

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

На правах рукописи

Сухоруков Василий Николаевич

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРОАТЕРОГЕННЫХ ДЕГЛИКОЗИЛИРОВАННЫХ
ЛИПОПРОТЕИДОВ С МАКРОФАГАМИ**

3.3.3 – патологическая физиология

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук
Собенин Игорь Александрович

Москва 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1. Атерогенные ЛНП	11
1.2. Пенистые клетки	22
1.3. Заключение	26
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	28
2.1. Доноры	28
2.2. Выделение липопротеидов.....	30
2.2.1. Выделение суммарной фракции ЛНП из плазмы крови	30
2.2.2. Выделение подфракций липопротеидов.....	30
2.4. Химический анализ и ферментативная активность липопротеидов	31
2.5. Измерение активности лецитин-холестерин ацилтрансферазы (ЛХАТ) в ЛВП	31
2.6. Определение неоднородности и среднего размера ЛВП	32
2.7. Определение гликомного профиля липопротеидов.....	32
2.8. Десиалилирование и дегликазилирование липопротеидов.....	34
2.9. Получение модифицированных ЛНП	35
2.10. Измерение оттока холестерина при помощи ЛВП	35
2.11. Выделение первичной культуры макрофагов человека	36
2.12. Нокдаун генов при помощи siRNA	37
2.13. Накопление внутриклеточного холестерина в макрофагах, вызванное ЛНП	38
2.14. Определение внутриклеточного холестерина	39
2.15. Определение белка.....	39
2.16. Стимулирование фагоцитоза	40

2.17. Секвенирование тотальной РНК.....	40
2.18. Статистическая обработка данных.....	41
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	42
3.1. Влияние десиалирования ЛНП на накопление эфиров холестерина человеческими макрофагоподобными клетками ТНР-1	42
3.2. Анализ гликанового профиля ЛНП и ЛВП	43
3.4. Взаимосвязь между гликомом ЛНП и их способностью вызывать накопление эфиров холестерина в клетках	51
3.5. Влияние десиалирования и дегликозилирования ЛВП на их способность вызывать отток эфиров холестерина из человеческих макрофагоподобных клеток ТНР-1	53
3.5. Взаимосвязь между гликомом ЛВП и их способностью вызывать отток эфиров холестерина из клеток	57
3.10. Выявление ключевых сигнальных путей, участвующих в фагоцитозе модифицированных ЛНП	59
3.10. Изучение роли ключевых генов в оттоке холестерина на культуре макрофагов при помощи нокдауна этих генов.....	67
3.11 Изучение роли ключевых генов в накоплении холестерина на культуре первичных макрофагов при помощи нокдауна этих генов.....	70
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	78
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	92
ВЫВОДЫ	94
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	95
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	97

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) по-прежнему занимают лидирующее место в структуре общей смертности в России и мире, даже несмотря на прогресс в профилактике и лечении этих заболеваний [Virani и др., 2020; Ершова и др., 2018]. В основе таких ССЗ, как ишемическая болезнь сердца, нарушение мозгового кровообращения, болезни периферических сосудов, лежит атеросклероз [Бойцов и др., 2012]. По этой причине исследования факторов, обуславливающих возникновение и развитие атеросклероза, являются одним из главных приоритетов мировых медико-биологических исследований [Libby и др., 2019]. В развитие атеросклероза вовлечены множество клеточных механизмов и сигнальных путей, таких как накопление внутриклеточного холестерина, воспалительная реакция, апоптоз, окислительный стресс и другие [Гукасов и др., 2014; Мурашов и др., 2017; Фадеев и др., 2020]. В классическом представлении атеросклероз – это болезнь накопления липидов в стенке сосудов. Накопление липидов происходит в результате образования пенистых клеток в следствии нарушения метаболизма липидов. Накопление происходит из-за инфильтрации в интиму сосудов модифицированных атерогенных липопротеидов низкой плотности (ЛНП), которые фагоцитируются резидентными клетками интимы, такими как макрофаги, гладко-мышечные клетки и перициты. Это в конечном итоге приводит к образованию пенистых клеток из-за нарушения метаболизма поступающих из атерогенных ЛНП липидов [Душкин, 2012]. В настоящее время под атерогенными ЛНП подразумеваются десиалированные, мелкие плотные, элеткроотрицательные и окисленные ЛНП, которые способны вызвать накопление в культивируемых клетках интимы (макрофаги, гладкомышечные клетки, перициты) [Сухоруков, Карагодин, Орехов, 2016]. При этом минимальной модификацией, которая

превращает нативные ЛНП в атерогенные, считается десиалирование, которое является частным случаем процесса дегликозилирования, то есть удаления остатков от органических молекул (липидов или белков). Десиалированные ЛНП были обнаружены в крови больных атеросклерозом [Мухин и др., 1990] [Рыжкова и др., 2017]. Они вызывают накопление липидов в культуре клеток, являются мелкими плотными и отрицательно заряженными липопротеидами [Рыжкова и др., 2016]. Более того, десиалирование происходит в плазме человеческой крови и запускает каскад последующих изменений в ЛНП частице: уменьшение содержания свободного холестерина, фосфолипидов, триглицеридов и эфиров холестерина, уменьшение размера, увеличение отрицательного заряда и перекисное окисление липидов [Сухоруков, Карагодин, Орехов, 2016].

Макрофаги являются основными клеточными участниками атеросклероза в стенке сосудов, которые борются с избытком ЛНП, попадающих из кровотока в интиму сосуда. Более того, если в интиму сосуда инфильтруются атерогенные ЛНП, которые попадают в клетку в обход рецептора ЛНП через скавенджер рецепторы (SR-A, CD36, LOX-1) и вызывают избыточное накопление липидов в макрофагах с их превращением в конечном итоге в пенистые клетки [Давлятшина, Н.З., Маянская, С.Д., Мухаметгалиева, А.Р., Майкова, Е.В., Кравцова, 2017]. Образование пенистых клеток – сложный процесс, происходящий из-за неправильной регуляции сигнальных путей и экспрессии генов макрофагов, которая на сегодняшний день исследована в недостаточной степени. Одним из следствий взаимодействия атерогенных ЛНП с макрофагами является клеточной провоспалительный ответ, вызывающий развитие в месте формирования атеросклеротической бляшки хронического воспаления, которое является одним из главных факторов развития атеросклероза [Libby, 2021]. При этом не до конца изучено как между собой взаимосвязаны клеточный провоспалительный ответ и накопление липидов. Происходит ли секреция провоспалительных молекул в ответ на накопление липидов или же накопление внутриклеточного холестерина происходит в ответ на действие провоспалительных молекул, секреция которых запускается в ответ на фагоцитоз атерогенных ЛНП. Остается открытым вопрос

как именно изменяется транскриптом макрофагов при взаимодействии с атерогенными ЛНП, какие гены и сигнальные пути играют ведущую роль в процессе накопления внутриклеточного холестерина. Несмотря на то, что основные участники этого процесса изучены в достаточной степени, вопрос о том, что является основной причиной метаболического дисбаланса, ведущего к образованию пенистых клеток, остается открытым. Для ответа на этот вопрос важно установить причинно-следственные связи между накоплением липидов и провоспалительным ответом клеток. Более того, установление этих связей приведет к разработке более эффективных методик профилактики и лечения атеросклероза.

Цель и задачи исследования

Цель. Изучить клеточно-молекулярные механизмы взаимодействия дегликозилированных (десиалированных) липопротеидов низкой и высокой плотности с макрофагами.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить влияние десиалирования на качественные и количественные характеристики гликомов липопротеидов высокой и низкой плотности
2. Изучить влияние десиалированных липопротеидов низкой плотности на накопление внутриклеточного холестерина и влияние десиалированных липопротеидов высокой плотности на отток холестерина в клеточной модели макрофагов.
3. Изучить профиль активации сигнальных путей в макрофагах при накоплении холестерина, индуцированном модифицированными ЛНП.
4. Изучить роль генов (предполагаемых мастер-регуляторов внутриклеточного метаболизма холестерина) в накоплении и оттоке холестерина.

Научная новизна

Впервые проведена работа по изучению гликанового профиля ЛНП. Было показано, как именно изменяется гликановый состав липопротеидов при десиалировании, установлено какая часть гликанов салирована, показано наличие корреляции между гликановым составом и функциями липопротеидов. Впервые проведена работа по гликомике ЛНП. Показано, что ЛНП от больных атеросклерозом наиболее сходны с десиалированными ЛНП по профилю активации сигнальных путей в макрофагах. Воздействие на гены регуляторы метаболизма холестерина LDLR, INSIG1 приводит к изменению процессов оттока внутриклеточного холестерина, а на гены EIF2AK3 (PERK), IL15, ANXA1, IL7 и IL7R к изменению процессов накопления холестерина внутри клеток.

Методология и методы исследования

Работа выполнена при помощи различных методов биохимии, молекулярной и клеточной биологии и статистики с использованием современного высокотехнологичного научного оборудования. В качестве материала исследования использовались: первичные культуры моноцитов-макрофагов из крови человека, макрофагоподобные клетки линии THP-1 человеческие ЛНП и липопротеиды высокой плотности (ЛВП).

Первичные моноциты-макрофаги выделяли из крови практически здоровых людей. Липопротеиды выделяли из плазмы крови практически здоровых людей, а также больных с диагностированным атеросклерозом сонных артерий.

Теоретическая и практическая значимость

Исследованные в ходе работы гены, ассоциированные с метаболизмом холестерина макрофагами человека, представляют значительный интерес для

раскрытия механизмов патогенеза атеросклероза и в дальнейшем могут быть использованы в качестве терапевтических мишеней.

Выявленные корреляции между гликановым составом и функциями липопротеидов представляют интерес в рамках развития гликомики липопротеидов, а также для разработки диагностики предрасположенности к атеросклерозу и антиатеросклеротической терапии.

Положения, выносимые на защиту

1. ДесИАлирование липопротеидных частиц приводит к их проатерогенной модификации, в результате которой происходит усиление накопления внутриклеточного холестерина в случае ЛНП или снижения оттока холестерина в случае ЛВП.
2. ДесИАлирование липопротеидных частиц приводит к существенному изменению гликома как ЛНП, так и ЛВП, в результате которого все гликаны на поверхности липопротеидов утрачивают сиаловую кислоту и становятся асиАлированными.
3. Атерогенные ЛНП из крови больных атеросклерозом наиболее сходны по профилю активации сигнальных путей в макрофагах с десИАлированными ЛНП. В результате можно предположить, что это сходство указывает на то, что именно десИАлирование является основной *in vivo* модификацией ЛНП в крови.
4. Мастер-регуляторы LDLR и INSIG1 играют регулирующую роль в оттоке холестерина из макрофагов *in vitro*. Нокдаун генов LDLR и INSIG1 снижает отток холестерина из макрофагов.
5. Мастер-регуляторы EIF2AK3 (PERK), IL15, ANXA1, IL7 и IL7R принимают участие в регуляции накопления холестерина. Нокдаун генов EIF2AK3 (PERK), IL15, ANXA1 приводит к отсутствию накопления холестерина в клеточной модели *in vitro*, тогда как нокдаун генов IL7 и IL7R, напротив, усиливает накопление холестерина.

Личный вклад автора

Все указанные в диссертационной работе лабораторные методы исследования проводились автором диссертации лично, за исключением определения гликанового профиля липопротеидов методом сверхвысокой жидкостной хроматографии с гидрофильным взаимодействием с детектированием флуоресценции и с помощью времяпролетной масс-спектрометрией с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией, а также транскриптомного анализа макрофагов.

При подготовке и написании научных публикаций по теме диссертации автор осуществлял работу по анализу полученных результатов, его статистической обработке и подготовке текстов к публикации, а также выступал с устными докладами на международных научных конференциях.

Степень достоверности результатов

Достоверность полученных результатов подтверждается грамотно поставленными задачами, применением современных методик и подходов для решения поставленных задач в работе современных подходов и методов исследования, наличием обширного экспериментального материала, интерпретацией полученных данных при помощи адекватных методов статистики. Результаты исследования представлены и апробированы на крупных международных научных конференциях и опубликованы в высокорейтинговых журналах.

Апробация результатов

По теме диссертации опубликована 31 печатная работа, в том числе 16 статей в рецензируемых журналах (13 в рецензируемых иностранных журналах и 3 статьи

в рецензируемых журналах из перечня рецензируемых научных изданий ВАК РФ), 14 тезисов в сборниках докладов научных конференций, и 1 патент.

Результаты диссертационной работы были представлены на 85 конгрессе European Atherosclerosis Society (EAS) Congress (Прага, Чехия), 86 конгрессе European Atherosclerosis Society (EAS) Congress (Лиссабон, Португалия), 87 конгрессе European Atherosclerosis Society (EAS) Congress (Маастрихт, Нидерланды), 88 конгрессе European Atherosclerosis Society (EAS) Congress (Женева, Швейцария), 42 встрече European Lipoprotein Club (ELC) (Тутцинг, Германия), 41 встрече European Lipoprotein Club (ELC) (Тутцинг, Германия), 13 конгрессе Nouvelle Société Francophone d'Athérosclérose (NSFA) 2017 (Биарриц, Франция), на 11 конгрессе Asian-Pacific Society of Atherosclerosis and Vascular Disease (APSAVD) (Илоило, Филиппины), на 12 конгрессе Asian-Pacific Society of Atherosclerosis and Vascular Disease (APSAVD) (Тайбэй, Тайвань), на 18 симпозиуме International Symposium on Atherosclerosis (ISA) (Торонто, Канада), на 3 симпозиуме International Symposium on Frontiers in Molecular Science—RNA Regulatory Networks (Лиссабон, Португалия), на конгрессе 2018 года World Congress of Cardiology & Cardiovascular Health (Дубай, ОАЭ).

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Атерогенные ЛНП

Накопление пенистых клеток в стенке артерий является самым ранним проявлением атеросклероза, а модифицированные атерогенные ЛНП являются основным источником липидов, которые накапливаются в клетках интимы артерий (макрофаги, перициты, гладкомышечные клетки). Накапливая липиды, клетки становятся пенистыми. Известно, что нативные неатерогенные ЛНП не приводят к чрезмерному накоплению липидов в клетках, так как их проникновение в клетку строго регулируется рецептором ЛНП, а при избытке внутриклеточного холестерина количество рецепторов ЛНП на поверхности клетки становится меньше. Более того, увеличивается количество рецепторов к ЛВП, которые обеспечивают отток холестерина из клеток. Таким образом, система притока и оттока липидов из клеток уравновешена и без внешнего воздействия сбоя давать не будет [Yu и др., 2013].

В конце 70-х годов XX века было установлено, что источником внутриклеточных липидов, приводящих к образованию пенистых клеток, являются ЛНП, циркулирующие в крови человека [Chen, Fischer-Dzoga, 1977]. При этом ЛНП из крови людей не вызывали накопление липидов в клетках *in vitro*, за исключением пиноцитоза ЛНП макрофагами, стимулированными цитокином М-CSF (макрофагальный колония-стимулирующий фактор) [Zhao и др., 2006]. В результате была выдвинута гипотеза о необходимости химической модификации ЛНП, чтобы они начали вызывать накопление внутриклеточных липидов. Высказывались предположения о различных модификациях: окисление, взаимодействие с альдегидами, неферментативное гликозилирование, декликозилирование. Большинство из этих модификаций *in vivo* не происходит.

Химически модифицированные ЛНП неконтролируемо проникают в клетку при взаимодействии со скавенджер рецепторами, что приводит в конечном итоге к формированию пенистых клеток [Chistiakov и др., 2017; Sukhorukov и др., 2020b]. К атерогенным ЛНП крови относят окисленные, мелкие плотные, электроотрицательные и множественно-модифицированные ЛНП (ммЛНП) [Mezentsev и др., 2021]. На сегодняшний день окисленные ЛНП являются самым популярным видом липопротеидов (наряду с ацетилованными, но они не встречаются *in vivo*) при изучении накопления внутриклеточного холестерина *in vitro* [Poznyak и др., 2021].

Эксперименты Штейнберга с коллегами по получению окисленных ЛНП при инкубации нативных ЛНП с эндотелиальными клетками поспособствовало становлению теории об окислительной модификации ЛНП, которая необходима и достаточна для индукции накопления липидов в клетках [Henriksen, Mahoney, Steinberg, 1981; Steinbrecher, Zhang, Loughheed, 1990]. Окисление ЛНП – сложный процесс, при котором происходят окислительные изменения как белковой, аполипопротеин В (апоВ), так и липидной частей липопротеида с образованием разнообразных продуктов окисления. Эти изменения приводят к изменению заряда и плотности ЛНП, появлению перекисных липидов. В результате такие ЛНП теряют сродство к ЛНП-рецептору, который осуществляет взаимодействие с нативными ЛНП, и начинают распознаваться различными скавенджер-рецепторами (LOX-1, CD36) макрофагов и гладкомышечных клеток, что приводит к усиленному накоплению липидов и образованию пенистых клеток [Bruni и др., 2005; Шогенова М.Х. и др., 2015]. Окисление циркулирующих нативных ЛНП представляется сложным процессом, зависящим от множества факторов: типа окислителя, степени окисления, присутствия или отсутствия других агентов, таких как окислительно-восстановительные металлы. Более того, важное значение при образовании окисленных ЛНП играют типы жирных кислот, входящих в состав частицы. Так, например, полиненасыщенные жирные кислоты в большей степени способствуют окислению ЛНП, чем мононенасыщенные жирные кислоты [Lada, Rudel, 2003]. Кроме того, аминокислоты, входящие в состав апоВ, могут влиять на

то, как окисление происходит внутри частицы [Parthasarathy и др., 2010]. Таким образом, окисленные ЛНП можно описать как ЛНП, происходящие от циркулирующих нативных ЛНП, которые могут содержать продукты перекисного окисления либо распада перекиси, образующиеся внутри липопроотеида или ассоциированные с ним.

В настоящее время представление о том, что окисленные ЛНП вызывают образование пенных клеток и инициацию развития атеросклероза является общепризнанным [Arai, 2014; Trpkovic и др., 2015]. При этом точный механизм окисления ЛНП *in vivo* остается неизвестным. На сегодняшний день описан ряд механизмов, потенциально способных приводить к окислению ЛНП *in vivo*: 1) окисление, с участием пероксидазы, включая миелопероксидазу (МПА) и гем [Natella и др., 1998; Savenkova, Mueller, Heinecke, 1994]; 2) окисление пероксинитритом [Graham и др., 1993; Panasenکو и др., 1997]; 3) липоксигеназная реакция [Kühn, Chan, 1997]; 4) окисление NADPH-оксидазой, ксантиноксидазой и другими генераторами супероксидов [Aviram и др., 1996; Jessup, Simpson, Dean, 1993]; 5) окисление, опосредованное железом [Balla и др., 1991]; 6) окисление, опосредованное медью и церулоплазмином [Parthasarathy и др., 1990]; 7) окисление 2,2'-азобис(2-амидинопропан) дигидрохлоридом и другими генераторами свободных радикалов, включая цитохромы [Leonhardt, Bergmann, Hanefeld, 1997; Noguchi, Gotoh, Niki, 1994]; 8) окисление с участием тиолов [Wood, Graham, 1995].

Стоит отметить, что МПА фермент, содержащийся в моноцитах и нейтрофилах, способен катализировать окисление ионов галогенов до соответствующих гипогалоидных кислот, способствующие появлению активных галогенсодержащих соединений, взаимодействующих с белками, липидами и гликанами ЛНП. В результате образуются модифицированные ЛНП, вызывающие накопление липидов в клетках [Панасенко и др., 2020]. Кроме того, МПА способна образовывать комплекс с ЛНП в кровотоке, осуществляя проатерогенную модификацию липопроотеида, которая усиливается после миграции комплекса МПО–ЛНП в субэндотелиальное пространство [Панасенко и др., 2020].

Существуют следующие доказательства ключевой роли окисленных ЛНП в процессе атерогенеза:

1. В крови людей были обнаружены аутоантитела против ЛНП, модифицированных малоновым диальдегидом [Palinski и др., 1990].
2. Антитела против окисленных ЛНП, полученных *in vitro*, распознают солокализованные с продуктами окисления ЛНП, выделенные из атеросклеротических поражений [Fukuchi и др., 2002].
3. Разработаны три типа моноклональных антител для иммунологического выявления окисленных ЛНП: 1) F0H1a/DLH3, антитела распознающие окисленные остатки фосфорилхолина [Itabe и др., 1996]; 2) E06, антитела также распознающие окисленные остатки фосфорилхолина [Palinski и др., 1996]; 3) 4E6, антитела против модифицированных малоновым диальдегидом эпитопов лизина апоВ белка [Reaven, Witztum, 1996].
4. Часть ЛНП, выделенных из атеросклеротических поражений, имеют признаки окислительной модификации [Yla-Herttuala и др., 1990].

Таким образом, не возникает сомнений, что окисление является важной модификацией, приводящей к развитию атеросклероза на клеточном уровне. При этом, насколько нам известно, никто не охарактеризовал окисленные ЛНП, полученные из крови и/или тканей людей и животных, до такой степени, чтобы можно было механистически описать процесс окисления липопротеидов [Parthasarathy и др., 2010].

ЛНП, выделенные из крови пациентов больных атеросклерозом, способны вызывать накопление внутриклеточных липидов, что было впервые продемонстрировано на первичной культуре гладкомышечных α -актин положительных клеток интимы аорты человека (перичитоподобные и гладкомышечные клетки) [Tertov и др., 1989a]. Свойство ЛНП, полученных из крови больных атеросклерозом, вызывать накопление липидов в клетках *in vitro* было предложено называть «атерогенностью» [Chazov и др., 1986]. Этот термин до настоящего времени широко используется в научной литературе в том числе и в англоязычной (atherogenicity) [Farràs и др., 2020]. Тем не менее вопрос о широком

использовании данного термина остаётся открытым, поскольку данный феномен наблюдается в модельных условиях эксперимента *in vitro*, в то время как его клиническая релевантность остаётся неустановленной. Здесь и далее под термином «атерогенность» будет подразумеваться способность ЛНП вызывать накопление внутриклеточных липидов в культуре клеток *in vitro*.

В результате изучения свойств ЛНП, выделяемых из крови пациентов больных атеросклерозом, было установлено, что такие ЛНП могут быть мелкими плотными (мпЛНП), электроотрицательными (ЛНП(-)) и десалированными.

Идентификация мпЛНП в крови возможна при помощи градиентного ультрацентрифугирования, а также разделения в градиентном гель-электрофорезе. Известно, что мпЛНП более восприимчивы к окислению, чем ЛНП с большей плотностью за счет содержания меньшего количества антиоксидантов [Tribble и др., 2001].

ЛНП(-) могут выявляться при помощи электрофореза в агарозном геле или ионно-обменной хроматографией. ЛНП(-) также характеризуются способностью к агрегации за счет нарушения вторичной структуры аполипопротеина В (апоВ) и липидного состава липопротеидной частицы. Наиболее электроотрицательные ЛНП(-) не распознаются рецептором для нативных ЛНП, а взаимодействуют с LOX-1 и вызывают накопление внутриклеточных липидов, то есть являются атерогенными [Chu и др., 2013]. Помимо атерогенных свойств ЛНП(-) обладают и провоспалительными свойствами за счет индукции секреции провоспалительных молекул эндотелиальными клетками [Sánchez-Quesada и др., 2003; Рыжкова и др., 2016].

При изучении химического состава десалированных ЛНП было установлено, что они содержат в 2-3 раза меньше сиаловой кислоты, чем нативные ЛНП [Orekhov, Tertov, Mukhin, 1991]. Сиаловая кислота из ЛНП представляет собой N-замещенную производную нейраминовой кислоты и является концевым сахаром в составе би- и триантеннарных углеводных комплексов на поверхности апоВ [Sukhorukov и др., 2019; Sukhorukov и др., 2017; Swaminathan, Aladjem, 1976]. При десалировании ЛНП концевым сахаром в гликопротеидах становится галактоза.

Наличие экспонированной галактозы позволило выделить на колонках для аффинной хроматографии с агглютинином *Ricinus communis* из крови пациентов с атеросклерозом фракцию десиалированных ЛНП [Tertov и др., 1990b]. В экспериментах на клетках, выделенных из интимы аорты человека, было установлено, что десиалированные ЛНП способны вызывать накопление внутриклеточных липидов [Mukhin и др., 1990]. При помощи лектиновой хроматографии десиалированные ЛНП обнаруживаются как в крови здоровых людей в диапазоне 5-15% от общего количества ЛНП, так и в крови больных атеросклерозом в пределах от 20 до 60% от всех ЛНП плазмы крови [Tertov, Sobenin, Orekhov, 1995; Zakiev и др., 2016]. Десиалирование ЛНП по всей вероятности происходит в плазме крови *in vivo* при помощи фермента транс-сиалидазы [Karagodin и др., 2018; Tertov и др., 2001]. Транс-сиалидаза, что следует из её названия, способна переносить сиаловую кислоту от ЛНП, других липопротеидов, гликопротеинов и ганглиозидов на акцепторы (например, гликолипиды и сфинголипиды плазмы крови), присутствующие в плазме крови [Tertov и др., 2001]. Определенный вклад в десиалирование ЛНП могут вносить и экзогенные сиалидазы, такие как вирусная и бактериальная. Было показано, что содержание десиалированных ЛНП в крови резко увеличивалось в период сезонного заболевания гриппом. В том числе, случаи ССЗ имеют прямую корреляцию с заболеванием гриппом [Glanz и др., 2020]. Более того, схожие результаты были получены при изучении болезней, вызываемые бактериями, синтезирующими сиалидазы или транс-сиалидазы [Mezentsev и др., 2021]. Определенный вклад в десиалирование может вносить и отщепление гликоконъюгатов от ЛНП под действием активных галоген-содержащих соединений, образующихся при участии МПО [Панасенко и др., 2020].

В результате изучения десиалированных ЛНП было установлено, что десиалирование является лишь первой стадией в множественной модификации ЛНП, делающей их атерогенными [Summerhill и др., 2019; Tertov и др., 1998]. ЛНП, выделенные из крови больных атеросклерозом при помощи лектиновой хроматографии имеют меньший размер, большую плотность, увеличенный

электроотрицательный заряд, по сравнению с нативными ЛНП [Tertov и др., 1992a]. Более того в ЛНП больных атеросклерозом часть аминокрупп лизиновых остатков химически модифицирована [Zakiev и др., 2017], а сами липопротеиды являются окисленными и склонны к окислению за счёт сниженного содержания липид-растворимых антиоксидантов (коэнзима-Q, α - и γ -токоферолов, ликопина и β -каротина), при этом степень окисленности коррелирует с потерей каротиноидов и окислением убихинола. Сравнительный анализ (таблица 1) физических и химических свойств мПЛНП, ЛНП(-) и десиалированных ЛНП говорит о том, что все выделенные из плазмы крови людей подфракции ЛНП, вероятнее всего, представляют собой одни и те же липопротеидные частицы, подвергшиеся множественной модификации. Таким образом, можно с определенной степенью уверенности говорить о наличии в крови больных множественно-модифицированных ЛНП (ммЛНП) [Orekhov и др., 2014] [Мельниченко и др., 2016].

Модификация ЛНП происходит непосредственно в крови и протекает в несколько этапов. Сначала частицы липопротеидов теряют сиаловую кислоту, затем за счет потери нейтральных липидов и фосфолипидов происходит уменьшение их размеров и увеличение плотности, после увеличивается их электроотрицательный заряд, и в завершение с потерей антиоксидантов происходит перекисное окисление липидов [Nikifirov и др., 2017]. При этом было показано, что десиалирование является достаточным условием того, чтобы ЛНП стали атерогенными, то есть способными вызывать накопление липидов в клетках. Последующие модификации липопротеидной частицы приводят лишь к усилению её атерогенного потенциала. Следовательно, с большой долей вероятности можно утверждать, что атерогенные ЛНП, вызывающие патологическое накопление липидов в стенках артерий при атеросклерозе, циркулирующие в крови больных атеросклерозом являются ммЛНП. При этом самой первой модификацией, на пути превращения нативных ЛНП в ммЛНП, является по всей видимости десиалирование.

