заболеваний и больных ишемической болезнью сердца с документированным стенозом от 1 до 3 коронарной артерии. В исследовании проводилось выделение липопротеидов низкой плотности из сывороток крови здоровых доноров и больных ишемической болезнью сердца методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности для последующего добавления в культуру клеток. Первичные моноциты/макрофаги выделяли из крови методом магнитно-аффинной сепарации. В работе проводили забор аутопсийного материала (образцов аорт) для иммуно-гистологического окрашивания пораженных участков интимы аорты, а также изучение экспрессии генов воспаления в полученных образцах с помощью полимерной цепной реакции в реальном времени. Для поиска генов, ответственных за накопление холестерина, исследовали транскриптом нагруженных холестерином макрофагов с последующим биоинформатическим анализом данных с использованием метода «восходящий анализ».

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Внутриклеточное распределение атерогенных ЛНП отлично от распределения нативных ЛНП.
2. В атеросклеротическом поражении содержание и экспрессия провоспалительного цитокина TNF и противовоспалительного хемокина CCL18 выше, чем в непораженной интимае.

3. При внутриклеточном накоплении липидов макрофагами человека, вызванном атерогенными ЛНП, возрастает экспрессия генов TNF и CCL18.
4. При накоплении холестерина макрофагами человека существенно изменяется активность генов, вовлеченных в воспалительные реакции.

Степень достоверности и апробация результатов. Результаты получены с помощью современных методов с использованием высокоточного оборудования. Объем выборки, а также количество независимых экспериментов позволили получить статистически достоверные результаты. Результаты работы отражены в 39 публикациях, в т.ч. 21 рецензируемых РИНЦ и 13 рецензируемых Scopus. Результаты работы доложены на 8 конференциях: 85th European Atherosclerosis Society (EAS) Congress (Прага, Чехия), 84th EAS Congress (Инсбрук, Австрия), The 26th GW-ICC APHC/ISCCPR-2015 (Пекин, Китай), Pheripheral Vascular Disease 2015 Scientific Sessions (Сан-Франциско, США), 17th International Symposium on Atherosclerosis (Амстердам, Нидерланды), 83nd EAS Congress (Глазго, Великобритания), 82nd EAS Congress (Мадрид, Испания), 81nd EAS Congress (Лион, Франция).

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Понятие атеросклероза, типы поражений

Атеросклероз – это хроническое заболевание артерий эластического и мышечно-эластического типа. Артериальная стенка состоит из 3 слоев: интима, медиа, адвентиция (Рисунок 1).

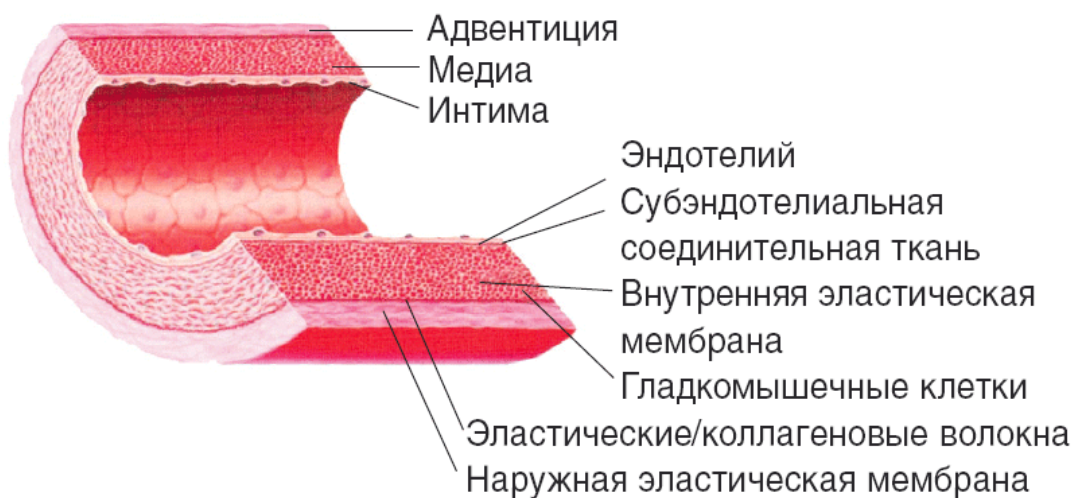


Рисунок 1. Строение артериальной стенки (Источник [1])

Атеросклеротическое поражение возникает и развивается в интиме – ближайшем к просвету сосуда слое, отделенным от кровотока только монослоем эндотелиальных клеток. В настоящее время определены четыре типа атеросклеротических поражений: начальное поражение, жировая полоса, липофиброзная бляшка, атеросклеротическая бляшка (Рисунок 2). Непораженные участки артерий и поражения принято идентифицировать макроскопически, а затем микроскопически в соответствии с классификацией Совета по атеросклерозу Американского Общества по изучению сердца [2-5]. Непораженные участки имеют гладкую люминальную поверхность, четко идентифицируемые слои интимы. Начальные поражения макроскопически представляют собой видоизмененные участки, с бугристой желтоватой

поверхностью, иногда с желтыми точками. Для 1 типа поражения наблюдаются небольшие скопления внеклеточных липидных капель, единичные пенистые клетки, увеличенное количество мононуклеарных клеток. Жировые полосы макроскопически представлены полосками и точками желтого цвета, выступающими в просвет сосуда. На срезах ткани можно увидеть в основном внутриклеточные липиды, наблюдающиеся как в гладкомышечных клетках, так и в макрофагах, а также скопление пенистых клеток. Также, иногда, наблюдается разрастание внеклеточного матрикса. Липофиброзные бляшки выглядят как сильно выступающие в просвет сосуда желтоватые или перламутровые, круглые или эллипсоидные образования. Этому типу поражения присущи изменения, характерные для жировых полос: накопление внутриклеточных липидов, разрастание внеклеточного матрикса. В липофиброзной бляшке присутствует массивное некротическое ядро и, расположенная над ним соединительнотканная покрышка. Плечи липофиброзной бляшки схожи по морфологии с жировой полосой. Фиброзные бляшки макроскопически представляют собой сильно выступающие над люминальной поверхностью образования белого цвета.

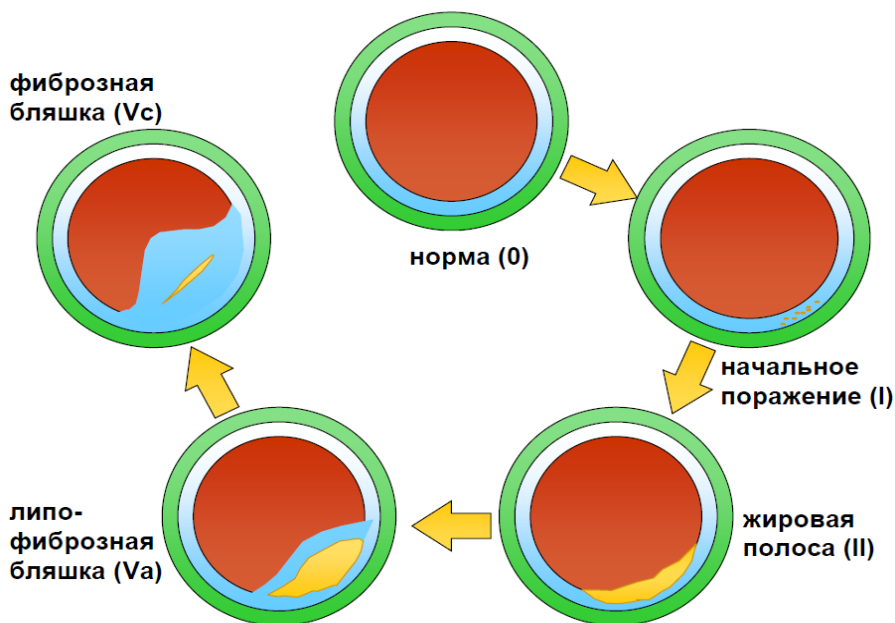


Рисунок 2. Типы атеросклеротических поражений (Источник [1])

Слои интимы различаются друг от друга по морфологии (Рисунок 3). Мышечно-эластический слой, называемый также слоем Йореса, состоит из

клеток вытянутой формы, ориентированных вдоль длинной оси сосуда, с пробегающими между ними эластическими волокнами. От медики этот слой отделен внутренней эластической мембраной. Сверху от мышечно-эластического слоя следует внутренняя пограничная пластинка. За ней, в направлении просвета сосуда, проходит несколько рядов довольно тесно расположенных эластических волокон и пластинок, составляющих, вместе с пограничной пластинкой эластико-гиперпластический (протеогликановый) слой. Волокна соединительнотканного матрикса протеогликанового слоя не имеют четкой ориентации относительно оси сосуда, а клетки представляют собой морфологически гетерогенную клеточную популяцию. Было показано, что в непораженной интима мышечно-эластический слой содержит гораздо больше эластиновых волокон по сравнению с протеогликановым, тогда как в протеогликановом слое выявляется больше волокон коллагена и ретикулина [6]. Наилучшим критерием для идентификации слоев интимы, является направление эластических волокон. В протеогликановом слое они всегда расположены в продольном направлении, а в мышечно-эластическом они имеют циркулярное или даже спирально расположение, а потому на срезах они представлены короткими толстыми волокнами.

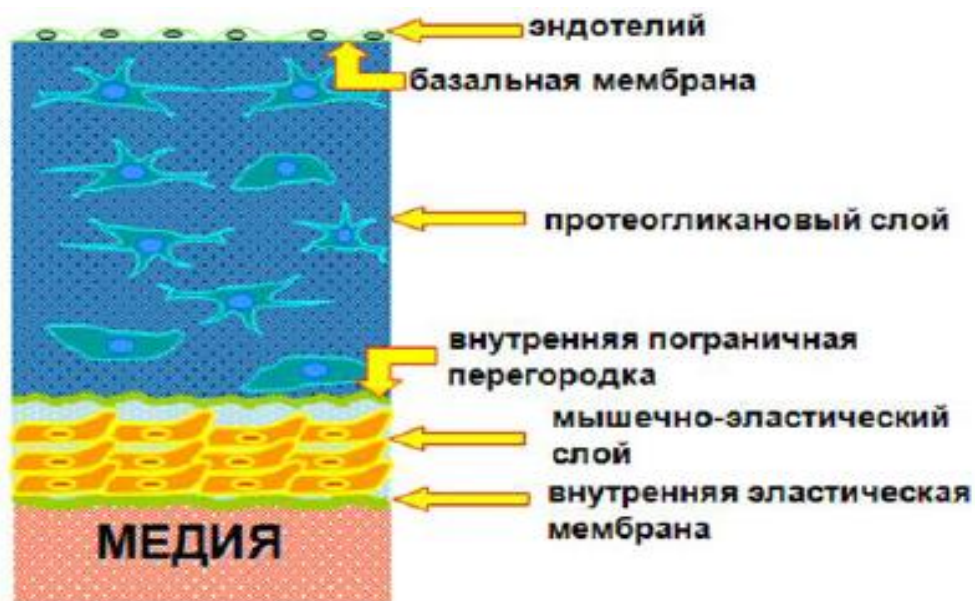


Рисунок 3. Структура интимы артерий (Источник [1])

1.2. Активация макрофагов при атеросклерозе

Наиболее распространенной является концепция, описывающая два основных типа активации макрофагов: M1 и M2 [7-9], зависящие от цитокинов, производимых Т-хелперами 1 и 2 типов соответственно. Активация 1 типа (M1) или классическая активация является ответом на провоспалительные стимулы, такие как интерферон-гамма (ИФН- γ) или липополисахарид (ЛПС). Для M1 характерна секреция активных форм кислорода (АФК) и провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухоли альфа (TNF) и интерлейкинов (IL) -1, -6, -12, а так же, экспрессией Fc- γ рецепторов 1, 2, 3. Второй тип (M2) или альтернативная активация макрофагов - результат влияния противовоспалительных цитокинов, таких как IL-4, -10, -13 и трансформирующий фактор роста бета (TGF- β) или других противовоспалительных медиаторов, например глюкокортикоидов [10-12]. Результатом альтернативной активации макрофагов является экспрессия противовоспалительных цитокинов: антагониста рецептора IL-1, IL-10, CCL18 и экспрессия таких маркеров, как рецептор гаптоглобина CD163, маннозный рецептор (CD206) и стабилилин-1 [12, 13].

TNF – многофункциональный цитокин, принимающий участие в воспалительных реакциях. Секретируется главным образом активированными M1 макрофагами, а также CD4⁺ лимфоцитами, NK-клетками и нейронами. Основная функция TNF в организме – регуляция иммунных клеток. TNF способен индуцировать лихорадку, апоптоз клеток, воспаление, развитие опухолей. Нарушение секреции TNF наблюдается при развитии различных человеческих заболеваний, включая болезнь Альцгеймера [14], рак [15] и атеросклероз [16].

CCL18 является эффекторным белком иммунной системы, главным образом, приобретенного иммунитета, но в то же время продуцируется и секретируется в основном клетками врожденного иммунитета: моноцитами,

макрофагами, дендритными клетками. CCL18 секретируется в ответ на такие цитокины, продуцируемые Т-хелперами 2 типа, как IL-4, IL-10, IL-13 [17].

CCL18 способствует хемотаксису Т-клеток и участвует в сложных механизмах взаимодействия между Т-клетками, Т-регуляторными клетками, Т-хелперами 2 типа, иммуносупрессивными и незрелыми дендритными клетками, базофилами и В-клетками [18].

CCL18 активно экспрессируется дендритными клетками в герминальном центре воспаленных лимфатических узлов, и способствует презентации антигенов нативным В-клеткам. Возможно, аномальная экспрессия CCL18 приводит к хронической патологии Т-хелперов 2, что приводит к астме [19] или артриту [20].

С другой стороны, CCL18 также способствует супрессии иммунного ответа. CCL18 вызывает альтернативную противовоспалительную активацию незрелых дендритных клеток, привлекая Т-клетки и подавляя их эффекторную функцию [21]. Кроме того, M2 макрофаги через секрецию CCL18 способствуют процессам репарации и подавлению воспалительной реакции. Т-регуляторные клетки, под воздействием CCL18 перестают экспрессировать FoxP3, и оказывают иммуносупрессивные функции путем секреции ИЛ-10 [17].

Целый ряд заболеваний связан или проявляется аномальным уровнем секреции CCL18: острый лимфобластный лейкоз, аллергический, атопический дерматит, атеросклероз, хронический гепатит С, рак желудка, гигантоклеточный артериит, аллергические пневмонии, идиопатический легочный фиброз, карцинома яичников, ревматоидный артрит и другие [22].

Помимо M1 и M2 также другие фенотипы макрофагов могут присутствовать в атеросклеротическом поражении. К ним относятся M(Hb) и Mhem [23], которые в меньшей степени способны накапливать липиды. M(Hb) и Mhem *in vitro* получают воздействием комплексов гемоглобин-гаптоглобина и

гемов, соответственно. Популяция M4 получают добавлением хемокина CXCL4 [24].

Морфологически в атеросклеротическом поражении обычно представлены все основные его типы. Поэтому условия в поражении нельзя считать однородными (Рисунок 4). Фенотип макрофагов может модулироваться многими внешними факторами: цитокинами, кристаллами холестерина, модифицированными ЛНП, жирными кислотами, иммунными комплексами. Присутствие провоспалительных макрофагов M1 в атеросклеротическом поражении было продемонстрировано несколько десятилетий назад, но альтернативно активированные макрофаги M2 обнаружили относительно недавно [25]. M2 макрофаги, положительно окрашенные на CD68 и маннозный рецептор (MR), впервые были найдены в периферийных областях атеросклеротического поражения, а также в более стабильных его областях. CD68+ MR+ макрофаги локализовались в областях с высоким содержанием IL-4. Клетки CD68+ MR+ имели меньшее количество и меньшие по размеру липидные включения по сравнению с CD68+MR- макрофагами [26].

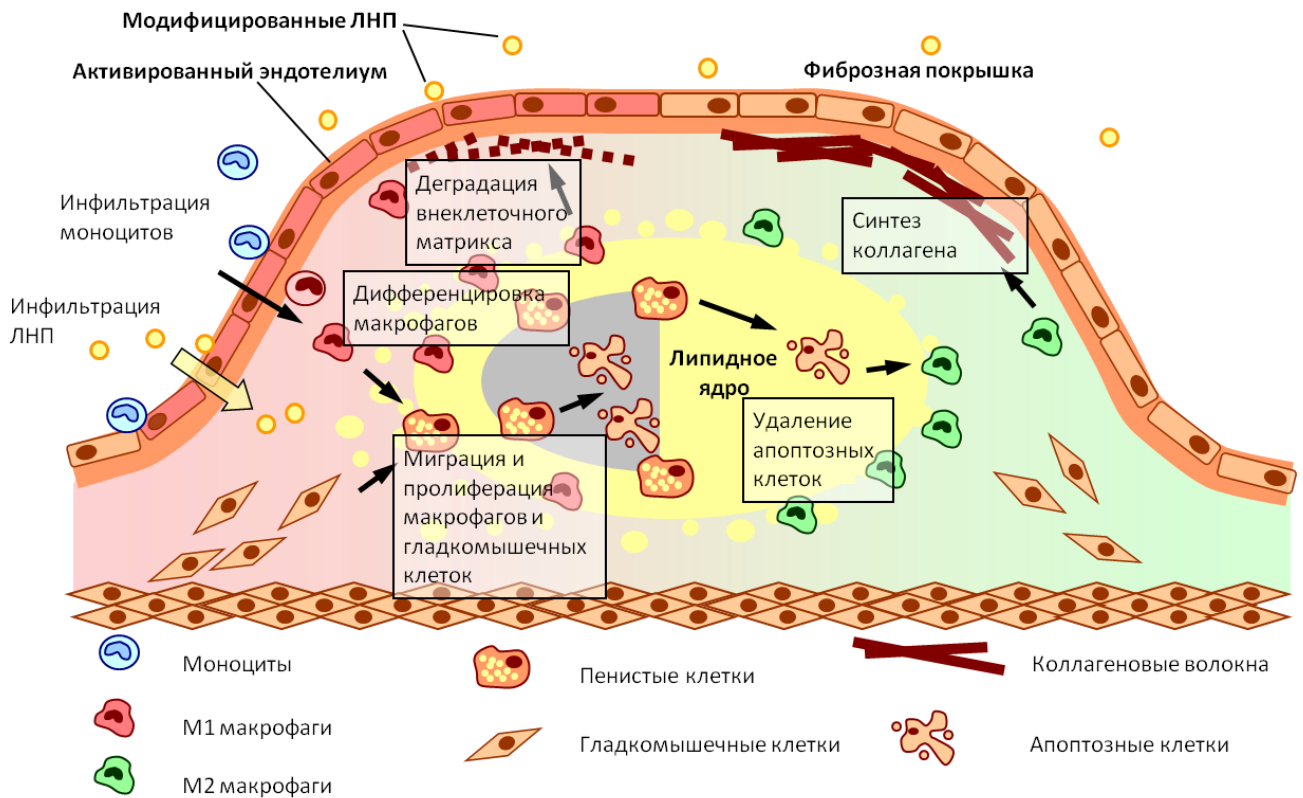


Рисунок 4. Фенотипы макрофагов и стабильность атеросклеротической бляшки. На рисунке представлена упрощенная схема роли M1 и M2 макрофагов при прогрессировании атеросклеротического поражения. Провоспалительные условия ассоциированы с высоким содержанием атерогенных ЛНП в плазме крови и локальной дисфункцией эндотелия. В таких условиях облегчается проникновение моноцитов в артериальную стенку, стимулируется провоспалительная (M1) поляризация макрофагов. M1 макрофаги участвуют в накоплении липидов, поддерживают провоспалительную среду и способствуют дестабилизации бляшек. Альтернативно активированные макрофаги M2 способствуют стабилизации бляшек посредством супрессии воспаленного ответа, эффероцитоза мертвых клеток и стимуляции синтеза внеклеточного матрикса. (Источник [27])

Boyle с соавт. обнаружили макрофаги, экспрессирующие высокий уровень CD163 и низкий HLA-DR. Такие клетки локализовались в геморрагических зонах поражений и были названы HA-mac [23]. Этот фенотип макрофагов проявляет преимущественно антиатерогенные функции, участвующие в подавлении окислительного стресса. Схожие с HA-mac, Mhem макрофаги проявляют сильное гемм-зависимое фосфорилирование и активацию фактора активации транскрипции 1. Этот фактор транскрипции инициирует каскад LXR α /ABCA1/ApoE, который препятствует формированию пенистых клеток [28]. M(Hb) макрофаги характеризуются экспрессией поверхностных маркеров M2-макрофагов: MR и CD163 [29]. Неоваскуляризация часто встречается в атеросклеротических бляшках и приводит к инфильтрации эритроцитов с последующим накоплением железа в поражении. CD68+ MR+ макрофаги были обнаружены в областях с высоким содержанием железа, что указывает на роль этих клеток в метаболизме железа [30]. M4 макрофаги обнаружили в атеросклеротическом поражении путем измерения экспрессии матриксной металлопротеиназы (MMP) 7 и кальций-связывающего белка S100A8 [31]. M4 макрофаги экспрессируют MMP12, MR, а также некоторые провоспалительные цитокины: IL-6 и TNF. M4 макрофаги не экспрессируют рецептор гемоглобин-гаптоглобина CD163 [31] (Таблица 1).

J. Lauran Stöger с соавт. изучили локализацию M1 и M2 макрофагов в различных типах поражений. Оба фенотипа макрофагов были обнаружены в атеросклеротических поражениях, причем в различных областях. Оба фенотипа были представлены в большем количестве в нестабильных поражениях, по сравнению со стабильными бляшками. M1 макрофаги преобладали в подверженных разрыву плечевых областях бляшек. В фиброзных покрышках не было обнаружено существенной разницы между количеством M1 и M2 клеток.

Таблица 1. Фенотипы макрофагов человека и их роль в атеросклерозе (Источник [32])

Фенотип макрофагов	Стимуляторы фенотипа	Маркеры фенотипа	Секретируемые молекулы	Функции	Роль в атеросклерозе
M1	IFN- γ , TNF- α , LPS	IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, TNF- α , CXCL9, CXCL10и CXCL11	IL-6, IL-10 (низкий уровень), IL-12 (высокий уровень), IL-23, TNF- α , АФК	Ответ Т-хелперов 1 типа	Развитие бляшки, поддержание воспалительного ответа
M2a	IL-4, IL-13	MR, IL1RN	IL-10, TGF- β , CCL17, CCL22	Репарация тканей	Высокое содержание в регрессирующих бляшках
M2b	IL-1 β , LPS	IL-10 (высокий уровень), IL-12 (низкий уровень)	IL-6, IL-10 (высокий уровень), IL-12 (низкий уровень), and TNF	Регуляция иммунного ответа	
M2c	IL-10, TGF- β , глюкокортикоиды	MR	IL-10, TGF- β , PTX3	Фагоцитоз	
M4	CXCL4	MR, MMP7, S100A8	IL-6, TNF- α , MMP12	Ослабление фагоцитоза	Минимальное образование пенистых клеток, потенциально проатерогенный фенотип
HA-мас	Гемоглобин / гаптоглобин	CD163 (высокий уровень), HLA-DR (низкий уровень)	HMOX-1	Удаление гемоглобина	Антиатерогенный
M (Hb)	Гемоглобин / гаптоглобин	MR, CD163	ABCA1, ABCG1, LXR- α	Удаление гемоглобина	Отток холестерина, антиатерогенный
Mhem	Гем	ATF1, CD163	LXR- β	Фагоцитоз эритроцитов	Антиатерогенный

Большое количество M2 макрофагов было обнаружено в адвентиции. Области внутренних кровоизлияний иммуногистохимически сильно окрашивались на CD163. Примечательно, что макрофаги, нагруженные липидами, экспрессировали маркеры как M1, так и M2 фенотипов [32].

Cho KY et al попытались выявить связь между стабильностью атеросклеротических поражений сонных артерий и содержанием M1 и M2 макрофагов в бляшках. В этом исследовании испытуемые были разделены на 2 группы: с симптоматическим атеросклерозом (пациенты перенесли острый ишемический приступ) и с бессимптомным. Было обнаружено, что в поражениях симптоматической группы испытуемых было повышенное содержание M1 макрофагов, а в поражениях из бессимптомной группы – повышенное количество M2 макрофагов. M1 макрофаги были найдены исключительно лишь в поражениях симптоматических пациентов. Таким образом, соотношение M1 и M2 макрофагов в поражении может служить маркером стабильности бляшки [16].

1.3. Метаболизм ЛНП и активация макрофагов

Во внешне неизменной интима липиды накапливаются в основном внеклеточно. На начальных стадиях атеросклероза, в стенке артерии выявляется присутствие клеток с липидными включениями. Наибольшее количество клеток с липидными включениями наблюдается в жировых полосах (до 25%) и они располагаются в поверхностной части протеогликанового слоя [33]. В бляшках, подобные клетки обнаруживаются в более глубоких слоях, ближе к внутренней пограничной пластинке. В мышечно-эластическом слое доля клеток, нагруженных липидами невелика, не превышает 5% в атеросклеротических бляшках. Клетки с липидными включениями обнаруживаются среди всех морфотипов, описанных в интима аорты, однако, среди клеток звездчатой

формы, доля клеток с липидными включениями максимальна и составляет 30%. Одной из причин внутриклеточного накопления липидов может быть нарушение их клеточного метаболизма. В клетках, культивируемых из атеросклеротических поражений скорость синтеза основных классов липидов выше, в сравнение с непораженной интимой аорты человека [34]. Чем выше содержание внутриклеточных липидов, тем интенсивнее идет метаболизм липидов в атеросклеротических клетках [35]. Однако эти наблюдения не дают ответ на вопрос: что вызывает изменение метаболизма липидов в артериальной стенке, ведущее в конечном итоге к накоплению избыточных липидов в клетках [36].

Липопротеиды низкой плотности – основной переносчик липидов в крови, а также наиболее вероятный источник липидов, перенасыщающих клетки атеросклеротического поражения. Попытка доказать это утверждение, посредством добавления в культуру клеток ЛНП, не увенчалась успехом [37, 38]. Причиной этому является обратная регуляция метаболизма холестерина в клетке, благодаря которой при накоплении внутриклеточного холестерина уменьшается число специфических рецепторов к ЛНП на поверхности клетки, что препятствует дальнейшему поступлению в нее ЛНП рецепторным путем [39]. Накопление внутриклеточных липидов можно вызвать нерастворимыми комплексами, содержащими ЛНП [40-43]. Например, ассоциаты ЛНП с гликозаминогликанами, протеогликанами, фибронектином, коллагеном, эластином и другими компонентами, составляющими основу соединительнотканного матрикса артериальной стенки. Такой путь накопления липидов в клетках сосуда представляется весьма возможным, поскольку в сосудистой стенке для того есть все условия.

Ассоциация ЛНП, при которой происходит объединение нескольких частиц липопротеида, является достаточным условием для накопления внутриклеточных липидов [44]. Возможно, что ассоциаты проникают в клетку путем фагоцитоза, минуя рецепторный путь проникновения ЛНП в клетку.

Подобный механизм может привести к нерегулируемому отложению липидов и перенасыщению клетки.

Все известные типы химической модификации ЛНП, включая множественную модификацию липопротеидов в крови, стимулируют ассоциацию ЛНП [45, 46]. Между способностью вызывать накопление липидов и размерами ассоциата липопротеидных частиц существует прямая корреляция [46]. В крови циркулируют атерогенные модифицированные ЛНП, способные в отличие от нативных ЛНП вызывать накопление липидов в клетках [47]. При модификации ЛНП происходят изменения в белковой, липидной, углеводной структурах липопротеидной частицы, изменяется ее заряд, размер, плотность, иммуногенность и многие другие свойства [48]. В крови, как больных, так и здоровых лиц имеется подфракция атерогенных модифицированных ЛНП, однако, в крови у пациентов с документированным атеросклерозом доля модифицированных ЛНП гораздо выше [47].