Таблица 1. Характеристика модифицированных ЛНП из плазмы крови людей.

Характеристика ЛНП	Десиалированные ЛНП	ЛНП(-)	мПЛНП
Атерогенность	↑ [Orekhov и др., 1989]	↑ [Avogaro, Bon, Gazzolato, 1988]	↑ [Jaakkola и др., 1993]
Плотность	↑ [Tertov и др., 1992a]	?	↑ [Shen и др., 1981]
Размер	↓ [Tertov и др., 1992a]	↓ [Avogaro, Bon, Gazzolato, 1988]	↓ [Jaakkola и др., 1993]
Заряд	↑ [Tertov и др., 1992a]	↑ [Avogaro, Bon, Gazzolato, 1988]	↑ [Jaakkola и др., 1993]
Сиаловая кислота	↓ [Tertov и др., 1990b]	↓ [Tertov, Sobenin, Orekhov, 1996]	↓ [Tertov, Sobenin, Orekhov, 1996]
Эфиры холестерина	↓ [Tertov и др., 1992a]	↓ [Avogaro, Cazzolato, Bittolo-Bon, 1991]	↓ [Shen и др., 1981]
Фосфолипиды	↓ [Orekhov и др., 1990]	↓ [Avogaro, Cazzolato, Bittolo-Bon, 1991]	↓ [Shen и др., 1981]
Способность к окислению	↑ [Tertov и др., 1988]	↑ [Berneis, Krauss, 2002]	↑ [Dejager, Bruckert, Chapman, 1993]
Антиоксиданты	↓ [Tertov и др., 1992a]	↓ [Avogaro, Cazzolato, Bittolo-Bon, 1991]	↓ [Dejager, Bruckert, Chapman, 1993]
Модифицированные аминокислоты	↑ [Tertov и др., 1992a]	↑ [Berneis, Krauss, 2002]	?
Агрегация	↑ [Tertov и др., 1992b]a	↑ [Avogaro, Bon, Gazzolato, 1988]	↑ [Orekhov и др., 1992]

По данным ультразвуковых и ангиографических исследований время необходимое для образования атеросклеротической бляшки может составлять несколько недель или месяцев. При этом теоретические расчёты, в основе которых лежат экспериментально измеренные скорости захвата и деградации ЛНП, демонстрируют, что клетке, чтобы стать пенистой при взаимодействии с нативными ЛНП может потребоваться до 130 лет, при этом весь захваченный холестерин всё это время должен оставаться внутри клетки. Взаимодействие с дезаилированными ЛНП может сократить это время до 15 лет [Сухоруков, Карагодин, Орехов, 2016]. Разумно предположить, что скорость образования пенистых клеток намного выше, чем следует из теоретических выкладок. Следовательно, должны существовать дополнительные механизмы усиления атерогенности дезаилированных ЛНП. На сегодняшний день известно, как минимум, три таких механизма: 1) образование ЛНП комплексов с компонентами соединительно-тканного матрикса, 2) образование агрегатов ЛНП и 3) формирование ЛНП-циркулирующих иммунных комплексов (ЛНП-ЦИК) [Сухоруков, Карагодин, Орехов, 2016].

ЛНП способны формировать комплексы с протеогликанами, коллагеном, эластином и дебрисом интимы аорты человека. В экспериментах *in vitro* добавление этих комплексов стимулировало внутриклеточное накопление липидов, при этом было показано, что ЛНП в составе комплексов захватываются клетками быстрее, а деградируют медленнее по сравнению с отдельными частицами ЛНП [Kotelianskiĭ и др., 1987; Orekhov и др., 1987].

Атерогенные ммЛНП также склонны к агрегации с формированием крупных частиц с высоким атерогенным потенциалом. Было показано, что агрегированные ЛНП проникают в клетку за счет фагоцитоза, а степень агрегированности прямо коррелирует со степенью накопления внутриклеточного холестерина [Tertov и др., 1992b].

Важно заметить, что антитела к ммЛНП способны взаимодействовать с различными модифицированными *in vitro* ЛНП: окисленными, дезаилированными, обработанными малоновым диальдегидом (МДА-ЛНП). При этом наибольшим

сродством антитела обладают с десиалированными ЛНП, затем МДА-ЛНП и только потом с окисленными ЛНП [Orekhov и др., 1991; Sobenin и др., 2014]. По этой причине более вероятным представляется то, что антитела образуются к десиалированным ЛНП, а не к окисленным ЛНП. При этом стоит учитывать тот факт, что склонность к агрегации модифицированных ЛНП может модулировать их взаимодействие с антителами, но нет экспериментальных обоснований этой возможности. Известно также, что десиалированные ЛНП обладают повышенной предрасположенностью к окислению *in vitro*, а также показано наличие повышенной концентрации оксистерина в десиалированных ЛНП, выделенных из плазмы крови по сравнению с нативными ЛНП. Эти факты могут объяснить наличие аффинности антител сразу к трём видам ЛНП (окисленным, десиалированным и МДА-ЛНП).

Связывание антител с ммЛНП приводит к образованию ЛНП-ЦИК, который усиливает атерогенный и иммуногенный потенциал ммЛНП. Более того, содержание ЛНП-ЦИК прямо коррелирует со степенью развития атеросклероза. При изучении химических и физических свойств ЛНП из ЛНП-ЦИК было установлено, что эти ЛНП по своему размеру, заряду, плотности и химическому составу идентичны ммЛНП [Sobenin и др., 2014; Tertov и др., 1990a]. Следовательно, в образовании ЛНП-ЦИК принимают участие именно ммЛНП. Вышеперечисленные факты указывают на то, что атерогенными ЛНП, циркулирующими в крови больных атеросклерозом, являются ммЛНП.

Таким образом, возможен такой порядок событий в результате которых ЛНП становятся множественно-модифицированными и многократно возрастает их атерогенность: в результате десиалирования ЛНП теряют сialовые кислоты, далее следует потеря свободного холестерина и его эфиров, фосфолипидов и триглицеридов, увеличение плотности и отрицательного заряда липопротеидов, апоВ белок становится неправильно свернутым, позднее наблюдаются признаки окисления белкового и липидных компонентов частиц, снижение антиоксидантов; после этого частицы начинают самоагрегироваться и формировать циркулирующие иммунные комплексы с аутоантителами (Рисунок 1).

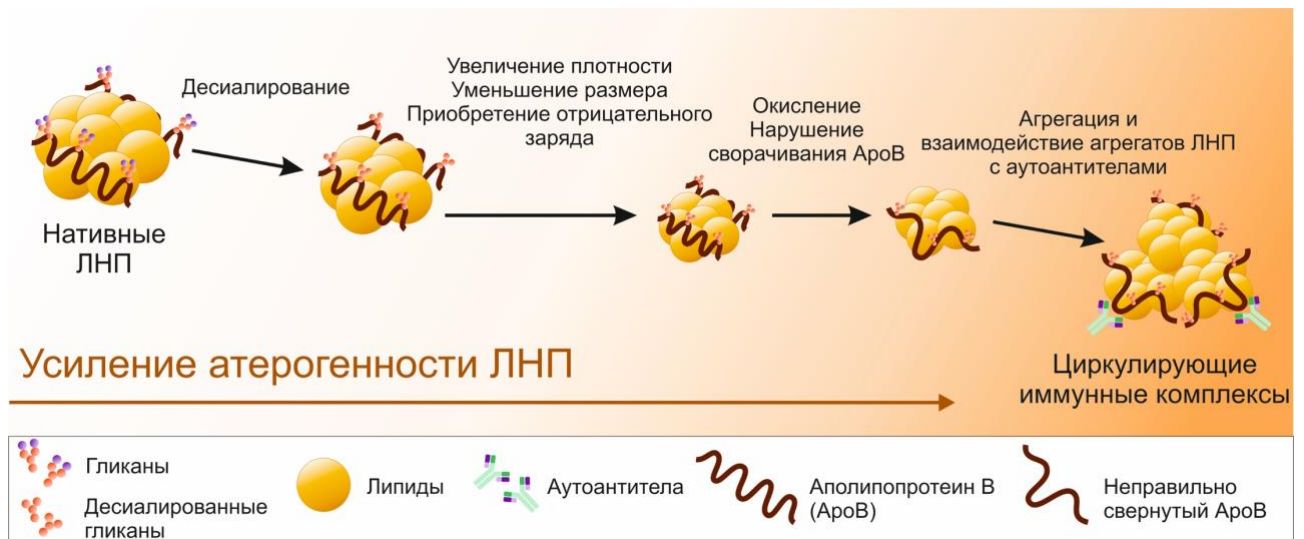


Рисунок 1. Атерогенные модификации ЛНП. Возможный ряд преобразований ЛНП *in vivo* ведущий к приобретению и увеличению их атерогенности.

Таким образом, циркулирующие в крови людей атерогенные ЛНП являются ммЛНП, чьи атерогенные свойства увеличиваются за счет агрегации и/или образования ЛНП-ЦИК. К появлению ммЛНП приводит десиамирование нативных ЛНП в крови под действием фермента транс-сиалидазы, а также дальнейшие преобразования липопротеидной частицы, включая окисление на поздних этапах модификации [Сухоруков, Карагодин, Орехов, 2016]. Наша работа является продолжением приводящегося в нашей лаборатории на протяжении десятков лет исследования роли десиамированных ЛНП в атеросклерозе, поэтому акцент будет сделан в первую очередь на этой атерогенной модификации ЛНП, при этом не отрицая наличие других модификаций, включая окисление.

Наличие сиаловой кислоты важно для функционирования не только ЛНП, но и ЛВП. Основная функция ЛВП в организме – обеспечение обратного транспорта холестерина из периферических тканей в печень, где он выводится с желчью или метаболизируется в желчные кислоты перед выведением [Ouimet, Barrett, Fisher, 2019]. ЛВП обеспечивают отток холестерина из клеток за счёт нескольких механизмов: 1) пассивный транспорт путём диффузии свободного холестерина в водной фазе от клетки к ЛВП [Phillips, Johnson, Rothblat, 1987]; 2) пассивный транспорт свободного холестерина, опосредованный скавенджер рецептором SR-BI [Thuahnaï и др., 2004]; 3) активный транспорт свободного холестерина через

транспортёры АТФ-связывающих кассет подсемейства А (ABCA1) и G (ABCG1) [Phillips, 2014].

ДесИАлирование ЛВП может приводить к снижению оттока свободного холестерина через ABCA1 и ABCG1 транспортёров и/или рецептор SR-BI, а также к ухудшению превращения свободного холестерина в эфиры холестерина при помощи лецитинхолестеринацилтрансферазы (ЛХАТ) [Harada и др., 1998]. Показано, что десИАлирование одного из белковых компонентов ЛВП, аполипопротеида Е (апоЕ), ухудшает его связь с ЛВП и может негативно сказываться на обратном транспорте эфиров холестерина к печени [Marmillot и др., 1999]. Более того, десИАлированные ЛВП частицы могут поглощаться макрофагами при помощи скавенджер-рецепторов, не вызывая при этом накопления внутриклеточного холестерина [Harada и др., 1998]. В клинических исследованиях было показано, что гликановый состав ЛВП отличается у пациентов с ишемической болезнью сердца и здоровых людей [Krishnan и др., 2015]. Различия в гликозилировании ЛВП были получены и при изучении пациентов с метаболическим синдромом [Savinova и др., 2014].

Таким образом, становится очевидно, что гликозилирование, в частности сИАлирование, играет важную роль в биологических свойствах ЛНП и ЛВП. ДесИАлирование, по всей, видимости приводит к возникновению атерогенных свойств как у ЛНП, так и ЛВП.

1.2. Пенистые клетки

Пенистые клетки называются так из-за того, что в их цитоплазме находятся множественные крупные включения, содержащие липиды, липидные капли. При делипидизации во время фиксации пенистых клеток из-за образовавшихся пустот на месте липидных капель цитоплазма этих клеток под микроскопом напоминает пену. Отсюда происходит название.

При изучении клеточного состава стенки человеческих артерий было установлено, что основная часть пенистых клеток представляет собой

гладкомышечные α -актин положительные клетки (гладкомышечные клетки и перецитоподобные клетки), тогда как макрофаги составляют только 3-5% от всей клеточной популяции [Riksen, Stienstra, 2018]. При этом макрофаги на сегодняшний день остаются более популярной моделью для изучения образования пенистых клеток, чем гладкомышечные клетки.

Важнейшую роль в образовании пенистых клеток играет взаимодействие ммЛНП со скавенджер рецепторами: CD36, LOX-1, SR-AI. Рецептор CD36 относится к классу В скавенджер рецепторов [Calvo, Dorazo, Vega, 1995] и способен распознавать окисленные ЛНП, окисленные фосфолипиды и длинноцепочечные жирные кислоты [Navazo и др., 1996]. Попадание внутрь клетки ЛНП приводит к взаимодействию окисленных липидов с ядерным гормональным рецептором PPAR- γ , который увеличивает экспрессию рецепторов CD36, что приводит к увеличению поглощения окисленных ЛНП. В макрофагах CD36 запускает фосфорилирование киназы Lyn из семейства нерецепторных тирозиновых киназ Src. Киназа Lyn приводит к активации митоген-активируемых протеинкиназ c-Jun N-терминальных киназ 1 и 2, которые способствуют поглощению окисленных ЛНП [Rahaman и др., 2006]. Киназы семейства Src также активируют фактор обмена гуаниновых нуклеотидов Vav, который регулирует эндоцитоз окисленных ЛНП за счет кальций и динамин-зависимых процессов [Rahaman, Zhou, Silverstein, 2011]. Кроме того, проникновение окисленных ЛНП в клетку посредством CD36 и LOX-1 может приводить к активации стресса эндоплазматического ретикулума (ЭПР стресс), который, в свою очередь, усиливает накопление внутриклеточных липидов [Hong и др., 2014; Yao и др., 2014]. ЭПР стресс также влияет на образование пенистых клеток за счет подавления экспрессии транспортера ABCA1 через сигнальный путь PERK/eIF2 α /ATF4 [Fusakio и др., 2016; Guo и др., 2018].

Рецептор CD36 может взаимодействовать с другими мембранными рецепторами такими как, toll-like рецепторы (TLR), интегринами и тетраспанинами. Активация рецептора TLR2 приводит к усилению захвата ммЛНП опосредованное рецептором CD36 [Rahaman и др., 2006]. Активированный при

помощи липополисахаридов TLR4 активирует сигнальный каскад mTORC2-Akt-mTORC1, который приводит к усилению экспрессии скавенджер рецепторов SR-A и CD36 [Banerjee и др., 2018]. Более того, взаимодействие окисленных ЛНП с рецептором CD36 и рецепторов TLR4 и 6 приводит к провоспалительному ответу клетки с секрецией ИЛ-1 β за счет активации инфламмосомы NLRP3 и развитию стерильного воспаления [Stewart и др., 2010]. Сам по себе TLR4 при взаимодействии с цитозольным адаптерным белком MyD88 через PI3K/SYK/AKT сигнальный путь участвует в образовании пенистых клеток через экстраклеточную деградацию агрегированных ЛНП [Singh и др., 2020]. Внутриклеточный ассоциированный с эндоплазматическим ретикуломом рецептор TLR9 может обеспечивать образование пенистых клеток через активацию регуляторного фактора интерферона IRF7 и сигнального пути ядерного фактора каппа бетта (NF-kB) и через активацию p38 MAP киназы [Lee и др., 2008; Sorrentino и др., 2010].

Окисленные ЛНП могут активировать Wnt5a сигнальный путь, который участвует в процессах метаболизма холестерина через блокирования синтеза холестерина и образования пенистых клеток через усиление синтеза CD36 и блокирования экспрессии транспортеров холестерина из клетки ABCA1 и ABCG1 [Ackers и др., 2018; Boucher, Matz, Terrand, 2020]. В результате Wnt5a сигнальный путь способствует поступлению липидов за счет усиленного захвата модифицированных ЛНП и блокировки оттока холестерина через активный путь, опосредованный ABCA1 и ABCG1 транспортёрами. Активация сигнального пути Wnt5a также приводит к провоспалительному ответу макрофагов через усиление экспрессии ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ИЛ-8 через DVL2/JNK сигнальный путь [Ackers и др., 2020], а также к эндотелиальному воспалению через активацию сигнального пути NF-kB с секрецией ИЛ-3 и ИЛ-1 α [Kim и др., 2010]. При этом провоспалительные цитокины сами по себе способны усиливать экспрессию Wnt5a, что потенциально может приводить к созданию порочной обратной связи [Linnskog и др., 2014; Rauner и др., 2012].

Рецептор к окисленным липопротеидам (LOX-1) играет важную роль в атерогенезе, участвуя в накоплении липидов, внося вклад в дисфункцию эндотелия

и образование пенистых клеток из макрофагов и гладко-мышечных клеток, а также вызывая провоспалительный ответ макрофагов [Kattoor, Goel, Mehta, 2019]. Взаимодействие окисленных ЛНП с рецептором LOX-1 приводит к активации сигнального пути универсального фактора транскрипции, контролирующего экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла (NF- κ B), что приводит к дополнительной активации LOX-1, а также синтезу провоспалительных молекул ФНО, ИЛ-1 и интерферон гамма (ИФН гамма) [Kattoor, Goel, Mehta, 2019]. При этом сами эти молекулы активируют LOX-1 рецептор, то есть при активации LOX-1 окисленными ЛНП происходит выброс макрофагами провоспалительных молекул, которую в свою очередь вносят вклад в накопление липидов через активацию экспрессии LOX-1 [Kattoor, Goel, Mehta, 2019]. Известно, что провоспалительная среда обеспечивает до 40% захвата окисленных ЛНП именно через рецептор LOX-1 [Pirillo, Norata, Catapano, 2013].

Рецептор SR-AI также участвует в накоплении липидов макрофагами при взаимодействии с окисленными ЛНП. По всей видимости киназа JNK2 усиливает экспрессию SR-AI при взаимодействии этого рецептора с окисленными ЛНП [Ricci, 2004]. Более того, липополисахариды вызывают усиление экспрессии SR-AI и, как следствие, образования пенистых клеток через сигнальный путь JNK1/CD14/SR-AI [An и др., 2018]. Таким образом, скавенджер рецепторы вовлечены в накопление внутриклеточного холестерина и последующее образование пенистых клеток. Более того, взаимодействие ммЛНП с этими рецепторами вызывает провоспалительный ответ клеток через активацию сигнального каскада с вовлечением различных киназ. Показано, что провоспалительные молекулы усиливают экспрессию скавенджер рецепторов и как следствие ускоряют накопление холестерина. При этом не до конца понятно, может ли провоспалительный ответ клеток приводить к образованию пенистых клеток, а не наоборот. На подобную возможность указывает одно из недавних исследований транскриптома макрофагов из атеросклеротического поражения, в котором было определено, что провоспалительными являлись в большей степени макрофаги без накопления внутриклеточных липидов [Kim и др., 2018].

1.3. Заключение

Анализ, опубликованных экспериментальных данных, позволяет сделать вывод, что наиболее вероятными типами модифицированных ЛНП *in vivo* являются мелкие плотные, электроотрицательные, окисленные и десиалированные ЛНП. При этом, по всей видимости, нельзя утверждать, что в плазме крови присутствует какой-то определенный тип ЛНП из вышеперечисленных. Принимая во внимание тот факт, что циркулирующие в крови атерогенные ЛНП имеют признаки всех указанных типов ЛНП, можно заключить, что они являются множественно-модифицированными, то есть обладают свойствами, присущими всем типам модификаций ЛНП. Экспериментальные данные указывают на то, что десиалирование является инициирующим событием, предвещающим все остальные модификации ЛНП на пути их превращения в ммЛНП. При этом атерогенность десиалированных ЛНП может усиливаться за счёт взаимодействия с компонентами соединительно-тканного матрикса, агрегирования и образования ЛНП-ЦИК. Дальнейшее развитие концепции десиалирования ЛНП и образования ммЛНП может привести к решению проблемы профилактики и терапии атеросклероза.

Несмотря, на огромное количество исследований, посвященных формированию пенистых клеток, взаимодействию макрофагов с окисленными и модифицированными ЛНП, наши знания об изменениях в экспрессии генов и активации сигнальных путей, которые происходят во время формирования пенистых клеток остаются довольно ограниченными. Большое количество данных об изменении экспрессии генов при формировании пенистых клеток было получено в результате исследования транскриптома макрофагов при взаимодействии с окисленными [Shiffman и др., 2000] и ацетилированными ЛНП [Berisha и др., 2013]. Однако, стоит отметить, что у этих исследований есть ряд недостатков: часть из них выполнены на мышинных макрофагах и/или мышинных моделях атеросклероза; в работах *in vitro* использовались искусственно модифицированные ЛНП, а не ЛНП из крови больных атеросклерозом [Cochain и др., 2018; Deng и др., 2020; Goo и др., 2016; Groenen и др., 2021; Kim и др., 2018;

Кубекина М.В., Никифоров Н.Г., Карагодин В.П., Собенин И.А., 2019]. В результате полученные в этих работах данные могут не соответствовать реальным процессам происходящим *in vivo* у людей и исследованных на человеческих клетках *in vivo* и *in vitro* [Willemssen, Winther, 2020]. На наш взгляд важно изучать активацию генов в человеческих макрофагах при взаимодействии с атерогенными ЛНП из крови больных атеросклерозом, а также с использованием дезаилированных ЛНП, так как это, вероятнее всего, первичная модификация, которая определяет атерогенный потенциал ЛНП. Изучению гликозилирования липопротеидов, в частности сиалированию, и влиянию гликозилирования липопротеидов на формирование пенистых клеток была посвящена наша работа.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Доноры

Диссертационное исследование выполнено в рамках плановых исследований Института. Соответствие работы международным и российским законодательным актам о юридических и этических принципах медико-биологических исследований с участием людей в качестве субъектов исследования, указанными в письме ВАК «О порядке проведения биомедицинских исследований у человека» (Бюллетень ВАК 2002 г., №3) (в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной Ассоциации Врачей «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием людей в качестве субъектов исследования», принятой 18-й Генеральной Ассамблеей Всемирной Медицинской Ассоциации (1964), с дополнениями в последней версии, принятой 64-й Генеральной Ассамблеей Всемирной Ассоциации Врачей в г. Форталеза Бразилия (2013); Конституцией РФ (12.12.93, ст. 21, 24, 41), Федеральным законом «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» от 21.11.2011 № 323-ФЗ (ст. 20, 36.1) в редакции от 03.07.2016 № 286-ФЗ, Стандартом отрасли ОСТ 42-511-99 «Правила проведения качественных клинических испытаний в Российской Федерации» от 29.12.98) подтверждена заключением Этического комитета ФГБНУ "НИИОПП", протокол №3-21 от 20.08.2021.

Клинические исследования, связанные с работой с донорской кровью, проведены в соответствии с общепринятым стандартом качества, требованиями Федерального закона от 20.07.2012 № 125-ФЗ «О донорстве крови и её компонентов», Правилами заготовки, хранения, транспортировки и клинического использования донорской крови и её компонентов (утв. Постановлением Правительства Российской Федерации от 22.06.2019 №797). Тара и упаковка донорской крови и (или) её компонентов соответствовали требованиям

государственных стандартов в отношении такой донорской крови и (или) её компонентов, обеспечивающим её сохранность по количеству и качеству при транспортировке и хранении, в соответствии с ГОСТ Р 52938-2008 «Национальный стандарт Российской Федерации. Кровь донорская и её компоненты «Контейнеры с консервированной кровью или её компонентами. Маркировка».

Кровь для получения плазмы закупали по договору в ФГБУ «НМИЦ ССХ им. А.Н.Бакулева» Минздрава России. Кровь использовали для выделения ЛНП, ЛВП, а также первичных моноцитов/макрофагов человека.

Кровь для выделения предположительно модифицированных и атерогенных ЛНП была предоставлена на безвозмездной основе на основании договора о совместной научной деятельности. Договор № 34 от 07.09.2016, «О создании клинической базы атеросклероза». Кабинетом по профилактике атеросклероза городской поликлиники №202 г. Москвы. Пациенты проходили обследования персоналом Кабинета по профилактике атеросклероза на предмет диагностики атеросклероза сонных артерий методом ультразвукового исследования (таблица 2). Пациенты не получали лекарства, влияющие на метаболизм липопротеинов, допускалась лишь базовая гипотензивная терапия (регулярный прием препаратов из групп ингибиторов АПФ, блокаторов ангиотензиновых рецепторов, диуретиков, бета-блокаторов). Выделенные ЛНП считались атерогенными, если достоверно ($p < 0.05$) вызывали накопление холестерина в макрофагах, инкубированных с этими ЛНП, по сравнению с контролем, в котором инкубация макрофагов проводилась без добавления ЛНП.

Для исследования гликозилирования ЛНП и ЛВП была использована плазма крови от 12 здоровых мужчин от 32 до 67 лет с нормальным липопротеидным составом, не страдающих ожирением (ИМТ 18.5-25, таблица 2) [Sukhorukov и др., 2019]. Ни один из доноров не курил, не употреблял, либо умеренно употреблял алкоголь (< 25 г / день), не имел почечных, печеночных, желудочно-кишечных, легочных, эндокринных или онкологических заболеваний и не получал лекарств, влияющих на метаболизм липопротеинов, по крайней мере, за 6 недель до

исследования. Все доноры дали письменное информированное согласие [Sukhorukov и др., 2019].

Таблица 2. Характеристика испытуемых чья плазма крови была использована в экспериментах.

группа	число	возраст	ИМТ	ТИМ
Пациенты	22	63.23±1.21	26.55±0.46	1.02±0.03
Здоровые	12	52±3.13	21.92±0.49	0.69±0.03

ИМТ – индекс массы тела; ТИМ – толщина интимы меди в мм

2.2. Выделение липопротеидов

2.2.1. Выделение суммарной фракции ЛНП из плазмы крови

Суммарную фракцию ЛНП выделяли последовательным ультрацентрифугированием по методу Lindgren [Kahlon, Glines, Lindgren, 1986] при 10°C со скоростью 40000 об/мин на центрифуге Optima XL-90 (ротор 50Ti; Beckman Coulter, США). Отобранные ЛНП (плотность 1,025-1,063 г/мл) диализовали против фосфатно-солевого буфера (PBS; pH 7,4) при 4°C в темноте, добавляли 10 мкМ ЭДТА хранили при 4 °C и использовали в течение 10 дней. ЭДТА исключали из диализного раствора в случае последующего окисления ЛНП ионами меди.

2.2.2 Выделение подфракций липопротеидов

Липопротеиды выделяли из плазмы одностадийным, изопикническим, неденатурирующим ультрацентрифугированием в градиенте плотности по методу Charman [Charman и др., 1981] с модификациями [Guérin и др., 1996]. Центрифугирование проводили в роторе Beckman SW41 Ti при 40000 об/мин в течение 44 часов в ультрацентрифуге Optima XPN 80 (Beckman CoulterСША) при

15 °С. После центрифугирования были отобраны 11 фракций липопротеидов, соответствующих ЛОНП + ЛНП (плотность <1,019 г/мл), ЛНП (пять подфракций, ЛНП1, плотность 1,019–1,023 г/мл. ; ЛНП2, плотность 1,023–1,029 г/мл; ЛНП3, плотность 1,029–1,039 г/мл; ЛНП4, плотность 1,039–1,050 г/мл; и ЛНП5, плотность 1,050–1,063 г/мл) и ЛВП (пять подфракций, большие, легкие ЛВПб, плотность 1,063–1,087 г/мл и ЛВП2а, плотность 1,088–1,110 г/мл, и маленькие, плотные ЛВПа, плотность 1,110–1,129 г/мл, ЛВП3б, плотность 1,129–1,154 г/мл и ЛВП3с, плотность 1,154–1,170 г/мл). Все подфракции ЛНП и подфракции ЛВП объединяли для получения суммарной фракции ЛНП и ЛВП, соответственно. Липопротеиды диализовали против фосфатно-солевого буфера (PBS; pH 7,4) при 4°С в темноте, хранили при 4 °С и использовали в течение 10 дней или замораживали при -80 °С для аналитических измерений.