Нативные ЛНП распознаются ЛНП-рецептором (LDLR). Путем эндоцитоза ЛНП транспортируются в лизосомы, в которых лизосомная кислая липаза гидролизует эфиры холестерина до свободного холестерина. Затем свободный холестерин транспортируется в эндоплазматический ретикулум и этерифицируется холестерин-ацилтрансферазой (ACAT) [49, 50]. Увеличение количества свободного холестерина в эндоплазматическом ретикулуме инициирует сигнальный каскад, который приводит к уменьшению экспрессии LDLR. Такая регуляция LDLR препятствует образованию пенистых клеток. АпоВ содержащие липопротеиды, которые также содержат АпоЕ, могут вызывать накопление холестерина путем взаимодействия АпоЕ с АпоЕ-рецепторами, такими как LRP1 и VLDL-рецептор, которые не регулируются количеством внутриклеточного холестерина. Захват нативных ЛНП путем пиноцитоза также способствует формированию пенистых клеток. Модификации АпоВ-содержащих липопротеидов вызывают значительное накопление холестерина. Агрегация ЛНП приводит к захвату через фагоцитоз [28, 51].

Окисление или гликолиз частиц ЛНП повышает интернализацию через ряд рецепторов, которые не регулируются уровнем внутриклеточного холестерина: CD36, Скэвенджер рецептор А (SRA), лектин-подобные рецепторы (LOX) и Толл-подобные рецепторы (TLR) [52, 53]. Эфиры холестерина накапливаются в цитоплазматических липидных каплях, в которых происходит последующий процесс гидролиза до свободного холестерина с помощью нейтральной эстеразы холестерина, а также новой этерификации с помощью ACAT.

Процессы накопления этерифицированного холестерина и оттока свободного холестерина могут влиять на фенотип макрофагов. Накопление свободного холестерина вызывает провоспалительную активацию макрофагов, приводящую к стрессу эндоплазматического ретикулума. Этот процесс также способствует утечке кальция в цитозоль [54]. Было показано, что накопление липидных капель вызывает активацию TLR4, а кристаллы холестерина приводят к активации инфламмасом [55].

Активация TLR4 может привести к активации NF- κ B, ERK, c-Jun N-terminal kinase (JNK) и интерфероновому ответу, каждый из которых ведет к различным последующим эффектам. Активация рецептора IL-4 вызывает активацию преобразователя сигнала и активатора транскрипции 6 (STAT6), который может подавлять сигналинг TLR4 [56]. Пересечения между разными сигнальными путями, вероятно, могут менять и на фенотип макрофагов.

da Silva RF с соавт. изучили способность нагруженных холестерином макрофагов активироваться в про- и противовоспалительном направлениях. Формирование пенистых клеток осуществлялось путем добавления в культуру ацетилированных ЛНП. Нагруженные холестерином макрофаги в меньшей степени экспрессировали маркеры воспаления при провоспалительной стимуляции, по сравнению с контрольными макрофагами. При стимуляции клеток противовоспалительными стимулами нагруженные холестерином

макрофаги и контрольные клетки не отличались по экспрессии противовоспалительных маркеров [57].

Цитоплазматические эфиры холестерина удаляются двумя способами. Первый состоит в том, что удаление свободного холестерина с плазматической мембраны стимулирует транспорт свободного холестерина, полученного с помощью нейтральной эстеразы холестерина, от АСАТ к плазматической мембране [58, 59]. Во втором случае цитоплазматические эфиры холестерина упаковываются в аутофагосомы, которые сливаются с лизосомами, где эфиры холестерина гидролизуются кислой липазой до свободного холестерина, который в свою очередь транспортируется к плазматической мембране [59, 60]. Отток свободного холестерина к ЛВП производится также рядом механизмов и препятствует формированию пенистой клетки. Экзогенный свободный от липидов АпоА-1 или АпоЕ, продуцируемый макрофагами, взаимодействуют с транспортером ABCA1, что приводит к стимуляции оттока фосфолипидов и свободного холестерина с образованием частиц ЛВП. ABCA1 играет основную роль в удалении цитоплазматических эфиров холестерина через аутофагию. Как незрелые частицы ЛВП, так и сформированные ЛВП стимулируют отток свободного холестерина через механизмы, включающие ABCG1, SR-BI и диффузию [61-64].

В мышинных моделях дефицит ABCA1 и ABCG1 вызывают воспалительную активацию макрофагов [49]. И наоборот, воспаление препятствует обратному транспорту холестерина в макрофагах [65].

1.4. Транскриптомный анализ

В мире генерируются множественные данные, измеряющие экспрессию белков, микроРНК и длинных некодирующих РНК в различных клеточных условиях при исследовании различных заболеваний. Одной из наиболее важных

проблем является расшифровка причинно-молекулярных механизмов возникновения и развития заболеваний на уровне клеточных сетей регуляции. Часто из-за некоторых специфических патологических эпигенетических изменений в геномах молекулярные регуляторные сети клеток перестраиваются. Реконструкция специфических для конкретных заболеваний сетей и выявление потенциальных генов-регуляторов этих сетей может дать представление о потенциальных способах блокирования патологических регуляторных каскадов и подавления развития заболевания путем взаимодействия с конкретными молекулярными мишенями.

Транскриптомные данные со всего мира накапливаются в таких базах данных, как ArrayExpress [66] или Gene Expression Omnibus (GEO) [67]. Производные наборы дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) можно найти в более специализированных базах данных, например, в Expression Atlas, Mouse Expression Database (GXD) и других. Эти данные могут использоваться непосредственно для выбора потенциальных мишеней лекарственного средства, используя только статистическую значимость изменений в экспрессии генов. Для более точного анализа молекулярных механизмов обычно применяется традиционный подход по картированию наборов ДЭГ на категории генной онтологии (GO) или на пути KEGG, например, методом GSEA (анализ обогащения генов) [68].

Поскольку такой подход обеспечивает лишь очень ограниченные выводы о причинах наблюдаемых явлений, появилась новая стратегия, так называемый «восходящий анализ» позволяющий выявлять причины изменений экспрессии [69]. Эта стратегия состоит из двух основных этапов: (1) анализа промоторов и энхансеров идентифицированных ДЭГ для определения факторов транскрипции (ТФ), участвующих в изучаемом процессе; (2) реконструкция сигнальных путей, которые активируют эти ТФ и идентификацию главных регуляторов на вершине таких путей.

1.5. Влияние факторов транскрипции на фенотип макрофагов

Недавние исследования подчеркнули роль факторов транскрипции и ядерных рецепторов в изменении фенотипа макрофагов при атеросклерозе. Ядерные рецепторы PPAR γ и PPAR δ имеют решающее значение в поляризации макрофагов в направлении противовоспалительного фенотипа M2 [70]. PPAR γ и PPAR δ влияют на транскрипцию в ответ на связывание жирных кислот. Было показано, что при поражении сонной артерии человека экспрессия PPAR γ положительно коррелирует с экспрессией маркеров M2, таких как IL-10, MR и ассоциированного с активацией макрофагов СС-хемокина АМАС1 [25]. M1 макрофаги используют гликолиз для выработки энергии, а макрофаги M2 предпочитают окислять липиды. PPAR γ регулирует экспрессию генов, ответственных за поглощение жирных кислот, таких как CD36 и другие. Индукция PPAR γ или PPAR δ в макрофагах M1 усиливает окисление жирных кислот и, в свою очередь, меняет фенотип клетки на M2. Показано, что индукция PPAR δ с помощью полиненасыщенных жирных кислот оказывает синергетическое действие вместе с IL-4 и индуцирует экспрессию M2 маркера аргиназы-1 [71].

Было показано, что в макрофагах накопление окисленных и других модифицированных форм холестерина активирует транскрипционные факторы LXR α и LXR β . Транскрипционная активность обоих факторов возрастает вместе с увеличением концентрации внутриклеточного холестерина для того, чтобы скорректировать генную экспрессию в соответствии с содержанием холестерина в цитоплазме. LXR α и LXR β активируют экспрессию генов, таких как ABCA1, ABCG1 и ApoE, белковые продукты которых участвуют в обратном транспорте холестерина [72].

Также LXR α и LXR β участвуют в увеличении продукции IL-10, влияя на пути, зависимые от протеинкиназы А. LXR α и LXR β могут также регулировать воспалительный ответ путем активации экспрессии регуляторного фактора

интерферона 8 (IRF8), который, в свою очередь, взаимодействует с фактором транскрипции PU.1 индуцируя экспрессию аргиназы-1. Таким образом, LXR α и LXR β способствуют экспрессии, по меньшей мере, двух маркеров M2: Arg-1 и IL-10. LXR α и LXR β могут подавлять активность транскрипционных факторов NF κ B и AP-1 путем стабилизации транскрипционных репрессорных комплексов на промоторных участках генов воспаления [73].

Взаимодействие LXR α и LXR β с провоспалительными путями являются взаимно супрессирующими. Показано, что активация сигналов воспаления посредством TLR снижает активности факторов LXR, что приводит к дальнейшему снижению экспрессии ABCA1 и уменьшению оттока холестерина. Макрофаги, подвергающиеся воздействию гема или гемоглобина, уменьшают продукцию АФК из-за вызванной гемом активации активирующего транскрипционного фактора, гемоксидазы 1 и LXR β . LXR β затем вызывает увеличение экспрессии LXR α и ABCA1, что, в свою очередь, увеличивает отток холестерина и продукцию IL-10 [74]. Эти данные свидетельствуют о том, что макрофаги имеют компенсаторный механизм для корректировки экспрессии генов в соответствии с уровнем холестерина и наличием про- или противовоспалительных сигналов.

Эстрогены проявляют свою биологическую активность путем связывания с рецепторами эстрогенов (ER) α и β . Нокаут ER α приводит к более развитым атеросклеротическим бляшкам у мышей. Было обнаружено, что ядерный рецептор ER α участвует в регуляции функциональной активности макрофагов. Транскрипционная активность ER α регулируется коактиватором PPAR γ 1 β (PGC-1 β). И IL-4, и ER α участвуют в индукции PGC-1 β . Активация PGC-1 β в макрофагах приводит к определенному сдвигу в сторону активации генов, участвующих в митохондриально-зависимом окислении липидов, а затем и к индукции фенотипа M2. Активация фенотипа M2 связана с окислительным взрывом и усилением продукции АФК, необходимой для утилизации клеток, ушедших в апоптоз. Активация ER α индуцирует нескольких маркеров M2, включая PPAR γ / δ , TGF- β и трансглутаминазу 2 (TGM2) и сопровождается

ингибированием экспрессии провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6 и IFN- γ [75].

Показано, что у мышей Круппель-подобный фактор (KLF) 4, способен направлять поляризацию макрофагов в сторону провоспалительного фенотипа M1 путем прямой стимуляции экспрессии NO-синтазы и снижения восприимчивости к TGF- β 1. В макрофагах KLF4 может индуцироваться стимуляцией IFN- γ , LPS и TNF α и подавляется TGF- β [76]. Показано, что ЛВП регулируют экспрессию KLF4 в моноцитах и макрофагах крови, что, в свою очередь, приводит к экспрессии проатерогенного скэвенджер рецептора V1 (SRB1), связывающего ЛВП. Ингибирование KLF4 в гладкомышечных клетках аорты у мышей ApoE^{-/-} приводило к значительному уменьшению размера бляшек аорты, уменьшению количества макрофагов, увеличению площади фиброзной покрышки и повышенному синтезу коллагена, гладкомышечного α -актина и миокардина в стенке аорты [77].

Другой Круппель-подобный фактор KLF6 также индуцирует провоспалительный ответ в человеческих и мышинных макрофагах, ингибируя экспрессию PPAR γ и взаимодействуя с NF κ B, активируя экспрессию провоспалительных генов. Экспрессия KLF6 может быть вызвана окислительным стрессом в ответ на АФК [78]. Данных о роли KLF6 в развитии атеросклероза нет. Однако недавнее компьютерное моделирование показало, что KLF6 может отвечать за базальную экспрессию TGF- β 1 в сосудах, а также играть важную роль в прогрессировании атеросклеротических бляшек [79].

Семейство орфановых рецепторов NR4A содержит три члена (NR4A1-NR4A3), способных модулировать фенотип макрофагов у мышей. Было обнаружено, что NR4A1 сильно экспрессируется в циркулирующих моноцитах и оседлых LyC6C⁻CCR2⁻CXCR1^{hi}CD62L⁻ макрофагах, которые затем дифференцируются в M2 макрофаги. Мыши, дефицитные по NR4A1, в меньшей степени экспрессируют IL-12, NO-синтазу и TNF, но в большей – аргиназу-1 [80]. Однако данные о

способности NR4A1 или NR4A3 модулировать фенотип макрофагов были подвергнуты сомнению [81].

1.6. Заключение

Вероятно, фенотипы макрофагов в атеросклеротическом поражении не могут быть разделены на определенные подмножества. Вероятнее, что фенотипы формируются вследствие влияния микроокружения и активации специфических внутриклеточных сигнальных путей в ответ на внешние изменения. Фенотип макрофагов может быстро меняться в ответ на изменения во внешней среде и во внутриклеточных сигнальных путях, которые могут обуславливаться повышенным взаимодействием с липидами (или различными типами модифицированных липидов). Таким образом, макрофаги стоит рассматривать как клетки, способные проявлять широкий спектр фенотипов и функций. Не возникает сомнений в роли врожденного иммунитета в атерогенезе. Выявлена связь между провоспалительно активированными макрофагами и развитием нестабильных атеросклеротических поражений, в то время как противовоспалительно активированные макрофаги связывают с репаративными функциями и стабильными поражениями. Макрофаги играют важную роль во врожденном иммунитете. С одной стороны путем эндоцитоза и фагоцитоза они захватывают и разрушают окружающие их патогены. С другой, макрофаги секретируют молекулы для регуляции функций других клеток. Оседлые макрофаги участвуют в поддержании целостности ткани, захватывая мертвые клетки и дебрис.

Результаты исследований, рассмотренные выше, указывают на функциональную пластичность макрофагов, их способных изменять фенотип в ответ на изменения в микроокружении. При атеросклерозе были обнаружены макрофаги с различными фенотипами. Однако неясно, почему разные фенотипы

макрофагов сосуществуют в непосредственной близости друг от друга. Существующие данные свидетельствуют о том, что макрофаги в атеросклеротических бляшках экспрессируют молекулы, свойственные фенотипам, промежуточным между «крайними» M1 и M2.

Есть еще много вопросов, на которые нужно ответить. На сегодняшний день неясно, является ли пенная клетка одним фенотипом или существует несколько типов пенных клеток. Было бы интересно узнать, существует ли ключевой сигнальный механизм (механизмы), который регулирует фенотипическую поляризацию в макрофагах. Является ли фенотипическая пластичность макрофагов выгодной при атеросклерозе? Промежуточные состояния макрофагов обеспечивают динамическую пластичность, способность активировать или понижать регуляцию перекрывающегося набора факторов транскрипции в ответ на внешние сигналы, а также «переключать» фенотип для адаптации к изменяющимся условиям микроокружения, в особенности при накоплении липидов. Однако, остается неизвестным, является ли накопление липидов ответственным за реакцию врожденного иммунитета, или же наоборот – воспаление является причиной в изменении метаболизма липидов. Ответу на этот вопрос посвящена данная работа.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Доноры

В работе была использована плазма и сыворотка крови мужчин и женщин в возрасте от 28 до 59 лет, больных ишемической болезнью сердца (ИБС), с документированным стенозом от 1 до 3 коронарной артерии, а также здоровых лиц (24-57 лет), у которых отсутствовали признаки ИБС в анамнезе и при медицинском обследовании (опросник Роуза и велоэргометрическая проба) [82, 83]. Содержание холестерина и триглицеридов в плазме крови не превышало 200 мг/дл и 150 мг/дл, соответственно.

Критерии включения практически здоровых лиц:

1. Мужчины и женщины в возрасте от 25 до 59 лет;
2. Отсутствие сердечно-сосудистых заболеваний или ангиографически документированных стенозов коронарных артерий.

Критерии включения больных ишемической болезнью сердца:

1. Мужчины и женщины в возрасте от 25 до 59 лет;
2. Диагноз ИБС и наличие ангиографически документированного стеноза 1-3 коронарных артерий.

Критерии исключения:

Наличие тяжелых хронических заболеваний и коморбидных состояний, способных повлиять на результаты оценки атерогенных свойств сыворотки крови (сахарный диабет, хроническая почечная недостаточность, хроническая печеночная недостаточность, онкопатология). Работа с пациентами была выполнена в рамках Федеральной целевой программы с разрешения Этического комитета ФГБНУ «НИИОПП».

2.2. Получение плазмы и сыворотки крови

Для получения плазмы кровь забирали утром натощак в пробирку со следующими растворами: натриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА, конечная концентрация - 1 мг/мл; Sigma Chemical Co., США), цитрата натрия (конечная концентрация - 0,38% Sigma Chemical Co., США) или гепарина-натрия (конечная концентрация - 10 единиц/мл). Препараты центрифугировали 10 мин при 800g на центрифуге TJ-6 (Beckman Instruments, Inc., США).

Для получения сыворотки кровь забирали из локтевой вены в пластиковую пробирку и инкубировали 1 час при 37°C. Образовавшийся сгусток отделяли от стенок пробирки, после чего кровь центрифугировали в течение 15 мин при 800g.

2.3. Выделение суммарной фракции ЛНП из плазмы крови

Для выделения ЛНП по Lindgren [84] в центрифужную пробирку (10 мл) вносили 8 мл плазмы или сыворотки и аккуратно наслаивали 2 мл раствора NaBr в изотоническом фосфатном буфере (ИФБ) плотностью 1,019 г/мл. Первое центрифугирование проводили в течение 18 часов при 12°C со скоростью 40000 об/мин на центрифуге L8-55 (ротор Type 50Ti; Beckman Instruments, Inc., США). Пастеровской пипеткой с поверхности отбирали 2 мл. Оставшийся объем доводили до плотности 1,070 г/мл, используя твердую соль NaBr, и аккуратно наслаивали 2 мл раствора NaBr в ИФБ с плотностью 1,065 г/мл. Второе центрифугирование проводили в течение 24 часов при 12°C со скоростью 40000 об/мин. Пастеровской пипеткой с поверхности отбирали 2,5 мл - в этом объеме флотировали ЛНП. Сразу после выделения ЛНП диализовали в течение 24 часов

против 6000 объемов ИФБ, содержащего 10 мкМ ЭДТА, стерилизовали путем фильтрации, размер пор фильтра 0,45 мкм (Nalge Company, США), и хранили в пластиковых пробирках при 4°C в течение 1-2 недель. ЭДТА исключали из диализного раствора в случае последующего окисления ЛНП ионами меди. Мечение препаратов ЛНП FITC проводилось с использованием набора FluoroTag™ FITC Conjugation Kit (Sigma, США) согласно протоколу производителя; DiI – с помощью Dil Stain (TermoFisher, США).

2.4. Определение концентрации белка в препаратах ЛНП

Концентрацию белка в препаратах липопропротеидов определяли по методу Lowry [85] с модификациями. К пробе объемом 5-20 мкл добавляли 200 мкл свежеприготовленного 0,2 N раствора NaOH, содержащего 0,01% тартрата калия-натрия, 0,005% сульфата меди и 0,02% карбоната натрия, 10 мкл 1% раствора додецилсульфата натрия (Boehringer Mannheim, ФРГ), затем 20 мкл 1 N реактива Фолина (Sigma Chemical Company, США), перемешивали и выдерживали при комнатной температуре в течение 1 часа, после чего измеряли оптическую плотность проб на спектрофотометре "Multiscan MCC" при длине волны 690 нм и рассчитывали концентрацию белка в препарате. В качестве стандарта использовали раствор БСА в 0,2 N NaOH.

2.5. Получение ацетилированных ЛНП

ЛНП ацетилировали уксусным ангидридом по методу Vasu с соавт. [86]. Для этого препарат нативных ЛНП диализовали против 2000 объемов 0,15M NaCl при 4°C (две смены по 12 часов). ЛНП переносили в стеклянную пробирку, которую устанавливали в ледяной бане с постоянным встряхиванием. Для

предотвращения образования уксусной кислоты из ангидрида к препарату ЛНП медленно добавляли насыщенный раствор ацетата натрия. Уксусный ангидрид вносили из расчета 1,386 мкл/мг белка ЛНП. Рассчитанное количество уксусного ангидрида делили на пять частей и вносили дробно с 10 минутными перерывами при постоянном перемешивании. После последней добавки инкубацию продолжали еще 30 мин. Ацетилированные ЛНП диализовали против 2000 объемов 0,3 мМ ЭДТА рН 7,4 с пятикратной сменой диализующего раствора через каждые 3 часа, и еще дважды против 2000 объемов ИФБ в течение 24 часов при 4°C. Ацетилированные ЛНП стерилизовали путем фильтрации (диаметр пор фильтра 0,45 мкм).

2.6. Получение препаратов окисленных ЛНП

Окисленные ЛНП получали путем инкубирования липопротеидов в течение 18 часов при 37°C в присутствии 10 мкМ CuSO_4 [87].

2.7. Выделение и культивирование макрофагов человека

В качестве модели исследования использовали первичную культуру моноцитов человека, полученную из крови условно здоровых доноров. Кровь центрифугировали 20 минут, 300g, 21°C, затем отбирали плазму, клеточный осадок, содержащий форменные элементы крови, доводили до первоначального объема стерильным изотоническим фосфатным буфером (ИФБ). Полученную суспензию наслаивали на «Раствор фиколла» (ПанЭко, плотность 1,077 г/см³) и центрифугировали 30 минут, 300g, 21°C. Затем отбирали фракцию мононуклеарных клеток. Полученные клетки промывали трижды в ИФБ. Клетки ресуспендировали в 3 мл MACS-буфера, доводили MACS-буфером до 30 мл и

добавляли раствор парамагнитных наночастиц (CD14 MicroBeads, human) в количестве 100 мкл. Инкубировали в течение 30 минут при 4°C при постоянном перемешивании не более 100 об/мин. Затем промывали колонки для магнитной сортировки (установленные в магнит) 3 мл MACS-буфера перед нанесением образцов, после чего наносили суспензию клеток на колонку для магнитной сортировки. Промывали колонку 4 раза по 3 мл MACS-буфера. Далее вынимали колонку из магнита и ставили в открытую пустую стерильную 15-мл-ю пробирку. Затем смывали клетки с колонки 10 мл MACS-буфера, подсчитывали количество клеток. Суспензию клеток центрифугировали 10 мин, 300g, 21°C. Клеточный осадок ресуспендировали в среде RPMI или X-Vivo 10 (Lonza) в зависимости от типа эксперимента в концентрации 10^6 клеток на мл.

2.8. Определение содержания внутриклеточного холестерина

Внутриклеточные липиды трижды экстрагировали смесью гексана и изопропанола (3:2, объем/объем) по методу Nara and Radin [88], каждая экстракция продолжалась по 30 мин. Экстракт переносили в чистый 96-гнездный микротест и высушивали при комнатной температуре в токе воздуха. Полученный сухой осадок растворяли в 25 мкл раствора, содержащего 15 мМ холат натрия и 0,05% Тритон X-100 (Sigma Chemical Company, США), добавляли по 25 мкл изопропанола и по 100 мкл раствора "Monotest" (Boehringer Mannheim, ФРГ) для определения общего холестерина, содержащего 0,2 Ед/мл холестеринэстеразы, 0,1 Ед/мл холестериноксидазы, 0,1 Ед/мл пероксидазы хрена, 1 мМ 4-аминофеназон, 3 мМ фенол и 2 мМ 3,4-дихлорфенол в 50 мМ Трис-буфере, pH7,7. В качестве стандарта использовали стандартный раствор холестерина в изопропаноле, 1 мг/мл (Boehringer Mannheim, ФРГ). Смесь инкубировали при 37°C в течение 30 мин, после чего измеряли оптическую плотность проб при длине волны 492 нм на

автоматическом 8-канальном спектрофотометре "Multiscan MCC" (LabSystems, Финляндия) и рассчитывали содержание общего холестерина в каждой пробе.

2.9. Определение клеточного белка

Фиксированные на пластике клетки после экстракции липидов растворяли в 50 мкл 0,2 N NaOH при комнатной температуре в течение 12-16 часов, после чего определяли содержание клеточного белка в каждой пробе по методу Lowry [85]. К пробе добавляли 200 мкл свежеприготовленного 0,2 н. раствора NaOH, содержащего 0,01% тартрата калия-натрия, 0,005% сульфата меди и 0,02% карбоната натрия, затем 20 мкл 1 N реактива Фолина (Sigma Chemical Company, США) и выдерживали при комнатной температуре в течение 1 часа, после чего измеряли оптическую плотность проб на спектрофотометре "Multiscan MCC" при длине волны 690 нм и рассчитывали содержание клеточного белка в каждой пробе. В качестве стандарта использовали раствор БСА в 0,2 N NaOH, 1 мг/мл.

2.10. Фиксация клеток для конфокальной микроскопии

Клетки, посаженные на стекла и проинкубированные с ЛНП промывались 2 раза 1 мл PBS (очень медленно). В каждую лунку добавлялся 1 мл 2% параформальдегида (PFA) в PBS на точно фиксированное время – 10 минут (очень медленно). PFA удалялся из лунок и добавлялся 1 мл 0.5% Triton-X 100 в PBS точно на 15 минут (медленно). После удаления раствора Triton-X 100 в лунку добавлялся 1 мл 4% PFA в PBS точно на 10 минут (медленно). Клетки промывались 3 мл PBS 3 раза по 10 минут на шейкере при 100 об/мин.

2.11. Конфокальная микроскопия

Использовался конфокальный микроскоп Leica TCS SP2 с 63x1.32 объективом. В качестве источника возбуждения были использованы аргоновый лазер на 488 нм, криптоновый лазер на 568 нм и гелий / неоновый лазер, излучающий на длине волны 633 нм. Данные были получены с помощью Leica Confocal Software.

2.12. Правила забора и подготовки аутопсийного материала

Аорты извлекали через 1,5-3 часа после смерти. Сосуды вскрывали продольно и промывали в ИФБ. Внешне непораженные участки аорт и участки с атеросклеротическими поражениями идентифицировали макроскопически в соответствии с классификацией Совета по атеросклерозу Американского Общества по изучению сердца [89, 90].

2.13. Иммуногистохимическое окрашивание

Из тканевых блоков аорты человека, были получены срезы, толщиной 5мкм. Далее, с целью снижения эндогенной пероксидазной активности, образцы были обработаны 3% H_2O_2 . После образцы инкубировали с неиммунной сывороткой животного, соответствующего используемым антителам. Далее образцы проверяли на неспецифическую реакцию, посредством обработки авидин-биотиновым комплексом (АВС) используя стандартный метод АВС. Затем образцы инкубировали с первичными антителами. После промывки в TPBS (tris-phosphate buffered saline), pH=7,6., кусочки инкубировали с соответствующими биотин-мечеными вторичными антителами, за которым

следовала обработка авидин-биотиновым комплексом (Elite ABC, Vector PK61000). После промывки TPBS, коричневое окрашивание было достигнуто путем 5-минутной обработки 3,3'-diaminobenzidine (DAB). Все инкубации проводились при комнатной температуре. В качестве негативного контроля были использованы фракции иммуноглобулинов неиммунной сыворотки животного, соответствующего первичным антителам.

2.14. Выделение РНК

После макроскопической идентификации были собраны образцы внешне непораженных и атеросклеротических участков аорты (начальные поражения, жировые полосы, липофиброзные и фиброзные бляшки). Затем механически удаляли медию и проводили выделение тотальной РНК из образцов интимы аорты человека с использованием реагента Тризол (Invitrogen, США) согласно рекомендации производителя [62].