2.4. Химический анализ и ферментативная активность липопротеидов

Содержание общего белка, общего холестерина (ОХ), свободного холестерина (СХ), фосфолипидов (ФЛ) и триглицеридов (ТГ) в выделенных липопротеидах определяли с использованием коммерческих наборов (Abscam, Великобритания) [Kontush, Chantepie, Chapman, 2003]. Содержание эфиров холестерина (ЭХ) рассчитывали по формуле (концентрация ОХ – концентрация СХ)*1.67 [Chapman и др., 1981]. Общую массу липопротеидов рассчитывали, как сумму общего белка, ЭХ, СХ, ФЛ и ТГ.

2.5. Измерение активности лецитин-холестерин ацилтрансферазы (ЛХАТ) в ЛВП

Активность ЛХАТ в ЛВП измеряли с использованием флуоресцентного набора для ЛХАТ-активности плазмы (Roar Biomedical, США), который оценивает накопление свободного холестерина в образцах. Протокол был изменен для включения в анализ количества ЛВП, аналогичного количеству, используемому

при измерении активности ЛХАТ в плазме. Для этого 50 мкг ЛВП по белку смешивали с реагентами в соответствии с инструкциями производителя. Коэффициент вариации анализа составил 2,4%.

2.6. Определение неоднородности и среднего размера ЛВП

Гетерогенность ЛВП оценивали с помощью нативного электрофореза в полиакриламидном геле с использованием готовых 4–12% градиентных гелей (Invitrogen, США). Этот подход позволил выявить не содержащий липидов/бедный липидами апоА-I с помощью вестерн-блоттинга и рассчитать средний размер ЛВП [Kontush и др., 2004]. 15 мкг белка ЛВП или 5 мкг не содержащего липидов АпоА-I наносили на 4–12% - гели NuPAGE с трис-ацетатом (Invitrogen, США), и гели прогоняли в течение 3 часов при 150 В в буфере MOPS (морфолинопропансульфоновая кислота) согласно инструкции производителя. Далее переносили белки на нитроцеллюлозу, козы античеловеческого апоА-I (Merck, Германия) и ослиные античеловеческого апоА-I IRDye 800CW (LI-COR, Lincoln, США) использовали в качестве первичных и вторичных антител, соответственно, для обнаружения апоА-I.

Средний размер ЛВП рассчитывали с использованием шкалы неокрашенных белков PageRuler Wide Range (Thermo Scientific, США) в качестве калибровки. Гели сканировали с использованием системы Odyssey Imaging System (LI-COR, США) для вестерн-блоттинга и визуализации гелей.

2.7. Определение гликомного профиля липопротеидов

Перед дегликозилированием образцы липопротеидов обессоливали с использованием холодного метанола (Merck, Германия). Высушенные образцы липопротеидов ресуспендировали в 1 мл холодного метанола и центрифугировали в течение 15 мин при 2200g. Супернатант осторожно удаляли и процедуру повторяли. Оставшийся метанол выпаривали в вакуумном концентраторе.

Высушенные образцы растворяли в 30 мкл 1,33% SDS и денатурировали путем инкубации при 65°C в течение 10 мин. Следующие этапы высвобождения N-гликанов и флуоресцентного мечения были выполнены согласно методики [Trbojević Akmačić и др., 2015]. После маркировки свободную метку и восстанавливающий агент удаляли из образцов методом твердофазной экстракции жидкостной хроматографией с гидрофильным взаимодействием (HILIC-SPE) с использованием фильтровальных пластин GHP 0,2 мкм и охлажденного 96% ацетонитрила [Trbojević Akmačić и др., 2015]. Флуоресцентно меченые N-гликаны разделяли с помощью сверхвысокой жидкостной хроматографии с гидрофильным взаимодействием с детектированием флуоресценции (HILIC-UHPLC-FLD) на системе Waters Acquity UHPLC H-class (Милфорд, США), как описано ранее [Trbojević Akmačić и др., 2015]. Меченые N-гликаны разделяли на хроматографической колонке Waters BEH Glycan, внутренний диаметр 150 × 2,1 мм, частицы BEH (Ethylene Bridged Hybrid) 1,7 мкм, со 100 mM формиатом аммония, pH 4,4, в качестве растворителя А и ацетонитрилом в качестве растворителя В. В методе разделения использовался линейный градиент 70–53% ацетонитрила (об/об) при скорости потока 0,56 мл/мин за 23 минутный аналитический цикл. Перед впрыском образцы выдерживали при 10 °С, а температура разделения составляла 25 °С. Все полученные хроматограммы были разделены таким же образом на 22 и 18 хроматографических пиков для ЛВП и ЛНП, соответственно, и количество гликанов в каждом пике выражалось в процентах от общей интегрированной площади.

Идентичность N-гликанов, разделенных HILIC-UHPLC-FLD, определяли с помощью времяпролетной масс-спектрометрией с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF-MS). Перед анализом методом масс-спектрометрии фракции каждого пика хроматографии N-гликана собирали, сушили в вакуумном концентраторе, ресуспендировали в 10 мкл воды высшей степени очистки и стабилизировали этиловой этерификацией согласно протоколу [Reiding и др., 2014]. Аликвоты по 2 мкл наносили на мишень MTP AnchorChip 384 BC MALDI (Bruker Daltronics, Германия), смешивая на планшете с 1 мкл

матричного раствора (5 мг/мл 2,5-DHB, 1 mM NaOH в 50% ацетонитриле). и оставили сушиться на воздухе. Перекристаллизацию проводили, добавляя 0,2 мкл этанола в каждую точку. Анализы проводили в режиме отражателя положительных ионов на UltrafleXtreme MALDI-TOF-MS, оборудованном лазером Smartbeam-II и программным обеспечением FlexControl 3.4 Build 119 (Bruker Daltonics, Германия). Прибор был откалиброван с использованием стандарта N-гликома плазмы. Ускоряющее напряжение 25 кВ было приложено после задержки извлечения 140 нс. Для образцов N-гликана использовали массовое окно с m/z от 1000 до 5000 с подавлением до m/z 900. Для каждого спектра было накоплено 10000 лазерных выстрелов при частоте лазера 2000 Гц с использованием полного случайного блуждания выборки с 200 выстрелами на растровое пятно.

2.8. Десиалилирование и дегликазилирование липопротеидов

ЛНП и ЛВП инкубировали в отсутствие (контроль) и в присутствии нейраминидазы (конечная концентрация фермента 0,1 Ед/мг белка; нейраминидаза GlycoCleave® (EnzymeBeads, Германия) в буфере ацетата натрия (конечная концентрация 50 mM ацетата натрия, 1 mM CaCl_2 , pH 6,0) при встряхивании в течение 16 ч при 37 °C. По окончании инкубации гранулы фермента удаляли из образцов центрифугированием при 1000 об / мин в течение 5 мин. В некоторых экспериментах обработанные нейраминидазой ЛВП впоследствии инкубировали с бета-галактозидазой (New England Biolabs, США) в течение 16 ч при 37 °C при постоянном встряхивании. Для полного удаления гликанов нативные ЛВП обрабатывали PNGазой F (New England Biolabs, США) в течение 16 ч при 37 °C при постоянном встряхивании.

2.9. Получение модифицированных ЛНП

Ацетилирование ЛНП осуществляли при по методу Голдштейн и Браун с соавторами [Goldstein и др., 1979].

ЛНП ацетилировали уксусным ангедридом, диализовали против 0,3 мМ ЭДТА pH 7,4 и затем против PBS.

Окисление ЛНП проводили по методу Steinbrecher [Steinbrecher и др., 1989]. Окисление проводили 10 мкМ CuSO₄, после ЛНП диализовали против PBS.

Полученные препараты модифицированных ЛНП стерилизовали при помощи фильтрации через фильтры с диаметром пор 0.4 мкм (Corning, США).

2.10. Измерение оттока холестерина при помощи ЛВП

Измерение оттока холестерина проводили на моноцитарных клетках человека THP-1 (ATCC, США), на линии клеток THP-1 с нокдауном гена ABCA1 и на линии клеток THP-1 с нокдауном гена SCARB1, которые были получены в данной работе по методу, описанному ниже, с добавлением 30 мг ЛВП по ФЛ [Larrede и др., 2009]. Частицы ЛВП сравнивали на основе их концентраций ФЛ, поскольку было показано, что ФЛ представляет собой ключевой компонент, определяющий способность ЛВП вызывать отток холестерина [Fournier и др., 2001]. Анализы оттока клеточного холестерина проводили, как описано ранее [Bellanger и др., 2011], с небольшими изменениями. Клетки THP-1 культивировали на 24-луночных планшетах в среде RPMI 1640 (среда Roswell Park Memorial Institute, Thermo Fisher, США) с 10% эмбриональной бычьей сывороткой (FBS) и 50 нг/мл форбол 12-миристат 13-ацетат (PMA) для дифференцировки в макрофагоподобные клетки в течение 48 ч при 37 °C. Клетки промывали натрий-фосфатным буфером (PBS) и добавляли меченые тритием ацетилированные ЛНП (³H-асЛНП, 1мКи/мл; для мечения тритием ацетилированные ЛНП инкубировали с 5 мКи [³H]холестерина в 1% FBS DMEM в течение 24 ч.) и инкубировали в течение течение 24 ч в бессывороточной культуральной среде RPMI 1640 с добавлением 50 мМ глюкозы,

2 мМ глутамин, 0,2% БСА, 100 мкг/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Среду для мечения удаляли, и макрофаги человека инкубировали в бессывороточной культуральной среде RPMI 1640 с добавлением 50 мМ глюкозы, 2 мМ глутамин, 0,2% БСА, 100 мкг/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина в течение дополнительных 16-24 часов, чтобы позволить клеткам уравновесить свои метаболические процессы. Отток клеточного холестерина анализировали в бессывороточной среде с добавлением ЛВП в течение 4 часов. Наконец, культуральные среды собирали и очищали от клеточного дебриса путем кратковременного центрифугирования. Радиоактивность клеток определяли экстракцией смесью гексан-изопропанол (3/2 по объёму), выпариванием растворителя в атмосфере азота и подсчетом в сцинтилляционном счетчике (Wallac Trilux 1450 Microbeta, Perkin Elmer, США). Процент оттока холестерина рассчитывали, как (среднее количество импульсов в минуту в среде) / (среднее количество импульсов в минуту в среде + количество импульсов в минуту в клетках) $\times$ 100%. Специфический отток холестерина определяли путем вычитания неспецифического оттока холестерина, происходящего в отсутствие акцепторов холестерина (ЛВП).

2.11. Выделение первичной культуры макрофагов человека

Моноциты выделяли из крови условно здоровых доноров. Для этого свежую кровь центрифугировали при 300g, 21°C в течение 20 минут. Плазму отбирали, а клеточный осадок, содержащий форменные элементы крови, доводили до первоначального объема стерильным изотоническим фосфатным буфером (PBS). Полученную суспензию наслаивали на раствор фиколла (плотность 1,077 г/см³, ПанЭко, Россия) и центрифугировали при 600g, 21°C в течение 30 минут. Затем отбирали фракцию лейкоцитарных клеток. Полученные клетки промывали трижды в PBS. Клетки ресуспендировали в 3 мл буфера MACS (Miltenyi Biotec, Германия), доводили MACS-буфером до 30 мл и добавляли 150 мкл раствора парамагнитных наночастиц MicroBeads к человеческому CD14 (Miltenyi Biotec, Германия).

Инкубировали в течение 35 минут при 4°C при постоянном перемешивании на качалке при 135 об/мин. Перед нанесением смеси клеток с MicroBeads колонки для магнитной сортировки, установленные в магнитный штатив, промывали 5 мл буфером MACS, затем наносили суспензию клеток на колонку для магнитной сортировки. Промывали колонку 3 раза по 3 мл MACS-буфера для удаления лейкоцитов не содержащих CD14. После промывки колонки моноциты смывали с колонки 10 мл буфером MACS в стерильную пробирку объемом 15 мл. Суспензию клеток центрифугировали при 600g, 21°C в течение 10 минут. Супернатант удаляли и клеточный осадок ресуспендировали в среде RPMI 1640 до концентрации 1 млн клеток на мл. Моноциты переносили в 48-луночный планшет и инкубировали в течение 6 дней с однократной сменой среды через 3 дня после начала культивирования до превращения в макрофаги. Полученные макрофаги использовали в экспериментах.

2.12. Нокдаун генов при помощи siRNA

Нокдаун гена ABCA1 в клетках THP-1 достигался трансфекцией плазмидой shRNA SureSilencing (SABiosciences, США) [Larrede и др., 2009] в соответствии с инструкцией производителя. Линии моноклональных клеток THP-1-ΔABCA1 были отобраны с помощью пуромицина (250 нг/мл), и нокдаун ABCA1 был подтвержден вестерн-блоттингом. Для всех экспериментов клетки THP-1 доводили до концентрации 1 млн клеток в 1 мл, сажали в 12-луночный планшет и инкубировали в течение 72 часов в RPMI 1640 с 10% инактивированной нагреванием FBS и PMA (50 нг/мл, Sigma, США). Нокдаун гена SCARB1 в клетках THP-1 достигалось трансфекцией 50 нМ миРНК SCARB1 или отрицательным контролем (Dharmacon, Thermo Fisher Scientific, США) с использованием Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen, США) в соответствии с инструкциями производителя. Клетки инкубировали в течение 8 ч, промывали PBS, а затем инкубировали в течение 24ч в среде RPMI1640 с 10% FBS. Трансфекцию клеток подтверждали ПЦР-РВ.

Нокдаун генов *IL7*, *IL7R*, *IL15*, *ANXA1*, *CXCL8*, *DUSP1*, *EIF2AK3*, *F2RL1*, *TIGIT* и *TSPYL2* осуществляли в первичных макрофагах человека с использованием 50 нМ siRNA (Santa Cruz Biotechnology, США) отрицательным контролем (Dharmacon, Thermo Fisher Scientific, США) с использованием Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen, США) в соответствии с инструкциями производителя. Нокдаун генов подтверждали при помощи ПЦР-РВ.

Нокдаун генов *LDLR*, *INSIG1*, *FADS1* проводили в клетках THP-1 с использованием 50 нМ siRNA (Santa Cruz Biotechnology, США) отрицательным контролем (Dharmacon, Thermo Fisher Scientific, США) с использованием Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen, США) в соответствии с инструкциями производителя. Нокдаун генов подтверждали при помощи ПЦР-РВ.

2.13. Накопление внутриклеточного холестерина в макрофагах, вызванное ЛНП

Моноциты THP-1 культивировали в 24-луночных планшетах, выращивали в среде RPMI 1640 с 10% FBS и дифференцировали в макрофагоподобные клетки с 50 нг/мл PMA (Sigma, США) в течение 48 часов при 37 °С. В случае с экспериментом на первичных макрофагах человека клетки культивировали в среде RPMI 1640 с 10% FBS. Клетки промывали и инкубировали в течение 48 ч с десалилированным ЛНП (100 мкг белка/мл) или нативным ЛНП (100 мкг белка/мл) в качестве контроля в бессывороточной культуральной среде RPMI 1640, чтобы обеспечить уравнивание клеточных метаболических процессов. Контрольные клетки получали в идентичных условиях, но без добавления ЛНП. Общее содержание холестерина в клетках THP-1 определяли с помощью анализа холестерина коммерческим набором Amplex Red (Invitrogen, Франция) или Fluitest (Analyticon Biotechnologies AG, Германия).

2.14. Определение внутриклеточного холестерина

Липиды из клеток экстрагировали дважды смесью гексана и изопропанола в объемном отношении 3:2 по методу [Hara, Radin, 1978], продолжительность каждой экстракция была 30 мин. Экстракт переносили в чистый 96-луночный плоскодонный планшет и выпаривали при комнатной температуре под горизонтальным током воздуха. Полученный сухой осадок растворяли в 25 мкл раствора, содержащего 15 мМ холат натрия и 0,05% Тритон X-100 (Sigma-Aldrich, Merck, США), добавляли 25 мкл изопропанола и 100 мкл раствора Fluitest (Analyticon Biotechnologies AG, Германия) для определения общего холестерина. В качестве стандарта использовали стандартный раствор холестерина в изопропаноле, 1 мг/мл (Analyticon Biotechnologies AG, Германия). Смесью инкубировали при 37 °C в течение 30 минут, после чего измеряли оптическую плотность проб при длине волны 492 нм на микропланшетном ридере AMR-100T (Allsheng, Китай) и рассчитывали содержание общего холестерина в каждой пробе.

При необходимости содержание эфиров холестерина определяли набором Amplex Red (Invitrogen, Франция).

2.15. Определение белка

После экстракции липидов в лунки с клетками добавляли 250 мкл 0,2 N NaOH, и инкубировали 4 часа в термостате при 60 °C, после чего определяли содержание клеточного белка в каждой пробе по методу Лоури [LOWRY и др., 1951]. Далее переносили по 100 мкл пробы в два планшета (для дублирования измерения) и добавляли к каждой пробе 150 мкл свежеприготовленного раствора C, тщательно перемешивали. После во все лунки вносили по 20 мкл раствора Folin (Folin:H₂O, 1:1) (Sigma-Aldrich, США) и инкубировали 30 минут в темноте при комнатной температуре. Оптическую плотность измеряли при длине волны 650 нм на микропланшетном ридере AMR-100T (Allsheng, Китай) и рассчитывали

содержание белка в каждой пробе. В качестве стандарта использовали раствор БСА в 0,2 N NaOH.

Состав растворов А, В и С:

Раствор С: 100 р-ра А + 1 р-ра В1 + 1 р-ра В2.

раствор А: 2% Na_2CO_3 в 0,1 N NaOH (0,2 г NaOH, 1г Na_2CO_3 на 50 мл р-ра)

раствор В1: 0,5% CuSO_4 в 1% цитрате Na (100 мг цитрата Na, 78 мг $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ на 10 мл р-ра)

раствор В2: 1%-ый калий – натриевый тартрат (100 мг К-Na тартрата на 10 мл р-ра)

2.16. Стимулирование фагоцитоза

Латексные шарики размером 1,1 мкм (LB11, Merck, Германия) использовали для активации фагоцитоза. К первичным макрофагам человека добавляли латексные шарики в концентрации 0.4 мкл/мл и инкубировали в течение ночи. После инкубации клетки промывали PBS и выделяли РНК набором RNeasy Plus Mini kit (Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя.

2.17. Секвенирование тотальной РНК

Библиотеки РНК-seq были получены из обогащенной поли(А) мРНК с использованием набора NEBNext Ultra RNALibrary Prep (New England Biolabs, США) согласно рекомендации производителя. Секвенирование было произведено на секвинаторе HiSeq 1500 (Illumina, Сан-Диего, Калифорния, США) согласно рекомендации производителя сотрудниками лаборатории Биохимии и молекулярной биологии, Nippon Medical School, Токио [Orekhov и др., 2020b].

2.18. Статистическая обработка данных

Распределения всех переменных анализировали на нормальность с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Нормально распределенные переменные представлялись как средние значения $\pm$ стандартное отклонение; негауссово распределенные переменные выражались как медиана (минимум, максимум). Межгрупповые различия в нормально распределенных переменных были проанализированы с использованием t-критерия Стьюдента. В случае множественных сравнений нормально-распределенных переменных с однородными дисперсиями применялась поправка Бонферрони. Для негауссово распределенных переменных применяли U-критерий Манна-Уитни. Для оценки взаимосвязи между переменными рассчитывались коэффициенты корреляции Спирмена. Статистический анализ проводили с использованием пакета программ IBM SPSS Statistics 22 (IBM SPSS, США) и Statistica 6.1 (StatSoft France, Maisons Alfort, Франция).

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Влияние десиалирования ЛНП на накопление эфиров холестерина человеческими макрофагоподобными клетками ТНР-1

Для исследования влияния десиалированных ЛНП на накопление внутриклеточного холестерина нативные ЛНП, выделенные из крови здоровых людей, обрабатывали нейраминидазой для удаления N-ацетилнейраминовой (сиаловой) кислоты с целью получения десиалированных ЛНП. Далее полученные десиалированные ЛНП инкубировали с человеческими макрофагоподобными клетками линии ТНР-1. Всего было проведено 6 экспериментов с 3 повторами для контроля без добавления ЛНП, с 3 повторами для нативных ЛНП и 3 повторами для десиалированных ЛНП. При инкубации клеток линии ТНР-1 с десиалированными или нативными ЛНП накопление внутриклеточных эфиров холестерина было в 2,7 раза выше после инкубации с десиалированными ЛНП (Рисунок 2) по сравнению с нативными ЛНП ($0,0242 \pm 0,0125$ мкг/мг белка vs $0,0090 \pm 0,0045$ мкг/мг белка, соответственно; $p < 0,05$) [Sukhorukov и др., 2019].

После удаления сиаловой кислоты ЛНП становятся атерогенными за счёт изменения заряда липопroteида, повышению способности к агрегации и приобретению способности взаимодействовать со скавенджер рецепторами. Следовательно, отсутствие сиаловой кислоты в составе N-гликанов ЛНП обуславливает атерогенные свойства липопroteидов.

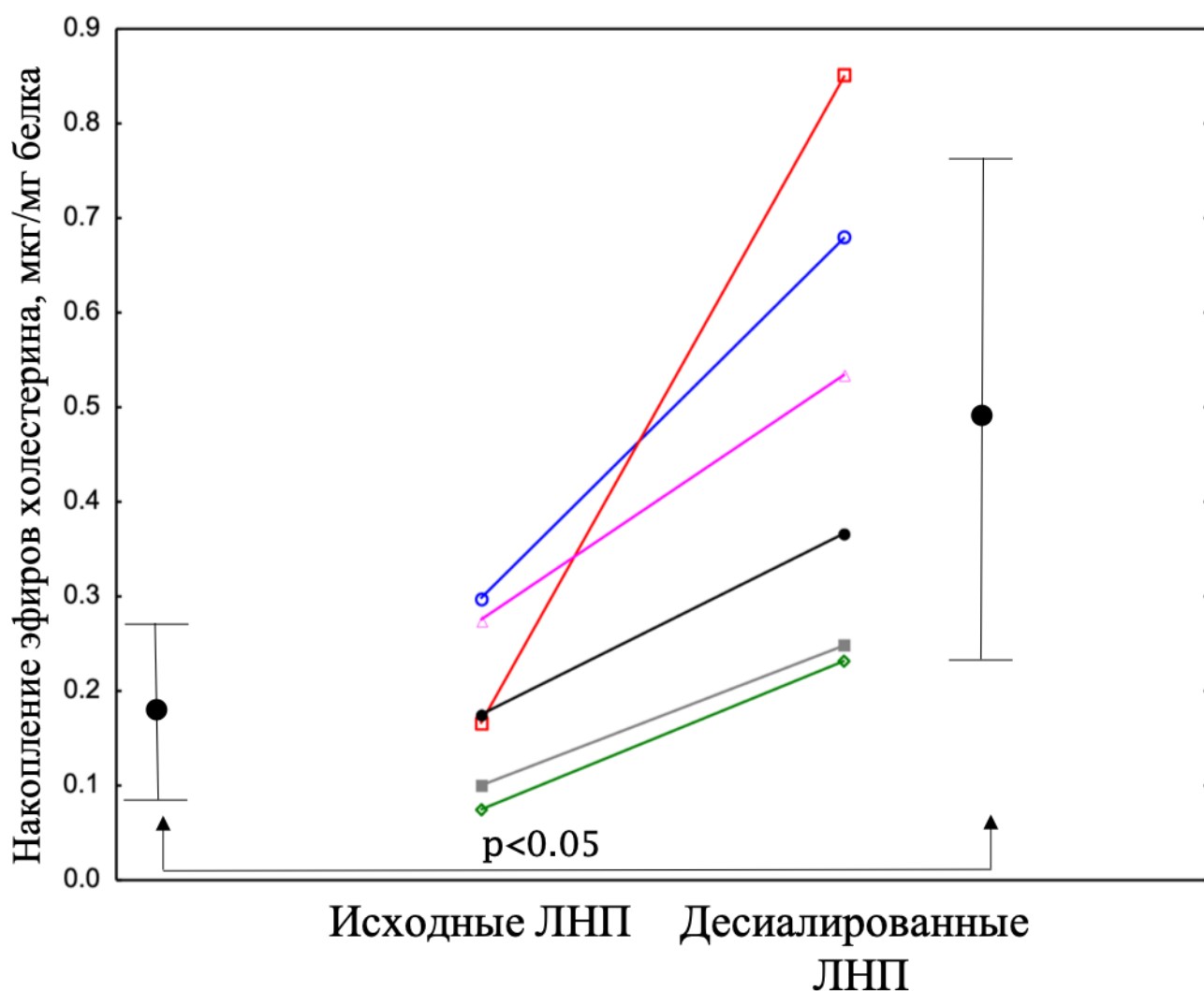


Рисунок 2. Влияние обработки нейраминидазой на атерогенные свойства ЛНП. Способность вызывать накопление эфиров холестерина в клетках THP-1 при инкубации с нативными и обработанными нейраминидазой ЛНП; среднее значение 0,49, стандартное отклонение 0,25 для базового накопления эфиров холестерина (ЭХ); среднее значение 0,18, стандартное отклонение 0,09 для накопления ЭХ [Sukhorukov и др., 2019].