Концентрацию и чистоту полученной РНК определяли с использованием спектрофотометра NanoPhotometer® (Implen, Германия). Получение конечного продукта высокого качества, свободного от примесей ДНК, позволяет с высокой специфичностью и чувствительностью обнаружить мРНК с помощью обратной транскрипции. Синтез кДНК проводили с использованием набора реактивов ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega, США) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя.

Выделение тотальной РНК из культур клеток для измерения экспрессии TNF и CCL18 проводили аналогичным образом.

Выделение РНК для транскриптомного анализа проводили с использованием набора RNeasy mini-kit (Qiagen, США) согласно протоколу производителя.

2.15. Метод ПЦР в реальном времени

Уровень экспрессии мРНК анализируемых генов TNF и CCL18 оценивали методом ПЦР в режиме реального времени на приборе 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США). Для амплификации использовали реакционную смесь и праймеры производства фирмы «Синтол» (Россия). В качестве флуорофора для детекции продуктов был использован интеркалирующий краситель SYBR GreenI. Для каждого исследуемого образца реакцию ПЦР-РВ ставили не менее трех раз. Уровень мРНК анализируемых генов выравнивали по отношению к усредненным данным амплификации двух генов неизменного уровня экспрессии GAPDH и CAP1.

В работе использовались праймеры со следующими нуклеотидными последовательностями: для GAPDH – 5'-actttggtatcgtggaaggact-3' и 5'-gtagaggcagggatgatgttct-3', для CAP1 – 5'-attccctggattgtgaaatagtc-3' и 5'-attaaagtcaccgccttctgtag-3', для TNF – 5'-gcttgtcctcagccttct-3' и 5'-ggtttgctacaacatgggcta-3', и CCL18 – 5'-ccaggtgtcatcctcctaacca-3' и 5'-aatgtggctgggcatagcaga-3'.

2.16. Секвенирование РНК

Подготовка библиотек проводилась с использованием TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit согласно протоколу производителя. Секвенирование РНК проводилось с использованием прибора MiSeq (Illumina) согласно протоколу производителя.

2.17. Анализ качества чтений и их предобработка

Входными данными для анализа являются парные чтения, полученные в результате секвенирования транскриптомного образца. Анализ состоит из трех основных этапов: предобработка чтений, дедупликация чтений и подсчет ридкаунтов (Рисунок 5).

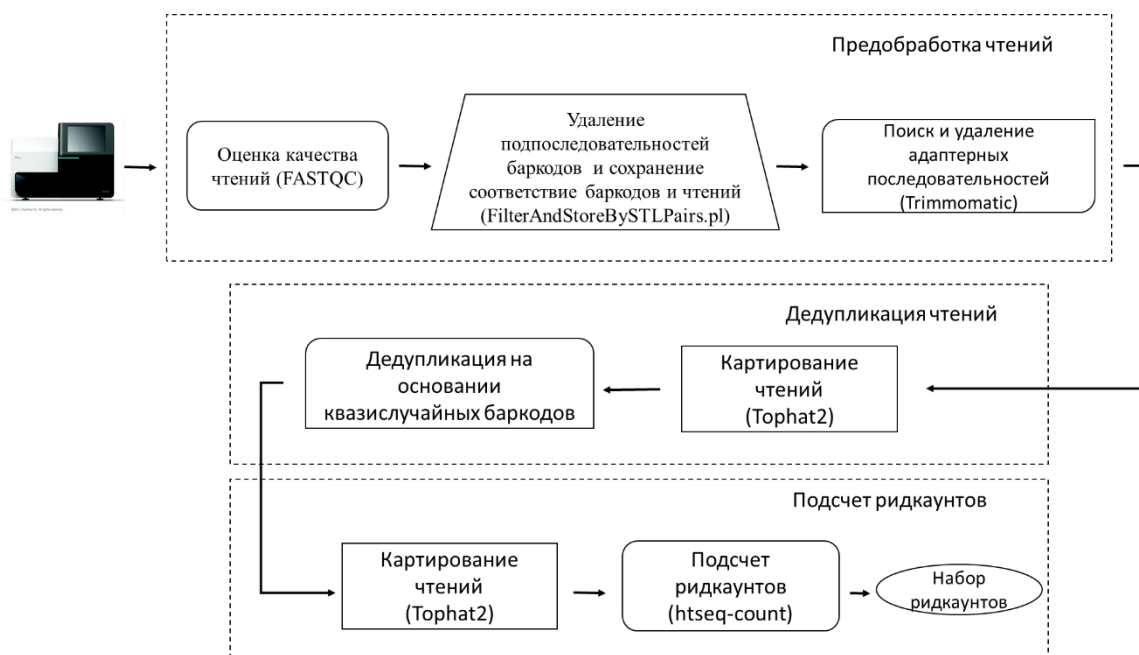


Рисунок 5. Структурная схема программного конвейера для первичной обработки результатов секвенирования транскриптомных образцов

Стандартная первичная обработка данных секвенирования проводилась с использованием пакета Torrent Suite и экспортировалась в формат представления нуклеотидных последовательностей FASTQ. Файлы формата FASTQ представляют из себя текстовые файлы, содержащие для каждой нуклеотидной последовательности саму эту последовательность, а так же информацию о качестве прочтения. Качество прочтения представлено в следующем виде: $Q = -10 \log_{10} P$, где p – это вероятность неверного прочтения нуклеотида в данной позиции.

Перед проведением автоматических процедур по подготовке наборов чтений производится ручная оценка качества секвенирования образца. Для этого

используется программа FASTQC . Данная программа на основе информации о значениях качества для каждого прочитанного нуклеотида в файлах формата FASTQ строит распределение значений качества по всем чтениям для каждой позиции. Таким образом, можно оценить насколько достоверна информация, полученная в результате секвенирования и возможно ли ее использовать в дальнейшем анализе. Благодаря такому контролю можно отследить резкое изменение качества секвенирования конкретных образцов и подтвердить необходимость их дополнительного секвенирования.

Специфика анализируемых данных такова, что они содержат специальные технические последовательности, так называемые квазислучайные баркоды. Они необходимы для проведения более точной процедуры дедупликации. Под дедупликацией имеется ввиду удаление последовательностей, представляющих собой артефакты амплификации. Проведение дедупликации позволяет увеличить точность процедуры определения дифференциально экспрессирующихся генов. К сожалению, использовать чтения, содержащие в своем составе квазислучайные баркоды без их удаления невозможно. Поэтому производится процесс удаления подпоследовательностей, соответствующих квазислучайным баркодам из последовательностей чтений и сохранение таблицы соответствия каждого конкретного чтения последовательности входящего в него баркода.

Далее чтения, не содержащие последовательности баркодов, подвергаются проверке на наличие адаптерных последовательностей. Необходимость такого типа предобработки связана с тем, что в ряде случаев целевая последовательность может быть меньше последовательности чтения, поэтому возможна ситуация, когда оказывается прочитана адаптерная последовательность с дальнего конца секвенируемого фрагмента ДНК, что может значительно затруднить дальнейший анализ. Для проведения указанных операций используется программа Trimmomatic [91].

Программа осуществляла удаление технических последовательностей, а так же триммирование чтений с использованием метода «скользящего окна». Тримминг методом «скользящего окна» заключается в том, что с конца ряда

считается среднее качество в различных окнах и анализ заканчивается в том случае, если достигается среднее качество в окне, превышающем заданный порог, далее отсекается конец чтения до этого окна.

2.18. Картирование чтений на геном *H. sapiens*

В качестве референсной последовательности использовался геном *H. sapiens* версии GRCh38. После удаления адаптерных последовательностей чтения готовы к проведению дедупликации. Данный процесс состоит из двух этапов (Рисунок 6). На первом этапе чтения картируются на референсный геном. На основе, полученных картирований устанавливаются наборы чтений, соответствующих одним и тем же позициям в геноме. Для чтений входящих в такие наборы производится проверка баркодов, в случае если набор содержит поднаборы чтений с одинаковыми баркодами, то чтения входящие в такие поднаборы считаются дубликатами и из них выбирается один представитель.

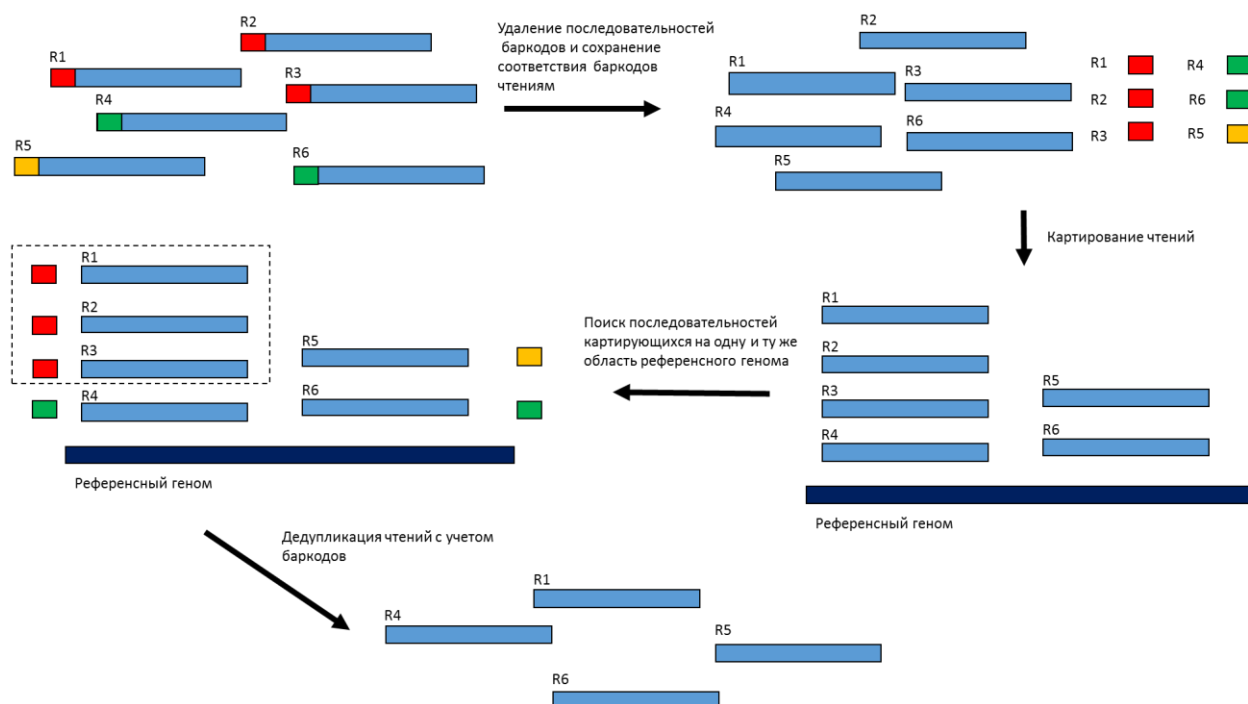


Рисунок 6. Дедупликация чтений с использованием квазислучайных баркодов

Картирование чтений осуществляется с использованием программы TopHat2 [92]. Данная программа позволяет картировать RNA-seq чтения на геномную последовательность. В своем составе TopHat2 использует программу bowtie2 [93] и осуществляет многостадийное картирование, как полных последовательностей чтений, так и их частей, что позволяет учесть экзон – интронную структуру гена эукариот.

Вследствие наличия экзон-интронной структуры чтения мРНК отличаются от сегментов генома и в местах соединения двух экзонов необходимо их разрывать и картировать получившиеся части ридов независимо. Именно это и делает TopHat2. На первом этапе он использует bowtie2 для картирования чтений на геном. В результате получается некоторая доля чтений, для которых не удастся найти геномное соответствие. Чтения из этой фракции в дальнейшем разделяют на части и картируют их повторно. Таким образом, удастся достичь достаточно высокого качества картирования.

2.19. Подсчет числа ридкаунтов

Для подсчета числа ридов, соответствующих генам (так называемых ридкаунтов), используется программа htseq-count [94]. Разметка генов по геному бралась соответствующая версии аннотации геном *H. sapiens* – GRCH38.76.

2.20. Поиск дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ)

Для определения генов, для которых наблюдается дифференциальная экспрессия использовалась программа edgeR, входящая в состав системы

статистического анализа R. Программа edgeR использует метод обобщенных линейных моделей. Была выбрана однофакторная модель, содержащая в качестве фактора наличие/отсутствие накопления холестерина макрофагами. Для построения модели использована программа glmFit, входящая в состав пакета edgeR. Гены были сортированы по значениям отношений квазиправдоподобия, вычисленного с помощью программы glmLRT.

Для определения ДЭГ для дальнейшего выявления сигнальных путей был использован другой метод - RankProd [95], непараметрический метод для поиска дифференциально экспрессирующихся генов, основанный на оценочном проценте ложных предсказаний. RankProd - это алгоритм мета-анализа, позволяющий получить единый список генов, включающий в себя те гены, которые показывают приблизительно аналогичное поведение по разным видам исходных образцов.

Применение данного позволило нам провести ранжирование генов по совокупному значению экспрессий каждого конкретного гена в различных группах сравнения. Это также позволило составить список генов, которые в среднем ап-регулируются, и список генов, которые в среднем даун-регулируются.

Ранг гена высчитывается путем суммирования его рангов во всех типах сравнений и дальнейшем упорядочивании полученных сумм рангов для всех генов в порядке возрастания. Процедура упорядочивания проводилась отдельно для ап- и для даун-регулированных генов.

2.21. Функциональный анализ ДЭГ

Анализ обогащения генов по различным категориям болезней был проведен с помощью метода GSEA (gene set enrichment analysis) [96].

2.22. Анализ сайтов связывания транскрипционных факторов

Сайты связывания транскрипционных факторов промотеров ДЭГ-ов были анализированы с использованием известных ДНК-связывающих последовательностей, представленных в библиотеке TRANSFAC® library, release 2014.4 (BIOBASE, Wolfenbüttel, Germany) (<http://genexplain.com/transfac>). Последовательности представлены с использованием матриц взвешенных позиций (PWMs, position weight matrices), которые оценивают «вес» каждого нуклеотида в каждой позиции участка связывания ДНК с транскрипционным фактором или группы факторов.

Платформа geneXplain предоставляет инструменты для идентификации сайтов связывания факторов транскрипции, которые обогащены исследуемыми промоторами по сравнению с набором фоновых последовательностей, такими как промоторы генов, которые не были дифференциально экспрессированы в условиях эксперимента [97, 98].

Для дальнейшего анализа были рассмотрены только те сайты связывания факторов транскрипции, которые достигли отношения Да / Нет > 1 и значения $P < 0,01$. Платформа также сопоставляет матрицы с потенциальными факторами транскрипции и генерирует визуализацию всех результатов.

2.23. Прогноз образования комплексов сайтов связывания факторов транскрипции

Был применен алгоритм Composite Module Analyst [99], позволяющий спрогнозировать образование комплексов сайтов связывания ТФ, совместно регулирующих группы генов и белков, стоящих ниже уровнем по иерархии передачи сигналов внутри клетки. В результате применения алгоритма

Composite Module Analyst были выявлены комплексы факторов транскрипции. В результате применения фильтрации по разумному пороговому значению достоверности были отобраны транскрипционные факторы, перспективные для дальнейшего анализа.

2.24. Поиск мастер-регуляторов

Поиск мастер-регуляторов производился среди молекул, стоящих выше по иерархии в сигнальных путях, чем выявленные факторы транскрипции с использованием инструментов платформы geneXplain. Поиск проводился с использованием базы данных TRANSPATH® database (BIOBASE) [100]. Основной алгоритм поиска главных регуляторов описан ранее [97]. Целью алгоритма является поиск ключевых узлов в глобальной сети передачи сигналов, которые могут потенциально регулировать активность набора факторов транскрипции, найденных на предыдущем этапе анализа. Такие узлы считаются наиболее перспективными мишенями для лекарств, поскольку любое влияние на такой узел может переключать транскрипционные программы сотен генов, которые регулируются соответствующими факторами транскрипции. В данном анализе был выполнен алгоритм с максимальным радиусом 10 шагов вверх по глобальной сети передачи сигналов от каждого фактора транскрипции в наборе входных данных (см. подробное описание в [97]).

2.25. Статистическая обработка

Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения Graph Pad Prism 5. Данные представлены как среднее \pm стандартная

ошибка среднего. Индивидуальные парные сравнения выполнялись с использованием t-критерия Стьюдента. $p < 0,05$ считалось достоверным.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Оценка атерогенных свойств сыворотки крови больных ишемической болезнью сердца

Была получена сыворотка крови от 97 практически здоровых лиц (62 мужчин и 35 женщин в возрасте 24-57 лет), которые не имели анамнеза сердечно-сосудистых заболеваний и 156 больных ишемической болезнью сердца (114 мужчин и 42 женщин в возрасте 28-59 лет) с документированным стенозом от 1 до 3 коронарной артерии.

Моноциты выделяли из крови здоровых доноров. На 7-ой день культивирования первичной культуру инкубировали в течение 24 часов в среде RPMI, содержащей от 10 до 60% сыворотки здоровых людей. В большинстве случаев это не вызывало никаких изменений в уровне внутриклеточного холестерина. В то же время культивирования клеток в течение 24 часов в среде, содержащей 20% или более сыворотки больных ИБС приводило к двух-четырёхкратным увеличению внутриклеточного холестерина. Для оценки влияния иммунологической совместимости сыворотки крови и моноцитов от разных испытуемых, проводили инкубацию моноцитов с делипидированной сывороткой, которая не приводила к морфологическим изменениям клеток, накоплению внутриклеточного холестерина или изменению экспрессии TNF моноцитами.

Продолжительное культивирование клеток в течение 48 и 72 часов в среде, содержащей 40% сыворотки больных ИБС привело к дальнейшему увеличению внутриклеточного холестерина. В течение 72 часов уровень холестерина в этих клетках превышал в четыре-шесть раз уровень в клетках, культивируемых в присутствии 10% фетальной телячьей сывороткой (контроль), т.е. такие сыворотки были атерогенными. Атерогенность крови была выявлена у 12

здоровых лиц (11,6%) и у 134 (85,9%) больных ИБС (Рисунок 7). Численные данные приведены в приложении (Таблица 6).

Полученные результаты требовали изучить характер взаимодействия атерогенных ЛНП с макрофагами человека и оценить последствия этого взаимодействия.



Рисунок 7. Распространенность атерогенных и неатерогенных сывороток крови в группах здоровых лиц и больных ИБС.

3.2. Внутриклеточное распределение липидов при взаимодействии нативных и атерогенных ЛНП с макрофагами человека

Была исследована разница во взаимодействии нативных и атерогенных ЛНП с макрофагами человека. Атерогенные ЛНП, выделенные из крови больных атеросклерозом, вызывали 2-кратное накопление общего холестерина в культуре макрофагов человека (Рисунок 8).

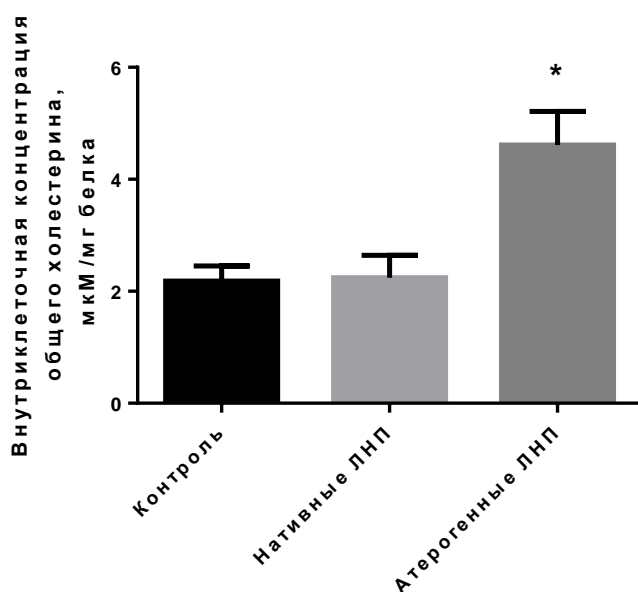


Рисунок 8. Накопление внутриклеточного холестерина макрофагами под влиянием атерогенных ЛНП

Для оценки разницы в характере взаимодействия атерогенных ЛНП по сравнению с нативными ЛНП было проведено изучение внутриклеточного распределения нативных и атерогенных ЛНП.

На рисунке (Рисунок 9, сверху) представлено внутриклеточное распределение нативных ЛНП (красный цвет), которые чаще всего встречаются в крови здоровых, которые были добавлены в культуру макрофагов на 4 часа.

Распределение нативных ЛНП в основном имел дисперсный характер. Последовательное добавление двух порций нативных ЛНП (зеленый и красный цвета) показало, что разные порции нативных ЛНП распределены в одних и тех же участках клетки (Рисунок 9, снизу).

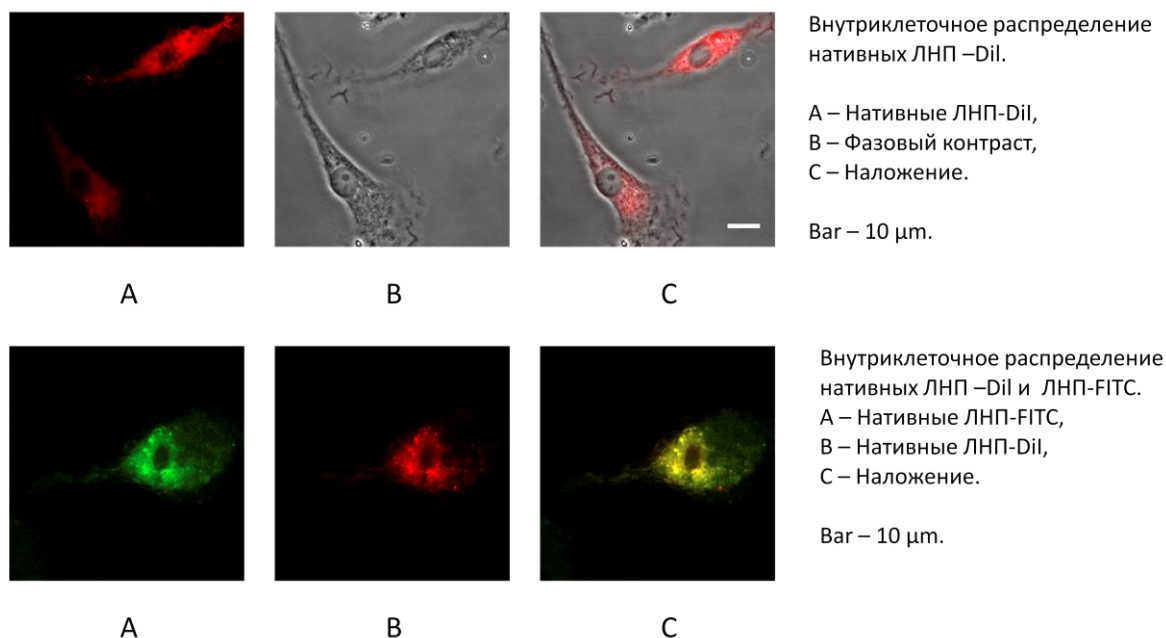


Рисунок 9. Внутриклеточное распределение нативных ЛНП

В отличие от нативных ЛНП, модифицированные ЛНП накапливались в клетке компактно, а не дисперсно (Рисунок 10). В нижней части рисунка зеленые и красные модифицированные ЛНП добавлялись в культуру последовательно. Видно, что различные порции атерогенных ЛНП могут накапливаться в разных участках клетки.

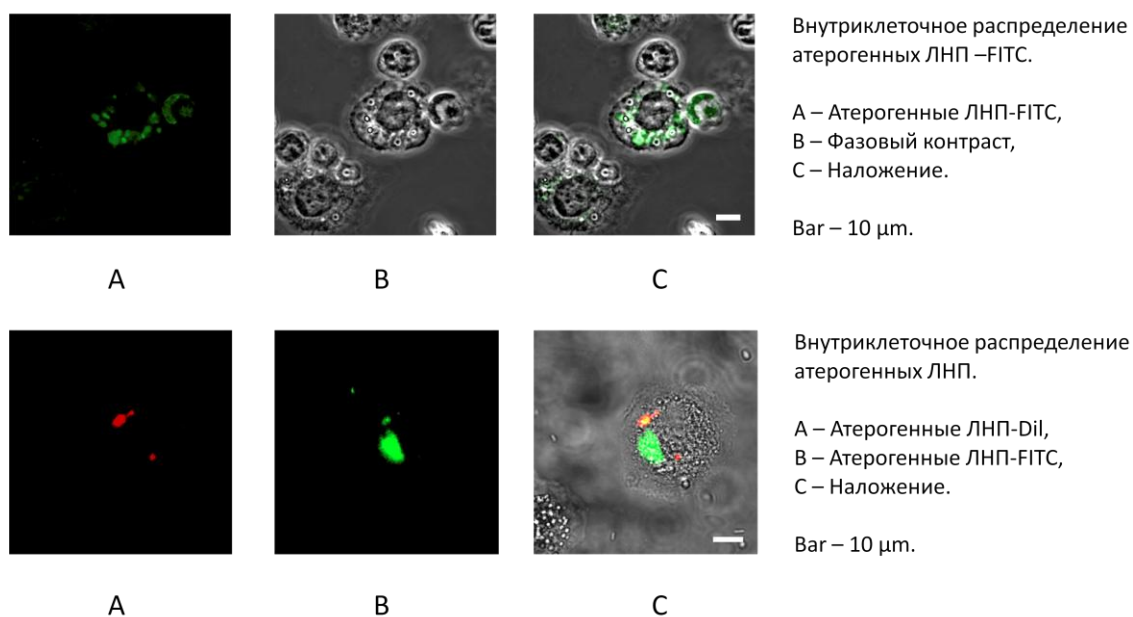


Рисунок 10. Внутриклеточное распределение атерогенных ЛНП

На рисунке ниже (Рисунок 11) к клеткам добавили смесь из нативных ЛНП (зеленый) и атерогенных (красный) ЛНП. Внутриклеточное распределение атерогенных ЛНП позволяет предположить, что атерогенные ЛНП были агрегированы. Это предположение согласуется с другими исследованиями, подтверждающими, что атерогенные ЛНП склонны к самоассоциации [101]. Клетки, инкубированные с атерогенными ЛНП, также отличались от инкубируемых с нативными ЛНП морфологически, имея более округлый вид с меньшими по размеру отростками.

Очевидные различия во внутриклеточном распределении частиц свидетельствуют о том, что взаимодействие атерогенных ЛНП с клетками принципиально отличается от взаимодействия нативных ЛНП. Возникает вопрос, в чем проявляется эта разница? Мы решили выяснить, как меняется активация макрофагов при накоплении холестерина под влиянием атерогенных ЛНП по сравнению с нативными ЛНП.

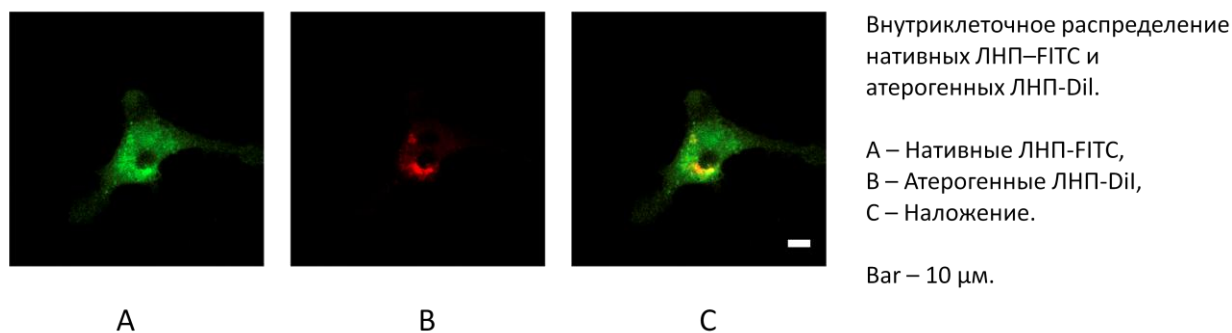


Рисунок 11. Взаимное внутриклеточное распределение нативных и атерогенных ЛНП

3.3. Исследование экспрессии TNF и CCL18 в пораженной и непораженной интиме аорты человека

Известно, что атеросклероз сопровождается хроническим воспалением. Однако, неизвестно, почему в одних участках артерий иммунная реакция быстро заканчивается, а в других воспаление становится хроническим. Для оценки связи про- и противовоспалительных реакций в атеросклеротическом поражении была проведена оценка взаимного распределения провоспалительного цитокина TNF и противовоспалительного хемокина CCL18.