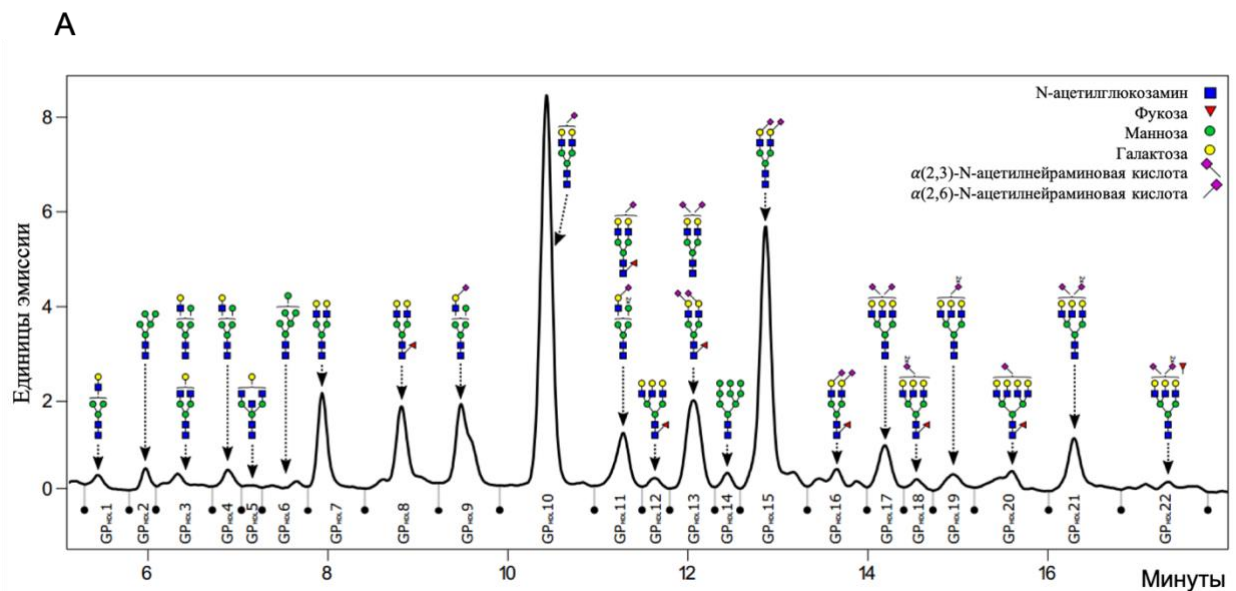
3.2. Анализ гликанового профиля ЛНП и ЛВП

Для изучения влияния десиалирования на качественные и количественные характеристики гликомов липопротеидов высокой и низкой плотности был проведён анализ гликанового профиля ЛНП и ЛВП до и после удаления концевой сиаловой кислоты при помощи нейраминидазы. Всего было проанализировано по 6 образцов десиалированных и нативных ЛНП и ЛВП. Сверхпроизводительная жидкостная хроматография гидрофильных взаимодействий с флуоресцентным

детектированием (HILIC-UPLC) позволила проанализировать N-гликаны ЛВП (Рисунок 3, А) и ЛНП (Рисунок 3, Б), полученные в результате обработки липопротеидов ПНГаза F. В результате анализа было выявлено 22 различных хроматографических пика для ЛВП и 18 для ЛНП. Относительное содержание пиков (гликановый пик, ГП), представляющих N-гликаны, количественно оценивали как процент от общей интегрированной площади. Идентичность структур N-гликана, присутствующих в каждом пике, определяли при помощи метода времяпролетной масс-спектрометрии с лазерной ионизацией и десорбцией из жидкой матрицы (МАЛДИ МС) после этиловой этерификации, которая химически модифицирует сialiрированные гликаны, позволяя различать α 2,3- и α 2,6-связанные сialiровые кислоты. Перечень наиболее распространенных N-гликанов ЛВП и ЛНП для каждого пика с их значениями отношения массы к заряду (m/z), составом моносахаридов и предположительными структурами приведены в таблицах 3 и 4, соответственно. Более 20 гликановых структур было описано как для ЛВП, так и для ЛНП, включая сложные с высоким содержанием маннозы и гибридные N-гликаны. Большинство N-гликанов, присутствующих в ЛВП (~ 70%) и ЛНП (~ 60%), представляли собой сложные сialiрированные структуры с одним или двумя остатками сialiровой кислоты. Наиболее распространенными N-гликанами в ЛВП были моно- и дисialiрированные двухантеннарные структуры A2G2S1 и A2G2S2. Аналогично, A2G2S1 был наиболее распространенным N-гликаном в N-гликоме ЛНП, но в отличие от ЛВП у ЛНП в гораздо большей степени распространены N-гликаны с высоким содержанием маннозы (~ 33% против ~ 3%). Обработка ЛВП и ЛНП нейраминидазой, которая избирательно удаляет остатки N-ацетилнейраминовой кислоты (сialiровой кислоты), резко изменила их N-гликановые профили (Рисунок 4, А и Б). Стоит отметить, что относительное содержание пиков, представляющих сialiрированные структуры, уменьшалось при обработке нейраминидазой (например, ГП_{ЛВП13} и ГП_{ЛВП15}), тогда как количество пиков, представляющих соответствующие десialiрированные структуры, увеличивалось (например, ГП_{ЛВП7} и ГП_{ЛВП8}; рисунок 5, А). Точно так же пик ЛНП ГП_{ЛНП6} был повышен в соответствии с уменьшением пиков ГП_{ЛНП13}

и ГП_{ЛНП}15 (Рисунок 5, Б). Это изменение в относительном содержании сиалированных N-гликанов в результате обработки нейраминидазой было менее очевидным в случае ГП_{ЛВП}10 и ГП_{ЛНП}10, представляющих их наиболее распространенный N-гликан A2G2S1, поскольку, помимо того, что вызывало уменьшение их относительного содержания путем смещения десиализованной формы A2G2S1 к более раннему времени элюции (ГП_{ЛВП}7 и ГП_{ЛНП}6), обработка нейраминидазой также вызывало увеличение их относительного содержания путем смещения элюирования десиалированных форм триантеннарных N-гликанов во времена удерживания ГП_{ЛВП}10 и ГП_{ЛНП}10 (например, A3G2S2 из ГП_{ЛВП}17 сместилось в ГП_{ЛВП}10 после десиалирования) [Sukhorukov и др., 2019].

Липопротеиды представляют собой высокосиалированные частицы. При десиалировании гликановый состав липопротеидов претерпевает значительные изменения. Эти изменения, по всей вероятности, влияют на атерогенные свойства ЛНП и ЛВП.



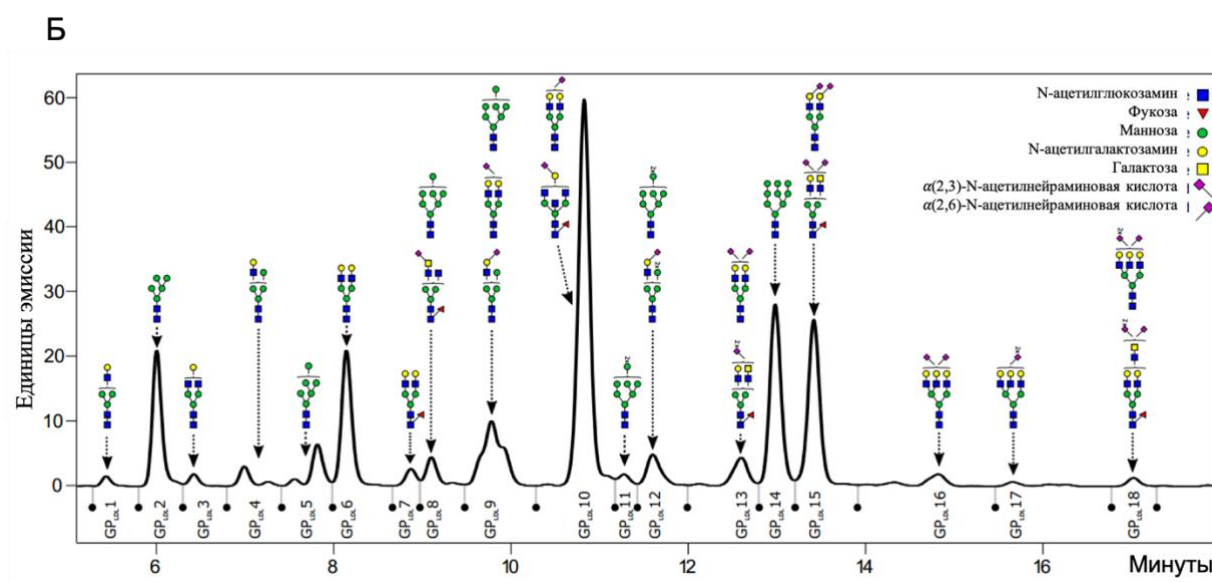


Рисунок 3. Репрезентативная хроматограмма 2-АВ (2-аминобензамид) меченных N-связанных гликанов, выделенных из нативных ЛВП (А) и ЛНП (Б) и разделенных методом HILIC (жидкостная хроматография гидрофильных взаимодействий)-UPLC (сверхэффективная жидкостная хроматография). Даны области интеграции вместе с основной структурой, представленной в каждой группе гликанов [Sukhorukov и др., 2019].

Таблица 3. Состав N-гликома ЛВП. N-гликом ЛВП был разделен на 22 хроматографических пика при помощи HILIC-UHPLC-FLD и массы отдельных гликановых структур были детектированы при помощи МАЛДИ МС [Sukhorukov и др., 2019].

Гликановый пик	Зарегистрированное м/з $[M+Na]^+$	Состав ¹	Предлагаемая структура ²
1	2	3	4
ГП _{ЛВП} 1	1418.954	H4N3	A1G1
ГП _{ЛВП} 2	1377.487	H5N2	M5
ГП _{ЛВП} 3	1580.740	H5N3	M4A1G1
	1621.754	H4N4	A2G1
ГП _{ЛВП} 4	1580.735	H5N3	M4A1G1
ГП _{ЛВП} 5	1824.958	H4N5	A2BG1
ГП _{ЛВП} 6	1539.900	H6N2	M6
ГП _{ЛВП} 7	1783.822	H5N4	A2G2

1	2	3	4
ГП _{ЛВП} 8	1929.743	H5N4F1	FA2G2
ГП _{ЛВП} 9	1899.789	H5N3E1	M4A1G1S[6]1
ГП _{ЛВП} 10	2102.970	H5N4E1	A2G2S[6]1
ГП _{ЛВП} 11	2249.204	H5N4F1E1	FA2G2S[6]1
	2062.102	H6N3E1	M5A1G1S[6]1
ГП _{ЛВП} 12	2294.788	H6N5F1	FA3G3
ГП _{ЛВП} 13	2376.184	H5N4E1L1	A2G2S[3,6]2
	2476.147	H5N4F1L2	FA2G2S[3,3]2
ГП _{ЛВП} 14	2026.124	H9N2	M9
ГП _{ЛВП} 15	2422.229	H5N4E2	A2G2S[6,6]2
ГП _{ЛВП} 16	2568.244	H5N4F1E2	FA2G2S[6,6]2
ГП _{ЛВП} 17	2741.402	H6N5E1L1	A3G3S[3,6]2
ГП _{ЛВП} 18	2841.466	H6N5F1L2	FA3G3S[3,3]2
ГП _{ЛВП} 19	2787.273	H6N5E2	A3G3S[6,6]2
ГП _{ЛВП} 20	2933.446	H7N6F1L1	FA4G4S[3]1
ГП _{ЛВП} 21	3060.590	H6N5E1L2	A3G3S[3,6,6]3
ГП _{ЛВП} 22	3206.680	H6N5F1E2L 1	A3F1G3S[3,6,6]3

¹ Н = гексоза, N = N-ацетилгексозамин, F = дезокси гексоза (фукоза), E = этиловый эфир N-ацетилнейраминовой кислоты (α 2,6-связанная), L = лактонизированная N-ацетилнейраминовая кислота (α 2,3-связанная).

² Используемые аббревиатуры: все N-гликаны состоят из основной последовательности сахаров, включающей два N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) и три маннозных остатка; F в начале аббревиатуры обозначает основную фукозу α 1-6 связанную с внутренним GlcNAc; Mx, число (x) манноз у центрального GlcNAc; Ax, число (x) ветвей (GlcNAc) в триманнозном ядре; Fx, число (x) фукоз, α 1-3 связанных с ветвью GlcNAc; Gx, число (x) β 1-4 связанных галактоз на ветви; Sx, число (x) сиаловых кислот, связанных с галактозой; LacdiNAc(x), число (x) lacdiNAc (GalNAc β 1-4GlcNAc) вставок.

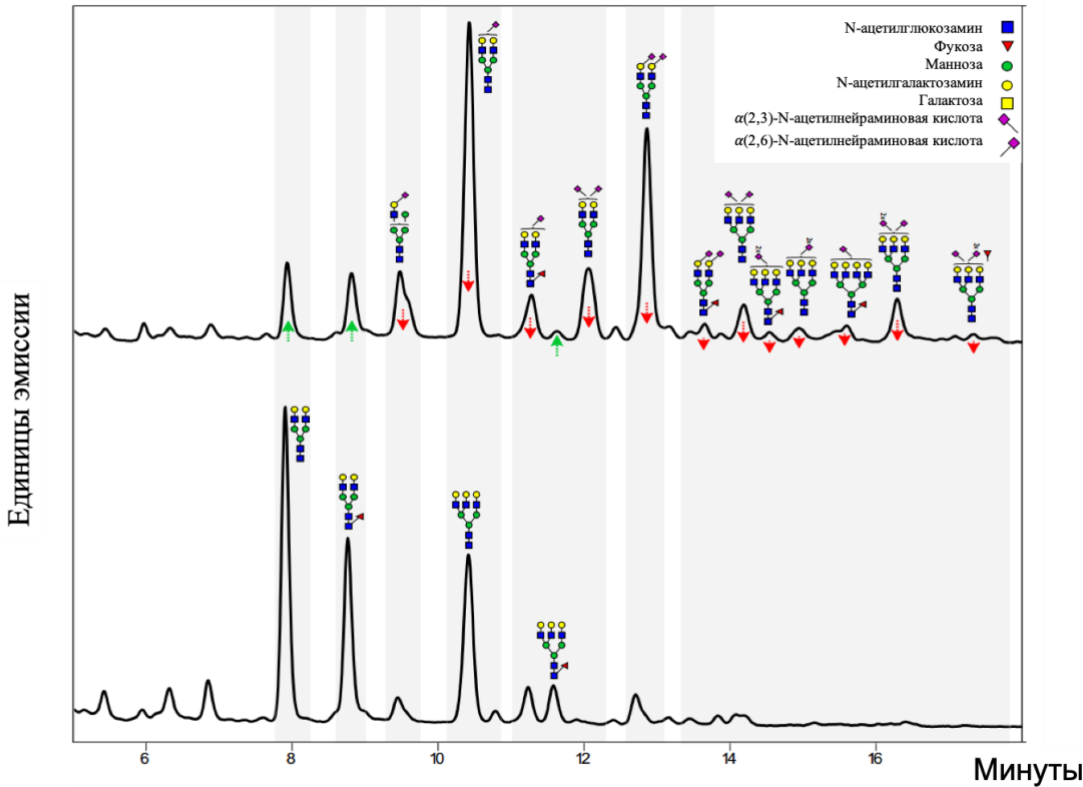
Таблица 4. Состав N-гликома ЛНП. N-гликом ЛНП был разделен на 18 хроматографических пиков при помощи HILIC-UHPLC-FLD и массы отдельных гликановых структур были детектированы при помощи МАЛДИ МС [Sukhorukov и др., 2019].

Гликановый пик	Зарегистрированное м/з [M+Na] ⁺	Состав ¹	Предлагаемая структура ²
1	2	3	4
ГП _{ЛНП} 1	1418.526	H4N3	A1G1
ГП _{ЛНП} 2	1377.596	H5N2	M5
ГП _{ЛНП} 3	1621.655	H4N4	A2G1
ГП _{ЛНП} 4	1580.656	H5N3	M4A1G1
ГП _{ЛНП} 5	1539.65	H6N2	M6
ГП _{ЛНП} 6	1783.701	H5N4	A2G2
ГП _{ЛНП} 7	1929.885	H5N4F1	FA2G2
ГП _{ЛНП} 8	1701.661	H7N2	M7
	2081.946	H3N5F1L1	FA1LacdiNAcS[3]1
ГП _{ЛНП} 9	1701.578	H7N2	M7
	2056.708	H5N4L1	A2G2S[3]1
	1899.659	H5N3E1	M4A1G1S[6]1
ГП _{ЛНП} 10	2102.79	H5N4E1	A2G2S[6]1
	2244.025	H4N5F1L1	FA2BG1S[3]1
ГП _{ЛНП} 11	1863.646	H8N2	M8
ГП _{ЛНП} 12	1863.624	H8N2	M8
	2061.715	H6N3E1	M5A1G1S[6]1
ГП _{ЛНП} 13	2375.82	H5N4E1L1	A2G2S[3,6]2
	2517.012	H4N5F1L2	FA1G1LacdiNAcS[3,3]2
ГП _{ЛНП} 14	2025.825	H9N2	M9
ГП _{ЛНП} 15	2421.876	H5N4E2	A2G2S[6,6]2
	2563.118	H4N5F1E1L1	FA1G1LacdiNAcS[3,6]2

1	2	3	4
ГП _{ЛНП} 16	2740.958	H6N5E1L1	A3G3S[3,6]2
ГП _{ЛНП} 17	2786.981	H6N5E2	A3G3S[6,6]2
ГП _{ЛНП} 18	3060.109	H6N5E1L2	A3G3S[3,3,6]3
	3201.328	H5N6E1L2	FA2G2LacdiNAcS[3,3,6]2

¹ Состав и структуры такие же как в таблице 3.

A



Б

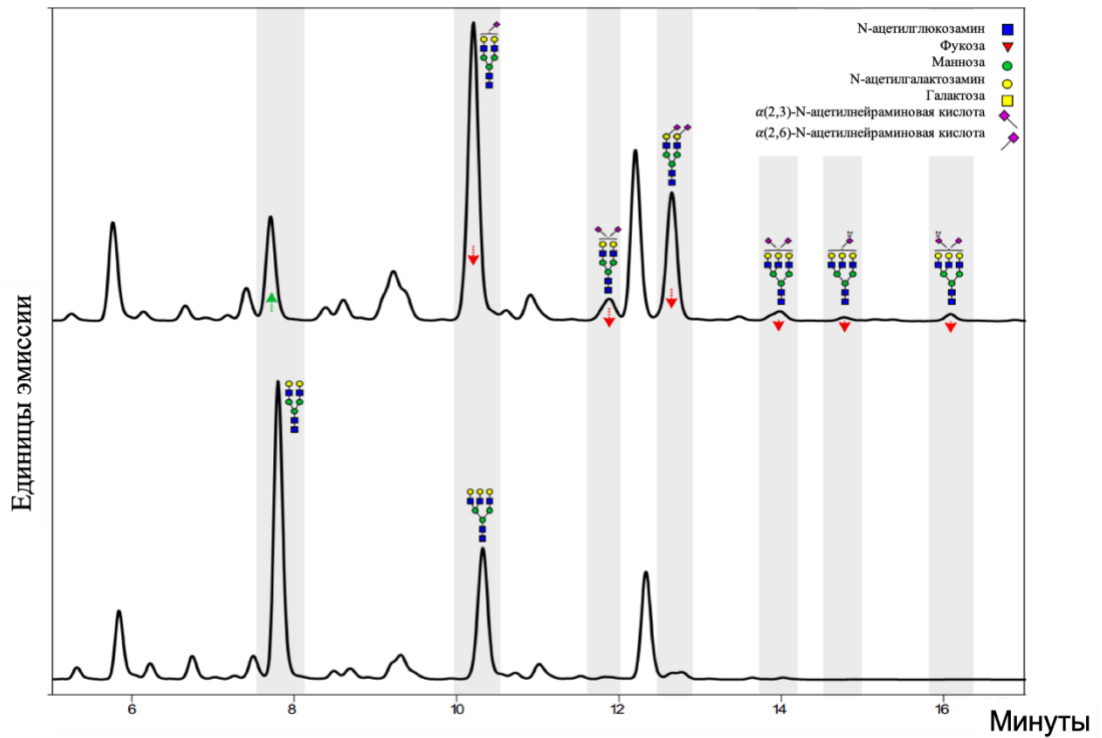
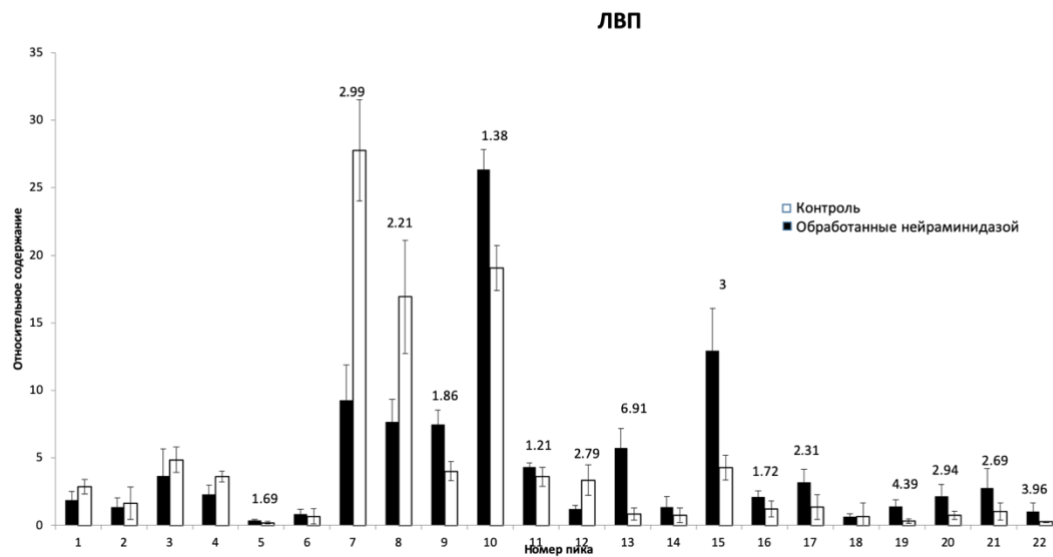


Рисунок 4. Типичная хроматограмма меченных N-связанными гликанов 2-AB, выделенных из нативных и обработанных нейраминидазой человеческих ЛВП (А) и ЛНП (В), разделенных HILIC-UPLC. Показана основная структура каждой группы гликанов, которая изменилась после проведения обработки нейраминидазой [Sukhorukov и др., 2019].

А



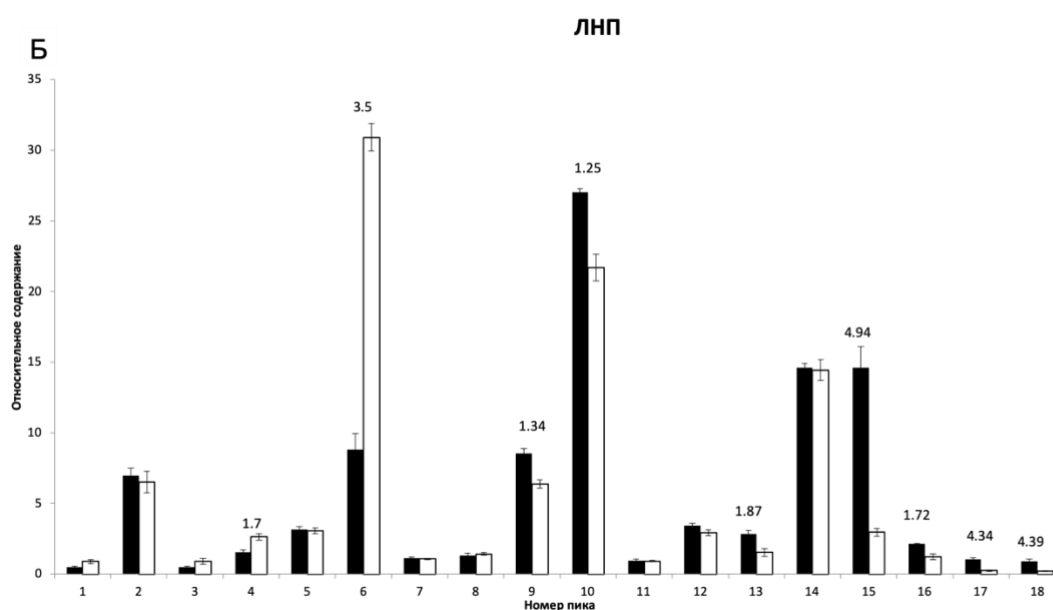


Рисунок 5. Относительное содержание отдельных гликановых пиков у нативных ЛВП (А) и ЛНП (Б), обработанных нейраминидазой. Числа обозначают разницу в размерах пиков в случае существенных различий [Sukhorukov и др., 2019].

3.4. Взаимосвязь между гликомом ЛНП и их способностью вызывать накопление эфиров холестерина в клетках

При анализе взаимосвязи между N-гликановым профилем ЛНП и способностью вызывать накопление клеточного холестерина, была обнаружена только одна значимая корреляция ($ГП_{ЛНП16}$, таблица 5). Примечательно, что площадь пика $ГП_{ЛНП16}$, представляющего сialiлированный N-гликан A3G3S2, положительно коррелировала со способностью обработанных нейраминидазой (десialiлированных) ЛНП индуцировать накопление эфиров холестерина. Во всех образцах способность индуцировать накопление эфиров холестерина отрицательно коррелировала с площадью пика номер 9, содержащего сialiовую кислоту (Рисунок 6). Следовательно, чем больше сialiовых кислот содержится в ЛНП, тем меньшей атерогенностью они обладают [Sukhorukov и др., 2019].

Таким образом, изменение N-гликанового профиля липопротеидов коррелирует с атерогенными свойствами ЛНП. В результате уменьшения

количества гликанов, содержащих сиаловую кислоту возрастают атерогенные свойства ЛНП.

Таблица 5. Коэффициенты корреляции между гликомным составом и способностью ЛНП индуцировать накопление эфиров холестерина в клетках [Sukhorukov и др., 2019].

Номер лика	Контрольные образцы (n=6)	Десиалированные образцы (n=6)
ГП _{ЛНП} 1	-0.71	-0.44
ГП _{ЛНП} 2	-0.08	0.02
ГП _{ЛНП} 3	-0.72	-0.58
ГП _{ЛНП} 4	-0.79	-0.54
ГП _{ЛНП} 5	-0.23	0.02
ГП _{ЛНП} 6	-0.58	-0.22
ГП _{ЛНП} 7	-0.45	-0.31
ГП _{ЛНП} 8	-0.66	-0.80
ГП _{ЛНП} 9	-0.41	-0.45
ГП _{ЛНП} 10	-0.53	0.30
ГП _{ЛНП} 11	-0.78	-0.69
ГП _{ЛНП} 12	-0.28	-0.44
ГП _{ЛНП} 13	0.59	0.66
ГП _{ЛНП} 14	-0.17	0.14
ГП _{ЛНП} 15	0.80	0.30
ГП _{ЛНП} 16	0.69	0.88
ГП _{ЛНП} 17	0.75	0.28
ГП _{ЛНП} 18	0.66	0.47

Значимые корреляции выделены жирным шрифтом; $p < 0,05$

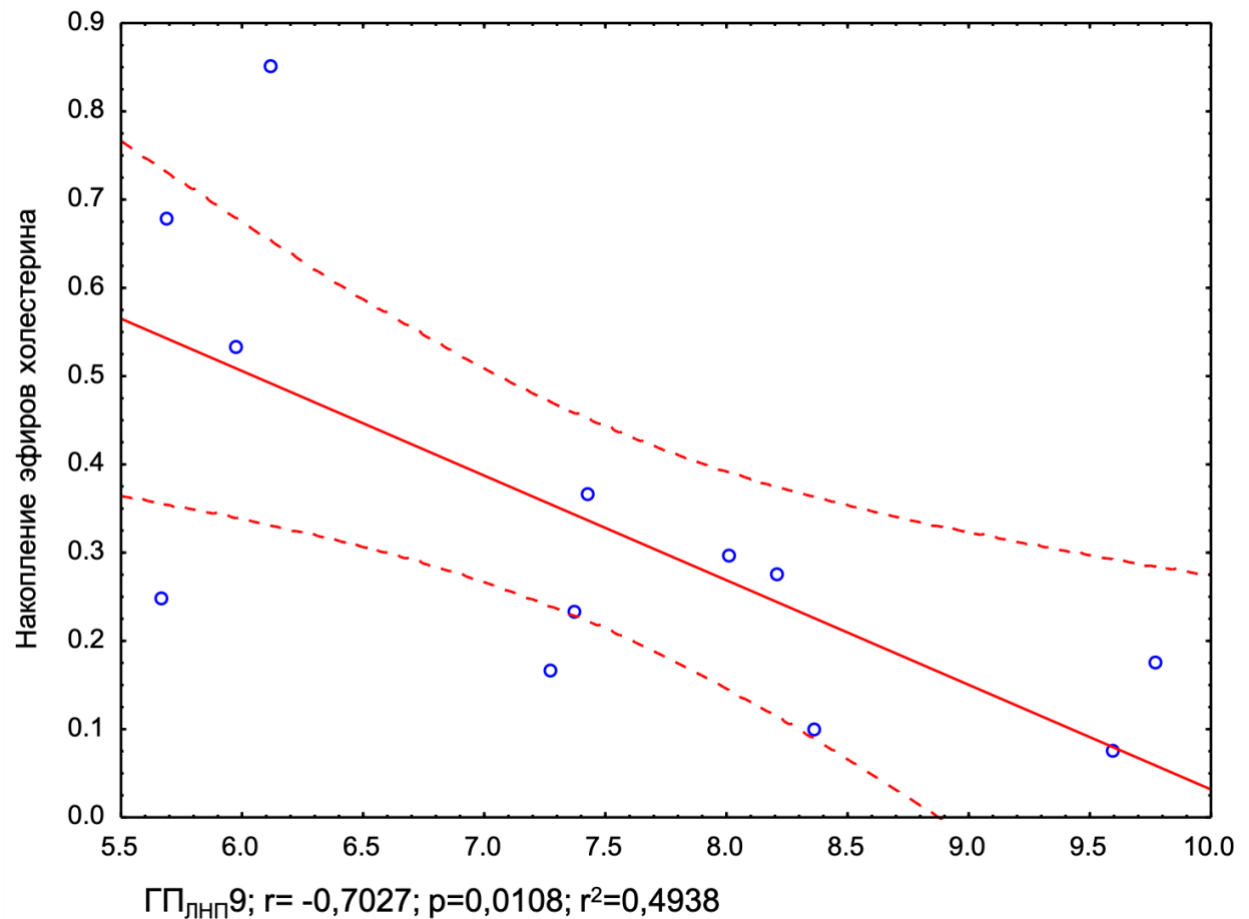


Рисунок 6. Взаимосвязь между гликомом и биологическими свойствами ЛНП. Показана корреляция между накоплением эфира холестерина в клетках, инкубированных с ЛНП, и площадью пика 9, представляющего сialiрированные гликаны. Таким образом, чем больше сialiрических кислот содержится в ЛНП, тем меньшей атерогенностью они обладают [Sukhorukov и др., 2019].

3.5. Влияние десialiрирования и дегликозилирования ЛВП на их способность вызывать отток эфиров холестерина из человеческих макрофагоподобных клеток ТНР-1

Способность нативных и десialiрированных ЛВП вызывать отток внутриклеточного холестерина оценивали в нагруженных липидами макрофагоподобных человеческих клетках ТНР-1, которые выводят холестерин преимущественно через ABCA1-зависимый путь. Всего были проведены 6 экспериментов с 3 повторами для контроля без добавления ЛВП, с 3 повторами для нативных ЛВП и 3 повторами для десialiрированных ЛВП. На клетках с нокдауном

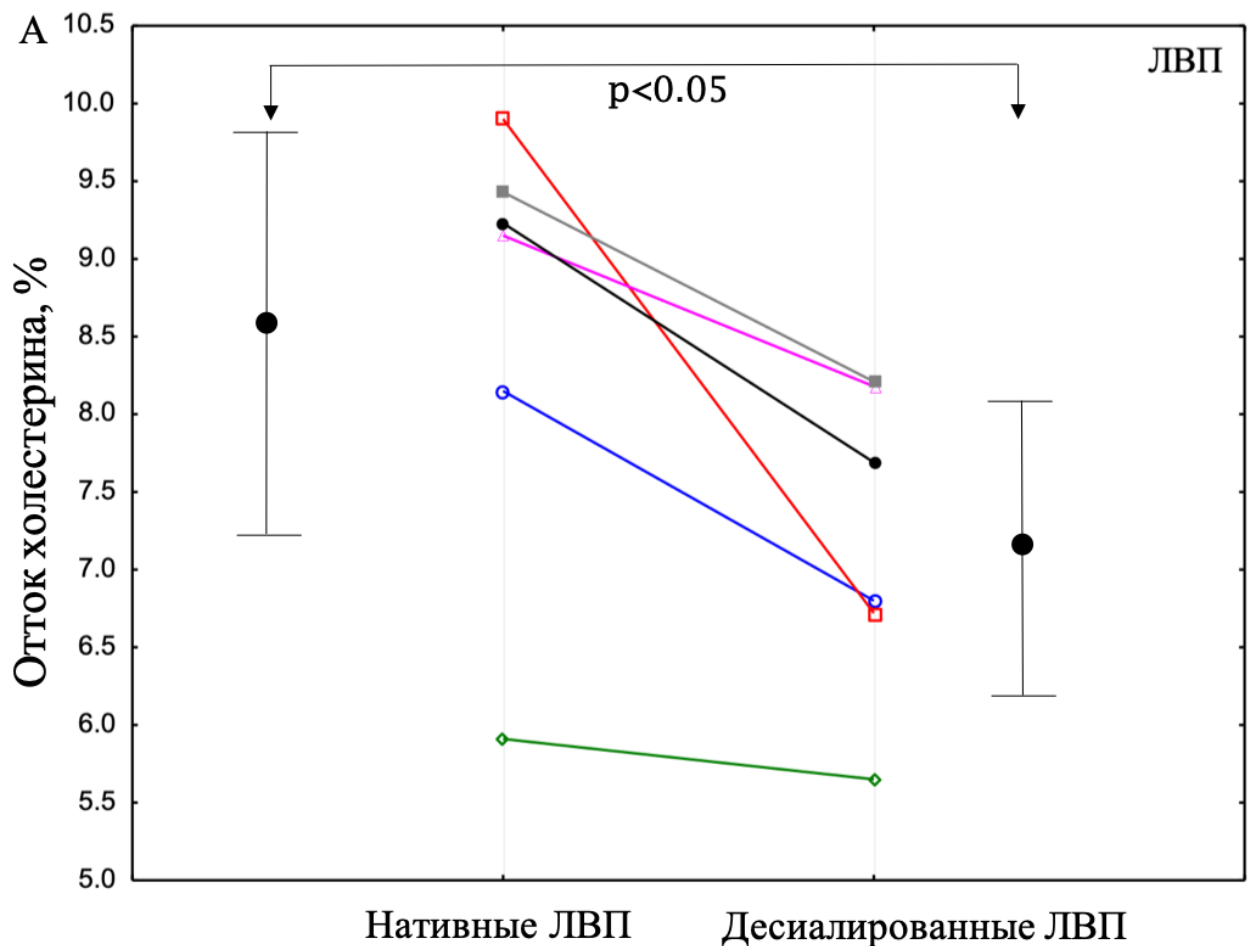
были проведены 3 эксперимента с 3 повторами для контроля без добавления ЛВП, с 3 повторами для нативных ЛВП и 3 повторами для десиалированных ЛВП. Нативные ЛВП значительно более эффективны (+16%) в оттоке клеточного холестерина по сравнению с десиалированными ЛВП ($8,62 \pm 1,44\%$ для нативных против $7,21 \pm 1,00\%$ для ЛВП, обработанных нейраминидазой, $p < 0,05$, рисунок 7, А). Напротив, не было существенной разницы в способности нативных и десиалированных ЛВП выводить холестерин из клеток THP-1 с нокдауном по гену *SCARB1* ($6,57 \pm 0,39\%$ против $6,09 \pm 0,47\%$ соответственно; $p > 0,05$). Точно также, не было различия в способности вызывать отток холестерина у нативных и десиалированных ЛВП в макрофагах с нокдауном по гену *ABCA1* ($4,19 \pm 0,18\%$ против $4,48 \pm 0,46\%$ соответственно; $p > 0,05$). Обработка ЛВП бета-галактозидазой после обработки нейраминидазой не вызывала дальнейшего снижения способности вызывать отток холестерина, что было показано в 3 экспериментах с 3 повторами для контроля без добавления ЛВП, с 3 повторами для нативных ЛВП и 3 повторами для обработанных бета-галактозидазой ЛВП (Рисунок 7, Б). Обработка только пептид:N-гликозидазой F (ПНГаза F) значительно снижала способность ЛВП к оттоку холестерина (Рисунок 7, Б), что было показано в 3 экспериментах с 3 повторами для контроля без добавления ЛВП, с 3 повторами для нативных ЛВП и 3 повторами для обработанных ПНГазой F ЛВП.

При разделении субпопуляций ЛВП с использованием нативного электрофореза в акриламидном геле и мечением антителами против белка апоА-I, отщепление апоА-I без липидов или с низким содержанием липидов из десиалированного ЛВП не наблюдалось. Средний размер ЛВП был несильно, но значимо уменьшен с $9,5 \pm 0,1$ до $9,0 \pm 0,1$ нм ($p < 0,01$, $n = 3$) в результате обработки салидазой [Sukhorukov и др., 2019]. Таким образом, десиалирование не вызывает потери апоА-I из состава липопротеидов, но способствует уменьшению среднего размера частицы ЛВП.

Активность лецитинхолестеринацилтрансферазы (ЛХАТ) оценивали на 6 разных образцах ЛВП и полученных на их основе десиалированных ЛВП. Активность ЛХАТ была заметно снижена (на 46%) у десиалированных ЛВП по

сравнению с образцами нативных ЛВП, инкубированными параллельно в отсутствие нейраминидазы (925 ± 412 против 1702 ± 442 нмоль/ч/мл соответственно; $p < 0,01$, $n = 3$) [Sukhorukov и др., 2019].

Отсюда следует, что ЛВП без сиаловой кислоты утрачивают свои антиатерогенные функции, за счет способности связываться со скавенджер рецепторами на поверхности макрофагов, а также с ЛХАТ. При этом именно сиаловые кислоты играют важную роль в этих функциях, так как полное удаление гликанов с поверхности ЛВП не приводило к дополнительному снижению оттока холестерина из макрофагов.



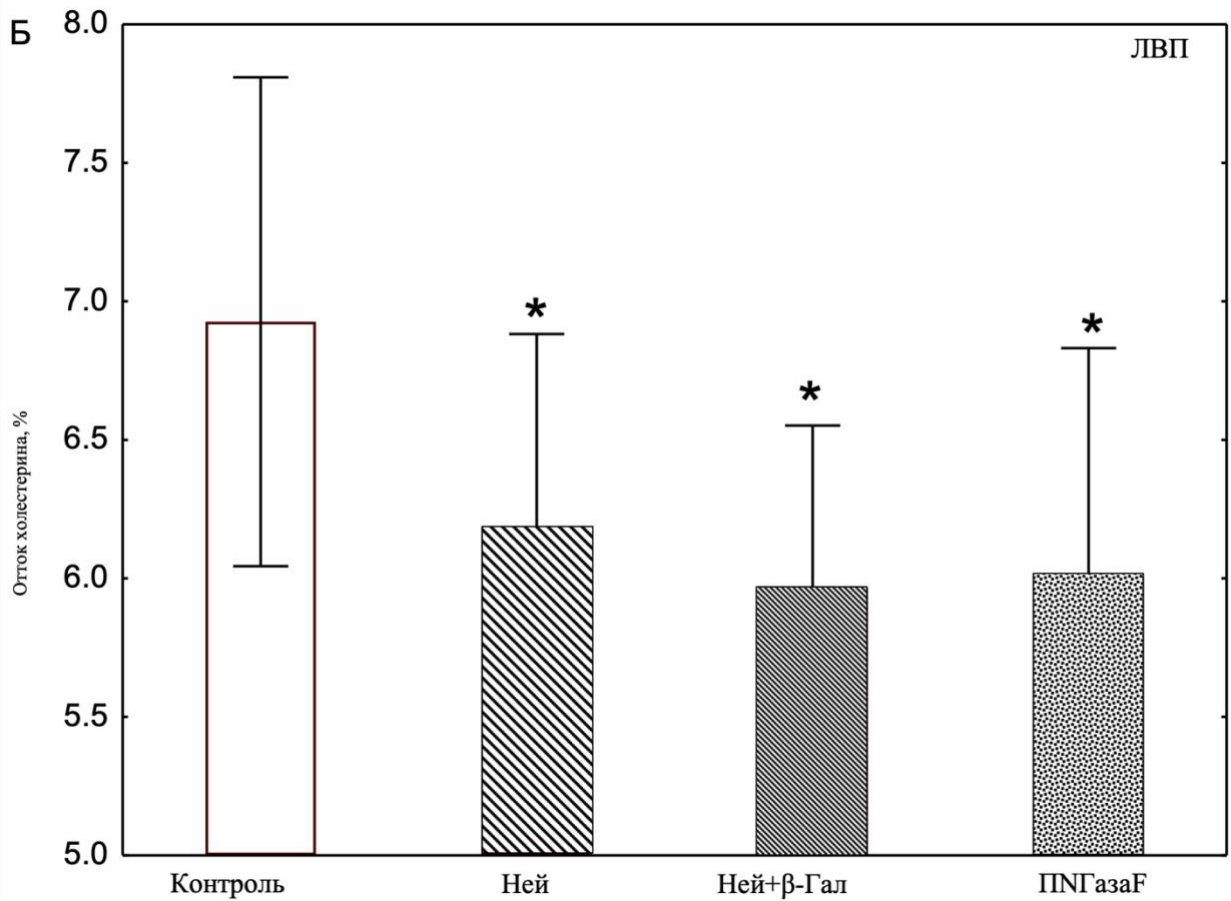


Рисунок 7. Влияние обработки нейраминидазой и другими ферментами на биологические свойства ЛВП.

Способность вызывать отток клеточного холестерина из макрофаго-подобных клеток ТНР-1 у нативных ЛВП и ЛВП обработанных нейраминидазой ЛВП (А), Способность вызывать отток клеточного холестерина из макрофаго-подобных клеток ТНР-1 у нативных ЛВП и ЛВП обработанных нейраминидазой, β-галактозидазой и ПНГазой F (Б).

А: среднее значение 8,63, стандартное отклонение 1,45 для исходного оттока; среднее значение 7,21, стандартное отклонение 1,0 для оттока + нейраминидаза.

Б: среднее значение 7,89, стандартное отклонение 3,16 для контроля (базовый уровень оттока); среднее значение 6,99, стандартное отклонение 2,62 для ЛВП, обработанных Ней (обработанной нейраминидазой) ; среднее значение 6,63, стандартное отклонение 2,18 для ЛВП, обработанных Ней+ β-Гал (нейраминидазой и β-галактозидазой); среднее значение 6,26, стандартное отклонение 1,76 для ЛВП, обработанных ПНГазой F. * обозначает значительное отличие от базового уровня ($p < 0.05$) [Sukhorukov и др., 2019].

3.5. Взаимосвязь между гликомом ЛВП и их способностью вызывать отток эфиров холестерина из клеток

Ряд значительных корреляций наблюдался между N-гликановым составом ЛВП и их способностью вызывать отток холестерина (таблица 6). Положительная корреляция со способностью ЛВП вызывать отток холестерина была показана для пиков, содержащих моно- и дисаилилированные N-гликаны (ГП_{ЛВП}11 и 13), тогда как для N-гликанов с высоким содержанием маннозы (ГП_{ЛВП}14) была показана отрицательная корреляция с оттоком холестерина. Аналогичным образом, в образцах ЛВП, обработанных нейраминидазой, содержание гибридных и с высокой концентрацией маннозы N-гликанов (ГП_{ЛВП}2, 6 и 14) показало отрицательную корреляцию со способностью к оттоку, в то время как сложные двухантеннарные (ГП_{ЛВП}8) и трехантеннарные (ГП_{ЛВП}22) N-гликаны выявили положительную корреляцию. Во всех образцах отток положительно коррелировал с площадью пика 13 (Рисунок 8).

Таблица 6. Коэффициенты корреляции между гликомным составом ЛВП и их способностью вызывать отток холестерина из клеток THP-1 [Sukhorukov и др., 2019].

Номер лика	Контрольные образцы (n=6)	Десалирированные образцы (n=6)
ГП _{ЛВП} 1	0.29	-0.1
ГП _{ЛВП} 2	-0.72	-0.88
ГП _{ЛВП} 3	-0.69	-0.55
ГП _{ЛВП} 4	0.25	-0.15
ГП _{ЛВП} 5	0.06	0.71
ГП _{ЛВП} 6	-0.69	-0.85
ГП _{ЛВП} 7	-0.35	-0.66
ГП _{ЛВП} 8	0.67	0.84
ГП _{ЛВП} 9	0.55	-0.27
ГП _{ЛВП} 10	-0.14	-0.55
ГП _{ЛВП} 11	0.83	0.65
ГП _{ЛВП} 12	0.15	0.78
ГП _{ЛВП} 13	0.84	0.20
ГП _{ЛВП} 14	-0.92	-0.89
ГП _{ЛВП} 15	0.00	0.00
ГП _{ЛВП} 16	0.20	0.08
ГП _{ЛВП} 17	0.11	0.10
ГП _{ЛВП} 18	0.59	0.57
ГП _{ЛВП} 19	-0.27	0.30
ГП _{ЛВП} 20	0.23	0.40
ГП _{ЛВП} 21	0.05	0.43
ГП _{ЛВП} 22	-0.15	0.82

Значимые корреляции выделены жирным шрифтом; $p < 0,05$.

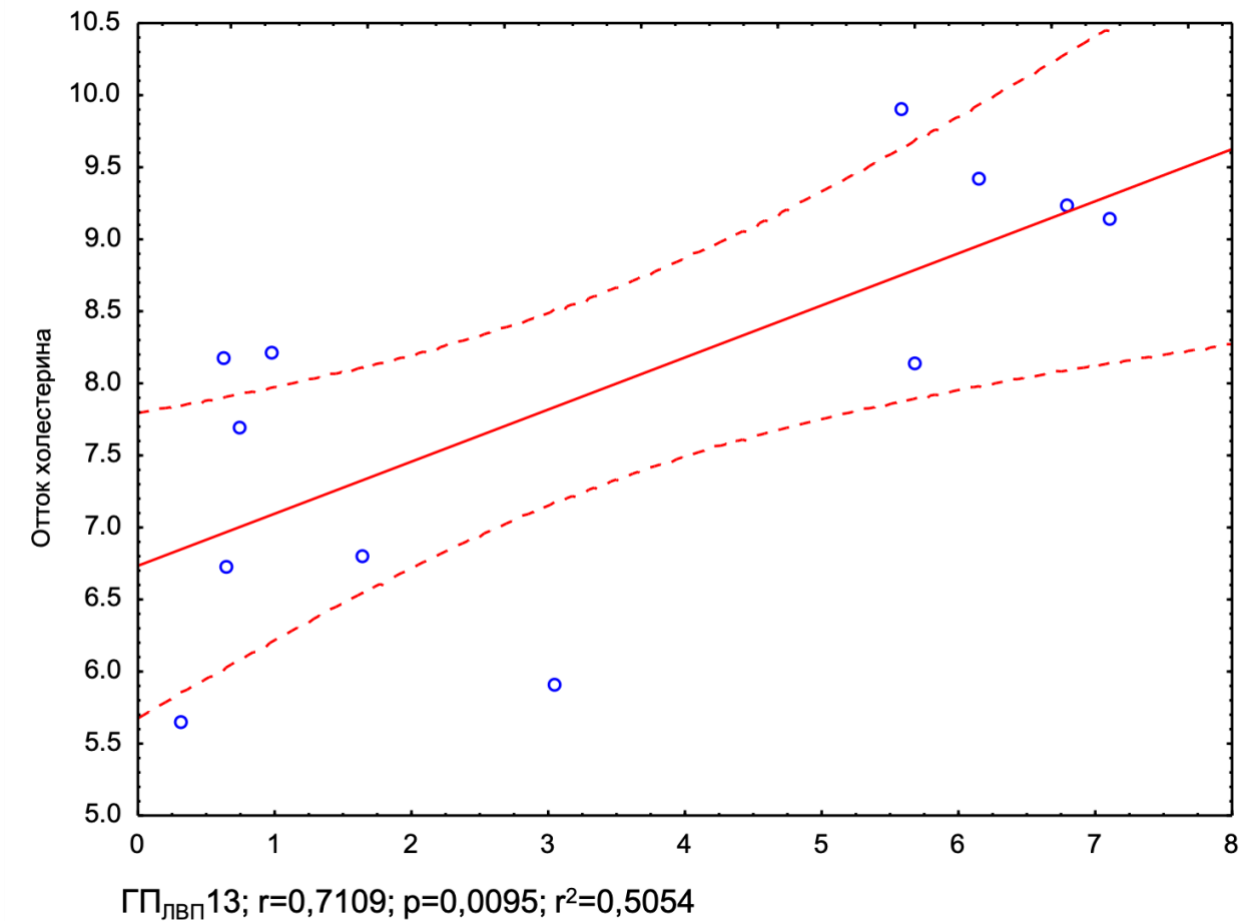


Рисунок 8. Взаимосвязь между гликомом и биологическими свойствами ЛВП. Показана корреляция между способностью ЛВП, вызывать отток клеточного холестерина и площадью пика 13 [Sukhorukov и др., 2019].

Полученные данные позволяют предположить, что способность ЛВП вызывать отток холестерина зависит от наличия на поверхности липопroteида сиаловой кислоты.

3.10. Выявление ключевых сигнальных путей, участвующих в фагоцитозе модифицированных ЛНП

Для выявления ключевых сигнальных путей, участвующих в фагоцитозе модифицированных ЛНП из культуры клеток первичных макрофагов человека, инкубированных в течение 24 часов с нативными или атерогенными (естественными, выделенными из крови больных атеросклерозом),

десиалированными, ацетилированными окисленными) ЛНП или шариками латекса, а также из контрольных макрофагов, не подвергавшимся никакому воздействию. Все эксперименты были выполнены в трех повторностях. Как ожидалось нативные ЛНП и шарики латекса не вызывали накопление общего холестерина. Напротив, модифицированные ЛНП (десиалированные, окисленные, ацетилированные) вызвали значительное накопление общего холестерина (таблица 7). Было проведено секвенирование РНК из 21 образца культуры человеческих макрофагов (3 повторности в 7 группах: с добавлением нативных, десиалированных, ацетилированных, окисленных, выделенных из крови больных атеросклерозом ЛНП (естественные ЛНП), шариков латекса и без воздействия). Данные транскрипционного анализа были проанализированы при помощи так называемого «восходящего анализа» с использованием базы данных TRANSPATH® [Krull, 2006; Orekhov и др., 2020a].

Таблица 7. Содержание общего холестерина в культуре макрофагов

Добавка	Общий холестерин (нмоль/мг белка)	
	Среднее±стандартная ошибка	Р-критерий (к контролю)
Контроль	57±9	-
Нативные ЛНП	56±5	незначимо
Окисленные ЛНП	98±11	0.014
Ацетилированные ЛНП	80±6	0.039
Десиалированные ЛНП	102±8	0.004
ЛНП из крови больных атеросклерозом	80±7	0.045
Шарики латекса	51±11	незначимо

С помощью построения диаграммы Венна для демонстрации сходства различия и связи между сигнальными путями мы определили сигнальные пути, регуляция которых была повышена и понижена в ответ на различные модификации ЛНП, а также шарики латекса. При выявлении сигнальных путей мы брали в рассмотрение только те сигнальные пути, которые регулировались отличным от регуляции сигнальных путей образом при взаимодействии макрофагов с нативными ЛНП, которые не вызывают накопление внутриклеточного холестерина. На рисунке 9 представлена диаграмма Венна, на которой сравниваются сигнальные пути с измененной активацией при взаимодействии клеток с нативными ЛНП, атерогенными ЛНП из крови больных атеросклерозом и шариками латекса. Для шариков латекса было обнаружено 88 сигнальных путей с повышенной регуляцией и 44 с пониженной. Для атерогенных ЛНП из крови больных атеросклерозом — 77 и 10, соответственно. Сравнение сигнальных путей с однонаправленной регуляцией при взаимодействии с шариками латекса и атерогенными ЛНП привело к выявлению общих сигнальных путей, регулируемых одинаково. Среди этих сигнальных путей 4 было с повышенной регуляцией и 8 с пониженной.

В таблице 8 представлены сигнальные пути с измененной регуляцией при взаимодействии макрофагов с модифицированными ЛНП и шариками латекса. Сигнальные пути, которые изменялись однонаправленно в случае атерогенных ЛНП из крови больных атеросклерозом и ЛНП, модифицированных *in vitro* (десиалированные, ацетилированные, окисленные) отмечены разными цветами. Зеленым отмечен сигнальный путь TLR9, который единственный был общим для всех четырех модификаций ЛНП. Сигнальные пути, чья регуляция была одинаковой для трех модификаций ЛНП, отмечены голубым цветом. Желтым цветом мы отметили сигнальные пути с одинаковой регуляцией для двух модификаций ЛНП. Сигнальные пути, регулируемые *in vitro* модифицированными ЛНП, сравнивали с сигнальными путями, регулируемые атерогенными ЛНП из крови больных атеросклерозом. Все сигнальные пути регулируемые атерогенными ЛНП имели сходную регуляцию хотя бы с одним сигнальным путем для *in vitro*

модифицированных ЛНП. Полное совпадение было обнаружено только для сигнальных путей с пониженной регуляцией десиалированными и атерогенными ЛНП из крови больных. При повышенной регуляции было только два совпадающих сигнальных пути: “neurotrophic signaling” и “TLR9 pathway”. Таким образом, 10 из 12 сигнальных путей регулируются одинаково в случае естественных атерогенных ЛНП и десиалированных ЛНП.

Регуляция сигнальных путей в случае ацетилованных и окисленных ЛНП значительно отличалась от естественных атерогенных ЛНП. В случае ацетилованных ЛНП, несмотря на то что четыре сигнальных пути с повышенной регуляцией совпадали с естественными атерогенными ЛНП, остальные 29 с повышенной регуляцией были обнаружены только для ацетилованных ЛНП, но не для естественных атерогенных. Общим для этих липопротеидов оказался только один сигнальный путь с пониженной регуляцией: “Aurora-B cell cycle regulation”. Всего для естественных и ацетилованных ЛНП общими были 5 из 12 сигнальных путей. Ещё меньше совпадений в регуляции сигнальных путей было обнаружено между окисленными и естественными ЛНП. Только 2 из 12 путей были общими для этих липопротеидов, и оба этих пути были с пониженной регуляцией (“TLR9 pathway” и “TLR2-mediated signaling”).

Таким образом, с использованием полученных данных было установлено, что естественные ЛНП и десиалированные ЛНП вызывают практически одинаковый профиль регуляции в макрофагах, при этом он значительно отличается от всех остальных модификаций ЛНП. Следовательно, десиалирование, вероятно, является основной модификацией ЛНП, циркулирующих в крови людей больных атеросклерозом.

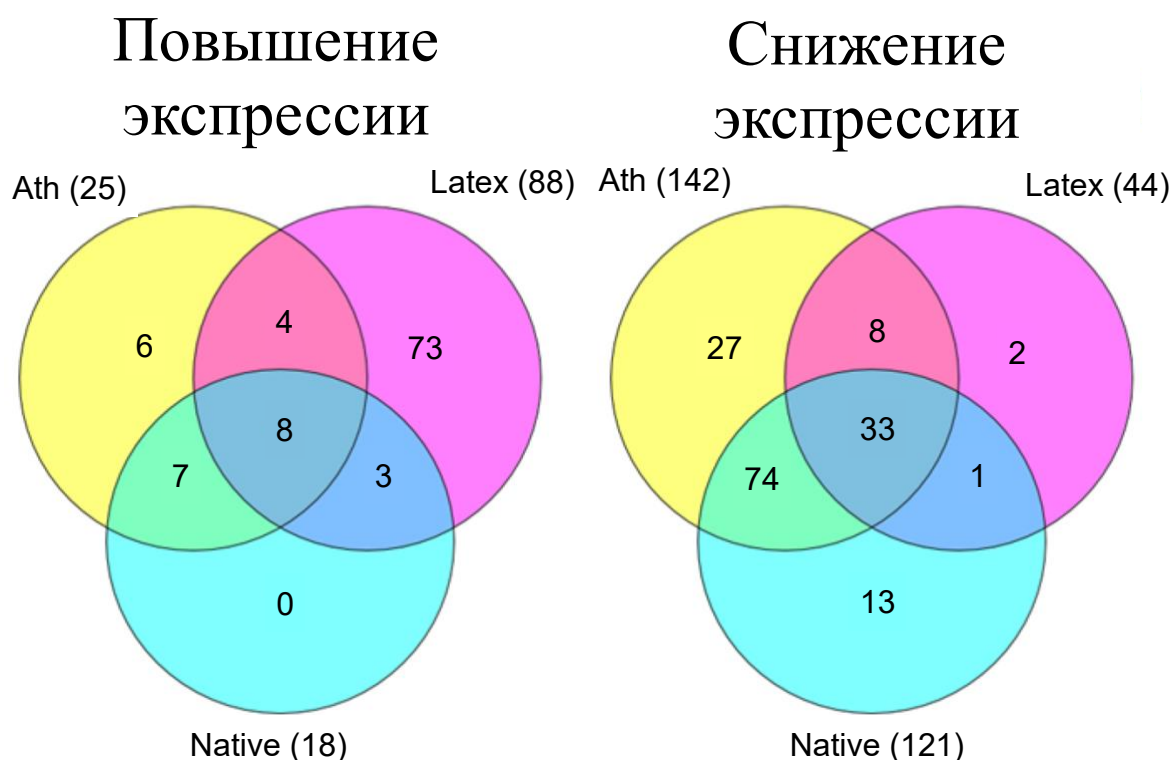


Рисунок 9. Диаграмма Венна (перекрывающиеся круги, демонстрирующие сходство, различия и связи между сигнальными путями) для сигнальных путей. Native, сигнальные пути, выявленные при инкубации культуры макрофагов с нативными ЛНП. Ath, сигнальные пути, выявленные при инкубации культуры макрофагов с естественными атерогенными ЛНП, выделенными из крови пациентов с атеросклерозом. Latex, сигнальные пути, выявленные при инкубации культуры макрофагов с шариками латекса. Количество выявленных сигнальных путей указано в скобках [Orekhov и др., 2020b].