Окраска на TNF проводилась с использованием комплекса авидин-биотин-пероксидаза и представлена коричневым цветом. Окраска на CCL18 проводилась с использованием субстрата Fast-Red и представлена красным цветом (Рисунки 12-16).

Продукция CCL18 в непораженной интиме (Рисунок 12 А) в большей степени локализована в субэндотелиальном пространстве. Следует отметить, что интенсивность окраски на CCL18 обычно была низкой. В некоторых областях выявлена фокальная интенсивная экспрессия CCL18 в субэндотелиальном пространстве (Рисунок 12 С). В отличие от CCL18, TNF был локализован

преимущественно в более глубоких областях интимы (Рисунок 12 А, В). Также в более глубоких частях интимы встречались области, где клетки, продуцирующие TNF, находились в непосредственной близости от клеток, продуцирующих CCL18 (Рисунок 12 А, В).

В начальных атеросклеротических поражениях глубокие участки интимы, а также фокальные очаги, расположенные вдоль поверхности просвета, содержали клетки, экспрессирующие либо TNF, либо CCL18 (Рисунок 13 А-Д).

В атеросклеротических поражениях (Рисунок 14) наблюдались большие различия между субэндотелиальной областью интимы и более глубокими участками. Можно увидеть, что в субэндотелиальной области атеросклеротической бляшки в основном наблюдалась продукция CCL18 (Рисунок 14 А). В более глубоких слоях отмечается мозаичность локализации CCL18 (Рисунок 14 А, В) и TNF (Рисунок 14 А, С). Тем не менее, в некоторых областях клетки, экспрессирующие TNF, были расположены близко к микрообластям, иммуноположительных к CCL18 (Рисунок 15 А-Е, Рисунок 16А-Д).

Иммуногистохимическое окрашивание свидетельствует, что как в непораженной интиме, так и в атеросклеротических поражениях продуцируются и TNF, и CCL18. Однако, картины их распределения для разных типов поражений различны. Необходимо отметить, что не было найдено клеток, продуцирующих одновременно и TNF, и CCL18 (Рисунки 15,16).

Очевидно, что интенсивность окрашивания в атеросклеротической бляшки CCL18 и TNF выше, чем в непораженных участках. Следовательно, секреция цитокинов при атеросклерозе возрастает, что видно качественно.

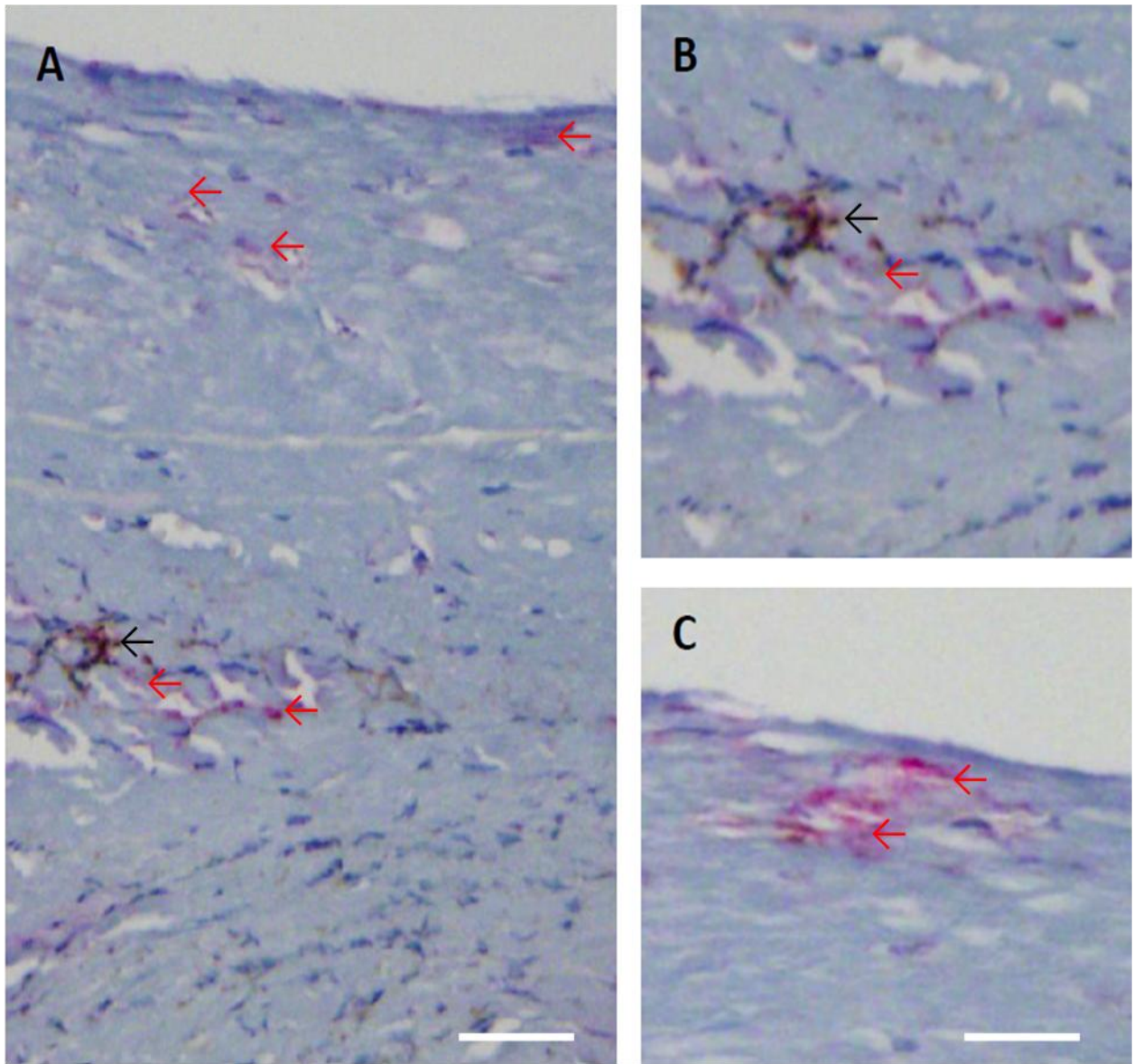


Рисунок 12. Двойное иммуногистохимическое окрашивание на TNF (коричневый) и SCL18 (красный) непораженной интимы аорты человека (А-С). В – увеличение А. Масштаб – 50 мкм(А), 25 мкм(С).

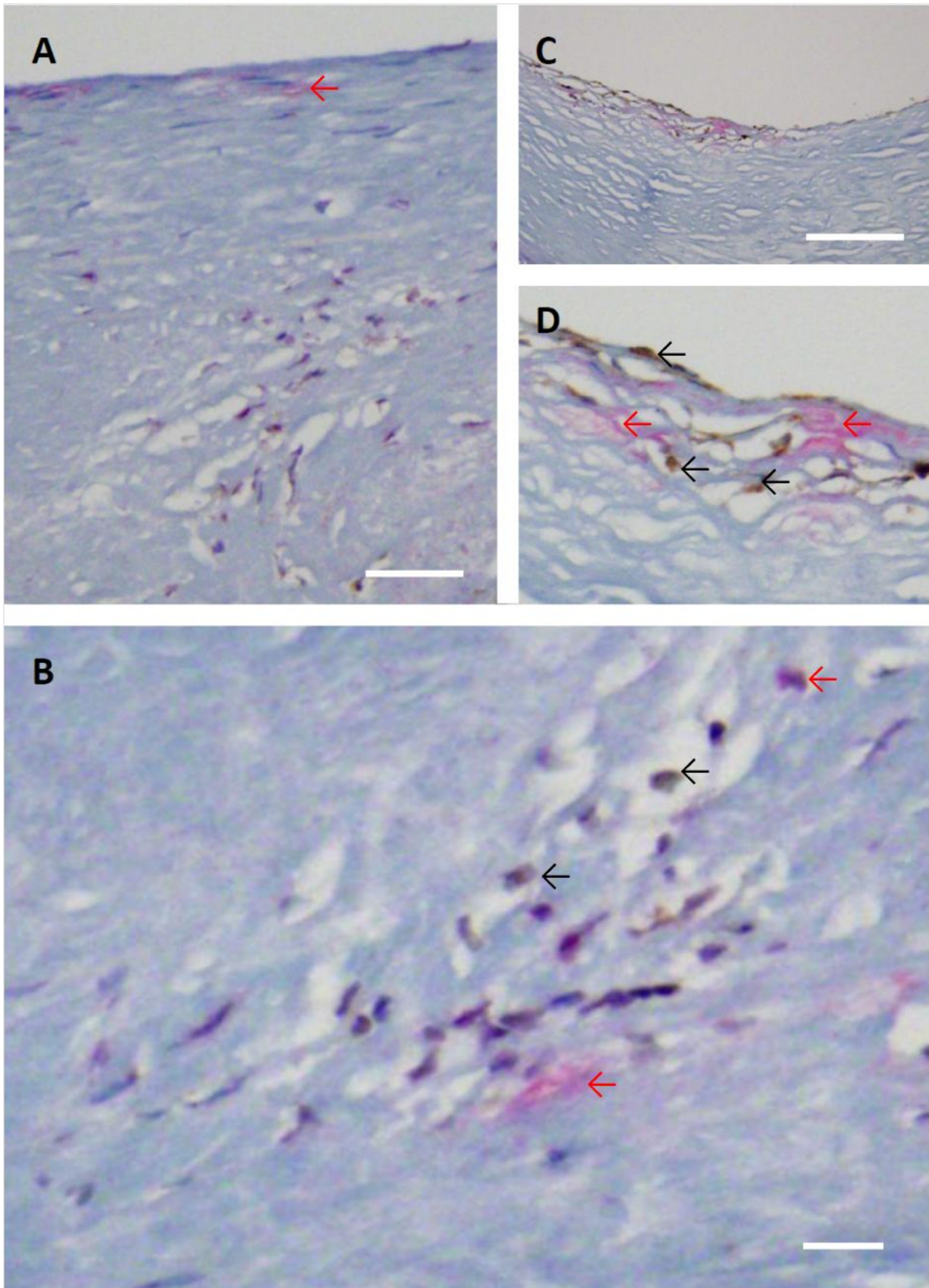


Рисунок 13. Двойное иммуногистохимическое окрашивание на TNF (коричневый) и CCL18 (красный) начального поражения интимы аорты человека (A-D). D – увеличение C. Масштаб – 50 мкм(A), 250 мкм(B)

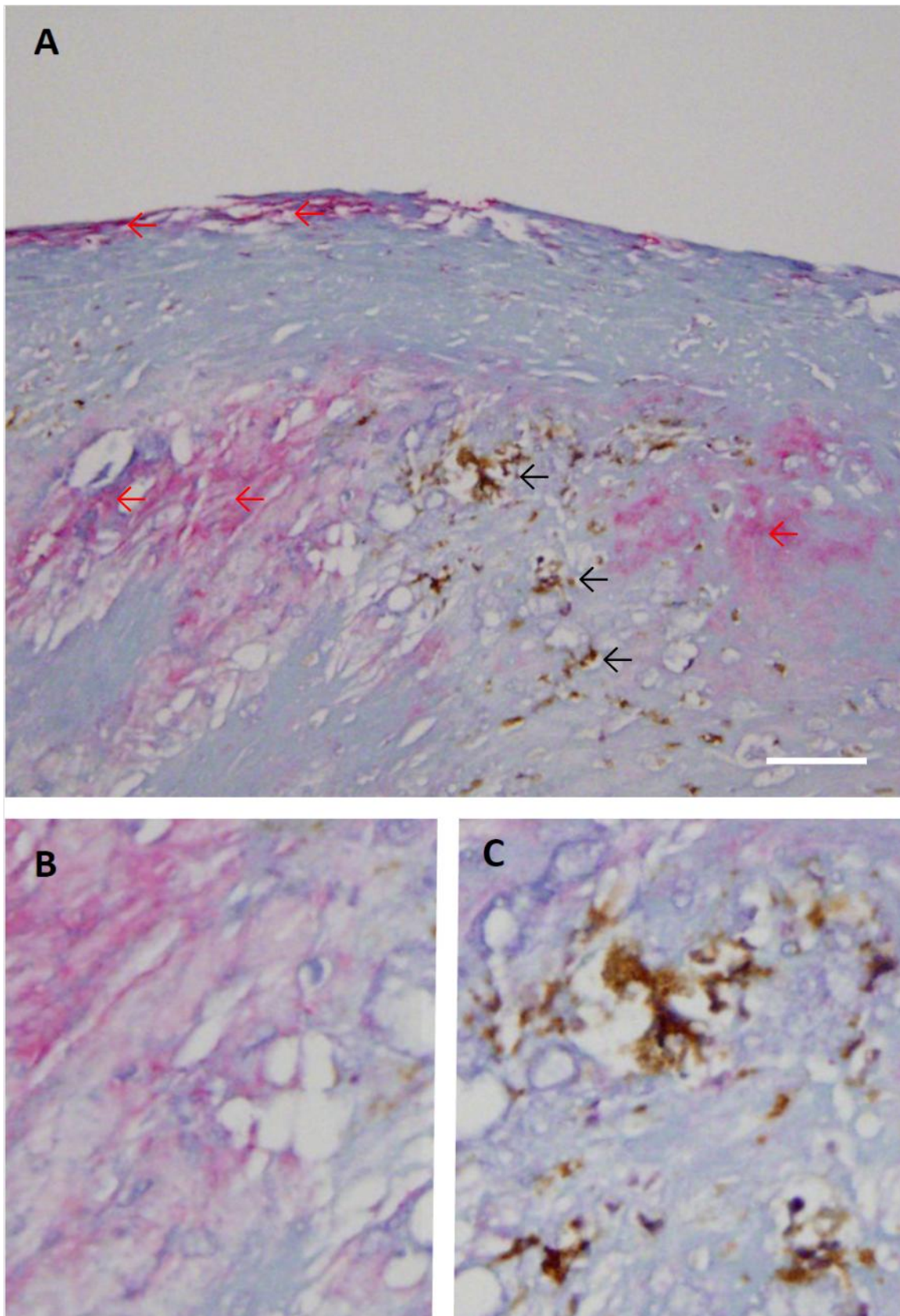


Рисунок 14. Двойное иммуногистохимическое окрашивание на TNF (коричневый) и CCL18 (красный) атеросклеротической бляшки интимы аорты человека (А-С). В и С – увеличения А. Масштаб – 100 мкм.

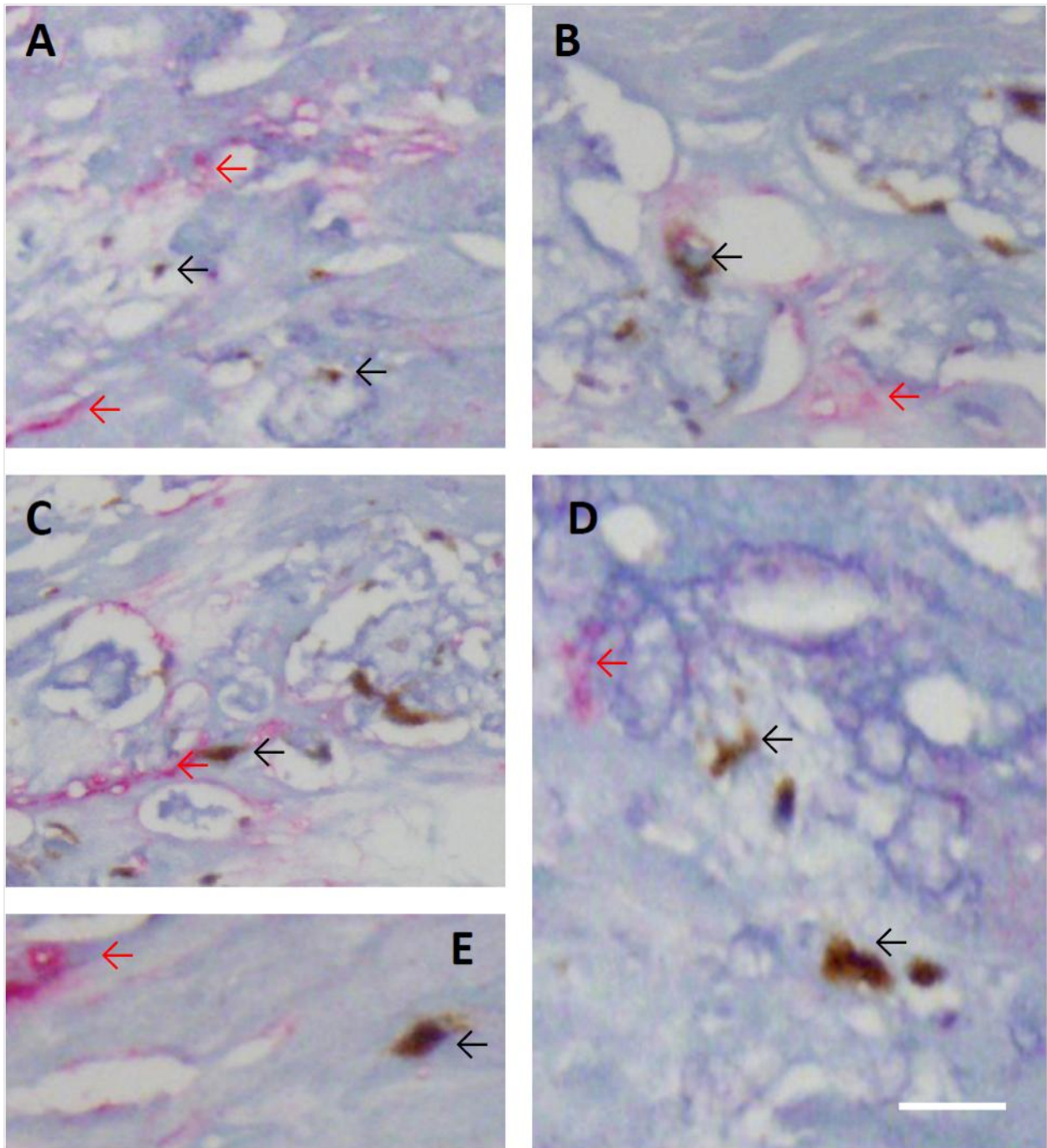


Рисунок 15. Двойное иммуногистохимическое окрашивание на TNF (коричневый) и SCL18 (красный) различных участков атеросклеротической бляшки интимы аорты человека (А-Е). Масштаб – 10 мкм.

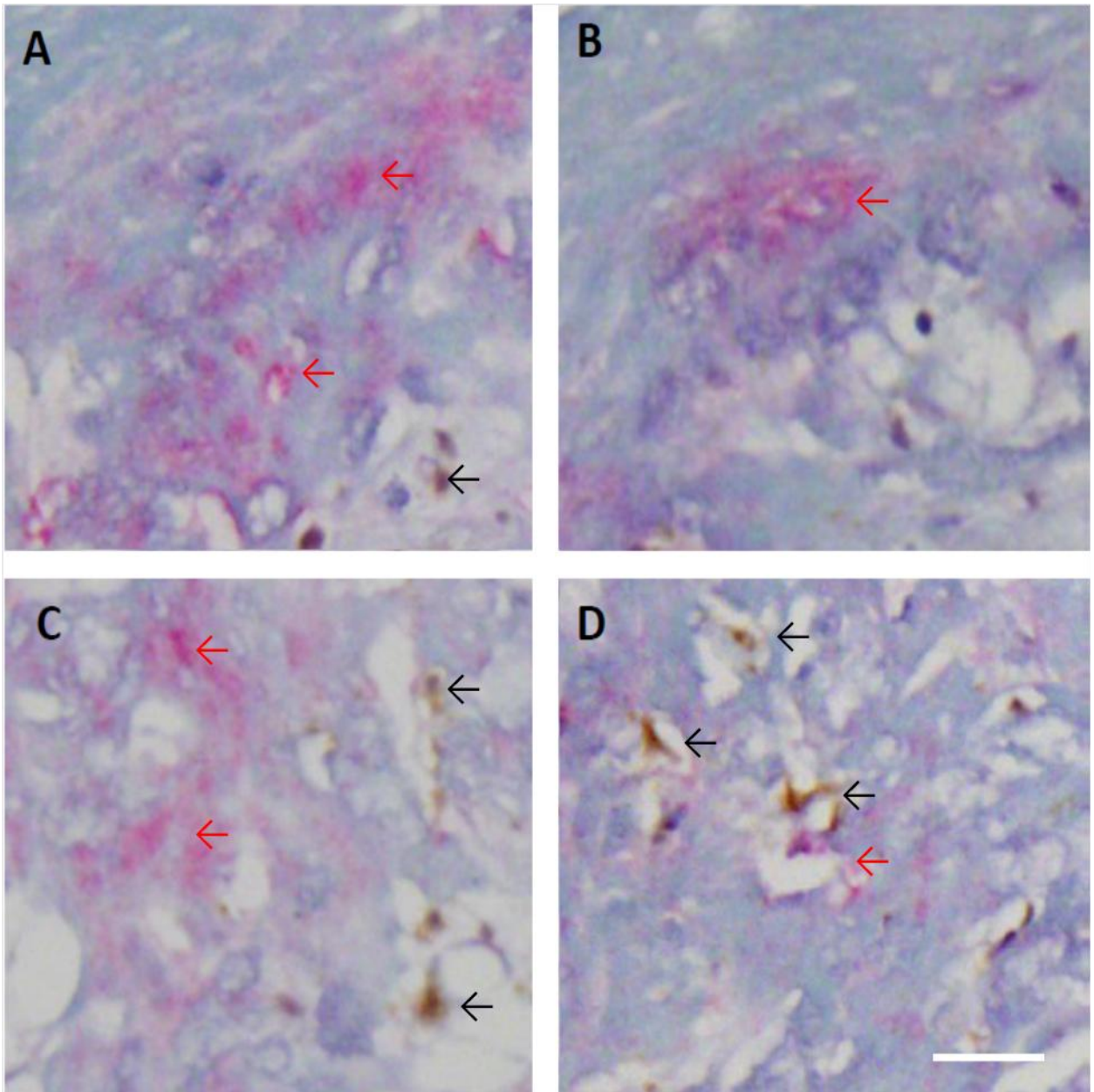


Рисунок 16. Двойное иммуногистохимическое окрашивание на TNF (коричневый) и CCL18 (красный) различных участков атеросклеротической бляшки интимы аорты человека (A-D). Масштаб – 20 мкм.

Для количественной оценки различий между непораженными участками и атеросклеротическим поражением было проведено измерение экспрессия генов соответствующих цитокинов с помощью ПЦР-РВ (Рисунок 17).

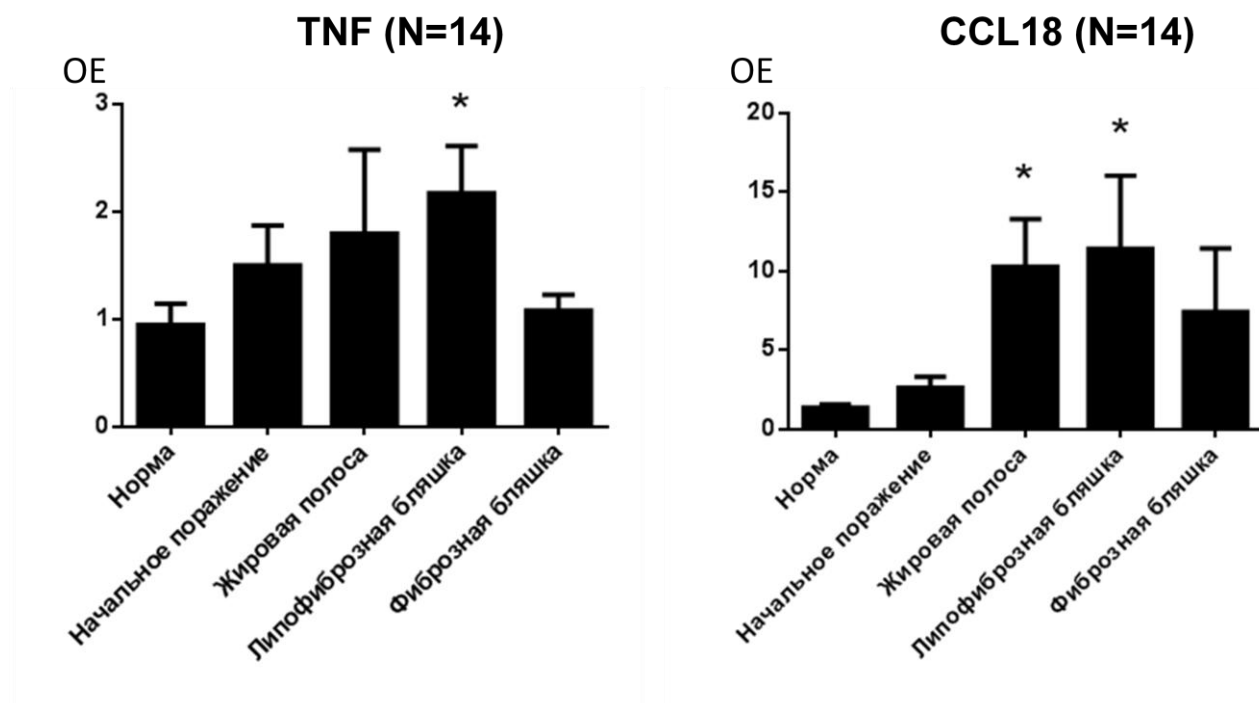


Рисунок 17. Экспрессия TNF и CCL18 в интима аорты человека. Уровень экспрессии представлен в относительных единицах (OE). За 1 был принят уровень экспрессии в норме.

Экспрессия гена TNF имела колоколообразный характер с максимумом в липофиброзной бляшке. Характер экспрессии гена CCL18 была аналогичной.

Липофиброзная бляшка характеризуется наибольшим содержанием липидов по сравнению с другими типами поражений. Это позволяет предположить о существовании связи между экспрессией TNF и CCL18 с накоплением внутриклеточных липидов.

Возникает вопрос, чем объясняется связь изменения экспрессии генов с накоплением липидов? Это стало предметом нашего следующего исследования.

3.4. Исследование активации макрофагов при взаимодействии с атерогенными ЛНП

Мы предположили, что изменение экспрессии генов могут быть обусловлены накоплением внутриклеточных липидов при взаимодействии клеток с атерогенными ЛНП.

Для проверки гипотезы экспрессию TNF и CCL18 измеряли в первичной культуре макрофагов человека, инкубированных со 100 мкг/мл нативных или атерогенных ЛНП в течение 24 часов. В культуре макрофагов атерогенные ЛНП вызвали повышенную экспрессию и TNF, и CCL18 по сравнению с нативными ЛНП (Рисунок 18). Таким образом, при накоплении холестерина макрофагами увеличивается экспрессия как про-, так и противовоспалительного маркера. Полученные результаты не позволяют сделать выводы в пользу только одной из общепринятых путей активации макрофагов нагруженных холестерином: M1 или M2. Мы решили выяснить, экспрессия каких генов активируется или репрессируется при накоплении холестерина под влиянием модифицированных ЛНП. Самым бесприоритетным представился способ анализа транскриптома.