Таблица 8. Сигнальные пути, регулируемые при инкубации макрофагов с шариками латекса и модифицированными ЛНП [Orekhov и др., 2020b].

Модификация	Регуляция экспрессии	Сигнальный путь
1	2	3
Атерогенные ЛНП	повышение	neurotrophic signaling TLR2-mediated signaling TLR9 pathway VEGF-A pathway
	понижение	Aurora-B cell cycle regulation Cdc20 deubiquitination Cdc20 ubiquitination cyclinB1 ubiquitination → anaphase onset Fzr1 → cyclin B1 degradation Metaphase to Anaphase transition securin degradation Usp44 → Cdc20
Десиалированные ЛНП	повышение	Apo2L pathway Fas pathway insulin → ERK neurotrophic signaling TLR9 pathway
	понижение	Aurora-B cell cycle regulation Cdc20 deubiquitination Cdc20 ubiquitination cyclinB1 ubiquitination → anaphase onset Fzr1 → cyclin B1 degradation Metaphase to Anaphase transition securin degradation Usp44 → Cdc20

1	2	3
Ацетилированные ЛНП	Повышение	alpha IIb beta3 —> Rac1 alpha IIb beta3 pathway angiotensin II —> DAG, CaMKII Aurora-A activation, substrates, and degradation Aurora-A cell cycle regulation B-cell antigen receptor pathway BCR —> ERK BDNF —trkB—> MAPK cascade beta-glucan —> AKT-1 Fas pathway G-alpha-q—> arachidonic acid, ERK insulin —> ERK insulin pathway insulin —Shc—> MAPK cascade KSR sca_old complex neurotensin pathway neurotrophic signaling p38 pathway p53 pathway alpha IIb beta3 —> Rac1 PDGF A —> ERK PDGF B—> ERK PKC —> ERK1, ERK2 POSH —> JNK1, JNK2 PRL —Src, FAK1—> ERK RANKL —> p38 RANKL pathway

1	2	3
		Tiam1 → p38alpha TLR2 — Rac1 → AKT TLR2-mediated signaling TLR3 pathway TLR9 pathway tuberin pathway VEGF-A pathway
Окисленные ЛНП	понижение	Aurora-B cell cycle regulation
	повышение	AR pathway Fas pathway HIF-1alpha pathway IRAK-1 — MKK3 → TNF p38 pathway p53 pathway PKC → ERK1, ERK2 RANKL → p38 RANKL pathway TLR2-mediated signaling TLR3 pathway TLR9 pathway
	понижение	-

Сигнальные пути, измененные однонаправленно в случае всех четырех типов модификаций, отмечены зеленым; сигнальные пути, совпадающие в случае трёх типов модификаций отмечены голубым; сигнальные пути, одинаковые для двух типов модификаций, отмечены желтым.

3.10. Изучение роли ключевых генов в оттоке холестерина на культуре макрофагов при помощи нокдауна этих генов

В нашей лаборатории был проведён поиск мастер-генов, участвующих в механизмах оттока холестерина из клетки при взаимодействии ЛВП с макрофагами, для этого было проведено сравнение дифференциально экспрессирующихся генов из макрофагов, инкубированных с добавлением ЛВП с макрофагами без добавления ЛВП, а также с макрофагами с добавлением нативных, ацетилированных или окисленных ЛНП (по 3 образца в каждой группе). В результате биоинформационного анализа, выполненного моими коллегами было идентифицировано три мастер-регулятора оттока холестерина из клеток: *FADS1* (fatty acid desaturase 1, десатураза жирных кислот), *INSIG1* (insulin induced gene 1, ген индуцируемый инсулином) и *LDLR* (low-density lipoprotein receptor, рецептор ЛНП) [Orekhov и др., 2018b].

Задачей моей диссертации являлось определить роль предполагаемых мастер-регуляторов в оттоке холестерина.

При помощи нокдауна мастер-генов *LDLR*, *INSIG1*, *FADS1* определяли способность этих генов влиять на отток холестерина из клеток макрофагов THP-1. Для нокдауна генов использовали коммерческие siRNA (Santa Cruz, США), для которых показано отсутствие взаимодействия с нецелевыми генами; эффективность нокдауна определяли при помощи ПЦР-РВ (Рисунок 10). Способность ЛВП вызывать отток холестерина оценивали после нокдауна генов *LDLR*, *INSIG1*, *FADS1* в клетках THP-1 (Рисунок 11). Было проведено по 3 эксперимента для каждого гена с 3 повторами на каждый тип воздействия. В результате было показано, что нокдаун гена *FADS1* не приводит к изменению оттока холестерина (Рисунок 11). Тогда как нокдаун генов *LDLR* и *INSIG1* приводит к уменьшению оттока холестерина. С целью установления возможного механизма влияния нокдауна на отток холестерина из клеток, мы провели серию из 3 экспериментов, в которых оценили уровень экспрессии генов *ABCA1*, *ABCG1* и *SCARB1* (Рисунок 12). Было установлено, что у генов *ABCA1* и *ABCG1* снижена

экспрессия в клетках с нокдауном генов *LDLR* и *INSIG1*, но не в клетках с нокдауном по гену *FADS1*. При этом экспрессия гена *SCARB1* осталась без изменений во всех трёх типах клеток с нокдауном [Orekhov и др., 2018b].

Исходя из проведенных экспериментов можно заключить, что выявленные биоинформационным методом мастер-регуляторы (*LDLR* и *INSIG1*) действительно играют роль в регулировании оттока холестерина из клеток. Вероятнее всего их эффект проявляется через регуляцию механизмов оттока холестерина при помощи транспортеров *ABCA1* и *ABCG1*.

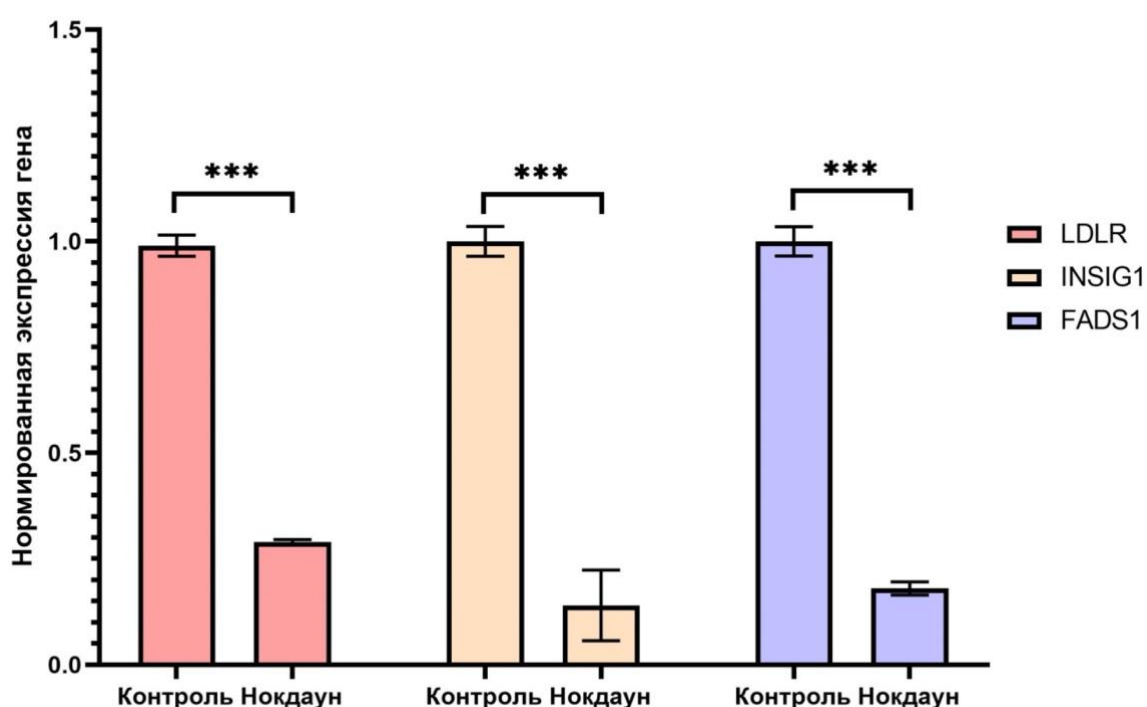


Рисунок 10. Эффективность нокдауна генов *LDLR*, *INSIG1*, *FADS1* [Orekhov и др., 2018b].

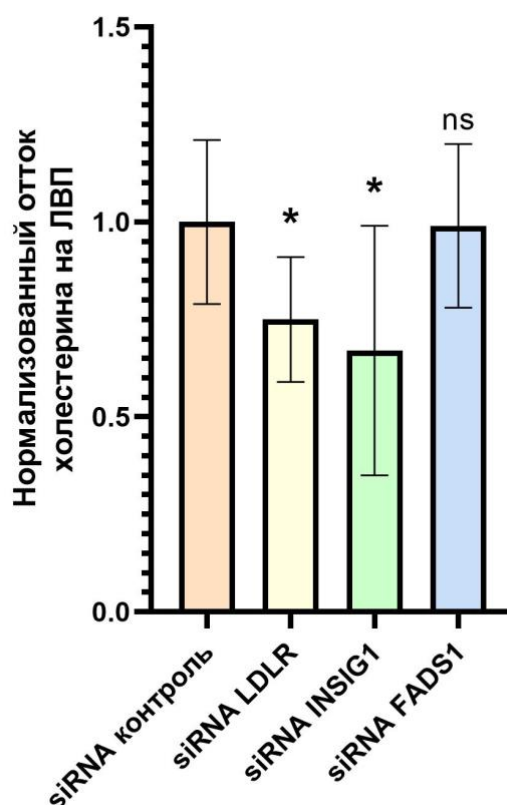


Рисунок 11. Изменение оттока холестерина при нокдауне генов [Orekhov и др., 2018b].

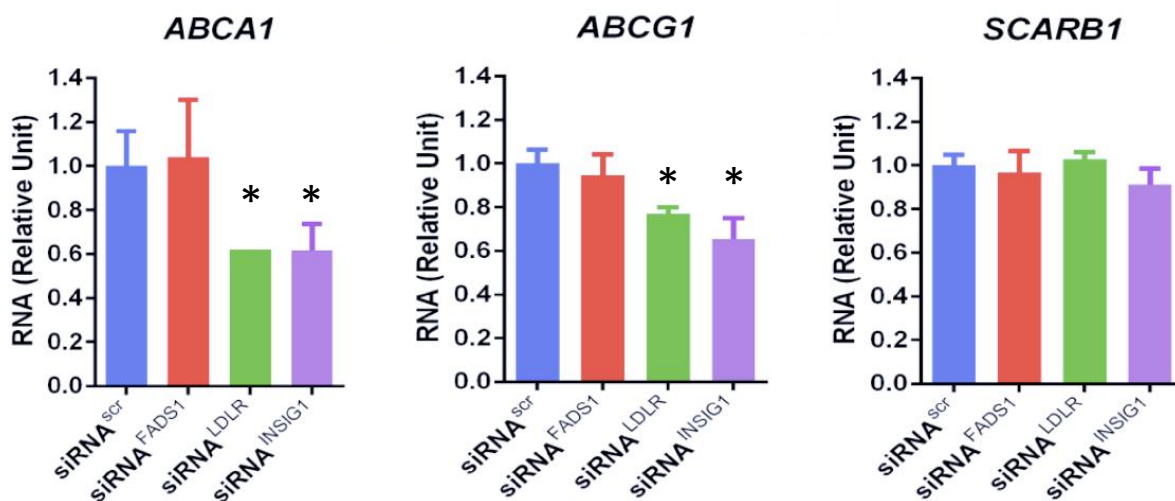


Рисунок 12. Уровень экспрессии генов ABCA1, ABCG1, SCARB1 при нокдауне генов FADS1, LDLR или INSIG1 в клетках THP-1 [Orekhov и др., 2018b].

3.11 Изучение роли ключевых генов в накоплении холестерина на культуре первичных макрофагов при помощи нокдауна этих генов

В нашей лаборатории был проведён поиск мастер-генов, участвующих в механизмах накопления холестерина макрофагами при взаимодействии с модифицированными ЛНП. Для этого было проведено секвенирование РНК из 18 образцов первичной культуры человеческих макрофагов (3 повторности в 6 группах: с добавлением ЛВП, нативных, десиалированных, ацетилованных, окисленных, естественных ЛНП и без воздействия). В результате биоинформационного анализа было выявлено 10 мастер-генов: *IL7* (interleukin 7), *IL7R* (interleukin 7 receptor), *IL15* (interleukin 15), *ANXA1* (annexin A1), *CXCL8* (C-X-C motif chemokine ligand 8), *DUSP1* (dual specificity phosphatase 1), *EIF2AK3* (eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 3), *F2RL1* (F2R like trypsin receptor 1), *TIGIT* (T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) domains) и *TSPYL2* (testis-specific protein Y-encoded-like protein 2). Экспрессия этих мастер-генов в макрофагах, накапливающих холестерин, отличалась от макрофагов без накопления холестерина во всех экспериментах [Orekhov и др., 2018a].

При помощи нокдауна выявленных мастер-генов *IL7*, *IL7R*, *IL15*, *ANXA1*, *CXCL8*, *DUSP1*, *EIF2AK3*, *F2RL1*, *TIGIT* и *TSPYL2* определяли способность этих генов влиять на отток холестерина из клеток первичных моноцитов-макрофагов. Для нокдауна генов использовали коммерческие siRNA (Santa Cruz, США), для которых показано отсутствие взаимодействия с нецелевыми генами; эффективность нокдауна определяли при помощи ПЦР-РВ (Рисунок 13 и 14). Для каждого гена проводили от 3 до 6 экспериментов по 5 повторов для каждого типа воздействия (точное количество экспериментов указано в таблицах 9-18).

При нокдауне генов *PERK*, *IL15* и *ANXA1* (Таблицы 9-11) макрофаги не накапливают холестерин при инкубации с атерогенными ЛНП. Более того, при нокдауне гена *ANXA1* (Таблица 10) содержание холестерина в макрофагах,

инкубированных с атерогенными ЛНП, достоверно ниже, чем в контроле без добавления атерогенных ЛНП [Orekhov и др., 2020a]. Наблюдалось увеличение накопления холестерина в макрофагах с нокдауном по генам IL7 и IL7R (Таблицы 14 и 15) при инкубации с атерогенными ЛНП. Нокдаун генов F2RL1, TSPYL2 (Таблицы 12 и 13) [Orekhov и др., 2020a], DUSP1, TIGIT и CXCL8 (Таблицы 16-18) не приводил к значимому изменению в уровне накопления холестерина при инкубации клеток с атерогенными ЛНП.

На основе данных о возможной роли мастер-регуляторов в процессах накопления холестерина нами был получен патент на потенциальное использование подавления экспрессии этих генов как возможное средство для лечения атеросклероза [Карагодин и др., 2019].

Полученные данные позволяют предположить, что мастер-регуляторы PERK, IL15, IL7, IL7R и ANXA1 могут играть определенную роль в регуляции накопления холестерина макрофагами.

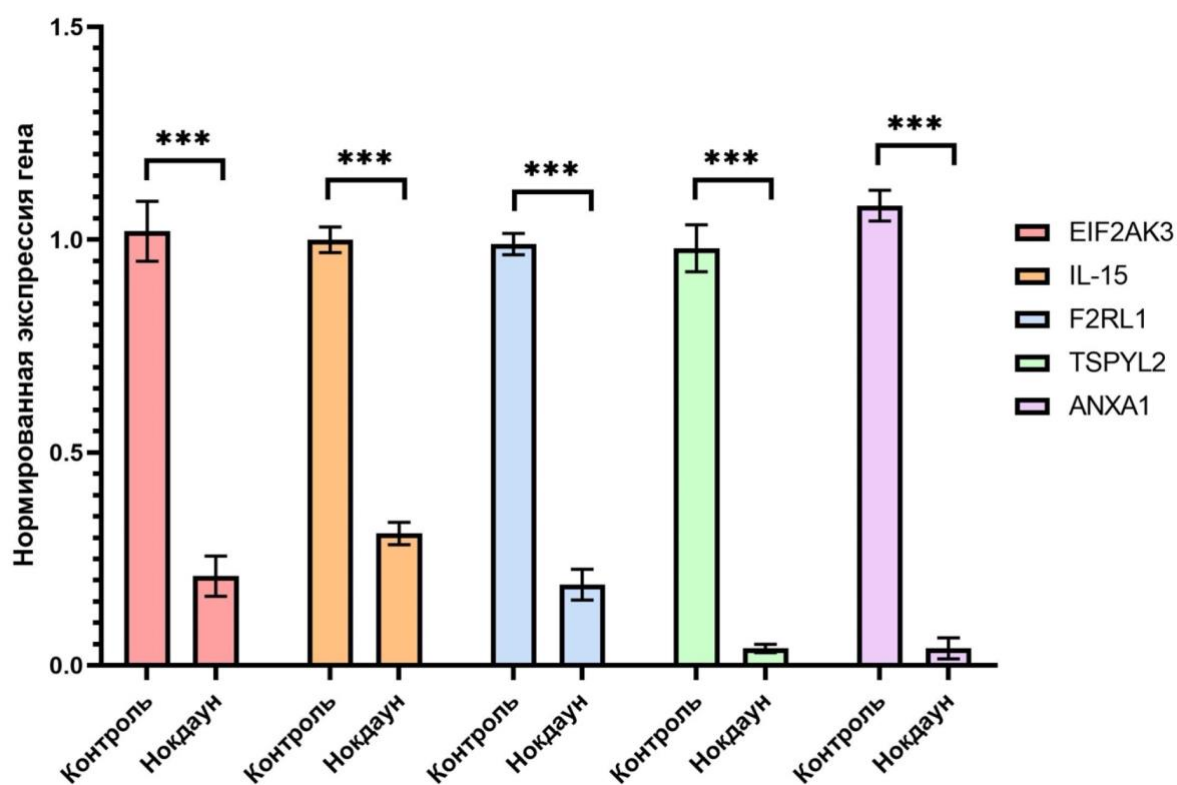


Рисунок 13. Эффективность нокдауна генов IL-15, EIF2AK3 (PERK), F2RL1, TSPYL2, ANXA1 [Orekhov и др., 2020a].

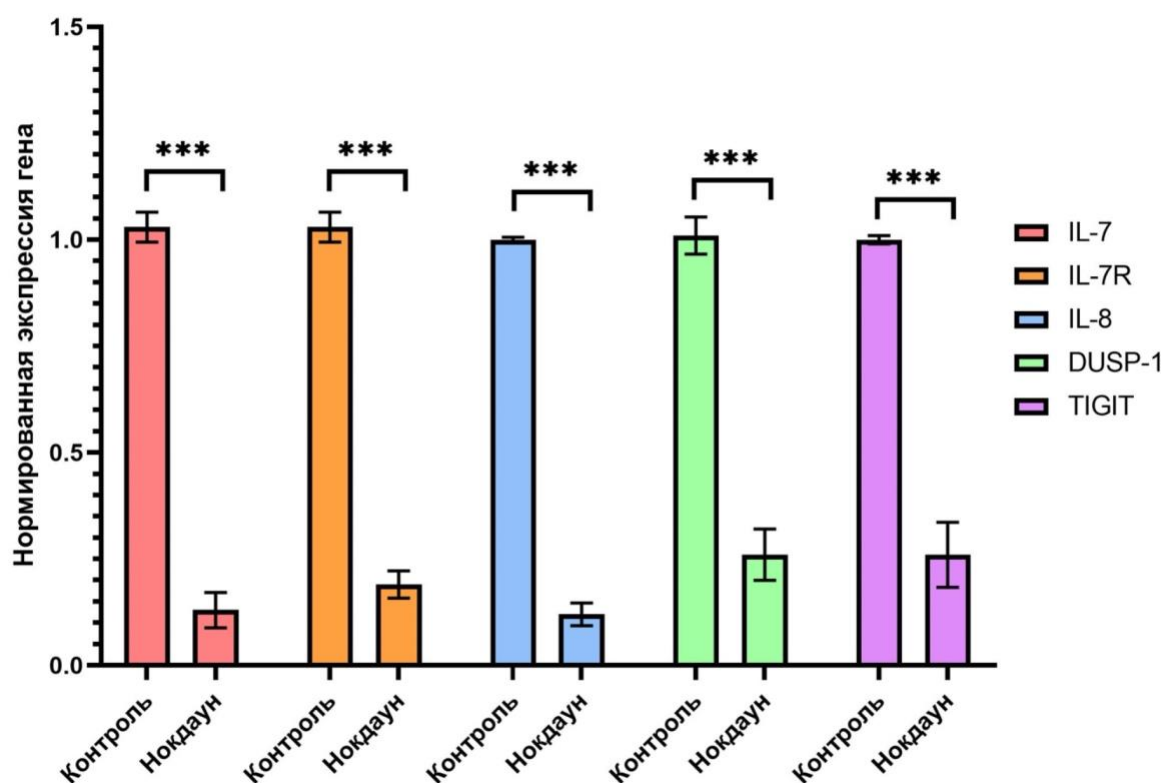


Рисунок 14. Эффективность нокдауна генов IL-7, IL-7R, IL-8, DUSP-1, TIGIT.

Таблица 9. Сводные данные по накоплению холестерина при нокдауне по PERK (EIF2AK3) [Orekhov и др., 2020b].

Инкубация с ЛНП и тип нокдауна	Количество экспериментов	Относительное содержание холестерина в клетках (SD)	P (t-test)	P (M-W)
Контроль	6	1,00±0,06 (0,35)	-	-
ЛНП + None	6	1,36±0,09 (0,58)	0,002	0,001
ЛНП + PERK ⁽⁻⁾	6	0,98±0,07 (0,43)	0,86 NS 0,002 vs ЛНП	0,53 NS 0,007 vs ЛНП

Таблица 10. Сводные данные по накоплению холестерина при нокдауне по ANXA1.

Инкубация с ЛНП и тип нокдауна	Количество экспериментов	Относительное содержание холестерина в клетках (SD)	P (t-test)	P (M-W)
Контроль	3	1,00±0,05 (0,17)	-	-
ЛНП + None	3	1,59±0,13 (0,45)	<0,001	0,001
ЛНП + ANXA1 ⁽⁻⁾	3	0,65±0,07 (0,34)	0,002 <0,001 vs ЛНП	0,002 <0,001 vs ЛНП

Таблица 11. Сводные данные по накоплению холестерина при нокдауне по IL15 [Orekhov и др., 2020b].

Инкубация с ЛНП и тип нокдауна	Количество экспериментов	Относительное содержание холестерина в клетках (SD)	P (t-test)	P (M-W)
Контроль	4	1,00±0,10 (0,58)	-	-
ЛНП + None	4	1,29±0,07 (0,19)	0,038	0,038
ЛНП + IL15 ⁽⁻⁾	4	0,89±0,09 (0,49)	0,35 NS 0,031 vs ЛНП	0,35 NS 0,011 vs ЛНП

Таблица 12. Сводные данные по накоплению холестерина при нокдауне по F2RL1 [Orekhov и др., 2020b].

Инкубация с ЛНП и тип нокдауна	Количество экспериментов	Относительное содержание холестерина в клетках (SD)	P (t-test)	P (M-W)
Контроль	4	1,00±0,07 (0,37)	-	-
ЛНП + None	4	1,29±0,09 (0,46)	0,014	0,016
ЛНП + F2RL1 ⁽⁻⁾	4	1,37±0,13 (0,71)	0,018 0,64 vs ЛНП NS	0,019 0,52 vs ЛНП NS

Таблица 13. Сводные данные по накоплению холестерина при нокдауне по TSPYL2.

Инкубация с ЛНП и тип нокдауна	Количество экспериментов	Относительное содержание холестерина в клетках (SD)	P (t-test)	P (M-W)
Контроль	4	1,00±0,07 (0,39)	-	-
ЛНП + None	4	1,44±0,11 (0,61)	0,001	0,003
ЛНП + TSPYL2 ⁽⁻⁾	4	1,35±0,15 (0,84)	0,035 0,65 vs ЛНП NS	0,095 NS 0,25 vs ЛНП NS

Таблица 14. Сводные данные по накоплению холестерина при нокдауне по гену IL7.

Инкубация с ЛНП и тип нокдауна	Количество экспериментов	Относительное содержание холестерина в клетках (SD)	P (t-test)	P (M-W)
Контроль	3	1±0.05 (0.18)		
+ЛНП	3	2.93±0.38 (1.32)	<0.001	<0.001
ЛНП+IL7 ⁽⁻⁾	3	5±0.85 (2.96)	<0.001 0.043 vs ЛНП	<0.001 0.015 vs ЛНП

Таблица 15. Сводные данные по накоплению холестерина при нокдауне по гену IL7R.

Инкубация с ЛНП и тип нокдауна	Количество экспериментов	Относительное содержание холестерина в клетках (SD)	P (t-test)	P (M-W)
Контроль	3	1±0.05 (0.18)		
+ЛНП	3	2.93±0.38 (1.32)	<0.001	<0.001
ЛНП+IL7R ⁽⁻⁾	3	5.48±0.84 (2.91)	<0.001 0.014 vs ЛНП	<0.001 0.01 vs ЛНП

Таблица 16. Сводные данные по накоплению холестерина при нокдауне по гену IL8.

Инкубация с ЛНП и тип нокдауна	Количество экспериментов	Относительное содержание холестерина в клетках (SD)	P (t-test)	P (M-W)
Контроль	3	1±0.05 (0.18)		
+ЛНП	3	2.93±0.38 (1.32)	<0.001	<0.001
ЛНП+IL8 ⁽⁻⁾	3	4.58±0.72 (2.51)	<0.001 0.059 vs ЛНП NS	<0.001 0.13 NS vs ЛНП

Таблица 17. Сводные данные по накоплению холестерина при нокдауне по гену TIGIT.

Инкубация с ЛНП и тип нокдауна	Количество экспериментов	Относительное содержание холестерина в клетках (SD)	P (t-test)	P (M-W)
Контроль	3	1±0.05 (0.18)		
+ЛНП	3	2.93±0.38 (1.32)	<0.001	<0.001
ЛНП+TIGIT ⁽⁻⁾	3	4.65±0.75 (2.61)	<0.001 0.058 NS vs ЛНП	<0.001 0.052 NS vs ЛНП

Таблица 18. Сводные данные по накоплению холестерина при нокдауне по гену DUSP1.