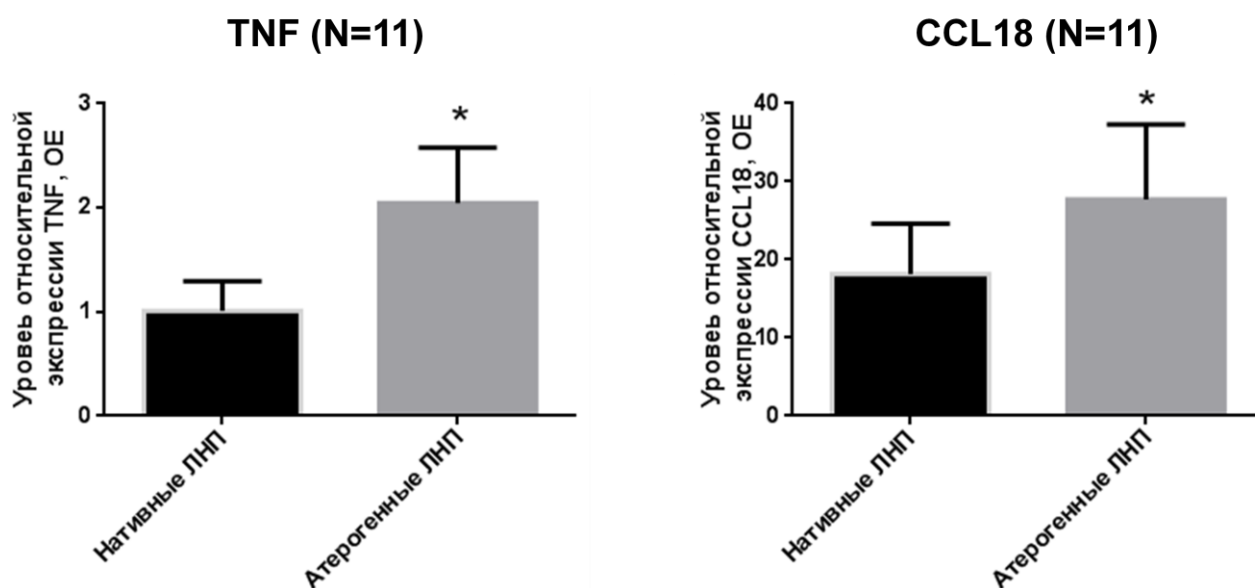


Рисунок 18. Экспрессия TNF и CCL18 макрофагами человека при взаимодействии с нативными и атерогенными ЛНП. Уровень экспрессии представлен в относительных единицах (OE). За 1 был принят уровень экспрессии в контрольной культуре.

3.5. Исследование транскриптома нагруженных холестерином макрофагов: поиск генов, экспрессия которых меняется вследствие накопления холестерина

В качестве индукторов накопления холестерина были выбраны две общепринятые химические модификации нативных ЛНП, приводящих к накоплению холестерина макрофагами человека: окисление и ацетилирование. Такой метод позволял использовать один и тот же препарат нативных ЛНП в качестве отрицательного контроля, который затем химически модифицировали. Это позволило обеспечить высокую степень стандартизации, необходимую для проведения транскриптомного анализа.

В первичную культуру макрофагов человека добавляли нативные или химически модифицированные ЛНП (окисленные или ацетилированные) и инкубировали в течение суток. Далее проводили транскриптомный анализ с целью узнать, экспрессия каких генов меняется при накоплении липидов.

Окисленные и ацетилированные ЛНП обладали повышенной электрофоретической подвижностью по сравнению с нативными ЛНП (Рисунок 19).

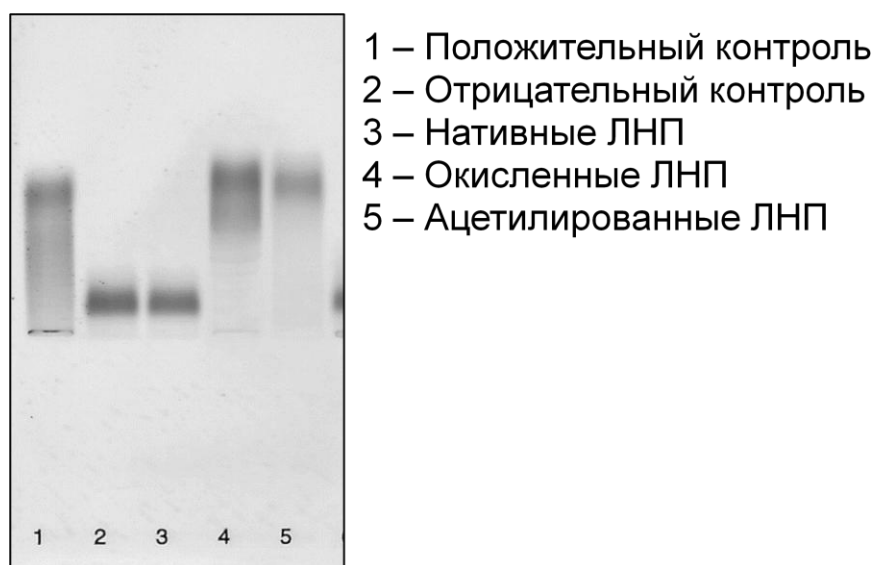


Рисунок 19. Электрофоретическая подвижность ЛНП

Окисленные и ацетилированные ЛНП вызывали накопление эфиров холестерина (Рисунок 20).

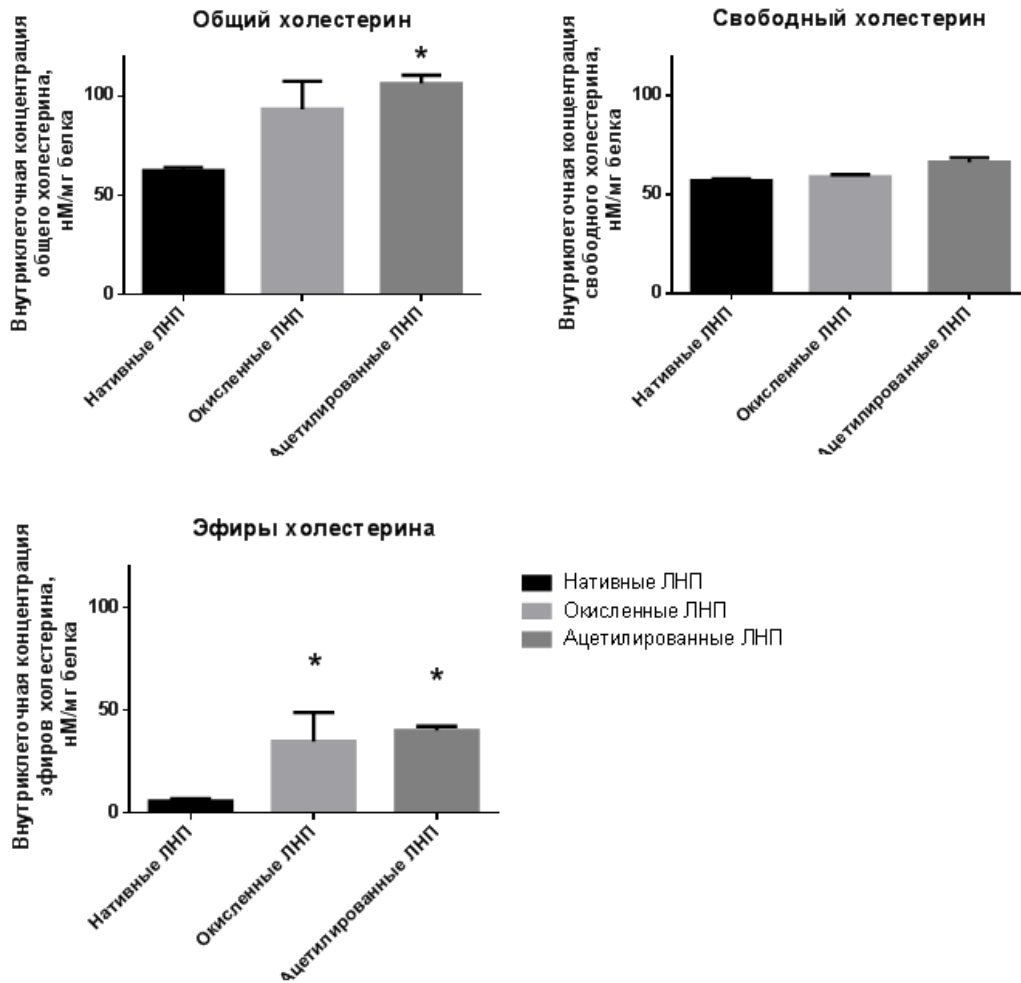


Рисунок 20. Влияние окисленных и ацетилированных ЛНП на внутриклеточный уровень общего холестерина, свободного холестерина и эфиров холестерина макрофагов

Данные секвенирования РНК анализировали с использованием метода «восходящего анализа», выполненного на платформе GenExplain [69]. Цель этого метода состоит в том, чтобы идентифицировать так называемые основные регуляторы в сетях регуляции генов, которые контролируют изучаемый патологический процесс и потенциально могут считаться фармакологическими мишенями. Восходящий анализ состоит из трех этапов. Сначала идентифицируются дифференциально экспрессирующиеся гены (ДЭГ) с помощью современных инструментов биоинформатики. Затем анализируются

промоторы ДЭГ с помощью выявления факторов транскрипции, которые могут регулировать наблюдаемое изменение экспрессии генов. Наконец, осуществляется поиск потенциальных мастер-регуляторов с использованием алгоритма анализа сетей регуляции генов, исходя из списка факторов транскрипции, выявленных на предыдущем шаге.

Для определения набора генов, демонстрирующих дифференциальную экспрессию между образцами, инкубированными с нативными или модифицированными ЛНП, был использован метод Limma ко всем парным сравнениям. За этим последовал анализ результатов попарного сравнения RankProd.

В результате было получено 4573 ап-регулируемых и 4072 даун-регулируемых гена. Среди них 93 ап-регулируемых гена (см. Приложение, Таблица 7) и 54 даун-регулируемых гена различались достоверно (см. Приложение, Таблица 8).

Платформа EnrichR была использована для полного списка генов, экспрессия которых менялась при накоплении холестерина для оценки функций идентифицированных генов [102]. EnrichR включает информацию о дифференциальной экспрессии генов и их роли в биологических процессах, сигнальных путях и заболеваниях. Наибольшие изменения в экспрессии генов наблюдались в группах генов, участвующих в реакциях иммунного ответа (Таблица 2).

Таблица 2. Онтология генов, активность которых меняется при накоплении холестерина макрофагами человека. В таблице представлены биологические процессы наибольшим образом соответствующие выявленным генам. Покрытие означает количество выявленных генов, относящихся к данному биологическому процессу/общее количество генов, участвующих в данном процессе. Таблица получена с помощью платформы EnrichR.

ID	Покрытие	Гены
inflammatory response (GO:0006954)	40/376	CCL13;CEBPA;CIITA;NOTCH1;NCF1;AK7;IRG1;CRHBP;HRH1;MMP25;CLEC7A;STAB1;SCN9A;ADORA1;SPP1;C3AR1;BLNK;AOX1;LTA4H;IL6R;APOL3;CCL24;CAMK1D;CCL20;SPHK1;PLA2G4C;SERPINF2;IL18;CYBB;FOS;HCK;TPST1;TLR8;SDC1;TLR7;PRKCQ;SIGLEC1;TLR5;S100A9;S100A8
cell chemotaxis (GO:0060326)	23/155	CCL24;CCL13;NRP1;EDN1;TGFB2;CXADR;CCL20;HGF;ARHGEF16;PDGFB;PPBP;CORO1A;CXCL16;NR4A1;HRH1;CXCL12;DPYSL3;SPP1;EPHB1;S100A9;IL6R;BCAR1;S100A8
taxis (GO:0042330)	29/263	NRP1;CCL13;PDGFB;CORO1A;CXCL16;HRH1;DPYSL3;SPP1;C3AR1;SLIT1;RAC2;EPHB1;IL6R;CMKLR1;CCL24;EDN1;TGFB2;CXADR;CCL20;HGF;ARHGEF16;PLAUR;PPBP;L1CAM;NR4A1;CXCL12;S100A9;S100A8;BCAR1
chemotaxis (GO:0006935)	29/263	NRP1;CCL13;PDGFB;CORO1A;CXCL16;HRH1;DPYSL3;SPP1;C3AR1;SLIT1;RAC2;EPHB1;IL6R;CMKLR1;CCL24;EDN1;TGFB2;CXADR;CCL20;HGF;ARHGEF16;PLAUR;PPBP;L1CAM;NR4A1;CXCL12;S100A9;BCAR1;S100A8
positive regulation of response to external stimulus (GO:0032103)	24/201	CCL24;NRP1;EDN1;CAMK1D;ITGA2;SERPINE1;IL18;PDGFB;IRG1;GPRC5B;NLRP12;CXCL12;ADORA2B;ALOX5AP;RAC2;C3AR1;TLR7;S100A9;IL6R;S100A8;SASH1;TGM2;IDO1;CMKLR1
sterol metabolic	17/119	SREBF1;CEBPA;CUBN;CETP;HMGCS1;PRKAG2;APOBR;

process (GO:0016125)		VLDLR;CYP7B1;EBP;LIPC;C14ORF1;APOC1;CYP1B1;APOE;APOL1;FDFT1
monocarboxylic acid metabolic process (GO:0032787)	42/473	SLC22A4;ACADVL;NCF1;HPGD;PRKAG2;ACSM4;ENO2;HIF1A;IRG1;CYP26B1;LDHA;LIPC;AMDHD1;THEM5;CYP1B1;LTA4H;PTGDS;ACSS1;ABCD1;PDK1;HSD3B7;EDN1;ACSL1;SPHK1;AKR1C1;PLA2G4C;ACSL6;ACSL4;IGF1;ELOVL7;CYP7B1;KMO;BCAN;POR;PC;P4HA1;ACOX2;SCD;ALDH1A2;ALOX5AP;ACSBG1;IDO1
positive regulation of monooxygenase activity (GO:0032770)	6/221	POR;GCH1;NPR3;CALM3;APOE;HIF1A
regulation of response to wounding (GO:1903034)	32/347	SERPINE1;PDGFB;METRNL;IRG1;ZFP36;C8G;UBASH3B;ADORA1;SPP1;CD36;APOE;TGM2;CCL24;EDN1;ITGA2;SERPINF2;IL18;PLAUR;NR1H3;KLF4;HCK;GPRC5B;NLRP12;ADORA2B;CD109;ALOX5AP;TLR7;PRKCQ;S100A9;S100A8;IDO1;NFE2L2
positive regulation of cell migration (GO:0030335)	27/280	NRP1;NOTCH1;SERPINE1;PDGFB;HIF1A;CORO1A;AQP1;CXCL16;P2RY6;C3AR1;RAC2;IL6R;SASH1;CMKLR1;CCL24;EDN1;TGFB2;CAMK1D;CCL20;SPHK1;HGF;ITGA2;IGF1;CXCL12;SNAI1;ROR2;BCAR1
positive regulation of cell motility (GO:2000147)	27/287	NRP1;NOTCH1;SERPINE1;PDGFB;HIF1A;CORO1A;AQP1;CXCL16;P2RY6;C3AR1;RAC2;IL6R;SASH1;CMKLR1;CCL24;EDN1;TGFB2;CAMK1D;CCL20;SPHK1;HGF;ITGA2;IGF1;CXCL12;SNAI1;ROR2;BCAR1

3.6. Исследование транскриптома нагруженных холестерином макрофагов: поиск генов, ответственных за накопление холестерина

Нами был проведен анализ обогащения генов по различным категориям болезней с помощью метода GSEA. В частности, было выявлено достоверное обогащение категории Atherosclerosis дифференциально экспрессированными генами. Далее приводится список из 25 генов – известных маркеров атеросклероза (Таблица 3). Гены 1-12 – ап-регулируемые гены, а 13-25 – даун-регулируемые гены.

Следующим этапом в определении потенциальных мастер-регуляторов, ответственных за накопление холестерина макрофагами было проведение анализа сигнальных путей, обогащенных отобранными генами. Для этого использовался алгоритм GSEA с применением базы данных TRANSPATH. Среди выявленных сигнальных путей можно выделить TGFbeta pathway, p53 pathway, E2F network, EGF pathway, HIF-1alpha pathway, а также более специфические IL-8 и IL-1.

Для выяснения механизма работы выявленных генов и их регуляции в сигнальных путях клеток нами были выбраны для дальнейшего анализа гены, которыми были обогащены выявленные сигнальные пути клеток, а именно, было выбрано 480 ап-регулируемых генов и 380 даун-регулируемых генов.

На основе этих выбранных генов был выполнен поиск сайтов связывания транскрипционных факторов. В результате фильтрации с помощью разумного порогового значения надежности были отобраны 27 факторов транскрипции, которые потенциально ответственны за изменения клеточной экспрессии генов под влиянием модифицированных ЛНП. К ним относятся c-Ets, GR-alpha, BRCA1, E2F-1, E2F-6 и EGR-1 (Таблица 4).

Таблица 3. Гены, ассоциированные с атеросклерозом

	Ген	Полное название гена
1	ABCA1 [↑]	ATP binding cassette subfamily A member 1
2	CXCL8 [↑]	chemokine (C-X-C motif) ligand 8
3	CXCL9 [↑]	chemokine (C-X-C motif) ligand 9
4	IL15 [↑]	interleukin 15
5	MMP1 [↑]	matrix metalloproteinase 1
6	SOAT1 [↑]	sterol O-acyltransferase 1
7	TNFSF14 [↑]	tumor necrosis factor superfamily member 14
8	CCL1 [↑]	chemokine (C-C motif) ligand 1
9	CD1B [↑]	CD1b molecule
10	HBEGF [↑]	heparin-binding EGF-like growth factor
11	EGR1 [↑]	early growth response 1
12	FOS [↑]	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
13	CD1C [↓]	CD1c molecule
14	MMP7 [↓]	matrix metalloproteinase 7
15	NFKB1 [↓]	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
16	IL1B [↓]	interleukin 1 beta
17	CD1A [↓]	CD1a molecule
18	IL10 [↓]	interleukin 10
19	TNFSF15 [↓]	tumor necrosis factor superfamily member 15
20	CD9 [↓]	CD9 molecule
21	CXCL10 [↓]	chemokine (C-X-C motif) ligand 10
22	F3 [↓]	coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor)
23	TGFB1 [↓]	transforming growth factor beta 1
24	TNFSF13 [↓]	tumor necrosis factor superfamily member 13
25	CSF1 [↓]	colony stimulating factor 1 (macrophage)

Таблица 4. Отобранные факторы транскрипции

ID	Title	Gene description	Gene symbol
MO000018136	c-Ets-1A(h)	v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1	ETS1
MO000019545	c-Ets-2(h)	v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2	ETS2
MO000019546	SAP-1a(h)	ELK4, ETS-domain protein (SRF accessory protein 1)	ELK4
MO000019614	GR-alpha(h)	nuclear receptor subfamily 3 group C member 1	NR3C1
MO000023577	hdac2-isoform1(h)	histone deacetylase 2	HDAC2
MO000025650	GABP-beta1(h)	GA binding protein transcription factor, beta subunit 1	GABPB1
MO000046075	TAFII250-isoform1(h)	TATA-box binding protein associated factor 1	TAF1
MO000056591	Kaiso(h)	zinc finger and BTB domain containing 33	ZBTB33
MO000057927	Elk1-isoform1(h)	ELK1, member of ETS oncogene family	ELK1
MO000058770	Sp1-isoform1(h)	Sp1 transcription factor	SP1
MO000079982	TEL1(h)	ets variant 6	ETV6
MO000080982	brca1-isoform1(h)	breast cancer 1	BRCA1
MO000082496	Fli-1-isoform1(h)	Fli-1 proto-oncogene, ETS transcription factor	FLI1
MO000083592	E2F-1(h)	E2F transcription factor 1	E2F1
MO000088374	GABP-alpha(h)	GA binding protein transcription factor alpha subunit	GABPA
MO000088705	Sp3-isoform1(h)	Sp3 transcription factor	SP3
MO000088889	Egr-1(h)	early growth response 1	EGR1
MO000095458	KLF8-isoform1(h)	Kruppel-like factor 8	KLF8
MO000095624	sp4(h)	Sp4 transcription factor	SP4
MO000102906	NRF-1-Long(h)	nuclear respiratory factor 1	NRF1
MO000104451	FKLF-isoform1(h)	Kruppel-like factor 11	KLF11
MO000114727	E2F-6-isoform1(h)	E2F transcription factor 6	E2F6

MO000115949	CNOT3-isoform1(h)	CCR4-NOT transcription complex subunit 3	CNOT3
MO000117843	TIEG-1-isoform1(h)	Kruppel-like factor 10	KLF10
MO000138365	Net(h)	ELK3, ETS-domain protein (SRF accessory protein 2)	ELK3
MO000140876	znf580(h)	zinc finger protein 580	ZNF580
MO000176427	DEAF1-isoform1(h)	DEAF1, transcription factor	DEAF1

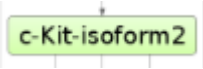
На основе выбранных 27 транскрипционных факторов был запущен алгоритм поиска мастер регуляторов – мастер-генов или мастер-белков, ответственных за регуляцию больших каскадов дифференциально экспрессирующихся генов, наблюдаемых в проведенных экспериментах. В результате проведенного поиска было выявлено 148 мастер регуляторов, полный список которых приведен в Приложении (Таблица 9).

Была проведена визуализация наиболее перспективных из найденных мастер-регуляторов и построена диаграмма (Рисунок 21 А). Для интерпретации диаграммы необходимо руководствоваться следующими правилами:


1) Прямоугольники морковного цвета

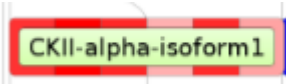
Пример:  Это перспективные мастер-регуляторы.

2) Зеленые прямоугольники

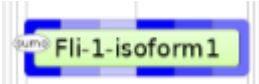
Пример:  Это достроенные в процессе построения сети внутриклеточной передачи сигнала молекулы.

3) Фиолетовые прямоугольники

Пример:  Это найденные на предыдущем шаге анализа транскрипционные факторы. Они находятся в нижней части диаграммы (Рисунок 21 В).

Красный цвет полосы в рамке гена говорит о повышенной экспрессии этого гена/белка в данном сравнении. Чем более насыщенный цвет, тем выше значение экспрессии.  (Рисунок 21 С).

Синий цвет говорит о пониженной экспрессии этого гена/белка в данном сравнении. Чем более насыщенный цвет, тем ниже значение экспрессии.

 (Рисунок 21 С).

Особый интерес представляют те молекулы, которые имеют одновременно все синие (даун-регулирование) или все красные (ап-регулирование) полосы на окружающей их рамке. Такие гены и белки показывают одинаковое поведение и при сравнении с окисленными образцами, и при сравнении с ацетилированными образцами, что делает их перспективными для дальнейшего исследования (Рисунок 21 С).

Следующие гены были отобраны, как наиболее перспективные мастер-регуляторы: IL7R, TIGIT, CXCL8, F2RL1, EIF2AK3, IL7, TSPYL2, ANXA1, DUSP1 и IL15. Эти гены были отобраны из-за их высокого показателя в тесте RankProd, а также их значения LogFC были выше 0,7 при сравнении образцов, в которых наблюдалось накопление холестерина, с образцами без накопления холестерина. Также сохранялась направленность изменения экспрессии этих генов во всех парных сравнениях образцов. Ниже приведены описания генов выявленных мастер-регуляторов (Таблица 5).

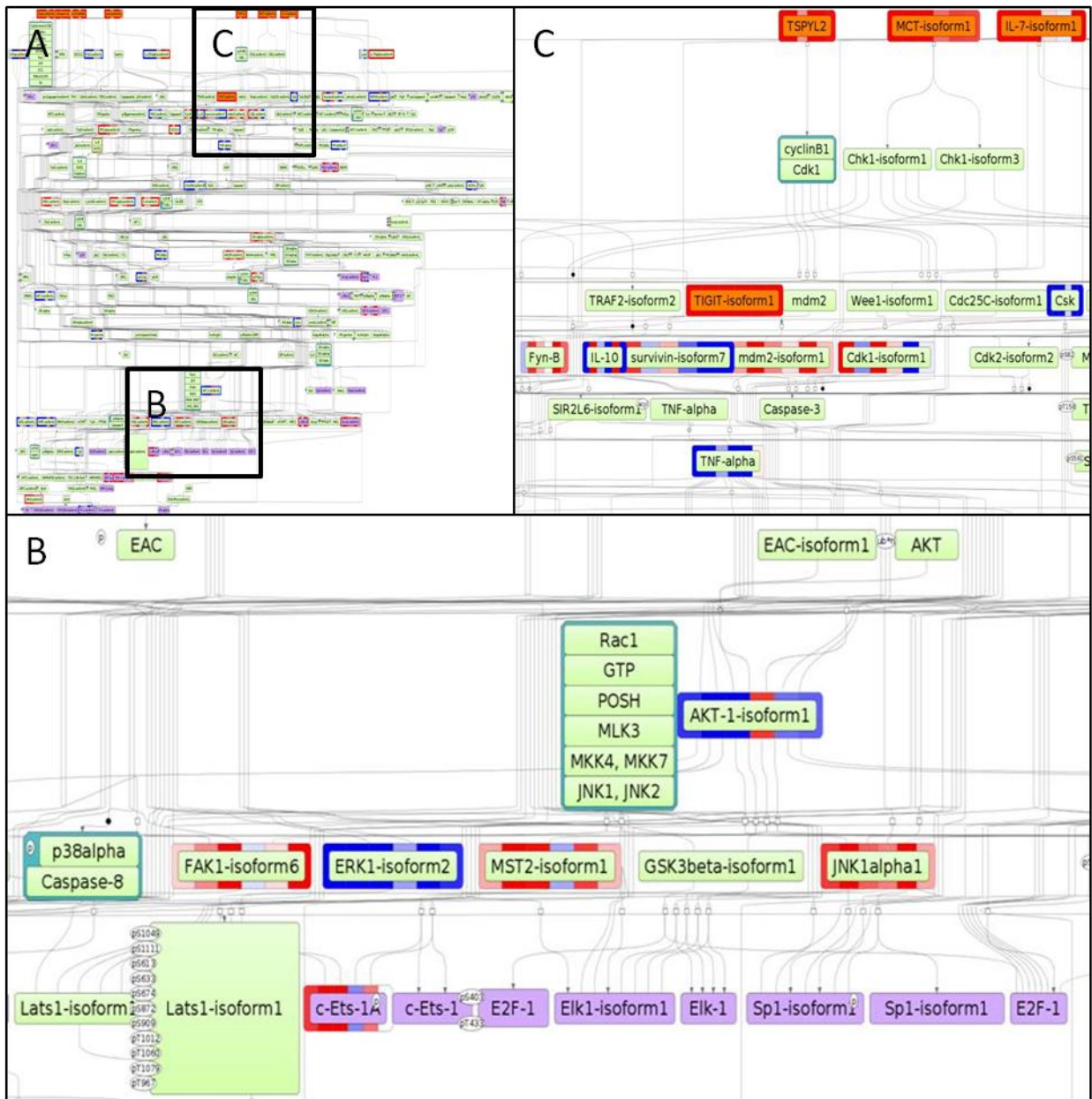


Рисунок 21. Общая диаграмма мастер-регуляторов, ответственных за внутриклеточное накопление холестерина под влиянием модифицированных ЛНП. В и С – увеличения А. Описание см. в тексте.