Инкубация с ЛНП и тип нокдауна	Количество экспериментов	Относительное содержание холестерина в клетках (SD)	P (t-test)	P (M-W)
Контроль	3	1±0.05 (0.18)		
+ЛНП	3	2.93±0.38 (1.32)	<0.001	<0.001
ЛНП+DUSP1 ⁽⁻⁾	3	3.55±0.77 (2.66)	<0.001 0.48 NS vs ЛНП	<0.001 0.98 NS vs ЛНП

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате характеристики N-гликозилирования нативных человеческих ЛВП и ЛНП с использованием методов HILIC-UHPLC-FLD и времяпролётной масс-спектрометрии с лазерной ионизацией и десорбцией из жидкой матрицы было установлено, что ЛВП и ЛНП являются высокосиалированными частицами в соответствии с более ранними исследованиями [Huang и др., 2014; Lindbohm, Gylling, Miettinen, 2000]. N-гликом обеих частиц обладает высоким уровнем разнообразия, заключающийся в наличии высокоманнозных и гибридных комплексов. Мы показали, что в частицах ЛВП самым распространённым N-гликаном был двухантенный гликан с одним или двумя остатками сиаловой кислоты. В этом отношении частицы ЛВП сходны с другими гликопротеидами плазмы крови человека [Ruhaak и др., 2008]. Мы установили, что A2G2S1 является основным гликаном ЛВП. Наши данные разнятся с данными другого исследования гликанового состава ЛВП, по результатам которого основным гликаном ЛВП был двухантенный гликан A2G2S2, содержащий две сиаловые кислоты [Huang и др., 2014]. Эту разницу можно объяснить различиями в методологии выделения ЛВП, а также в отличиях аналитических и/или экспериментальных условий [Vaisar, 2012].

В частицах ЛНП, так же, как и в ЛВП, самым распространённым N-гликаном был A2G2S1, но при этом частицы ЛНП были обогащены высокоманнозными структурами. Известно, что основной белок ЛНП – апоВ несет на себе большое количество высокоманнозных N-гликанов [Vauhkonen и др., 1985]. После обработки нейраминидазой соотношение отдельных гликанов заметно изменилась в результате удаления с них сиаловой кислоты. Сиаловые кислоты – это O- и N-ацил производные нейраминовой кислоты, которые в основном встречаются на концах N- и O-гликанов [Varki, 2008]. Сиаловые кислоты увеличивают электроотрицательный заряд гликопротеидов [Schauer, 2009], а также обладают

целым спектром биологических активностей, действуя как лиганды распознающих их рецепторов [Lehmann, Tiralongo, Tiralongo, 2006], маскируя галактозные остатки на концах олигосахаридов [Schauer, 2009], и выступая регулятором удержания белков в кровотоке [Weigel, 2002]. Сиаловая кислота может служить биомаркером сердечно-сосудистых заболеваний, так как в крови больных диабетом второго типа и атеросклерозом наблюдается увеличенная концентрация свободных сиаловых кислот [Lindberg и др., 1991; Yokoyama и др., 1995]. Более того, повышенное сиалирование белков плазмы крови может указывать на наличие диабета второго типа даже до манифестации самого заболевания [Keser и др., 2017].

Нами было установлено, что удаление остатков сиаловой кислоты с нативных ЛВП в значительной степени снижает их способность обеспечивать отток клеточного холестерина из макрофагов ТНР-1. Особая роль сиалирования в способности ЛВП вызывать отток холестерина хорошо проявилась в экспериментах с удалением других гликановых фрагментов из частиц ЛВП. Так, удаление галактозного остатка после обработки нейраминидазой не привело к дальнейшему снижению способности вызывать отток холестерина, а полное удаление гликанов с помощью PNGазы F приводит к такому же снижению оттока холестерина, как и при десиалировании нативных частиц ЛВП. Отток холестерина из клеток может осуществляться за счет пассивного транспорта через градиент посредством рецептора SR-BI, кодируемого геном SCARB1, а также активного транспорта, регулируемого мембранными липидными транслоказами, которые представлены ABCA1 и ABCG1 транспортерами [Phillips, 2014]. При нокдауне генов SCARB1 и ABCA1 не было обнаружено разницы в способности вызывать отток холестерина у нативных и десиалированных частиц ЛВП. На основе этих данных можно сделать предположение, что остатки сиаловых кислот способствуют связыванию ЛВП с рецепторами SR-BI и ABCA1 [Harada и др., 1998]. На сегодняшний день нет сведений о важности сиалирования для связывания ЛВП с рецепторами макрофагов. При этом можно предположить, что гликозилирование влияет на связывание частиц ЛВП со скавенджер рецепторами, так как отрицательно заряженные окисленные и ацетилированные ЛВП распознаются

скавенджер рецепторами на поверхности крысиных гепатоцитов и мышинных перитонеальных макрофагов [MURAKAMI и др., 1987; Ville La и др., 1994]. Различия в способности нативных и сialiрированных ЛВП вызывать отток холестерина из клетки с большей вероятностью обусловлена ABCA1 транспортером, чем ABCG1. Однако, нам удалось достигнуть лишь 80% снижения уровня экспрессии генов SCARB1 и ABCA1 относительно экспрессии этих генов в клетках без нокдауна, поэтому мы не можем исключить вероятность остаточной способности к оттоку холестерина. В связи с этим наши результаты мы интерпретируем с определенной осторожностью.

Десиалирование ЛВП также снижает скорость этерификации холестерина, опосредованную ЛХАТ, которая значительно N-гликозилирована [Dobiasova, 1983]. В полном соответствии с этими данными активность ЛХАТ была значительно снижена из-за десиалирования ЛВП в нашей работе. Уменьшение отрицательного заряда ЛВП в результате десиалирования [Marmillot и др., 1999] может влиять на связывание липаз с ЛВП, так как заряд ЛВП оказывает специфическое влияние на липолиз [Boucher, Nguyen, Sparks, 2007]. В работах, посвященных N- и O-гликозилированию человеческого апоА-I [Cubedo, Padró, Badimon, 2014; Májek и др., 2015], сообщалось, что десиалирование может изменять взаимодействия апоА-I с ABCA1. Вопрос о гликозилировании апоА-I остается дискуссионными, так как гликаны, ассоциированные с апоА-I, не были обнаружены в нескольких исследованиях с использованием жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией [Kailemia и др., 2018; Krishnan и др., 2015; Krishnan и др., 2017]. В нашей работе наблюдалось небольшое уменьшение среднего размера ЛВП после десиалирования. Принимая во внимание тот факт, что ABCA1 предпочтительно опосредует отток холестерина к более маленьким частицам ЛВП [Du и др., 2015], можно было ожидать увеличения оттока холестерина к десиалированным ЛВП, но этого по факту не происходит. Следовательно, другие функциональные изменения, такие как заряд частиц, играют более важную роль в атерогенных свойствах ЛВП.

На основе этих данных мы предположили, что N-гликом белков ЛВП, включая фетуин А, альфа-1-антитрипсин, ангиотензиноген [Kailemia и др., 2018; Krishnan и др., 2015; Krishnan и др., 2017], ЛХАТ [Dobiasova, 1983] и, возможно, апоА-I [Cubedo, Padró, Badimon, 2014; Májek и др., 2015], может изменяться под действием нейраминидазы и эти изменения влияют на заряд и ЛХАТ активность ЛВП, одновременно приводя к уменьшению оттока холестерина через ABCA1 транспортер на ЛВП и нивелируя положительный эффект от уменьшения липопротеидной частицы.

Полное удаление сиаловых кислот из ЛНП приводит к нарушению их метаболизма в контексте атеросклероза. ЛНП, выделенные из крови больных атеросклерозом, являются атерогенными, так как они способствуют накоплению эфиров холестерина в макрофагах в экспериментах *in vitro*, тогда как ЛНП из крови здоровых людей такого эффекта не вызывают [Chazov и др., 1986; Сухоруков, Карагодин, Орехов, 2016]. ЛНП, которые способствовали накоплению липидов, то есть были атерогенными, содержали меньше сиаловой кислоты, чем ЛНП из крови здоровых людей [Orekhov и др., 1989]. В соответствии с этими данными и данными других исследований [Harada и др., 1998] мы также наблюдали, что десиалированные ЛНП вызывали внутриклеточное накопление эфиров холестерина. В десиалированных ЛНП галактозные остатки в олигосахаридной цепи, предшествующие остаткам сиаловой кислоты в нативных ЛНП, становятся концевыми и экспонированными наружу. В макрофагах десиалированные ЛНП могут быть поглощены через галактоз-специфичные лектиновые рецепторы [Grewal и др., 1996]. Примечательно, что липополисахариды увеличивают экспрессию галактоза-специфичных лектинов в макрофагах, что, в свою очередь, приводит к увеличению накопления липидов при инкубации макрофагов с десиалированными ЛНП [Bartlett и др., 2000]. Кроме того, десиалирование липопротеидов может способствовать более быстрому переносу эфиров холестерина, опосредованному транспортным белком эфиров холестерина, от ЛВП на ЛНП, тем самым увеличивая содержание холестерина в ЛНП [Harada и др., 1998]. Известно, что различные способы *in vitro* модификации частиц ЛНП, такие

как ацетилирование, метилирование и окисление, приводят к образованию электроотрицательных ЛНП малой плотности, которые вызывают накопление внутриклеточных липидов [Liu, Atkinson, 2011]. Более того, электроотрицательные ЛНП могут формировать агрегаты [Sánchez-Quesada, Villegas, Ordóñez-Llanos, 2012], которые не взаимодействуют ни со скавенджер рецепторами, включая CD36 и SR-A, ни с рецептором ЛНП [Boyanovsky, Westhuyzen van der, Webb, 2005]. По последним данным, агрегированные ЛНП запускают сигнальный путь рецептора TLR4, что приводит к формированию лизосомального синапса (внеклеточный литический компартмент), катаболизму агрегированных ЛНП и образованию пенистых клеток [Singh и др., 2020]. В отличие от десалирированных ЛНП, окисленные ЛНП, как известно, взаимодействуют с клетками через скавенджер рецепторы CD36, SR-AI, SR-AII и LOX [Moore, Freeman, 2006]. Десалирирование является самым первым событием в ряду атерогенных модификаций ЛНП, включающих в том числе и окислительные модификации частиц ЛНП, следовательно, *in vivo* десалирирование делает ЛНП атерогенными и способствует образованию пенистых клеток [Orekhov и др., 2014].

Суммируя вышесказанное, на основе нашего исследования можно заключить, что N-гликом липопропротеидов в человеческой плазме крови отличаются большим разнообразием, определяющим биологические свойства ЛНП и ЛВП. При этом салирирование, по всей видимости, является основным фактором, определяющим будут ли ЛНП и ЛВП атерогенными или нет. Мы считаем, что определение гликомного профиля липопропротеидов может быть использован в клинической практике для обнаружения десалирированных ЛНП и ЛВП, которые могут служить биомаркерами сердечно-сосудистых заболеваний.

В последние годы становится популярным метод транскриптомного анализа при изучении различных болезней на клеточном уровне [Stark, Grzelak, Hadfield, 2019]. В том числе с помощью транскриптомного анализа можно изучать дифференциально экспрессирующиеся гены различных клеточных популяций, находящихся в атеросклеротическом поражении [Fernandez и др., 2019; Kim и др., 2018; Winkels и др., 2018]. Более того этот метод использовали для изучения

активации генов при взаимодействии атерогенных модифицированных ЛНП с клетками интимы сосуда [Damián-Zamacoa и др., 2016; Ho, Fraser, 2016]. С целью установления внутриклеточных механизмов, участвующих в накоплении внутриклеточных липидов, приводящем к образованию пенистых клеток, нашей научной группой был осуществлен транскриптомный анализ макрофагов, взаимодействующих с ЛВП, а также с нативными и модифицированными (ацетиленованными, окисленными, дезаилированными, выделенными из крови больных атеросклерозом) ЛНП и шариками латекса. В результате транскриптомного анализа были обнаружены сотни генов с измененной активностью. Далее с помощью биоинформатического анализа транскриптома макрофагов нами были определены 3 (INSIG1, FADS1 и LDLR) ключевых мастер регулятора, активирующихся при взаимодействии макрофагов с ЛВП, а также 10 ключевых мастер регуляторов (IL15, IL7, IL7R, EIF2AK3, CXCL8, TIGIT, F2RL1, TSPYL2, ANXA1, DUSP1), активирующихся при инкубации макрофагов с модифицированными ЛНП. Кроме того, мы обнаружили 12 сигнальных путей, регулируемых сходным образом при взаимодействии макрофагов с шариками латекса и естественными атерогенными ЛНП. При этом профиль активации сигнальных путей в макрофагах при взаимодействии с естественными атерогенными ЛНП, то есть с ммЛНП из крови больных атеросклерозом, наилучшим образом совпадал с активацией сигнальных путей при взаимодействии с дезаилированными ЛНП. При этом, окисленные и ацетиленованные ЛНП, широко используемые при изучении атеросклероза *in vitro* [Jones, Reagan, Willingham, 2000; Poznyak и др., 2021; Wang и др., 2007], имеют гораздо меньше общего в активации сигнальных путей с естественными атерогенными ЛНП. Соответственно, можно сделать вывод, что самые популярные формы модифицированных ЛНП являются, как минимум, не самой удачной моделью для изучения регуляции генов.

В результате взаимодействия макрофагов с ЛВП происходит уменьшение содержания клеточного холестерина, что вызывает повышенную экспрессию выявленных нами генов (INSIG1, FADS1 и LDLR) вероятнее всего через

сигнальный путь SREBP-SCAP [Brown, Goldstein, 1999; Griffiths и др., 2013; Loewen, Levine, 2002]. Так как экспрессия этих генов была увеличена в результате взаимодействия макрофагов ЛВП, то с большой вероятностью можно предположить, что их активность направлена на восполнение внутриклеточного холестерина, в том числе за счет подавления оттока холестерина. Однако, полученные нами данные оказались контринтуитивными, так как ген INSIG1 совместно с геном INSIG2 блокируют синтез холестерина за счет удержания SREBP в эндоплазматическом ретикулуме [Sever и др., 2003; Yang и др., 2002]. Таким образом, согласно данным *in vitro* и *in vivo* экспериментов [Carobbio и др., 2013] нокдаун гена INSIG1 должен приводить к накоплению внутриклеточного холестерина и компенсаторному увеличению оттоку холестерина. В таком случае наблюдаемое в нашем эксперименте подавление оттока холестерина должно будет приводить к усилению накопления холестерина.

Хорошо известно, что ЛНП рецептор, кодируемый геном LDLR, регулирует внутриклеточный холестерин за счёт поглощения из плазмы холестерина в составе ЛНП [Zhang и др., 2016]. В результате нокдауна гена LDLR ожидается снижение содержание внутриклеточного холестерина и уменьшение оттока холестерина. Однако, в нашем эксперименте мы использовали модифицированные ЛНП, которые не взаимодействуют с ЛНП рецептором. Соответственно, ЛНП рецептор не мог существенно повлиять на содержание внутриклеточного холестерина. Мы выявили, что снижение оттока холестерина в наших экспериментах связано с подавлением транспортеров холестерина ABCA1, ABCG1, но не SR-BI. По литературным данным известно, что подавление экспрессии INSIG1 и LDLR может изменять содержание оксистеринов или предшественников холестерина, в свою очередь вызывая экспрессию LXR, который является основным регулятором транскрипции ABCA1 и ABCG1, но не SCARB1 [Lee, Tontonoz, 2015]. Другим вероятным механизмом подавления оттока холестерина при нокдауне генов LDLR и INSIG1 может быть активация стресса ЭПР. Есть данные по связи дисфункции ЛНП рецептора и INSIG1 со стрессом ЭПР [Hu и др., 2020; Sørensen и др., 2006; Tekavec и др., 2020]. Однако, в случае стресса ЭПР происходит подавления всех

участников оттока холестерина [Sun и др., 2018], включая SR-B1 [Eberhart и др., 2016], что мы не наблюдали в наших экспериментах. Исходя из противоречивых данных, мы можем заключить, что этот интересный и сложный механизм подавления оттока холестерина требует дополнительного и более тщательного изучения.

Предыдущие исследования транскриптома макрофагов при их взаимодействии с ЛВП были в основной своей массе сосредоточены на активации провоспалительных генов [Lin и др., 2016; Vorst van der и др., 2017]. В нашем же исследовании мы впервые продемонстрировали, что ЛВП приводили к стимуляции экспрессии генов, регулирующих метаболизм холестерина посредством влияния на отток холестерина из клеток. Наши данные являются противоречивыми, так как классической причиной активации генов INSIG1 и LDLR является необходимость восполнить внутриклеточный холестерин, потерянный в результате опосредованного ЛВП оттока холестерина. Расширение результатов, представленных в нашем исследовании, поспособствует улучшению понимания антиатерогенной активности ЛВП и поможет определить новые терапевтические средства для борьбы с атеросклерозом.

При взаимодействии макрофагов с модифицированными ЛНП нами были идентифицированы 10 ключевых мастер регуляторов (IL15, IL7, IL7R, EIF2AK3, CXCL8, TIGIT, F2RL1, TSPYL2, ANXA1, DUSP1). Большинство этих генов относятся к генам участвующих в провоспалительном или иммунном ответе клеток. Ген EIF2AK3 (PERK) кодирует фактор активации стресса ЭПР PERK, который способствует провоспалительному ответу клетки за счет продукции ИЛ-6 посредством сигнального пути PERK/JAK1/STAT3 [Meares и др., 2014]. ИЛ-7 (ген IL7) и его рецептор (ген IL7R) напрямую связаны с воспалением в атеросклеротическом поражении и в направленной миграции моноцитов в интиму сосуда в месте образования атеросклеротической бляшки [Mihailovic и др., 2019]. ИЛ-15 (ген IL-15) участвует в провоспалительном ответе макрофагов за счет стимуляции продукции ИЛ-1, 6 и 8 [Perera и др., 2012]. ИЛ-8 (ген IL-8) – провоспалительный хемокин, участвующий в развитии атеросклероза [Gencer и др., 2018].

др., 2021]. Аннексин A1 (ген ANXA1) может участвовать в подавлении воспаления, в том числе за счет стимулирования секреции противовоспалительного ИЛ-10 [Han и др., 2020]. Ген TIGIT кодирует иммунный рецептор Т-клеток и натуральных киллеров, который может связываться с рецептором CD155 на поверхности макрофагов и дендритных клеток [Yu и др., 2009]. Слитый белок TIGIT-Fc может направлять дифференцировку макрофагов в сторону противовоспалительного фенотипа M2 за счет активации сигнального пути TIGIT/PVR, который активирует экспрессию ИЛ-10 [Chen и др., 2016]. Рецептор PAR2 (ген F2RL1) напротив способствует активации макрофагов по провоспалительному фенотипу M1 при помощи сигнального пути FOXO1, который способствует повышенной транскрипции генов ИЛ-1, ИЛ-6 и ФНО [Chen и др., 2019]. Фосфатаза, кодируемая геном DUSP1, также обладает противовоспалительной активностью за счет подавления сигнальных путей p38 и JNK киназы MAPK, которое препятствует экспрессии ФНО и ИЛ-6 [Hoppstädter, Ammit, 2019]. Только ген TSPYL2, который кодирует ядерный белок, принадлежащий к плохо изученной группе гистоновых шаперонов [Park, Luger, 2006], не играет никакой роли в иммунном или воспалительном ответе согласно известным научным данным. Таким образом, девять из десяти мастер-регуляторов связаны с иммунным ответом и воспалением. Причем их функции в воспалительном процессе разделились практически поровну: пять генов связаны с провоспалительным и четыре с противовоспалительным ответами клетки. Следовательно, исходя из данных транскриптомного анализа, можно сделать предположение, что в результате взаимодействия с модифицированными ЛНП в клетках активируются как про- так и противовоспалительные механизмы, и от их баланса зависят атерогенные свойства макрофагов. Более того, баланс про- и противовоспалительных цитокинов в атеросклеротической бляшке, вероятнее всего, определяет её стабильность [Fatkhullina, Peshkova, Koltsova, 2016].

Давно известно, что макрофаги в ответ на модифицированные липопротеиды (окисленные и ацетилированные) секретируют провоспалительные цитокины, такие как MCP-1, CXCL2 (MIP-2), CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), ФНО, ИЛ-1

бета, ИЛ-6, ИЛ-8 и ИЛ-18 [Bekkering и др., 2014; Jiang и др., 2012; Miller и др., 2005; Thomas и др., 1994]. Таким образом, согласно общепринятой модели взаимодействие модифицированных ЛНП с макрофагами приводит к образованию пенистых клеток и продукции провоспалительных молекул [Tall, Yvan-Charvet, 2015].

Главной неожиданностью нашего исследования стало то, что ни один из выявленных нами генов не является геном метаболизма холестерина. С целью анализа роли этих генов в метаболизме холестерина мы оценили степень накопления холестерина в макрофагах с нокдауном этих генов в экспериментах с естественными атерогенными ЛНП. Мы показали, что подавление экспрессии генов PERK, IL15 и ANXA1 предотвращает накопление холестерина в макрофагах при их инкубации с атерогенными ЛНП. Более того, подавление гена ANXA1 даже привело к снижению содержания холестерина по сравнению с контрольными клетками. Нами было выдвинуто предположение, что провоспалительные цитокины могут способствовать накоплению внутриклеточных липидов. Наше предположение было подтверждено экспериментально. Мы показали, что ИЛ-6 и ИЛ-15 усиливают накопление внутриклеточного холестерина в макрофагах. Наши данные соответствуют данным других исследований [Orekhov и др., 2021]. ИЛ-6 может как способствовать накоплению холестерина в макрофагах при инкубации с окисленными ЛНП за счет увеличения экспрессии рецептора SR-AI [Reiss, Siegart, Leon De, 2017], так и способствовать оттоку холестерина за счет повышения экспрессии рецептора ABCA1 [Frisdal и др., 2011]. ИЛ-1 бета влияет на накопление липидов за счёт повышенной активации экспрессии рецептора LOX-1 и подавлении экспрессии рецептора ABCA1 [Liu и др., 2020]. ИЛ-32 блокирует отток холестерина из макрофагов за счет подавления сигнального пути PPAR γ -LXR α -ABCA1 [Ху и др., 2017]. ИЛ-34 усиливает экспрессию CD36 через активацию сигнального пути p38 киназы MAPK [Liu и др., 2018]. ИНФ гамма снижает отток холестерина из макрофагов за счёт подавления экспрессии ABCA1 через активацию сигнального пути JAK2/Stat1 [НАО и др., 2009]. ФНО увеличивает экспрессию скавенджер рецепторов SR-A и LOX-1 [Hashizume, Mihara, 2012].

Также известно, что ИЛ-17 способствуют накоплению липидов в макрофагах за счет усиления экспрессии рецептора к окисленным ЛНП LOX-1 [Shiotsugu и др., 2019]. Кроме того, противовоспалительный цитокин ИЛ-10, как и ИЛ-6, обладает разнонаправленным действием на процесс метаболизма холестерина, так как он способствует накоплению липидов за счёт усиления экспрессии скавенджер рецепторов CD36 и SR-A, и усиливает отток холестерина за счёт активации транспортера ABCA1 через сигнальный путь PPAR γ [Han и др., 2009].

Напротив, в случае гена IL7 и гена его рецептора IL7R мы обнаружили, что нокдаун приводит к усилению накопления внутриклеточного холестерина в макрофагах. Разумно предположить, что сам ИЛ-7 может подавлять накопление холестерина в клетках. По нашим неопубликованным данным наблюдается эффект снижения накопления холестерина в макрофагах при инкубации одновременно с атерогенными ЛНП из крови больных атеросклерозом и ИЛ-7, что подтверждает наблюдаемый при нокдауне генов IL7 и IL7R эффект.

С помощью стресса ЭПР можно объяснить влияние цитокинов на процессы накопления внутриклеточных липидов. Трансмембранные белки PERK, ATF6 и IRE1 являются сенсорами несвернутых белков в эндоплазматическом ретикулуме и активаторами реакции несвернутых белков (РНБ), состоящей из трёх независимых сигнальных путей [Ma и др., 2016]. Запуск этих сигнальных путей приводит к остановке синтеза белка в клетке, повторному сворачиванию неправильно свернутых белков и восстановлению гомеостаза. Если стресс ЭПР не заканчивается восстановлением гомеостаза, то это приводит к гибели клетки через апоптоз. Была продемонстрирована роль PERK и IRE1 в образовании пенистых клеток [Yao и др., 2014]. Более того, эти белки являются сенсорами липидов в мембране ЭПР и активируются при избытке холестерина и триглицеридов, поступающих в мембрану ЭПР [Volmer, Ron, 2015]. Известно, что в результате стресса ЭПР, вызванного из-за избытка холестерина внутри клетки в результате поглощения макрофагами атерогенных ЛНП, повышается экспрессия скавенджер рецепторов к ЛНП [Guo и др., 2018], а также снижается экспрессия рецепторов к ЛВП [Eberhart и др., 2016], что способствует чрезмерному накоплению холестерина

в макрофагах. При этом повышенная экспрессия скавенджер рецепторов приводит к еще большему захвату атерогенных ЛНП и повышенному накоплению внутриклеточного холестерина, что в итоге приводит к образованию пенистых клеток. Более того, стресс ЭПР нарушает работу системы регуляции синтеза внутриклеточного холестерина [Sozen, Ozer, 2017]. В нашей работе мы также показали, что подавление экспрессии PERK приводит к снижению накопления липидов в макрофагах. Таким образом, имеются прямые доказательства роли стресса ЭПР в накоплении и метаболизме холестерина в макрофагах (рис 15).

В нескольких работах было показано, что активация РНБ приводит к экспрессии генов, кодирующие провоспалительные цитокины, такие как CXCL8 и ИЛ-6, и их секреции [Wang и др., 2016], что может приводить к усилению воспаления в интиме сосудистой стенки [Gotoh, Endo, Oike, 2011]. Кроме того, ЭПР стресс может нейтрализовать противовоспалительный ответ клетки за счет подавления действия ИЛ-10 [Hansen и др., 2019]. Существуют доказательства, что помимо влияния стресса ЭПР на синтез провоспалительных цитокинов, сами цитокины могут запускать стресс ЭПР. В ранних исследованиях было показано, что цитокины ИЛ-1 бета, ИЛ-6 и ФНО могут запускать стресс ЭПР за счет изменения продукции активных форм кислорода или изменению содержания кальция в ЭПР [Duvigneau и др., 2019]. В результате получается что-то вроде замкнутой петли – воспаление приводит к стрессу ЭПР и РНБ, что в свою очередь приводит к синтезу новых цитокинов и усилению провоспалительного ответа [Sukhorukov и др., 2020a] (рис 15). При этом интерлейкины и цитокины (ИЛ-6, ИЛ-32, ИЛ-34, ФНО) способствуют усилению накопления холестерина в клетках [Frisdal и др., 2011; Liu и др., 2020; Liu и др., 2018; Reiss, Siegart, Leon De, 2017; Shiotsugu и др., 2019; Xu и др., 2017], который также может вызывать ЭПР стресс и продукцию провоспалительных цитокинов.