Таблица 5. Описание генов мастер-регуляторов

	ID	Ген	Кодируемая молекула	Функции (из NCBI Gene Database)
1	ENSG00000168685	IL7R	interleukin 7 receptor	Белок, кодируемый этим геном, является рецептором для интерлейкина 7. Для функционирования этого рецептора требуется гамма-цепь рецептора интерлейкина-2, которая является общей гамма-цепью для рецепторов различных цитокинов, включая интерлейкины 2, 4, 7, 9 и 15. Этот белок играет ключевую роль в V(D)J-рекомбинации при созревании лимфоцитов. Дефекты этого гена могут быть связаны с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID). Также были найдены варианты альтернативного сплайсинга.
2	ENSG00000181847	TIGIT	T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) domains	Этот ген кодирует член семейства полиовирусных рецепторов иммуноглобулиновых белков. Продукт этого гена экспрессируется несколькими классами Т-клеток, включая фолликулярные В-хелперные Т-клетки (TFH). Было показано, что белок связывает полиовирусные рецепторы с высокой аффинностью; считается, что это связывание помогает взаимодействию между фолликулярными В-хелперными Т-клетками и дендритными клетками для

				регулирования ответов В-клеток.
3	ENSG00000169429	CXCL8	C-X-C motif chemokine ligand 8	Белок, кодируемый этим геном, является членом семейства хемокинов СХС и является основным медиатором воспалительного ответа. Интерлейкин 8 секретируется в первую очередь нейтрофилами, где он служит хемотаксическим фактором, направляя нейтрофилы в место заражения. Этот хемокин также является мощным ангиогенным фактором. Считается, что этот ген играет роль в патогенезе бронхолита, общего заболевания дыхательных путей, вызванного вирусной инфекцией. Этот ген и другие члены семейства генов хемокинов СХС образуют кластер генов в области хромосомы 4q
4	ENSG00000164251	F2RL1	F2R like trypsin receptor 1	Этот ген кодирует белок из семейства G-связанных рецепторных белков семейства 1. Кодируемый клеточный рецептор активируется посредством протеолитического расщепления его внеклеточного аминоконца, в результате чего образуется новый аминоконец, который действует как связный лиганд, связывающийся с внеклеточным петлевым доменом. Показано, что активация рецептора стимулирует релаксацию гладких мышц сосудов, расширяет кровеносные сосуды, увеличивает кровоток и понижает кровяное

				давление. Этот белок также важен для воспалительного ответа, а также врожденного и адаптивного иммунитета.
5	ENSG00000172071	EIF2AK3	eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 3	Белок, кодируемый этим геном, фосфорилирует альфа-субъединицу эукариотического фактора инициации трансляции 2, что приводит к ее инаktivации и, следовательно, к быстрому ингибированию инициации трансляции и репрессии синтеза белка. Считается, что этот белок модулирует митохондриальную функцию. Это мембранный белок типа I, расположенный в эндоплазматическом ретикулуме (ER), где он индуцируется стрессом ER, вызванным неправильно процессированными белками. Мутации в этом гене ассоциированы с синдромом Уолкотта-Раллисона.
6	ENSG00000104432	IL7	interleukin 7	Белок, кодируемый этим геном, является цитокином, важным для созревания В и Т-клеток. Этот цитокин и фактор роста гепатоцитов (HGF) образуют гетеродимер, который функционирует как фактор роста предшественников В-клеток. Этот цитокин является кофактором для V(D)J-рекомбинации бета-рецептора Т-клеточного рецептора (TCRB) во время созревания ранних Т-клеток. Этот цитокин может быть произведен локально

				эпителиальными клетками кишечника и может служить регулятивным фактором для лимфоцитов слизистой оболочки кишечника. Исследования нокаутных мышей показали, что этот цитокин играет существенную роль в выживании лимфоидных клеток. Альтернативный сплайсинг приводит к множественным вариантам транскрипции, кодирующим различные изоформы. Были описаны дополнительные варианты сплайсинга, но их присутствие в нормальных тканях не доказано.
7	ENSG00000184205	TSPYL2	testis-specific protein Y-encoded-like protein 2	Этот ген кодирует белок, специфичного для яичка, являющийся членом суперсемейства Y-кодированных, TSPY-подобных / SET / нуклеосомных белков-1. Белок находится в ядре, где он участвует в ремоделировании хроматина и ингибирует прогрессию клеточного цикла. Этот белок может играть определенную роль в подавлении роста опухоли.
8	ENSG00000135046	ANXA1	annexin A1	Этот ген кодирует мембранный белок, который связывается с фосфолипидами. Этот белок ингибирует фосфолипазу A2 и обладает противовоспалительной активностью. Потеря функции или экспрессии этого гена была обнаружена в нескольких опухолях.
9	ENSG00000	DUSP1	dual specificity	Белок, кодируемый этим геном,

	120129		phosphatase 1	представляет собой фосфатазу с двойной специфичностью для тирозина и треонина. Белок может дефосфорилировать MAP киназу MAPK1/ERK2, следовательно он вовлечен в различные клеточные процессы. Этот белок, по-видимому, играет важную роль в реакции клеток на внешний стресс, а также в отрицательной регуляции клеточной пролиферации. Наконец, кодируемый белок может привести к устойчивости некоторых солидных опухолей к химио- и лучевой терапии, что делает ее терапевтической мишенью.
10	ENSG00000164136	IL15	interleukin 15	Белок, кодируемый этим геном, является цитокином, который регулирует активацию и пролиферацию естественных киллерных клеток. Этот цитокин и интерлейкин 2 имеют много общих функций. Установлено, что они связывают общие субъединицы рецептора гематопоетина и могут конкурировать за один и тот же рецептор и, таким образом, отрицательно регулируют деятельность друг друга. Показано, что количество клеток памяти CD8+ контролируется балансом между этим цитокином и IL2. Этот цитокин индуцирует активацию JAK-киназ, а также фосфорилирование и активацию транскрипционных

				<p>активаторов STAT3, STAT5 и STAT6. Исследования мышиноного гомолога показали, что этот цитокин может увеличивать экспрессию ингибитора апоптоза BCL2L1/BCL-x(L), возможно, через увеличение транскрипционной активности STAT6 и, таким образом, препятствовать апоптозу.</p>
--	--	--	--	--

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе исследования было выявлено, что ЛНП, циркулирующие в крови здоровых лиц, обычно не вызывали накопления липидов в культивируемых макрофагах, тогда как ЛНП пациентов с атеросклерозом в большинстве случаев являлись мощным индуктором клеточного липоидоза. Таким образом, ЛНП пациентов с атеросклерозом, в отличие от ЛНП здоровых лиц, являются атерогенными.

Модифицированные ЛНП могут распознаваться макрофагами с помощью скэвенджер рецепторов, которые играют важную роль в развитии атеросклероза [52]. Различия, наблюдаемые во внутриклеточном распределении нативных и атерогенных ЛНП, хорошо согласуется с исследованиями путей их захвата и интернализации. Исследования *in vitro* показали, что утилизация модифицированных (ацетилированных или окисленных) ЛНП макрофагами происходит в основном с помощью SR-A1 и CD36 [103]. Дефицит этих рецепторов лишь частично ингибировал образование пенистых клеток у АпоЕ^{-/-} мышей, следовательно, в макрофагах существуют и другие механизмы захвата ЛНП. Большие количества нативных ЛНП, которые могут наблюдаться в условиях гиперлипидемии в развивающихся бляшках, также могут способствовать образованию внутриклеточных липидных капель путем пиноцитоза [104].

При добавлении к первичной культуре макрофагов атерогенных ЛНП, выделенных из крови пациентов, индуцировалось повышение активности провоспалительного цитокина TNF и противовоспалительного хемокина CCL18 на уровне транскрипции (Рисунок 18). В то же время неатерогенные (нативные) ЛНП здоровых лиц не влиял на экспрессию генов при добавлении к культивированным макрофагам. Множественно модифицированные атерогенные ЛНП вызывали активацию по про-, и противовоспалительному путям. Это очень важное наблюдение, учитывая значительную роль врожденного иммунитета и

хронического воспаления при возникновении и развитии атеросклеротических поражений. Полученные результаты хорошо согласуются с результатами исследований *in situ*, которые продемонстрировали повышенную экспрессию и про- и противовоспалительных цитокинов при атеросклерозе [105].

В силу отсутствия мышинных аналогов MIP-4, было получено мало данных *in vivo*, свидетельствующих о продукции хемокина CCL18 в атеросклеротическом поражении [22]. Исследования, направленные на изучение взаимосвязи хемокина CCL18 с сердечнососудистыми заболеваниями довольно немногочисленны. Полученные данные подтвердили выдвинутое предположение о взаимосвязи выбранных цитокинов с развитием атеросклероза, а также позволили расширить представление о роли макрофагов в возникновении и развитии атеросклеротического поражения *ex vivo*.

Было обнаружено, что экспрессия CCL18 в атеросклеротическом поражении достоверно выше, чем в непораженной интиме аорты человека приблизительно в 10 раз. А значит, продукция хемокина CCL18 клетками интимы аорты человека предположительно связана с развитием атеросклероза. Локализация хемокина преимущественно в субэндотелиальном пространстве может быть обусловлена попавшими из кровотока моноцитами, которые, как указывалось выше, могут быть преобразованы в тканевые макрофаги или дендритные клетки, в зависимости от локального баланса цитокинов. CCL18 участвует в привлечении незрелых Т-лимфоцитов к активированным макрофагам, а активированные дендритные клетки формируют множественные кластеры с Т-клетками, преимущественно в плечевых зонах бляшек [106]. В случае повышения экспрессии возможна дальнейшая миграция клеток из кровотока в стенку артерии. В атеросклеротическом поражении, продукция CCL18 в более глубоких слоях интимы заметно возрастала. Возможно, это связано с тем, что иммунные клетки, проникнув в глубокие слои, способствуют фокальному накоплению Т-клеток. Как указывалось ранее, моноциты обнаруживают на люминальной поверхности артерий, в непосредственной

близости от эндотелия, макрофаги, в то же время, - в более глубоких слоях интимы, что служит аргументом в пользу того, что макрофаги имеют гематогенное происхождение. В начальном поражении, в субэндотелиальном слое интимы, появляются области, в которых продукция CCL18 наблюдается в непосредственной близости от продукции TNF, тогда как в субэндотелиальном слое непораженной интимы наблюдалась только продукция CCL18. Мозаичность в локализации TNF и CCL18, подтверждает невозможность протекания провоспалительного и противовоспалительного процессов в одной клетке. Не было обнаружено клеток продуцирующих CCL18 и TNF одновременно, распределения исследуемых цитокинов сильно различались. Причиной может служить секреция этих цитокинов как разными типами клеток, так и разными фенотипами макрофагов. Однако, наблюдалось совместное увеличение экспрессии CCL18 и TNF макрофагами в культуре. Этот феномен может объясняться наличием двух (или более) фенотипически разных субпопуляций макрофагов в одной культуре. Можно предположить, что под действием атерогенных ЛНП, одни клетки накапливает липиды и дифференцируется в отдельную субпопуляцию с каким-либо воспалительным ответом, в то время как другие образуют другую субпопуляцию с противоположным иммунным ответом.

В непораженной интимае аорты человека экспрессия исследуемых цитокинов была заметно ниже, чем в выраженных жировых поражениях. В случае фиброзной бляшки, где уровень липидов заметно ниже, чем в жировой полосе или липофиброзной бляшке наблюдалось заметное снижение экспрессии исследуемых цитокинов. Мы предположили, что подобные изменения связаны не только с общим увеличением иммунных клеток в атеросклеротическом поражении, но и с липоидозом.

Для оценки влияния накопления холестерина при взаимодействии с модифицированными ЛНП на экспрессию генов было проведено исследование транскриптома макрофагов, инкубированных с окисленными и

ацетилированными ЛНП. Добавление модифицированных ЛНП вызвало изменения в активности сотен генов макрофагов. Были идентифицированы гены, связанные с накоплением липидов. Инкубация с модифицированными ЛНП достоверно изменяла активность 147 генов (Приложение, Таблицы 7 и 8). Следует отметить, что многие из этих генов связаны с функцией врожденного иммунитета. Это наблюдение позволяет предположить, что накопление холестерина, вызванное модифицированными ЛНП в макрофагах, приводит к их активации.

Множественные данные по исследованию транскриптомов накапливаются в таких базах данных, как ArrayExpress или Gene Expression Omnibus (GEO). Наборы дифференциально экспрессирующихся генов были также найдены в более специализированных базах данных, таких как Expression Atlas, Mouse Expression Database (GXD) и др. Такие данные могут использоваться непосредственно для выбора потенциальных мишеней лекарственных средств, используя только статистическую значимость изменений экспрессии. Для более точного анализа молекулярных механизмов обычно применяется традиционный подход к картированию наборов дифференциально экспрессирующихся генов к категориям генной онтологии (GO) или к путям KEGG, например, методом GSEA (анализ обогащения генов).

Поскольку такой подход не обеспечивает полного понимания причин наблюдаемых явлений, был применен другой подход, так называемый «восходящий анализ» для более наглядной интерпретации изменений экспрессии. Эта стратегия состоит из двух основных этапов: (1) анализ промоторов и энхансеров идентифицированных дифференциально экспрессирующихся генов для определения факторов транскрипции, участвующих в изучаемом процессе; (2) реконструкция сигнальных путей, которые активируют найденные факторы транскрипции и идентификацию главных регуляторов на вершине таких путей. Первый шаг выполнялся с помощью базы данных TRANSFAC и алгоритмов идентификации сайтов

связывания Match и CMA. Второй шаг осуществляется с помощью базы данных TRANSPATH, одной из первых доступных баз данных сигнальных путей и специальных графовых алгоритмов поиска, реализованных в платформе geneXplain. С помощью этих методов было идентифицировано 10 генов потенциально ответственных за накопление холестерина макрофагами человека: IL7R, IL7, TIGIT, CXCL8, F2RL1, EIF2AK3, TSPYL2, ANXA1, DUSP1 и IL15.

Наиболее характерными особенностями регрессии поражений являются уменьшение содержания макрофагов и липидов, уменьшение богатого коллагеном внеклеточного матрикса и слоя гладкомышечных клеток. Потенциальные механизмы отвечающие за этот процесс - это повышенный отток холестерина, снижение миграции моноцитов [107] и снижение содержания пенистых клеток [108]. Однако другие клетки также могут быть задействованы путем создания среды, благоприятствующей регрессии поражения. Rongying Li с соавт. было обнаружено три гена достоверно ответственных за снижение холестерина в поражении, один из которых IL-7 [109]. IL-7 индуцировал экспрессию генов CAM и MCP-1, обеспечивающих присоединение моноцитов к эндотелиальным клеткам и их миграцию в интиму [110]. Сигнальный путь IL-7 опосредован через JAK/STAT и играет ключевую роль в выживании T-клеток и их пролиферации [111]. Как было указано выше, для функционирования рецептора IL-7 требуется гамма-цепь рецептора интерлейкина-2, которая является общей гамма-цепью для рецепторов различных цитокинов, включая интерлейкины 2, 4, 7, 9 и 15. IL-15 является провоспалительным цитокином, участвующим в воспалительных заболеваниях, также IL-15 экспрессируется в атеросклеротических бляшках. IL-15 способствует развитию атеросклеротического поражения у LDLR^{-/-} мышей. Добавление IL-15 к макрофагам индуцирует экспрессию TNF и MCP-1. van Es T с соавт. показали, что вакцинация мышей против IL-15 приводила к уменьшению размера бляшек у 75% мышей, но не способствовала устойчивости поражений [112]. Reddy S с соавт. впервые показали, что DUSP1 также принимает участие в продукции

MCP-1 через активацию MAPK1, что также индуцирует хемотаксис моноцитов субэндотелиальную интиму аорты человека [113].

Помимо MCP-1, CXCL8 также индуцирует миграцию моноцитов, экспрессирующих CXCR2, рецептор CXCL8 [114]. Уровень CXCL8 значительно возрастает внутри атеросклеротических бляшек. Sun-Mi Kim с соавт. показали, что добавление к TNP-1 окисленного холестерина 27ОНChol вызывала транслокацию субъединицы p65 NF- κ B в ядро и ап-регуляцию CD88 [115]. Ингибирование NF κ B и CD88 с использованием SN50 и W-54011, соответственно, приводило к уменьшенной транскрипции гена IL-8 и ослабленной секреции CXCL8, индуцированной 27ОНChol. Авторы предположили, что окисленный модифицированный холестерин, такой как 27ОНChol, а не холестерин, отвечал за устойчивую экспрессию CXCL8 в моноцитах/макрофагах в атеросклеротических поражениях. Тао YK с соавт. изучили регуляторный эффект окисленных ЛНП и обнаружили их влияние на сигнальный путь PERK/eIF2 α /CHOP в сосудистых эндотелиальных клетках, индуцирующий стресс эндоплазматического ретикулума и апоптоз [116]. Выявленный ген-регулятор EIF2AK3 расположен в эндоплазматическом ретикулуме и индуцируется стрессом, но его связь с атерогенезом пока остается неясной. При анализе сигнальных путей, была обнаружена даун-регуляция сигнального пути TGF- β . Pham Y с соавт. обнаружили, что в мышинной модели ген Tspyl2, кодирующий CDA1 (Cell division autoantigen 1), играет важную роль в избыточном накоплении внеклеточного матрикса в стенке сосудов путем ап-регуляции пути TGF- β .

В работе de Jong RJ с соавт. Apoe^{-/-} и Apoe^{-/-}AnxA1^{-/-} мыши подвергались повреждению сосудов совместно с диетой с высоким содержанием холестерина [117]. Впоследствии была изучена локализация аннексина A1, а также уровень аннексина A1 в плазме. Было обнаружено, что AnxA1 локализуется в эндотелиальных клетках и макрофагах в неоинтимае. Уровень AnxA1 в плазме, а также уровень экспрессии в интимае, обратно коррелировали с размером

неоинтимы. При нокауте по *AnxA1* образование неоинтимы усугублялось увеличением количества макрофагов в интиме и их пролиферацией. Таким образом, аннексин A1 способствовал заживлению после повреждений. В другой работе Kusters DN с соавт. показали, что лечение *LDLR*^{-/-} мышей аннексином A1 способствовало регрессии атеросклеротического поражения.

Наконец, следует отметить, что сигнальный путь TIGIT/CD226 связан с несколькими аутоиммунными заболеваниями человека, а исследования на мышах показывают, что вмешательство в этот путь может быть привлекательным подходом для модуляции аутоиммунных заболеваний [118]. Предыдущие исследования показали, что TIGIT в основном экспрессируется активированными CD4⁺ Т-клетками у людей и мышей [119]. Было обнаружено, что во время индукции атеросклероза путем диеты западного типа происходит активация Т-клеток. Активация Т-клеток сильно коррелирует с развитием атеросклероза. Foks AC с соавт показали, что хотя ап-регуляция сигнального пути TIGIT снижает пролиферацию и активацию Т-клеток как *in vitro*, так и *in vivo*, это не влияет на развитие атеросклероза и количество Т-клеток в поражении [120].

4.1. Заключение

Можно заключить, что выявленные мастер-регуляторы в разной степени связаны с развитием атеросклероза, однако механизмы участия многих из них остаются неизученными. Представляется необходимым прицельно исследовать их роль в ключевом событии атерогенеза - накоплении внутриклеточного холестерина - с использованием методов нокаута и оверэкспрессии выявленных генов в клеточных моделях, а также оценить их роль в атерогенезе в целом с использованием мышинных моделей атеросклероза.

Исходя из данных экспрессии TNF и CCL18 в пораженной интиме, мы предположили, что накопление внутриклеточных липидов индуцирует про- и противовоспалительные реакции в артериальных клетках. Однако анализ транскриптома, проведенный в данной работе, выявил гены-регуляторы, ответственные за накопление внутриклеточного холестерина. Выявленные гены не связаны напрямую с метаболизмом холестерина в клетках. Вероятно, что верно обратное утверждение: не внутриклеточное накопление холестерина вызывает реакцию врожденного иммунитета, но иммунный ответ вследствие взаимодействия клеток с модифицированным ЛНП стимулирует накопление внутриклеточных липидов. Эта гипотеза подтверждается данными о влиянии молекул, участвующих в иммунном ответе, на внутриклеточный метаболизм липидов [121-124].

ВЫВОДЫ

1. Внутриклеточное распределение нативных и атерогенных ЛНП различно. Распределение нативных ЛНП носит дисперсный характер, а модифицированные ЛНП накапливаются в виде гранул, капель, крупных жировых отложений.
2. Содержание и экспрессия провоспалительного цитокина TNF и противовоспалительного хемокина CCL18 в атеросклеротическом поражении были выше, чем в непораженной интиме.
3. Экспрессия генов TNF и CCL18 повышается в результате внутриклеточного накопления липидов, вызванного атерогенными ЛНП, в первичной культуре макрофагов человека.
4. Транскриптомный анализ выявил гены, активность которых существенно изменяется при взаимодействии клеток с модифицированными ЛНП. В частности существенно изменялась активность генов, вовлеченных в воспалительные реакции.
5. С помощью методов биоинформатики идентифицировано 10 генов, тесно связанных с накоплением холестерина макрофагами человека: IL7R, IL7, TIGIT, CXCL8, F2RL1, EIF2AK3, TSPYL2, ANXA1, DUSP1 и IL15.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

CCL18 - CC-хемокин 18

IL - интерлейкин

LDLR - рецептор липопротеидов низкой плотности

LOX - лектин-подобный рецептор

MMP - матриксная металлопротеаза

MR - маннозный рецептор

SR - скэвенджер рецептор

STAT - преобразователь сигнала и активатор транскрипции

TLR - Толл-подобный рецептор

TNF - фактор некроза опухоли

АСАТ - холестерин-ацилтрансфераза

АФК - активные формы кислорода

ИБС - ишемическая болезнь сердца

ИФБ - изотонический фосфатный буфер

ИФН- γ - интерферон-гамма

ЛНП - липопротеиды низкой плотности

ЛПС - липополисахарид

ТФ - транскрипционный фактор

ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Орехов А.Н. Атеросклероз. Молекулярно-клеточные механизмы атерогенеза человека; антиатеросклеротическая терапия. // Palmarium Academic Publishing. 2013. Т 1. С. 9-30.
2. Sary H.C. Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults // *Arteriosclerosis*. 1989. Т 9. С. 119-32.
3. Sary H.C. Composition and classification of human atherosclerotic lesions // *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1992. Т 421. С. 277-290.
4. Sary H.C. Changes in components and structure of atherosclerotic lesions developing from childhood to middle age in coronary arteries // *Basic Res Cardiol*. 1994. Т 89 Suppl 1. С. 17-32.
5. Sary H.C. Lipid and macrophage accumulations in arteries of children and the development of atherosclerosis // *Am J Clin Nutr*. 2000. Т 72. С. 1297S-1306S.
6. Velican D. and Velican C. Histochemical study on the glycosaminoglycans (acid mucopolysaccharides) of the human coronary arteries // *Acta Histochem*. 1977. Т 59. С. 190-200.
7. Goerdts S., Politz O., Schledzewski K., Birk R., Gratchev A., Guillot P., Hakiy N., Klemke C.D., Dippel E., Kodelja V. and Orfanos C.E. Alternative versus classical activation of macrophages // *Pathobiology*. 1999. Т 67. С. 222-226.
8. Gordon S. and Taylor P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity // *Nat Rev Immunol*. 2005. Т 5. С. 953-964.
9. Varin A. and Gordon S. Alternative activation of macrophages: immune function and cellular biology // *Immunobiology*. 2009. Т 214. С. 630-641.
10. Brocheriou I., Maouche S., Durand H., Braunersreuther V., Le Naour G., Gratchev A., Koskas F., Mach F., Kzhyshkowska J. and Ninio E. Antagonistic regulation of macrophage phenotype by M-CSF and GM-CSF: implication in atherosclerosis // *Atherosclerosis*. 2011. Т 214. С. 316-324.

11. Gratchev A., Guillot P., Hakiy N., Politz O., Orfanos C.E., Schledzewski K. and Goerdts S. Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and its splice variants and the extracellular matrix protein betaIG-H3 // *Scand J Immunol.* 2001. T 53. C. 386-392.
12. Gordon S. and Martinez F.O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions // *Immunity.* 2010. T 32. C. 593-604.
13. Gratchev A., Kzhyshkowska J., Kothe K., Muller-Molinet I., Kannookadan S., Utikal J. and Goerdts S. Mphi1 and Mphi2 can be re-polarized by Th2 or Th1 cytokines, respectively, and respond to exogenous danger signals // *Immunobiology.* 2006. T 211. C. 473-486.
14. Swardfager W., Lanctot K., Rothenburg L., Wong A., Cappell J. and Herrmann N. A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease // *Biol Psychiatry.* 2010. T 68. C. 930-941.
15. Locksley R.M., Killeen N. and Lenardo M.J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology // *Cell.* 2001. T 104. C. 487-501.
16. Fragoso Lona J.M., Sierra Martinez M., Vargas Alarcon G., Barrios Rodas A. and Ramirez Bello J. [Tumor necrosis factor alfa in cardiovascular diseases: molecular biology and genetics] // *Gac Med Mex.* 2013. T 149. C. 521-530.
17. Schraufstatter I.U., Zhao M., Khaldoyanidi S.K. and Discipio R.G. The chemokine CCL18 causes maturation of cultured monocytes to macrophages in the M2 spectrum // *Immunology.* 2012. T 135. C. 287-298.
18. Chenivesse C., Chang Y., Azzaoui I., Ait Yahia S., Morales O., Ple C., Foussat A., Tonnel A.B., Delhem N., Yssel H., Vorng H., Wallaert B. and Tsicopoulos A. Pulmonary CCL18 recruits human regulatory T cells // *J Immunol.* 2012. T 189. C. 128-137.
19. Bellinghausen I., Reuter S., Martin H., Maxeiner J., Luxemburger U., Tureci O., Grabbe S., Taube C. and Saloga J. Enhanced production of CCL18 by tolerogenic dendritic cells is associated with inhibition of allergic airway reactivity // *J Allergy Clin Immunol.* 2012. T 130. C. 1384-1393.

20. Kodelja V., Muller C., Politz O., Hakij N., Orfanos C.E. and Goerdts S. Alternative macrophage activation-associated CC-chemokine-1, a novel structural homologue of macrophage inflammatory protein-1 alpha with a Th2-associated expression pattern // *J Immunol*. 1998. T 160. C. 1411-1418.
21. Azzaoui I., Yahia S.A., Chang Y., Vorng H., Morales O., Fan Y., Delhem N., Ple C., Tonnel A.B., Wallaert B. and Tsicopoulos A. CCL18 differentiates dendritic cells in tolerogenic cells able to prime regulatory T cells in healthy subjects // *Blood*. 2011. T 118. C. 3549-3558.
22. Reape T.J., Rayner K., Manning C.D., Gee A.N., Barnette M.S., Burnand K.G. and Groot P.H. Expression and cellular localization of the CC chemokines PARC and ELC in human atherosclerotic plaques // *Am J Pathol*. 1999. T 154. C. 365-374.
23. Boyle J.J., Harrington H.A., Piper E., Elderfield K., Stark J., Landis R.C. and Haskard D.O. Coronary intraplaque hemorrhage evokes a novel atheroprotective macrophage phenotype // *Am J Pathol*. 2009. T 174. C. 1097-1108.
24. Chinetti-Gbaguidi G., Colin S. and Staels B. Macrophage subsets in atherosclerosis // *Nat Rev Cardiol*. 2015. T 12. C. 10-17.
25. Bouhrel M.A., Derudas B., Rigamonti E., Dievart R., Brozek J., Haulon S., Zawadzki C., Jude B., Torpier G., Marx N., Staels B. and Chinetti-Gbaguidi G. PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties // *Cell Metab*. 2007. T 6. C. 137-143.
26. Chinetti-Gbaguidi G., Baron M., Bouhrel M.A., Vanhoutte J., Copin C., Sebti Y., Derudas B., Mayi T., Bories G., Tailleux A., Haulon S., Zawadzki C., Jude B. and Staels B. Human atherosclerotic plaque alternative macrophages display low cholesterol handling but high phagocytosis because of distinct activities of the PPARgamma and LXRA pathways // *Circ Res*. 2011. T 108. C. 985-995.
27. Bobryshev YV N.N., Elizova NV, Orekhov AN. Macrophages and Their Contribution to the Development of Atherosclerosis // *Results Probl Cell Differ*. 2017. T 62. C. 273-298.

28. Torzewski M. and Lackner K.J. Initiation and progression of atherosclerosis--enzymatic or oxidative modification of low-density lipoprotein? // *Clin Chem Lab Med.* 2006. T 44. C. 1389-1394.
29. Finn A.V., Nakano M., Polavarapu R., Karmali V., Saeed O., Zhao X., Yazdani S., Otsuka F., Davis T., Habib A., Narula J., Kolodgie F.D. and Virmani R. Hemoglobin directs macrophage differentiation and prevents foam cell formation in human atherosclerotic plaques // *J Am Coll Cardiol.* 2012. T 59. C. 166-177.
30. Bories G., Colin S., Vanhoutte J., Derudas B., Copin C., Fanchon M., Daoudi M., Belloy L., Haulon S., Zawadzki C., Jude B., Staels B. and Chinetti-Gbaguidi G. Liver X receptor activation stimulates iron export in human alternative macrophages // *Circ Res.* 2013. T 113. C. 1196-1205.
31. Erbel C., Tyka M., Helmes C.M., Akhavanpoor M., Rupp G., Domschke G., Linden F., Wolf A., Doesch A., Lasitschka F., Katus H.A. and Gleissner C.A. CXCL4-induced plaque macrophages can be specifically identified by co-expression of MMP7+S100A8+ in vitro and in vivo // *Innate Immun.* 2015. T 21. C. 255-265.
32. Stoger J.L., Gijbels M.J., van der Velden S., Manca M., van der Loos C.M., Biessen E.A., Daemen M.J., Lutgens E. and de Winther M.P. Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis // *Atherosclerosis.* 2012. T 225. C. 461-468.
33. Andreeva E.R., Orekhov A.N. and Smirnov V.N. Quantitative estimation of lipid-laden cells in atherosclerotic lesions of the human aorta // *Acta Anat (Basel).* 1991. T 141. C. 316-323.
34. Orekhov A.N., Tertov V.V. and Smirnov V.N. Lipids in cells of atherosclerotic and uninvolved human aorta. II. Lipid metabolism in primary culture // *Exp Mol Pathol.* 1985. T 43. C. 187-195.
35. Orekhov A.N., Tertov V.V., Novikov I.D., Krushinsky A.V., Andreeva E.R., Lankin V.Z. and Smirnov V.N. Lipids in cells of atherosclerotic and uninvolved human aorta. I. Lipid composition of aortic tissue and enzyme-isolated and cultured cells // *Exp Mol Pathol.* 1985. T 42. C. 117-137.

36. Mukhin D.N., Orekhov A.N., Andreeva E.R., Schindeler E.M. and Smirnov V.N. Lipids in cells of atherosclerotic and uninvolved human aorta. III. Lipid distribution in intimal sublayers // *Exp Mol Pathol*. 1991. T 54. C. 22-30.
37. Orekhov A.N., Tertov V.V., Mukhin D.N., Koteliansky V.E., Glukhova M.A., Khashimov K.A. and Smirnov V.N. Association of low-density lipoprotein with particulate connective tissue matrix components enhances cholesterol accumulation in cultured subendothelial cells of human aorta // *Biochim Biophys Acta*. 1987. T 928. C. 251-258.
38. Orekhov A.N., Tertov V.V., Mukhin D.N., Koteliansky V.E., Glukhova M.A., Frid M.G., Sukhova G.K., Khashimov K.A. and Smirnov V.N. Insolubilization of low density lipoprotein induces cholesterol accumulation in cultured subendothelial cells of human aorta // *Atherosclerosis*. 1989. T 79. C. 59-70.
39. Goldstein J.L., Brown M.S., Anderson R.G., Russell D.W. and Schneider W.J. Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system // *Annu Rev Cell Biol*. 1985. T 1. C. 1-39.
40. Basu S.K., Brown M.S., Ho Y.K. and Goldstein J.L. Degradation of low density lipoprotein . dextran sulfate complexes associated with deposition of cholesteryl esters in mouse macrophages // *J Biol Chem*. 1979. T 254. C. 7141-7146.
41. Falcone D.J., Mated N., Shio H., Minick C.R. and Fowler S.D. Lipoprotein-heparin-fibronectin-denatured collagen complexes enhance cholesteryl ester accumulation in macrophages // *J Cell Biol*. 1984. T 99. C. 1266-1274.
42. Salisbury B.G., Falcone D.J. and Minick C.R. Insoluble low-density lipoprotein-proteoglycan complexes enhance cholesteryl ester accumulation in macrophages // *Am J Pathol*. 1985. T 120. C. 6-11.
43. Vijayagopal P., Srinivasan S.R., Jones K.M., Radhakrishnamurthy B. and Berenson G.S. Complexes of low-density lipoproteins and arterial proteoglycan aggregates promote cholesteryl ester accumulation in mouse macrophages // *Biochim Biophys Acta*. 1985. T 837. C. 251-261.
44. Tertov V.V., Sobenin I.A., Gabbasov Z.A., Popov E.G. and Orekhov A.N. Lipoprotein aggregation as an essential condition of intracellular lipid accumulation

caused by modified low density lipoproteins // *Biochem Biophys Res Commun.* 1989. T 163. C. 489-494.

45. Tertov V.V., Orekhov A.N., Sobenin I.A., Gabbasov Z.A., Popov E.G., Yaroslavov A.A. and Smirnov V.N. Three types of naturally occurring modified lipoproteins induce intracellular lipid accumulation due to lipoprotein aggregation // *Circ Res.* 1992. T 71. C. 218-228.

46. Tertov V.V., Sobenin I.A., Gabbasov Z.A., Popov E.G., Yaroslavov A.A., Jauhiainen M., Ehnholm C., Smirnov V.N. and Orekhov A.N. Three types of naturally occurring modified lipoproteins induce intracellular lipid accumulation in human aortic intimal cells--the role of lipoprotein aggregation // *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1992. T 30. C. 171-178.

47. Tertov V.V., Sobenin I.A., Gabbasov Z.A., Popov E.G., Jaakkola O., Solakivi T., Nikkari T., Smirnov V.N. and Orekhov A.N. Multiple-modified desialylated low density lipoproteins that cause intracellular lipid accumulation. Isolation, fractionation and characterization // *Lab Invest.* 1992. T 67. C. 665-675.

48. Tertov V.V., Sobenin I.A. and Orekhov A.N. Characterization of desialylated low-density lipoproteins which cause intracellular lipid accumulation // *Int J Tissue React.* 1992. T 14. C. 155-162.

49. Brown M.S. and Goldstein J.L. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis // *Annu Rev Biochem.* 1983. T 52. C. 223-261.

50. Brown M.S., Goldstein J.L., Krieger M., Ho Y.K. and Anderson R.G. Reversible accumulation of cholesteryl esters in macrophages incubated with acetylated lipoproteins // *J Cell Biol.* 1979. T 82. C. 597-613.

51. Torzewski M., Suriyaphol P., Paprotka K., Spath L., Ochsenhirt V., Schmitt A., Han S.R., Husmann M., Gerl V.B., Bhakdi S. and Lackner K.J. Enzymatic modification of low-density lipoprotein in the arterial wall: a new role for plasmin and matrix metalloproteinases in atherogenesis // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004. T 24. C. 2130-2136.

52. Moore K.J. and Freeman M.W. Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006. T 26. C. 1702-1711.
53. Younis N., Sharma R., Soran H., Charlton-Menys V., Elseweidy M. and Durrington P.N. Glycation as an atherogenic modification of LDL // *Curr Opin Lipidol.* 2008. T 19. C. 378-384.
54. Lim W.S., Timmins J.M., Seimon T.A., Sadler A., Kolodgie F.D., Virmani R. and Tabas I. Signal transducer and activator of transcription-1 is critical for apoptosis in macrophages subjected to endoplasmic reticulum stress in vitro and in advanced atherosclerotic lesions in vivo // *Circulation.* 2008. T 117. C. 940-951.
55. Tall A.R. and Yvan-Charvet L. Cholesterol, inflammation and innate immunity // *Nat Rev Immunol.* 2015. T 15. C. 104-116.
56. Biswas S.K. and Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm // *Nat Immunol.* 2010. T 11. C. 889-896.
57. da Silva R.F., Lappalainen J., Lee-Rueckert M. and Kovanen P.T. Conversion of human M-CSF macrophages into foam cells reduces their proinflammatory responses to classical M1-polarizing activation // *Atherosclerosis.* 2016. T 248. C. 170-178.
58. Ghosh S., Zhao B., Bie J. and Song J. Macrophage cholesteryl ester mobilization and atherosclerosis // *Vascul Pharmacol.* 2010. T 52. C. 1-10.
59. Ouimet M. and Marcel Y.L. Regulation of lipid droplet cholesterol efflux from macrophage foam cells // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012. T 32. C. 575-581.
60. Ouimet M., Franklin V., Mak E., Liao X., Tabas I. and Marcel Y.L. Autophagy regulates cholesterol efflux from macrophage foam cells via lysosomal acid lipase // *Cell Metab.* 2011. T 13. C. 655-667.
61. Fioravanti J., Medina-Echeverz J. and Berraondo P. Scavenger receptor class B, type I: a promising immunotherapy target // *Immunotherapy.* 2011. T 3. C. 395-406.
62. Kellner-Weibel G. and de la Llera-Moya M. Update on HDL receptors and cellular cholesterol transport // *Curr Atheroscler Rep.* 2011. T 13. C. 233-241.
63. Yancey P.G., Jerome W.G., Yu H., Griffin E.E., Cox B.E., Babaev V.R., Fazio S. and Linton M.F. Severely altered cholesterol homeostasis in macrophages lacking apoE and SR-BI // *J Lipid Res.* 2007. T 48. C. 1140-1149.

64. Ye D., Lammers B., Zhao Y., Meurs I., Van Berkel T.J. and Van Eck M. ATP-binding cassette transporters A1 and G1, HDL metabolism, cholesterol efflux, and inflammation: important targets for the treatment of atherosclerosis // *Curr Drug Targets*. 2011. T 12. C. 647-660.
65. Schwartz E.A. and Reaven P.D. Lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins, vascular inflammation, and atherosclerosis // *Biochim Biophys Acta*. 2012. T 1821. C. 858-866.
66. Parkinson H., Sarkans U., Kolesnikov N., Abeygunawardena N., Burdett T., Dylag M., Emam I., Farne A., Hastings E., Holloway E., Kurbatova N., Lukk M., Malone J., Mani R., Pilicheva E., Rustici G., Sharma A., Williams E., Adamusiak T., Brandizi M., Sklyar N. and Brazma A. ArrayExpress update--an archive of microarray and high-throughput sequencing-based functional genomics experiments // *Nucleic Acids Res*. 2011. T 39. C. D1002-1004.
67. Edgar R. and Barrett T. NCBI GEO standards and services for microarray data // *Nat Biotechnol*. 2006. T 24. C. 1471-1472.
68. Holden M., Deng S., Wojnowski L. and Kulle B. GSEA-SNP: applying gene set enrichment analysis to SNP data from genome-wide association studies // *Bioinformatics*. 2008. T 24. C. 2784-2785.
69. Kel A. Data on master regulators and transcription factor binding sites found by upstream analysis of multi-omics data on methotrexate resistance of colon cancer // *Data Brief*. 2017. T 10. C. 499-504.
70. Odegaard J.I., Ricardo-Gonzalez R.R., Goforth M.H., Morel C.R., Subramanian V., Mukundan L., Red Eagle A., Vats D., Brombacher F., Ferrante A.W. and Chawla A. Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance // *Nature*. 2007. T 447. C. 1116-1120.
71. Odegaard J.I., Ricardo-Gonzalez R.R., Red Eagle A., Vats D., Morel C.R., Goforth M.H., Subramanian V., Mukundan L., Ferrante A.W. and Chawla A. Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPARdelta ameliorates obesity-induced insulin resistance // *Cell Metab*. 2008. T 7. C. 496-507.

72. Spann N.J., Garmire L.X., McDonald J.G., Myers D.S., Milne S.B., Shibata N., Reichart D., Fox J.N., Shaked I., Heudobler D., Raetz C.R., Wang E.W., Kelly S.L., Sullards M.C., Murphy R.C., Merrill A.H., Jr., Brown H.A., Dennis E.A., Li A.C., Ley K., Tsimikas S., Fahy E., Subramaniam S., Quehenberger O., Russell D.W. and Glass C.K. Regulated accumulation of desmosterol integrates macrophage lipid metabolism and inflammatory responses // *Cell*. 2012. T 151. C. 138-152.
73. Ghisletti S., Huang W., Ogawa S., Pascual G., Lin M.E., Willson T.M., Rosenfeld M.G. and Glass C.K. Parallel SUMOylation-dependent pathways mediate gene- and signal-specific transrepression by LXRs and PPARgamma // *Mol Cell*. 2007. T 25. C. 57-70.
74. Boyle J.J. Heme and haemoglobin direct macrophage Mhem phenotype and counter foam cell formation in areas of intraplaque haemorrhage // *Curr Opin Lipidol*. 2012. T 23. C. 453-461.
75. Ribas V., Drew B.G., Le J.A., Soleymani T., Daraei P., Sitz D., Mohammad L., Henstridge D.C., Febbraio M.A., Hewitt S.C., Korach K.S., Bensinger S.J. and Hevener A.L. Myeloid-specific estrogen receptor alpha deficiency impairs metabolic homeostasis and accelerates atherosclerotic lesion development // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011. T 108. C. 16457-16462.
76. Feinberg M.W., Cao Z., Wara A.K., Lebedeva M.A., Senbanerjee S. and Jain M.K. Kruppel-like factor 4 is a mediator of proinflammatory signaling in macrophages // *J Biol Chem*. 2005. T 280. C. 38247-38258.
77. Lovren F., Pan Y., Quan A., Singh K.K., Shukla P.C., Gupta N., Steer B.M., Ingram A.J., Gupta M., Al-Omran M., Teoh H., Marsden P.A. and Verma S. MicroRNA-145 targeted therapy reduces atherosclerosis // *Circulation*. 2012. T 126. C. S81-90.
78. Urtasun R., Cubero F.J. and Nieto N. Oxidative stress modulates KLF6Full and its splice variants // *Alcohol Clin Exp Res*. 2012. T 36. C. 1851-1862.
79. Dhaouadi N., Li J.Y., Feugier P., Gustin M.P., Dab H., Kacem K., Bricca G. and Cerutti C. Computational identification of potential transcriptional regulators of TGF-ss1 in human atherosclerotic arteries // *Genomics*. 2014. T 103. C. 357-370.

80. Hamers A.A., Vos M., Rassam F., Marinkovic G., Kurakula K., van Gorp P.J., de Winther M.P., Gijbels M.J., de Waard V. and de Vries C.J. Bone marrow-specific deficiency of nuclear receptor Nur77 enhances atherosclerosis // *Circ Res.* 2012. T 110. C. 428-438.
81. Chao L.C., Soto E., Hong C., Ito A., Pei L., Chawla A., Conneely O.M., Tangirala R.K., Evans R.M. and Tontonoz P. Bone marrow NR4A expression is not a dominant factor in the development of atherosclerosis or macrophage polarization in mice // *J Lipid Res.* 2013. T 54. C. 806-815.
82. Rose G.A. and Blackburn H. Cardiovascular survey methods // *East Afr Med J.* 1969. T 46. C. 220-227.
83. Rose G.A. and Blackburn H. Cardiovascular survey methods // *Monogr Ser World Health Organ.* 1968. T 56. C. 1-188.
84. Kahlon T.S., Glines L.A. and Lindgren F.T. Analytic ultracentrifugation of plasma lipoproteins // *Methods Enzymol.* 1986. T 129. C. 26-45.
85. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J Biol Chem.* 1951. T 193. C. 265-275.
86. Goldstein J.L., Ho Y.K., Basu S.K. and Brown M.S. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979. T 76. C. 333-337.
87. Steinbrecher U.P., Lougheed M., Kwan W.C. and Dirks M. Recognition of oxidized low density lipoprotein by the scavenger receptor of macrophages results from derivatization of apolipoprotein B by products of fatty acid peroxidation // *J Biol Chem.* 1989. T 264. C. 15216-15223.
88. Hara A. and Radin N.S. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent // *Anal Biochem.* 1978. T 90. C. 420-426.
89. Stary H.C., Chandler A.B., Glagov S., Guyton J.R., Insull W., Jr., Rosenfeld M.E., Schaffer S.A., Schwartz C.J., Wagner W.D. and Wissler R.W. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association // *Circulation.* 1994. T 89. C. 2462-2478.

90. Stary H.C., Chandler A.B., Glagov S., Guyton J.R., Insull W., Jr., Rosenfeld M.E., Schaffer S.A., Schwartz C.J., Wagner W.D. and Wissler R.W. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association // *Arterioscler Thromb.* 1994. T 14. C. 840-856.
91. Bolger A.M., Lohse M. and Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // *Bioinformatics.* 2014. T 30. C. 2114-2120.
92. Kim D., Pertea G., Trapnell C., Pimentel H., Kelley R. and Salzberg S.L. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions // *Genome Biol.* 2013. T 14. C. R36.
93. Langmead B. and Salzberg S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 // *Nat Methods.* 2012. T 9. C. 357-359.
94. Anders S., Pyl P.T. and Huber W. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data // *Bioinformatics.* 2015. T 31. C. 166-169.
95. Hong F., Breitling R., McEntee C.W., Wittner B.S., Nemhauser J.L. and Chory J. RankProd: a bioconductor package for detecting differentially expressed genes in meta-analysis // *Bioinformatics.* 2006. T 22. C. 2825-2827.
96. Subramanian A., Kuehn H., Gould J., Tamayo P. and Mesirov J.P. GSEA-P: a desktop application for Gene Set Enrichment Analysis // *Bioinformatics.* 2007. T 23. C. 3251-3253.
97. Stegmaier P., Voss N., Meier T., Kel A., Wingender E. and Borlak J. Advanced computational biology methods identify molecular switches for malignancy in an EGF mouse model of liver cancer // *PLoS One.* 2011. T 6. C. e17738.
98. Koschmann J., Bhar A., Stegmaier P., Kel A.E. and Wingender E. "Upstream Analysis": An Integrated Promoter-Pathway Analysis Approach to Causal Interpretation of Microarray Data // *Microarrays (Basel).* 2015. T 4. C. 270-286.
99. Waleev T., Shtokalo D., Konovalova T., Voss N., Cheremushkin E., Stegmaier P., Kel-Margoulis O., Wingender E. and Kel A. Composite Module Analyst: identification of transcription factor binding site combinations using genetic algorithm // *Nucleic Acids Res.* 2006. T 34. C. W541-545.

100. Krull M., Pistor S., Voss N., Kel A., Reuter I., Kronenberg D., Michael H., Schwarzer K., Potapov A., Choi C., Kel-Margoulis O. and Wingender E. TRANSPATH: an information resource for storing and visualizing signaling pathways and their pathological aberrations // *Nucleic Acids Res.* 2006. T 34. C. D546-551.
101. Panasenko O.M., Mel'nichenko A.A., Aksenov D.V., Tertov V.V., Kaplun V.V., Sobenin I.A. and Orekhov A.N. Oxidation-induced aggregation of LDL increases their uptake by smooth muscle cells from human aorta // *Bull Exp Biol Med.* 2007. T 143. C. 200-203.
102. Chen E.Y., Tan C.M., Kou Y., Duan Q., Wang Z., Meirelles G.V., Clark N.R. and Ma'ayan A. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool // *BMC Bioinformatics.* 2013. T 14. C. 128.
103. Kunjathoor V.V., Febbraio M., Podrez E.A., Moore K.J., Andersson L., Koehn S., Rhee J.S., Silverstein R., Hoff H.F. and Freeman M.W. Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages // *J Biol Chem.* 2002. T 277. C. 49982-49988.
104. Kruth H.S. Receptor-independent fluid-phase pinocytosis mechanisms for induction of foam cell formation with native low-density lipoprotein particles // *Curr Opin Lipidol.* 2011. T 22. C. 386-393.
105. De Paoli F., Staels B. and Chinetti-Gbaguidi G. Macrophage phenotypes and their modulation in atherosclerosis // *Circ J.* 2014. T 78. C. 1775-1781.
106. Yilmaz A., Lipfert B., Cicha I., Schubert K., Klein M., Raithel D., Daniel W.G. and Garlachs C.D. Accumulation of immune cells and high expression of chemokines/chemokine receptors in the upstream shoulder of atherosclerotic carotid plaques // *Exp Mol Pathol.* 2007. T 82. C. 245-255.
107. Trogan E., Feig J.E., Dogan S., Rothblat G.H., Angeli V., Tacke F., Randolph G.J. and Fisher E.A. Gene expression changes in foam cells and the role of chemokine receptor CCR7 during atherosclerosis regression in ApoE-deficient mice // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006. T 103. C. 3781-3786.

108. Park Y.M., Febbraio M. and Silverstein R.L. CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima // *J Clin Invest.* 2009. T 119. C. 136-145.
109. Li R., Paul A., Ko K.W., Sheldon M., Rich B.E., Terashima T., Dieker C., Cormier S., Li L., Nour E.A., Chan L. and Oka K. Interleukin-7 induces recruitment of monocytes/macrophages to endothelium // *Eur Heart J.* 2012. T 33. C. 3114-3123.
110. Lusis A.J. Atherosclerosis // *Nature.* 2000. T 407. C. 233-241.
111. Kittipatarin C. and Khaled A.R. Interlinking interleukin-7 // *Cytokine.* 2007. T 39. C. 75-83.
112. van Es T., van Puijvelde G.H., Michon I.N., van Wanrooij E.J., de Vos P., Peterse N., van Berkel T.J. and Kuiper J. IL-15 aggravates atherosclerotic lesion development in LDL receptor deficient mice // *Vaccine.* 2011. T 29. C. 976-983.
113. Reddy S., Hama S., Grijalva V., Hassan K., Mottahedeh R., Hough G., Wadleigh D.J., Navab M. and Fogelman A.M. Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 activity is necessary for oxidized phospholipids to induce monocyte chemotactic activity in human aortic endothelial cells // *J Biol Chem.* 2001. T 276. C. 17030-17035.
114. Zerneck A., Shagdarsuren E. and Weber C. Chemokines in atherosclerosis: an update // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008. T 28. C. 1897-1908.
115. Kim S.M., Lee C.W., Kim B.Y., Jung Y.S., Eo S.K., Park Y.C. and Kim K. 27-Oxygenated cholesterol induces expression of CXCL8 in macrophages via NF-kappaB and CD88 // *Biochem Biophys Res Commun.* 2015. T 463. C. 1152-1158.
116. Tao Y.K., Yu P.L., Bai Y.P., Yan S.T., Zhao S.P. and Zhang G.Q. Role of PERK/eIF2alpha/CHOP Endoplasmic Reticulum Stress Pathway in Oxidized Low-density Lipoprotein Mediated Induction of Endothelial Apoptosis // *Biomed Environ Sci.* 2016. T 29. C. 868-876.
117. de Jong R.J., Paulin N., Lemnitzer P., Viola J.R., Winter C., Ferraro B., Grommes J., Weber C., Reutelingsperger C., Drechsler M. and Soehnlein O. Protective Aptitude of Annexin A1 in Arterial Neointima Formation in Atherosclerosis-Prone Mice-Brief Report // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017. T 37. C. 312-315.

118. Levin S.D., Taft D.W., Brandt C.S., Bucher C., Howard E.D., Chadwick E.M., Johnston J., Hammond A., Bontadelli K., Ardourel D., Hebb L., Wolf A., Bukowski T.R., Rixon M.W., Kuijper J.L., Ostrander C.D., West J.W., Billsborough J., Fox B., Gao Z., Xu W., Ramsdell F., Blazar B.R. and Lewis K.E. Vstm3 is a member of the CD28 family and an important modulator of T-cell function // *Eur J Immunol.* 2011. T 41. C. 902-915.
119. Lozano E., Dominguez-Villar M., Kuchroo V. and Hafler D.A. The TIGIT/CD226 axis regulates human T cell function // *J Immunol.* 2012. T 188. C. 3869-3875.
120. Foks A.C., Ran I.A., Frodermann V., Bot I., van Santbrink P.J., Kuiper J. and van Puijvelde G.H. Agonistic anti-TIGIT treatment inhibits T cell responses in LDLr deficient mice without affecting atherosclerotic lesion development // *PLoS One.* 2013. T 8. C. e83134.
121. Kidani Y. and Bensinger S.J. Reviewing the impact of lipid synthetic flux on Th17 function // *Curr Opin Immunol.* 2017. T 46. C. 121-126.
122. Ito A., Hong C., Oka K., Salazar J.V., Diehl C., Witztum J.L., Diaz M., Castrillo A., Bensinger S.J., Chan L. and Tontonoz P. Cholesterol Accumulation in CD11c+ Immune Cells Is a Causal and Targetable Factor in Autoimmune Disease // *Immunity.* 2016. T 45. C. 1311-1326.
123. Kidani Y. and Bensinger S.J. Modulating Cholesterol Homeostasis to Build a Better T Cell // *Cell Metab.* 2016. T 23. C. 963-964.
124. York A.G., Williams K.J., Argus J.P., Zhou Q.D., Brar G., Vergnes L., Gray E.E., Zhen A., Wu N.C., Yamada D.H., Cunningham C.R., Tarling E.J., Wilks M.Q., Casero D., Gray D.H., Yu A.K., Wang E.S., Brooks D.G., Sun R., Kitchen S.G., Wu T.T., Reue K., Stetson D.B. and Bensinger S.J. Limiting Cholesterol Biosynthetic Flux Spontaneously Engages Type I IFN Signaling // *Cell.* 2015. T 163. C. 1716-1729.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

Рисунок 1. Строение артериальной стенки. стр. 9

Рисунок 2. Типы атеросклеротических поражений. стр. 10

Рисунок 3. Структура интимы артерий. стр. 12

Рисунок 4. Фенотипы макрофагов и стабильность атеросклеротической бляшки. стр. 15

Таблица 1. Фенотипы макрофагов человека и их роль в атеросклерозе. стр. 17

Рисунок 5. Структурная схема программного конвейера для первичной обработки результатов секвенирования транскриптомных образцов. стр. 38

Рисунок 6. Дедупликация чтений с использованием квазислучайных баркодов. стр. 40

Рисунок 7. Распространенность атерогенных и неатерогенных сывороток крови в группах здоровых лиц и больных ИБС. стр. 47

Рисунок 8. Накопление внутриклеточного холестерина макрофагами под влиянием атерогенных ЛНП. стр. 48

Рисунок 9. Внутриклеточное распределение нативных ЛНП. стр. 49

Рисунок 10. Внутриклеточное распределение атерогенных ЛНП. стр. 50

Рисунок 11. Взаимное внутриклеточное распределение нативных и атерогенных ЛНП. стр. 51

Рисунок 12. Двойное иммуногистохимическое окрашивание на TNF (коричневый) и CCL18 (красный) непораженной интимы аорты человека (А-С). стр. 53

Рисунок 13. Двойное иммуногистохимическое окрашивание на TNF (коричневый) и CCL18 (красный) начального поражения интимы аорты человека (A-D). стр. 54

Рисунок 14. Двойное иммуногистохимическое окрашивание на TNF (коричневый) и CCL18 (красный) атеросклеротической бляшки интимы аорты человека (A-C). стр. 55

Рисунок 15. Двойное иммуногистохимическое окрашивание на TNF (коричневый) и CCL18 (красный) различных участков атеросклеротической бляшки интимы аорты человека (A-E). стр. 56

Рисунок 16. Двойное иммуногистохимическое окрашивание на TNF (коричневый) и CCL18 (красный) различных участков атеросклеротической бляшки интимы аорты человека (A-D). стр.57

Рисунок 17. Экспрессия TNF и CCL18 в интимае аорты человека. стр. 58

Рисунок 18. Экспрессия TNF и CCL18 макрофагами человека при взаимодействии с нативными и атерогенными ЛНП. стр. 60

Рисунок 19. Электрофоретическая подвижность ЛНП. стр. 61

Рисунок 20. Влияние окисленных и ацетилированных ЛНП на внутриклеточный уровень общего холестерина, свободного холестерина и эфиров холестерина макрофагов. стр. 62

Таблица 2. Онтология генов, активность которых меняется при накоплении холестерина макрофагами человека. стр. 64

Таблица 3. Гены, ассоциированные с атеросклерозом. стр. 67

Таблица 4. Отобранные факторы транскрипции. стр. 68

Рисунок 21. Общая диаграмма мастер-регуляторов, ответственных за внутриклеточное накопление холестерина под влиянием модифицированных ЛНП. стр. 71

Таблица 5. Описание генов мастер-регуляторов. стр. 72

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 6. Первичные данные накопления холестерина, вызванного сывороткой крови больных ИБС и здоровых лиц. Содержание холестерина в клетках, инкубированных с исследуемой сывороткой, представлено в % от содержания холестерина в контрольной культуре клеток в среде RPMI с соответствующим содержанием FBS, которое принималось за 100%

* - Статистически значимое отличие от контроля ($p < 0,05$).

номер	диагноз / число стенозов	пол	возраст	содержание холестерина, % от контроля
1	здоров	м	36	117±13
2	здоров	м	34	100±10
3	здоров	м	37	108±14
4	здоров	м	54	105±1
5	здоров	м	53	103±1
6	здоров	ж	46	127±14
7	здоров	ж	37	332±45*
8	здоров	ж	41	113±3
9	здоров	м	30	108±1
10	здоров	м	33	119±3
11	здоров	м	43	119±5
12	здоров	ж	47	128±15
13	здоров	ж	40	232±16*
14	здоров	ж	41	160±21*
15	здоров	м	38	130±19
16	здоров	ж	45	117±13
17	здоров	ж	49	135±18
18	здоров	м	36	109±19
19	здоров	м	40	116±1
20	здоров	м	43	112±12
21	здоров	м	40	109±3
22	здоров	ж	44	121±13
23	здоров	ж	49	198±12*
24	здоров	ж	51	221±15*

25	здоров	ж	44	106±16
26	здоров	ж	50	148±16
27	здоров	ж	43	115±5
28	здоров	ж	54	256±22*
29	здоров	ж	46	150±35
30	здоров	ж	52	113±2
31	здоров	м	29	110±3
32	здоров	м	31	109±2
33	здоров	м	35	106±20
34	здоров	м	47	109±5
35	здоров	м	50	119±5
36	здоров	ж	53	256±8*
37	здоров	м	46	109±1
38	здоров	ж	44	111±11
39	здоров	м	24	103±1
40	здоров	м	38	135±18
41	здоров	м	42	119±3
42	здоров	м	46	116±13
43	здоров	ж	45	124±13
44	здоров	м	27	104±2
45	здоров	м	37	150±35
46	здоров	м	43	111±12
47	здоров	м	55	104±5
48	здоров	м	41	120±8
49	здоров	м	39	125±23
50	здоров	м	53	105±1
51	здоров	м	51	100±10
52	здоров	м	35	120±10
53	здоров	м	41	111±11
54	здоров	м	57	117±16
55	здоров	м	57	100±5
56	здоров	м	48	150±5
57	здоров	ж	52	196±8*
58	здоров	м	32	118±2
59	здоров	м	38	128±19
60	здоров	м	45	111±13
61	здоров	м	51	112±15

62	здоров	м	45	110±5
63	здоров	м	54	104±1
64	здоров	м	42	118±8
65	здоров	ж	39	238±39*
66	здоров	ж	48	130±16
67	здоров	ж	45	111±14
68	здоров	м	32	120±3
69	здоров	м	52	131±16
70	здоров	м	55	105±2
71	здоров	ж	43	106±40
72	здоров	ж	51	145±23
73	здоров	ж	38	280±35*
74	здоров	ж	42	140±10
75	здоров	ж	47	108±14
76	здоров	ж	47	116±3
77	здоров	м	29	100±3
78	здоров	м	44	119±5
79	здоров	м	49	119±5
80	здоров	м	56	100±12
81	здоров	ж	48	131±14
82	здоров	ж	46	114±3
83	здоров	м	26	103±1
84	здоров	м	42	1112±3
85	здоров	м	40	115±1
86	здоров	м	39	108±3
87	здоров	ж	50	212±18*
88	здоров	ж	55	203±10*
89	здоров	м	39	113±1
90	здоров	ж	42	116±4
91	здоров	м	39	113±1
92	здоров	м	41	111±12
93	здоров	м	52	103±2
94	здоров	м	57	100±8
95	здоров	ж	48	111±14
96	здоров	м	28	105±1
97	здоров	м	56	105±1
98	ИБС / 2	ж	57	205±26*

99	ИБС / 1	м	36	100±10
100	ИБС / 1	ж	39	128±19
101	ИБС / 1	м	47	449±53*
102	ИБС / 1	м	48	256±28*
103	ИБС / 1	м	50	232±16*
104	ИБС / 2	ж	55	334±35*
105	ИБС / 2	ж	56	203±21*
106	ИБС / 3	ж	57	228±29*
107	ИБС / 1	м	44	309±51*
108	ИБС / 1	м	39	226±26*
109	ИБС / 1	м	42	332±35*
110	ИБС / 1	м	46	400±42*
111	ИБС / 1	м	48	434±44*
112	ИБС / 1	м	48	196±18*
113	ИБС / 1	м	51	333±34*
114	ИБС / 1	м	52	333±34*
115	ИБС / 2	ж	55	203±10*
116	ИБС / 2	ж	56	222±22*
117	ИБС / 1	м	44	309±38*
118	ИБС / 1	м	47	424±44*
119	ИБС / 1	м	51	333±38*
120	ИБС / 1	м	53	305±26*
121	ИБС / 1	м	41	229±35*
122	ИБС / 1	м	43	305±38*
123	ИБС / 3	ж	57	228±29*
124	ИБС / 1	м	43	300±51*
125	ИБС / 1	м	47	424±43*
126	ИБС / 1	м	49	256±22*
127	ИБС / 1	м	50	208±24*
128	ИБС / 1	м	50	235±28*
129	ИБС / 1	м	53	218±38*
130	ИБС / 2	ж	54	308±34*
131	ИБС / 2	ж	54	339±51*
132	ИБС / 2	ж	56	205±32*
133	ИБС / 3	ж	58	238±39*
134	ИБС / 3	м	59	445±23*
135	ИБС / 1	м	46	400±48*

136	ИБС / 1	м	47	428±45*
137	ИБС / 1	м	52	336±36*
138	ИБС / 1	м	41	222±40*
139	ИБС / 1	м	48	212±18*
140	ИБС / 1	м	50	227±23*
141	ИБС / 1	м	35	118±4
142	ИБС / 1	м	36	140±38
143	ИБС / 1	м	45	403±28*
144	ИБС / 1	м	49	280±35*
145	ИБС / 1	м	50	240±20*
146	ИБС / 1	м	50	206±26*
147	ИБС / 1	м	51	245±23*
148	ИБС / 1	м	52	412±15*
149	ИБС / 2	ж	55	300±32*
150	ИБС / 2	ж	55	212±18*
151	ИБС / 2	ж	56	223±25*
152	ИБС / 2	ж	56	222±24*
153	ИБС / 1	м	41	222±32*
154	ИБС / 1	м	28	203±2
155	ИБС / 1	м	43	330±50*
156	ИБС / 1	м	51	333±22*
157	ИБС / 1	м	29	103±3
158	ИБС / 1	м	41	229±38*
159	ИБС / 1	м	49	238±39*
160	ИБС / 1	м	50	260±22*
161	ИБС / 1	м	53	210±55*
162	ИБС / 3	ж	57	222±23*
163	ИБС / 3	м	58	405±27*
164	ИБС / 1	ж	38	150±35
165	ИБС / 1	м	43	305±35*
166	ИБС / 1	м	44	339±39*
167	ИБС / 1	м	46	409±36*
168	ИБС / 1	м	53	304±19*
169	ИБС / 2	ж	54	340±30*
170	ИБС / 2	ж	55	532±38*
171	ИБС / 2	ж	57	296±28*
172	ИБС / 3	м	59	406±40*

173	ИБС / 1	м	32	110±3
174	ИБС / 1	м	30	105±2
175	ИБС / 1	м	50	250±35*
176	ИБС / 3	ж	57	220±35*
177	ИБС / 1	м	29	104±4
178	ИБС / 1	м	37	106±40
179	ИБС / 1	ж	38	130±19
180	ИБС / 1	м	45	403±49*
181	ИБС / 1	м	47	427±44*
182	ИБС / 1	м	49	332±45*
183	ИБС / 1	м	50	230±26*
184	ИБС / 1	м	51	248±26*
185	ИБС / 1	м	52	334±36*
186	ИБС / 1	м	52	196±28*
187	ИБС / 1	м	53	220±36*
188	ИБС / 2	ж	55	333±34*
189	ИБС / 2	ж	56	200±28*
190	ИБС / 3	м	58	444±44*
191	ИБС / 1	ж	37	109±19
192	ИБС / 1	м	32	108±1
193	ИБС / 1	ж	38	108±14
194	ИБС / 1	ж	38	135±18
195	ИБС / 1	м	40	225±27*
196	ИБС / 1	м	40	222±28*
197	ИБС / 1	м	41	338±33*
198	ИБС / 1	м	42	337±36*
199	ИБС / 1	м	44	350±55*
200	ИБС / 1	м	51	333±37*
201	ИБС / 1	м	53	230±16*
202	ИБС / 1	м	53	331±16*
203	ИБС / 1	м	54	480±35*
204	ИБС / 2	ж	56	223±22*
205	ИБС / 3	ж	57	222±25*
206	ИБС / 1	м	54	306±40*
207	ИБС / 1	м	35	119±3
208	ИБС / 1	ж	37	117±13
209	ИБС / 1	м	40	222±22*

210	ИБС / 1	м	42	336±33*
211	ИБС / 1	м	51	335±35*
212	ИБС / 1	м	52	411±13*
213	ИБС / 2	ж	54	339±54*
214	ИБС / 2	ж	56	226±45*
215	ИБС / 1	м	39	223±23*
216	ИБС / 1	м	45	404±41*
217	ИБС / 1	м	46	408±35*
218	ИБС / 2	ж	54	336±38*
219	ИБС / 1	м	31	100±3
220	ИБС / 1	ж	39	145±43
221	ИБС / 1	м	40	262±39*
222	ИБС / 1	м	46	405±25*
223	ИБС / 1	м	52	128±19*
224	ИБС / 1	м	53	238±39*
225	ИБС / 2	ж	54	300±31*
226	ИБС / 2	ж	55	308±34*
227	ИБС / 3	м	59	280±35*
228	ИБС / 1	м	49	203±10*
229	ИБС / 1	м	46	420±38*
230	ИБС / 1	м	51	336±42*
231	ИБС / 1	м	52	118±26*
232	ИБС / 2	ж	55	303±30*
233	ИБС / 3	м	59	440±40*
234	ИБС / 1	м	54	445±23*
235	ИБС / 3	м	58	434±46*
236	ИБС / 1	м	42	305±30*
237	ИБС / 1	м	50	206±40*
238	ИБС / 1	м	47	448±48*
239	ИБС / 1	м	53	311±14*
240	ИБС / 3	ж	58	430±46*
241	ИБС / 1	м	45	300±30*
242	ИБС / 3	ж	57	228±28*
243	ИБС / 1	м	34	140±30
244	ИБС / 1	м	39	243±28*
245	ИБС / 1	м	42	333±36*
246	ИБС / 1	м	48	498±42*

247	ИБС / 1	м	48	221±15*
248	ИБС / 3	ж	57	204±32*
249	ИБС / 3	м	58	420±35*
250	ИБС / 1	м	33	129±14
251	ИБС / 1	м	45	339±35*
252	ИБС / 2	ж	55	335±30*
253	ИБС / 1	м	43	304±50*

Таблица 7. Гены, экспрессия которых увеличивается при взаимодействии макрофагов с модифицированными ЛНП по сравнению с нативными ЛНП

Ген	Полное название гена	P
RP11-96C23.14		3,87E-04
NPM1P12	nucleophosmin 1 (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin) pseudogene 12	3,87E-04
CLEC9A	C-type lectin domain family 9 member A	4,64E-04
PSMD10P2	proteasome 26S subunit, non-ATPase, 10 pseudogene 2	4,64E-04
RP11-69I8.2		6,49E-04
RP11-32B5.7		6,93E-04
RP11-697N18.2		9,44E-04
ANXA3	annexin A3	9,61E-04
AC022210.2		9,61E-04
EFHC2	EF-hand domain (C-terminal) containing 2	9,81E-04
MAPK10	mitogen-activated protein kinase 10	0,001037
UBE2NL	ubiquitin conjugating enzyme E2N-like (gene/pseudogene)	0,001037
DBIL5P	diazepam binding inhibitor-like 5, pseudogene	0,001061
CTD-2540F13.2		0,001118
RP11-707P17.1		0,003524
NR2E3	nuclear receptor subfamily 2 group E member 3	0,003849
MFSD2B	major facilitator superfamily domain containing 2B	0,003993
GPR137C	G protein-coupled receptor 137C	0,00491
RP1-65J11.5		0,00503
LINC01352	long intergenic non-protein coding RNA 1352	0,005105
ACTN1-AS1	ACTN1 antisense RNA 1	0,00591
RP11-		0,007403

317G6.1		
HNRNPA1P1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 pseudogene 1	0,007403
AC079779.4		0,007403
FERP1	fer (fps/fes related) tyrosine kinase (phosphoprotein NCP94) pseudogene 1	0,007544
TANC1	tetratricopeptide repeat, ankyrin repeat and coiled-coil containing 1	0,0078
RN7SL128P	RNA, 7SL, cytoplasmic 128, pseudogene	0,007824
RCAN2	regulator of calcineurin 2	0,008265
RP11-120C12.3		0,008552
RP11-305D15.8		0,008749
RP3-455J7.3		0,008816
GJA1	gap junction protein alpha 1	0,008889
RP3-507I15.1		0,010078
RP11-298O21.6		0,010245
SMC5-AS1	SMC5 antisense RNA 1 (head to head)	0,010502
ADAMTS10	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 10	0,010739
AP000704.5		0,014572
CTD-2290C23.1		0,014801
SUMO2P12	SUMO2 pseudogene 12	0,015196
HIST1H4J	histone cluster 1, H4j	0,015267
AC009264.1		0,015822
RP11-377K22.2		0,016247
RP11-603J24.5		0,017173
CTD-2135D7.3		0,01934
DDX12P	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 12, pseudogene	0,01972
RPL39P40	ribosomal protein L39 pseudogene 40	0,019888
C1QTNF7	C1q and tumor necrosis factor related protein 7	0,02019
RP4-580O19.2		0,021118
RP11-504I13.3		0,021358
GDF6	growth differentiation factor 6	0,021612
LINC01412	long intergenic non-protein coding RNA 1412	0,022292
AC103724.1		0,022292
RP11-367H5.8		0,022639
XRCC6P2	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6 pseudogene 2	0,025186
FOSB	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B	0,025957
RNU6-199P	RNA, U6 small nuclear 199, pseudogene	0,026704
NBEAP1	neurobeachin pseudogene 1	0,026704
RP5-899B16.1		0,026704
RP11-222K16.1		0,026704

RP11-830F9.7		0,026704
UBE2Q1-AS1	UBE2Q1 antisense RNA 1	0,026704
PFN1P1	profilin 1 pseudogene 1	0,028193
RP11-84C10.1		0,029239
HMGB1P3	high mobility group box 1 pseudogene 3	0,029239
IGFL2	IGF like family member 2	0,029239
RNU6-194P	RNA, U6 small nuclear 194, pseudogene	0,029239
RP13-258O15.1		0,029383
SNORA77	small nucleolar RNA, H/ACA box 77	0,030291
RPS20P24	ribosomal protein S20 pseudogene 24	0,030421
OR1AB1P	olfactory receptor family 1 subfamily AB member 1 pseudogene	0,031379
HSD17B6	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 6	0,031553
RP11-434D12.1		0,032689
RP13-128O4.3		0,033666
SLC25A5P7	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 5 pseudogene 7	0,034098
CMB9-94B1.2		0,036317
RN7SL288P	RNA, 7SL, cytoplasmic 288, pseudogene	0,037187
RP11-383G6.3		0,038992
RP4-669H2.1		0,039443
ROR1	receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1	0,039443
RP11-524O24.2		0,039469
NSUN7	NOP2/Sun RNA methyltransferase family member 7	0,039863
STMN1P1	stathmin 1 pseudogene 1	0,044211
AP003096.1		0,044329
HOXB13	homeobox B13	0,044329
RP11-972P1.8		0,044329
NDUFAB1P1	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit AB1 pseudogene 1	0,044521
SETP17	SET pseudogene 17	0,04521
BMP7	bone morphogenetic protein 7	0,045663
SIGLEC12	sialic acid binding Ig-like lectin 12 (gene/pseudogene)	0,04635
CHRNA10	cholinergic receptor, nicotinic alpha 10	0,047543
HES4	hes family bHLH transcription factor 4	0,047543
CAPN6	calpain 6	0,048018
RP4-614O4.11		0,048124

Таблица 8. Гены, экспрессия которых уменьшается при взаимодействии макрофагов с модифицированными ЛНП по сравнению с нативными ЛНП

Ген	Полное название гена	P
AIPL1	aryl hydrocarbon receptor interacting protein-like 1	3,87E-04
RP11-1029M24.1		6,93E-04
RP11-1074O12.1		9,44E-04
MAL	mal, T-cell differentiation protein	9,85E-04
ALDH8A1	aldehyde dehydrogenase 8 family member A1	0,001254
SOCS5P4	suppressor of cytokine signaling 5 pseudogene 4	0,001315
CCDC136	coiled-coil domain containing 136	0,001546
OLA1P3	Obg-like ATPase 1 pseudogene 3	0,001625
CTB-180A7.6		0,001687
RPL5P3	ribosomal protein L5 pseudogene 3	0,002907
RPL29P14	ribosomal protein L29 pseudogene 14	0,003849
HSPD1P7	heat shock protein family D (Hsp60) member 1 pseudogene 7	0,003849
AC012358.7		0,003849
RP1-21O18.3		0,004442
RP11-6O2.3		0,00515
AC005229.5		0,00515
LINC01057	long intergenic non-protein coding RNA 1057	0,005379
RP11-429P3.5		0,005395
POU3F1	POU class 3 homeobox 1	0,005575
MUSK	muscle, skeletal, receptor tyrosine kinase	0,005807
RP11-339B9.1		0,007403
TAS2R20	taste 2 receptor member 20	0,007403
RP11-96D1.3		0,007544
CA14	carbonic anhydrase XIV	0,007989
SNX6P1	sorting nexin 6 pseudogene 1	0,007989
RP11-141M1.1		0,008265
PNMA2	paraneoplastic Ma antigen 2	0,008265
TEAD2	TEA domain family member 2	0,009197
RP5-965G21.4		0,012703
ABHD1	abhydrolase domain containing 1	0,014465
RP11-667M19.9		0,014886
OR7E94P	olfactory receptor family 7 subfamily E member 94 pseudogene	0,016247
RP11-539L10.2		0,019888
SARNP	SAP domain containing ribonucleoprotein	0,022292
AC008074.3		0,022292

ATP6V1E1P1	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 31kDa, V1 subunit E1 pseudogene 1	0,022639
POU5F1P3	POU class 5 homeobox 1 pseudogene 3	0,023365
RPS15AP25	ribosomal protein S15a pseudogene 25	0,025186
CTD-2262B20.1		0,026109
RP11-1018N14.2		0,026377
FAM151A	family with sequence similarity 151 member A	0,029239
EFHD1	EF-hand domain family member D1	0,030291
RPS3AP4	ribosomal protein S3A pseudogene 4	0,031838
CFB	complement factor B	0,033588
POPDC3	popeye domain containing 3	0,03387
VDAC2P2	voltage-dependent anion channel 2 pseudogene 2	0,034098
CXCR3	chemokine (C-X-C motif) receptor 3	0,034098
KB-431C1.5		0,038813
AC011288.2		0,039443
AC068491.3		0,039469
EIF4A1P5	eukaryotic translation initiation factor 4A1 pseudogene 5	0,04252
CTC-539A10.7		0,045273
RP11-404O13.5		0,047543
RP13-131K19.6		0,048124

Таблица 9. Регуляторы, потенциально ответственные за внутриклеточное накопление холестерина под влиянием модифицированных ЛНП

ID	Master molecule
MO000000191	EGF:(ErbB1)2:Shc-1:Grb-2:Sos
MO000000292	PA700
MO000016838	IL-7Ralpha-isoform1(h)
MO000019461	IFNGR2:Jak2:Tid-1:Hsp70-1
MO000019545	c-Ets-2(h)
MO000019913	MCP-1:CCR2
MO000020374	ALK-1(h)
MO000022280	IL-8(h):CXCR1(h)

MO000022284	IL-8(h):CXCR2(h)
MO000022339	IL-8(h):CXCR1(h):G-alpha-i2(h)
MO000022340	IL-8(h):CXCR2(h):G-alpha-i2(h)
MO000023508	CDKN3-isoform1(h)
MO000023516	CDKN3-isoform1(h):HTm4(h)
MO000025574	ATF-3-isoform1(h)
MO000025584	ATF-3-isoform2(h)
MO000034188	VHL(h):TCP-1(h):Hsp70-1(h)
MO000034656	(Hsp90)2:AhR:STIP1:Hsp70-1
MO000036617	Hsp70-1-isoform1(h)
MO000038057	CD51(h):beta5-integrin(h)
MO000038091	CD51(h):beta3-integrin(h)
MO000042779	epiregulin(h)
MO000043414	cyclosome(h)
MO000043472	cyclosome(p)n
MO000043487	cyclosome(h):Cdc20(h)
MO000043586	cyclosome(p)n:Cdc20(p)
MO000043591	cyclosome(p)n:Fzr
MO000043635	cyclosome(p)n:Fzr:MAD2B
MO000044269	cyclosome(h):Fzr(h)
MO000045999	CREMalpha(h)
MO000058574	trim25(h)
MO000058631	Nedd4-2-xbb1(h)
MO000058633	PAR2(h)
MO000058639	Nedd4-2-isoform4(h)
MO000058647	Nedd4-2-isoform5(h)

MO000058653	Nedd4-2-isoform1(h)
MO000058658	Nedd4-2-isoform6(h)
MO000058660	Nedd4-2-isoform7(h)
MO000059050	PAR2(h)(ub)
MO000059062	CD51-isoform1(h)
MO000059189	Keratin10(h)
MO000059216	Annexin A1(h)
MO000059675	SOCS-3(h)
MO000060056	leptin(h)
MO000078350	Laminin-gamma1(h)
MO000078608	PC5B(h)
MO000078613	Sos1-isoform1(h)
MO000080414	EULIR(h)
MO000082602	IL-7-isoform1(h)
MO000083220	pam-isoform2(h)
MO000083769	MKP-1(h)
MO000086854	PKCeta-isoform1(h)
MO000086870	PTN4(h)
MO000089711	Hsp90-alpha(h)
MO000093601	RALT(h)
MO000094911	c-Met-isoform2(h)
MO000094913	c-Met-isoform1(h)
MO000094964	FANCL-isoform1(h)
MO000096389	COX2(h)
MO000098265	nucleoside diphosphate kinase 7-isoform1(h)
MO000099481	IL-8-isoform1(h)

MO000102591	Itk(h)
MO000104136	cyclosome(h):Fzr1(h)
MO000108205	cyclosome(h):Cdc20(h)(ub)n
MO000108289	cyclosome:Cdc20(ub)n
MO000114396	MCP-1(h)
MO000119104	Insulinase-isoform1(h)
MO000123125	cyclosome(p)n:Cdc20:(MAD2)2:BubR1:cyclinB1:Cdk1:Cks1:p31-comet:(E2-C(ub(1)))n
MO000123226	Nek2A:cyclosome(p)n:Cdc20:E2-C(ub(1))
MO000123239	Nek2A(ub(1)):cyclosome(p)n:Cdc20:(E2-C(ub(1)))n
MO000123290	cyclosome(p)n:Fzr1:cyclinB1:E2-C(ub(1))
MO000123308	cyclosome(p)n:Fzr1:cyclinB1(ub(1)):(E2-C(ub(1)))n
MO000123384	securin:Separin(pS1126):cyclosome(p)n:Fzr1:E2-C(ub(1))
MO000123386	securin(ub(1)):Separin(pS1126):cyclosome(p)n:Fzr1:(E2-C(ub(1)))n
MO000123503	PrPc-isoform1(h)
MO000125037	beta3-integrin(h):CD51-isoform1(h)
MO000128063	perk(h)
MO000133223	PRL-1(h)
MO000138868	DAN-isoform1(h)
MO000143668	4-1BB(h)
MO000144380	Fz7(h)
MO000144705	IL15-S48AA(h)
MO000145441	slc7a11(h)
MO000145604	Apelin(h)
MO000155609	SCF-isoform1(h)
MO000156322	GNRH(h)

MO000164835	MCT-isoform1(h)
MO000167063	TOSO-isoform1(h)
MO000168304	SCF-isoform2(h)
MO000171006	SYND2(h)
MO000172788	pam-isoform1(h)
MO000172789	pam-isoform3(h)
MO000172790	pam-isoform4(h)
MO000172791	pam-isoform5(h)
MO000173338	TRXR1-isoform1(h)
MO000173339	TRXR1-isoform2(h)
MO000173340	TRXR1-isoform3(h)
MO000173341	TRXR1-isoform4(h)
MO000173342	TRXR1-isoform5(h)
MO000173343	TRXR1-isoform6(h)
MO000179914	Gwl-isoform1(h)
MO000180153	LOX-1-isoform1(h)
MO000187711	EGF-ECD:(ErbB1-p170(pY1016)(pY1092)(pY1110)(pY1172)(pY1197))2:Sos1:abi1:Eps8
MO000188062	Sos1:abi1:Eps8:PIP3
MO000188063	PIP3:Sos1(p):abi1:Eps8
MO000197521	Itk(h):SLP-76(h)
MO000201420	TSPYL2(h)
MO000213610	KLK4-isoform1(h)
MO000216163	MME(h)
MO000223260	TIGIT-isoform1(h)
MO000223262	TIGIT-isoform2(h)

MO000254196	pam-isoform6(h)
MO000254616	CDKN3-isoform2(h)
MO000255573	Hsp90-alpha-isoform2(h)
MO000255640	IL15-S21AA(h)
MO000255665	IL-7Ralpha-isoform3(h)
MO000255667	IL-7Ralpha-isoform4(h)
MO000255668	IL-7Ralpha-isoform2(h)
MO000255727	CD51-isoform2(h)
MO000256110	c-Met-isoform3(h)
MO000256318	nucleoside diphosphate kinase 7-isoform2(h)
MO000256326	Nedd4-2-isoform3(h)
MO000256555	LOX-1-isoform2(h)
MO000256696	PC5A(h)
MO000256923	PrPc-isoform2(h)
MO000257335	SCF-isoform3(h)
MO000258871	DAN-isoform2(h)
MO000270854	ATF-3-isoform3(h)
MO000270855	ATF-3-isoform4(h)
MO000271069	TOSO-isoform2(h)
MO000271189	IL-7-isoform2(h)
MO000271336	Nedd4-2-isoform9(h)
MO000277254	Insulinase-isoform2(h)
MO000286323	TOSO-isoform3(h)
MO000286429	CD51-isoform3(h)
MO000286518	MCT-isoform2(h)
MO000286626	LOX-1-isoform3(h)

MO000287109	Hsp70-1-isoform2(h)
MO000311888	ATF-3-isoform5(h)
MO000318973	IL-7-isoform3(h)
MO000319024	MCT-isoform3(h)
MO000328431	TRXR1-isoform7(h)
MO000330500	trim25(h)(ub)
MO000334738	KLK4-isoform2(h)
MO000334740	PKCeta-isoform2(h)
MO000335200	Sos1-isoform2(h)
MO000339650	trim25(h)(ub)n
MO000339654	trim25(h)(ub)n
MO000339668	trim25(h)(ub)