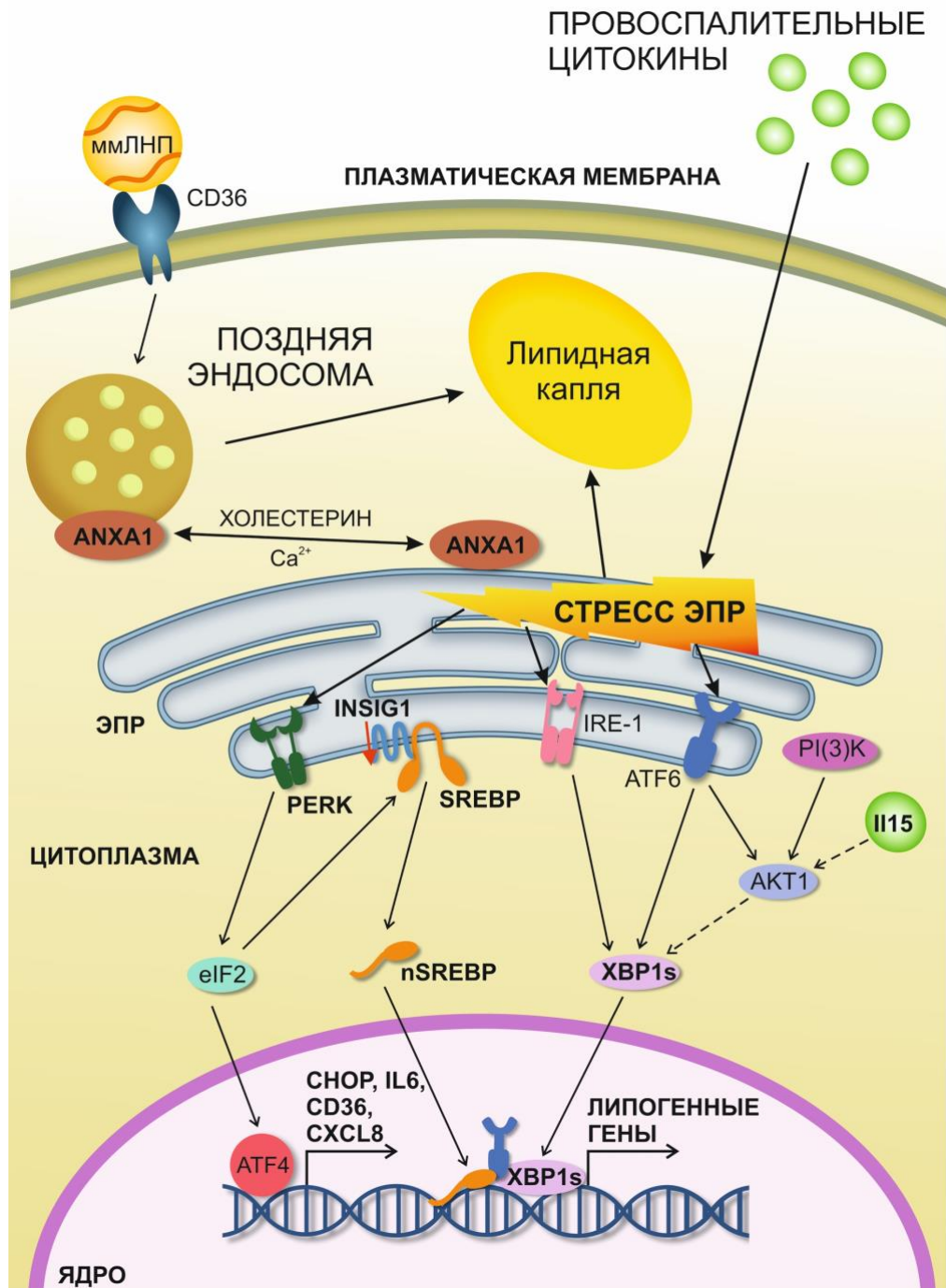


Рисунок 15. Взаимосвязь между накоплением холестерина, стрессом ЭПР и провоспалительной реакцией. Провоспалительные цитокины, ммЛНП, могут вызывать стресс ЭПР, нарушение гомеостаза кальция, и/или избыточное накопление липидов в ЭПР, что может вызвать РНБ, где ключевыми игроками являются PERK, IRE1 α и ATF6. PERK, IRE1 α и ATF6 активируют нисходящие сигнальные пути, которые могут запускать провоспалительную реакцию, апоптоз, снижение оттока холестерина и/или увеличение захвата ммЛНП, что может привести к образованию пенистых клеток за счет накопления липидных капель.

Согласно нашим данным и результатам других исследований вполне возможна цепь событий отличная от классических представлений об активации провоспалительного ответа из-за накопления холестерина. Мы предполагаем, что провоспалительные цитокины способствуют или вызывают накопление внутриклеточного холестерина в макрофагах. В пользу этого предположения служат данные полученные нами при сравнении активации сигнальных путей при взаимодействии макрофагов с модифицированными ЛНП [Orekhov и др., 2020b; Poznyak и др., 2020].

В этом исследовании мы предположили, что фагоцитоз агрегированных ЛНП является ключевым событием, сочетающим накопление липидов и воспалительную реакцию. Согласно классической концепции фагоцитоз патогена (например, бактерии) запускает реакцию врожденного иммунитета. Далее секретированные провоспалительные молекулы привлекают циркулирующие иммунные клетки в очаг будущего воспаления [Aderem, 2003]. Резидентные субэндотелиальные клетки могут воспринимать атерогенные модифицированные ЛНП как патоген, так как модифицированные ЛНП склонны к самоассоциации с образованием структур сходных по размеру с патогеном [Tertov и др., 1989b; Tertov и др., 1992b]. Таким образом, агрегированные ЛНП могут фагоцитироваться макрофагами, что в конечном итоге приводит к активации провоспалительного ответа. Полученные нами данные об одинаковой регуляции 12 сигнальных путей при взаимодействии макрофагов с естественными атерогенными ЛНП и шариками латекса, которые чаще всего применяются для активации фагоцитоза в экспериментах *in vitro* [Schroeder, Kinden, 1983] подтверждают наше предположение о стимуляции провоспалительного ответа агрегированными ЛНП. В результате возможна следующая цепь событий: частицы ЛНП подвергаются атерогенной модификации, которая сопровождается образованием самоассоциатов ЛНП. Затем самоассоциаты ЛНП стимулируют фагоцитоз, который запускает продукцию провоспалительных молекул. Провоспалительные молекулы, в свою очередь, стимулируют или вызывают накопление внутриклеточного холестерина. Эта гипотеза способна объяснить то, как могут быть связаны между собой

провоспалительная реакция и накопление холестерина (Рисунок 16). В результате можно говорить о том, что первичным в этой последовательности является провоспалительный ответ, а не накопление холестерина.

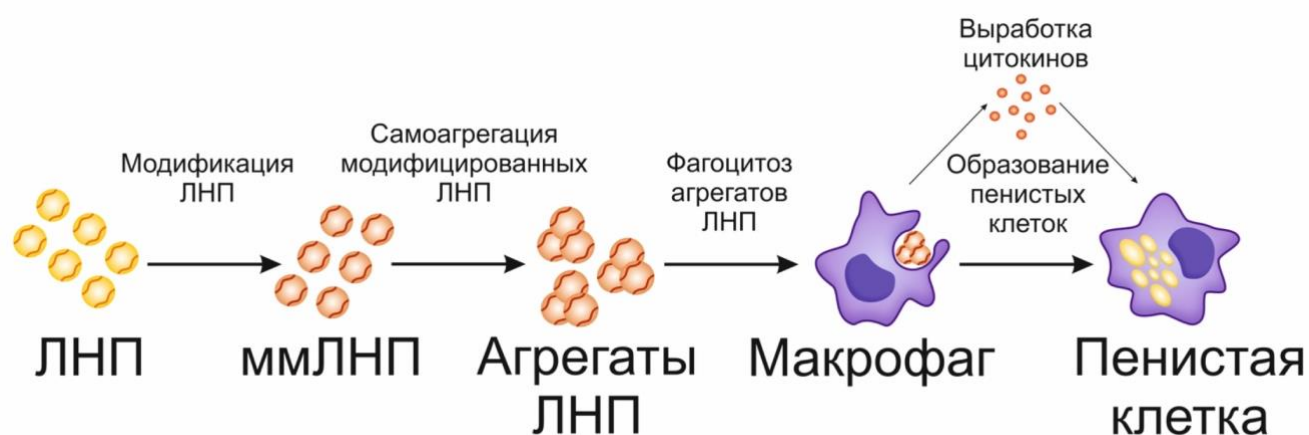


Рисунок 16. Последовательность событий, ведущих к накоплению внутриклеточного холестерина. Нативные ЛНП подвергаются атерогенной модификации в плазме крови, которая сопровождается образованием агрегированных ЛНП. Затем агрегированные ЛНП стимулируют фагоцитоз, который запускает продукцию провоспалительных молекул

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основной атерогенной модификацией ЛНП и ЛВП в крови является десиалирование. Десиалированные ЛНП вызывают накопление липидов в макрофагах, а у десиалированных ЛВП проявляется сниженная способность к оттоку холестерина из клеток, а также ускоренный перенос эфиров холестерина от ЛВП к ЛНП. Таким образом, десиалированные ЛНП и ЛВП являются атерогенными и способствуют образованию пенистых клеток.

При взаимодействии ЛВП с макрофагами мы обнаружили гены, участвующие в метаболизме холестерина. Нокдаун генов INSIG1 и LDLR способствует снижению оттока холестерина из макрофагов. При взаимодействии макрофагов с

атерогенными ЛНП нокдаун одних генов (EIF2AK3, IL15, ANXA1) приводил к отсутствию накопления внутриклеточного холестерина, а нокдаун других (IL7 и IL7R), напротив, усиливал накопление холестерина в клетках.

В случае взаимодействия модифицированных ЛНП с макрофагами нами были обнаружены 10 мастер-регуляторов причем 9 из них были связаны с иммунным ответом и воспалением. Таким образом, провоспалительный ответ макрофагов может являться ключевым событием ведущим к образованию пенистых клеток, а не наоборот, как принято считать. В пользу нашего предположения свидетельствует обнаружение активации 12 сигнальных путей, регулируемых сходным образом при взаимодействии макрофагов с шариками латекса и естественными атерогенными ЛНП. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что основной модификацией ЛНП в крови является десиалирование, а не окисление, а также, что агрегация ммЛНП приводит к активации фагоцитоза, затем провоспалительного ответа и как следствие приводит к накоплению холестерина. Следовательно, провоспалительный ответ макрофагов на ммЛНП вероятнее всего является причиной накопления внутриклеточного холестерина и образования пенистых клеток.

ВЫВОДЫ

1. ЛНП из крови больных атеросклерозом наиболее сходны с десИАлированными ЛНП по профилю активации сигнальных путей в макрофагах. Наибольшее сходство предполагает десИАлирование ЛНП *in vivo* в организме человека, как основной путь атерогенной модификации в крови.
2. ДесИАлирование приводит к существенному изменению гликома ЛВП и ЛНП; основным проявлением повреждения является полное исчезновение ди- и моносиАлированных дву- и триантеннарных гликанов с их переходом в соответствующие десИАлированные дву- и триантеннарные гликаны.
3. ДесИАлирование липопротеидных частиц может вызывать одновременную проатерогенную модификацию как ЛНП, так и ЛВП, синергичным образом усиливая атерогенный эффект, наблюдаемый в условиях клеточной модели накопления холестерина.
4. Из 3 генов (предполагаемых мастер-регуляторов) оттока холестерина из клеток подтверждена регуляторная роль для генов LDLR и INSIG1.
5. Из 10 генов (предполагаемых мастер-регуляторов) накопления внутриклеточного холестерина подтверждена роль 5 генов: нокдаун PERK, IL15, и ANXA1 блокирует накопление холестерина в макрофагах; нокдаун IL7 и IL7R усиливает накопление холестерина.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

апоА-I – аполипопротеид А I

апоВ – аполипопротеин В

ИЛ – интерлейкин

ИМТ – индекс массы тела

ИНФ гамма – интерферон гамма

ЛВП – липопротеиды высокой плотности

ЛНП – липопротеиды низкой плотности

ЛНП-ЦИК – ЛНП-циркулирующий иммунный комплекс

ЛНП(-) – электроотрицательные ЛНП

ЛХАТ – лецитинхолестеринацилтрансфераза

МАЛДИ МС – времяпролетная масс-спектрометрия с лазерной ионизацией и десорбцией из жидкой матрицы

МДА-ЛНП – ЛНП, модифицированные малоновым диальдегидом

ммЛНП – множественно-модифицированные ЛНП

МПА - миелопероксидаза

млЛНП – мелкие плотные ЛНП

ПЦР-РВ – ПЦР в реальном времени

ПНГаза F – пептид-N-гликозидаза F

РНБ – реакция несвернутых белков

ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания

ТИМ – толщина интима-медиа

ФНО – фактор некроза опухоли

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

ЭПР стресс – стресс эндоплазматического ретикулума

A2G2S2 – 2 ветви с 2 галактозами и двумя сиаловыми кислотами. Все N-гликаны состоят из основной последовательности сахаров, включающей два N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) и три маннозных остатка; Ax, число (x) ветвей

(GlcNAc) в триманнозном ядре; Gx, число (x) β 1-4 связанных галактоз на ветве; Sx, число (x) сиаловых кислот, связанных с галактозой. Здесь 2 ветви с 2 галактозами и двумя сиаловыми кислотами.

HILIC-UHPLC-FLD - сверхвысокая жидкостная хроматография с гидрофильным взаимодействием с детектированием флуоресценции

TLR – toll-like рецепторы

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бойцов С. А., Кухарчук В. В., Карпов Ю. А., Сергиенко И. В., Драпкина О. М., Семенова А. Е., Уразалина С. . Субклинический атеросклероз как фактор риска сердечно-сосудистых осложнений // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2012. Т. 11. № 3. С. 82–86.
2. Гукасов В. М., Расулов М. М., Смирнова М. И., Расулов Р. М. Клеточные механизмы развития атеросклероза // Медицина и высокие технологии. 2014. Т. 3. С. 19–25.
3. Давлятшина, Н.З., Маянская, С.Д., Мухаметгалиева, А.Р., Майкова, Е.В., Кравцова О. А. Особенности экспрессии генов скавенджер-рецепторов моноцитов и макрофагов при разных клинических формах атеросклероза // Вестник современной клинической медицины. 2017. Т. 10. № 2. С. 13–18.
4. Душкин М. И. Макрофаг/пенистая клетка как атрибут воспаления: механизмы образования и функциональная роль обзор // Биохимия. 2012. Т. 77. № 4. С. 419–432.
5. Ершова А. И., Мешков А. Н., Деев А. Д., Александрова Е. Л., Лищенко Н. Е., Новикова А. С., Хорошилова О. В., Шутемова Е. А., Белова О. А., Балахонова Т. В., Шальнова С. А., Драпкина О. М., С.А. Б. Атеросклеротическая бляшка в сонных артериях как маркер риска развития сердечно-сосудистых событий в популяции среднего возраста // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2018. Т. 17. № 4. С. 34–39.
6. Карагодин В. П., Орехов А. Н., Колмычкова К. И., Кубекина М. В., Никифоров Н. Г., Закиев Э. Р., Романенко Е. Б., Сухоруков В. Н. Средство для подавления экспрессии генов, связанных с накоплением холестерина макрофагами человека // 2019.
7. Кубекина М.В., Никифоров Н.Г., Карагодин В.П., Собенин И.А. О. А. Н. Анализ транскриптома макрофагов при атерогенезе // Российский кардиологический журнал. 2019. Т. 24. № 2. С. 92–98.

8. Мельниченко А. А., Мясоедова В. А., Елизова Н. В., Никитина Н. А., Карагодин В. П., Собенин И. А., Орехов А. Н. Оценка содержания циркулирующих множественно модифицированных липопротеидов низкой плотности в сыворотке крови // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2016. Т. 60. № 2. С. 107–111.
9. Мурашов И. С., Савченко С. В., Волков А. М., Кливер Е. Э., Новоселов В. П., Воевода М. И. Основные механизмы развития атеросклероза // Вестник судебной медицины. 2017. Т. 6. № 1. С. 31–36.
10. Мухин Д. Н., Тертов В. В., Качарова А. Г., Орехов А. Н. Десалирированные липопротеиды низкой плотности - атерогенные модифицированные липопротеиды низкой плотности, обнаруженные в крови больных коронарным атеросклерозом // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1990. Т. 110. № 8. С. 138–140.
11. Панасенко О. М., Торховская Т. И., Горудко И. В., Соколов А. В. Роль галогенирующего стресса в атерогенной модификации липопротеинов низкой плотности // Успехи биологической химии. 2020. Т. 60. С. 75–122.
12. Рыжкова А. И., Иванова Е. А., Сухоруков В. Н., Карагодин В. П., Сазонова М. А., Орехов А. Н. Электроотрицательные липопротеиды низкой плотности // Патогенез. 2016. Т. 14. № 3. С. 11–16.
13. Рыжкова А. И., Карагодин В. П., Сухоруков В. Н., Сазонова М. А., Орехов А. Н. Десалирированные липопротеины низкой плотности в крови человека // Клиническая медицина. 2017. Т. 95. № 3. С. 216–221.
14. Сухоруков В. Н., Карагодин В. П., Орехов А. Н. Атерогенные модификации липопротеинов низкой плотности. // Биомедицинская химия. 2016. Т. 62. № 4. С. 391–402.
15. Фадеев Г. А., Фатыхов Р. Г., Цибулькин Н. А., Михопарова О. Ю., Ощепкова О. Б., Абдрахманова А. И. Воспалительные механизмы в генезе атеросклероза // Вестник современной клинической медицины. 2020. Т. 13. № 6. С. 62–67.

- 16.Шогенова М.Х., Жетишева Р. А., Карпов А. М., Доценко Ю. В., Масенко В. П., Наумов В. Г. Роль окисленных липопротеинов низкой плотности и антител к ним в иммунно-воспалительном процессе при атеросклерозе // Атеросклероз и дислипидемии. 2015. Т. 2. № 19. С. 17–21.
- 17.Ackers I., Szymanski C., Duckett K. J., Consitt L. A., Silver M. J., Malgor R. Blocking Wnt5a signaling decreases CD36 expression and foam cell formation in atherosclerosis // Cardiovasc. Pathol. 2018. Т. 34. С. 1–8.
- 18.Ackers I., Szymanski C., Silver M. J., Malgor R. Oxidized Low-Density Lipoprotein Induces WNT5A Signaling Activation in THP-1 Derived Macrophages and a Human Aortic Vascular Smooth Muscle Cell Line // Front. Cardiovasc. Med. 2020. Т. 7.
- 19.Aderem A. Phagocytosis and the Inflammatory Response // J. Infect. Dis. 2003. Т. 187. № s2. С. S340–S345.
- 20.An D., Hao F., Hu C., Kong W., Xu X., Cui M.-Z. JNK1 Mediates Lipopolysaccharide-Induced CD14 and SR-AI Expression and Macrophage Foam Cell Formation // Front. Physiol. 2018. Т. 8.
- 21.Arai H. Oxidative Modification of Lipoproteins. , 2014. С. 103–114.
- 22.Aviram M., Rosenblat M., Etzioni A., Levy R. Activation of NADPH oxidase is required for macrophage-mediated oxidation of low-density lipoprotein // Metabolism. 1996. Т. 45. № 9. С. 1069–1079.
- 23.Avogaro P., Bon G. B., Gazzolato G. Presence of a modified low density lipoprotein in humans // Arteriosclerosis. 1988. Т. 8. № 1. С. 79–87.
- 24.Avogaro P., Cazzolato G., Bittolo-Bon G. Some questions concerning a small, more electronegative LDL circulating in human plasma // Atherosclerosis. 1991. Т. 91. № 1–2. С. 163–171.
- 25.Balla G., Jacob H. S., Eaton J. W., Belcher J. D., Vercellotti G. M. Hemin: a possible physiological mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial injury. // Arterioscler. Thromb. A J. Vasc. Biol. 1991. Т. 11. № 6. С. 1700–1711.

26. Banerjee D., Sinha A., Saikia S., Gogoi B., Rathore A. K., Das A. S., Pal D., Buragohain A. K., Dasgupta S. Inflammation-induced mTORC2-Akt-mTORC1 signaling promotes macrophage foam cell formation // *Biochimie*. 2018. T. 151. C. 139–149.
27. Bartlett A. L., Grewal T., Angelis E. De, Myers S., Stanley K. K. Role of the macrophage galactose lectin in the uptake of desialylated LDL // *Atherosclerosis*. 2000. T. 153. № 1. C. 219–230.
28. Bekkering S., Quintin J., Joosten L. A. B., Meer J. W. M. van der, Netea M. G., Riksen N. P. Oxidized Low-Density Lipoprotein Induces Long-Term Proinflammatory Cytokine Production and Foam Cell Formation via Epigenetic Reprogramming of Monocytes // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2014. T. 34. № 8. C. 1731–1738.
29. Bellanger N., Orsoni A., Julia Z., Fournier N., Frisdal E., Duchene E., Bruckert E., Carrie A., Bonnefont-Rousselot D., Pirault J., Saint-Charles F., Chapman M. J., Lesnik P., Goff W. Le, Guerin M. Atheroprotective Reverse Cholesterol Transport Pathway Is Defective in Familial Hypercholesterolemia // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011. T. 31. № 7. C. 1675–1681.
30. Berisha S. Z., Hsu J., Robinet P., Smith J. D. Transcriptome Analysis of Genes Regulated by Cholesterol Loading in Two Strains of Mouse Macrophages Associates Lysosome Pathway and ER Stress Response with Atherosclerosis Susceptibility // *PLoS One*. 2013. T. 8. № 5. C. e65003.
31. Berneis K. K., Krauss R. M. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity // *J. Lipid Res.* 2002. T. 43. № 9. C. 1363–1379.
32. Boucher J. G., Nguyen T., Sparks D. L. Lipoprotein electrostatic properties regulate hepatic lipase association and activity // *Biochem. Cell Biol.* 2007. T. 85. № 6. C. 696–708.
33. Boucher P., Matz R. L., Terrand J. atherosclerosis: gone with the Wnt? // *Atherosclerosis*. 2020. T. 301. C. 15–22.
34. Boyanovsky B. B., Westhuyzen D. R. van der, Webb N. R. Group V Secretory Phospholipase A2-modified Low Density Lipoprotein Promotes Foam Cell

- Formation by a SR-A- and CD36-independent Process That Involves Cellular Proteoglycans // *J. Biol. Chem.* 2005. T. 280. № 38. C. 32746–32752.
35. Brown M. S., Goldstein J. L. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999. T. 96. № 20. C. 11041–11048.
36. Bruni F., Pasqui A. L., Pastorelli M., Bova G., Cercignani M., Palazzuoli A., Sawamura T., Auteri A., Puccetti L. Different Effect of Statins on Platelet Oxidized-LDL Receptor (CD36 and LOX-1) Expression in Hypercholesterolemic Subjects // *Clin. Appl. Thromb.* 2005. T. 11. № 4. C. 417–428.
37. Calvo D., Dopazo J., Vega M. A. The CD36, CLA-1 (CD36L1), and LIMPII (CD36L2) gene family: cellular distribution, chromosomal location, and genetic evolution // *Genomics.* 1995. T. 25. № 1. C. 100–106.
38. Carobbio S., Hagen R. M., Lelliott C. J., Slawik M., Medina-Gomez G., Tan C.-Y., Sicard A., Atherton H. J., Barbarroja N., Bjursell M., Bohlooly-Y M., Virtue S., Tuthill A., Lefai E., Laville M., Wu T., Considine R. V., Vidal H., Langin D., Oresic M., Tinahones F. J., Fernandez-Real J. M., Griffin J. L., Sethi J. K., Lopez M., Vidal-Puig A. Adaptive Changes of the Insig1/SREBP1/SCD1 Set Point Help Adipose Tissue to Cope With Increased Storage Demands of Obesity // *Diabetes.* 2013. T. 62. № 11. C. 3697–3708.
39. Chapman M. J., Goldstein S., Lagrange D., Laplaud P. M. A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum. // *J. Lipid Res.* 1981. T. 22. № 2. C. 339–358.
40. Chazov E. I., Orekhov A. N., Perova N. V., Khashimov K. A., Tertov V. V., Lyakishev A. A., Kurdanov K. A., Novikov I. D., Smirnov V. N. ATHEROGENICITY OF BLOOD SERUM FROM PATIENTS WITH CORONARY HEART DISEASE // *Lancet.* 1986. T. 328. № 8507. C. 595–598.
41. Chen L., Gao B., Zhang Y., Lu H., Li X., Pan L., Yin L., Zhi X. PAR2 promotes M1 macrophage polarization and inflammation via FOXO1 pathway // *J. Cell. Biochem.* 2019. T. 120. № 6. C. 9799–9809.

- 42.Chen R. M., Fischer-Dzoga K. Effect of hyperlipemic serum lipoproteins on the lipid accumulation and cholesterol flux of rabbit aortic medial cells // *Atherosclerosis*. 1977. T. 28. № 3. C. 339–353.
- 43.Chen X., Lu P.-H., Liu L., Fang Z.-M., Duan W., Liu Z.-L., Wang C.-Y., Zhou P., Yu X.-F., He W.-T. TIGIT negatively regulates inflammation by altering macrophage phenotype // *Immunobiology*. 2016. T. 221. № 1. C. 48–55.
- 44.Chistiakov D. A., Melnichenko A. A., Myasoedova V. A., Grechko A. V., Orekhov A. N. Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis // *J. Mol. Med*. 2017. T. 95. № 11. C. 1153–1165.
- 45.Chu C.-S., Wang Y.-C., Lu L.-S., Walton B., Yilmaz H. R., Huang R. Y., Sawamura T., Dixon R. A. F., Lai W.-T., Chen C.-H., Lu J. Electronegative Low-Density Lipoprotein Increases C-Reactive Protein Expression in Vascular Endothelial Cells through the LOX-1 Receptor // *PLoS One*. 2013. T. 8. № 8. C. e70533.
- 46.Cochain C., Vafadarnejad E., Arampatzi P., Pelisek J., Winkels H., Ley K., Wolf D., Saliba A.-E., Zernecke A. Single-Cell RNA-Seq Reveals the Transcriptional Landscape and Heterogeneity of Aortic Macrophages in Murine Atherosclerosis // *Circ. Res*. 2018. T. 122. № 12. C. 1661–1674.
- 47.Cubedo J., Padró T., Badimon L. Glycoproteome of human apolipoprotein A-I: N- and O-glycosylated forms are increased in patients with acute myocardial infarction // *Transl. Res*. 2014. T. 164. № 3. C. 209–222.
- 48.Damián-Zamacona S., Toledo-Ibelles P., Ibarra-Abundis M. Z., Uribe-Figueroa L., Hernández-Lemus E., Macedo-Alcibia K. P., Delgado-Coello B., Mas-Oliva J., Reyes-Grajeda J. P. Early Transcriptomic Response to LDL and oxLDL in Human Vascular Smooth Muscle Cells // *PLoS One*. 2016. T. 11. № 10. C. e0163924.
- 49.Dejager S., Bruckert E., Chapman M. J. Dense low density lipoprotein subspecies with diminished oxidative resistance predominate in combined hyperlipidemia // *J. Lipid Res*. 1993. T. 34. № 2. C. 295–308.

50. Deng H., Sun Y., Zeng W., Li H., Guo M., Yang L., Lu B., Yu B., Fan G., Gao Q., Jiang X. New Classification of Macrophages in Plaques: a Revolution // *Curr. Atheroscler. Rep.* 2020. T. 22. № 8. C. 31.
51. Dobiasova M. Lecithin: cholesterol acyltransferase and the regulation of endogenous cholesterol transport. // *Adv. Lipid Res.* 1983. T. 20. C. 107–194.
52. Du X.-M., Kim M.-J., Hou L., Goff W. Le, Chapman M. J., Eck M. Van, Curtiss L. K., Burnett J. R., Cartland S. P., Quinn C. M., Kockx M., Kontush A., Rye K.-A., Kritharides L., Jessup W. HDL Particle Size Is a Critical Determinant of ABCA1-Mediated Macrophage Cellular Cholesterol Export // *Circ. Res.* 2015. T. 116. № 7. C. 1133–1142.
53. Duvigneau J. C., Luís A., Gorman A. M., Samali A., Kaltenecker D., Moriggl R., Kozlov A. V. Crosstalk between inflammatory mediators and endoplasmic reticulum stress in liver diseases // *Cytokine.* 2019. T. 124. C. 154577.
54. Eberhart T., Eigner K., Filik Y., Fruhwürth S., Stangl H., Röhrl C. The unfolded protein response is a negative regulator of scavenger receptor class B, type I (SR-BI) expression // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016. T. 479. № 3. C. 557–562.
55. Farràs M., Canyelles M., Fitó M., Escolà-Gil J. C. Effects of Virgin Olive Oil and Phenol-Enriched Virgin Olive Oils on Lipoprotein Atherogenicity // *Nutrients.* 2020. T. 12. № 3. C. 601.
56. Fatkhullina A. R., Peshkova I. O., Koltsova E. K. The role of cytokines in the development of atherosclerosis // *Biochem.* 2016. T. 81. № 11. C. 1358–1370.
57. Fernandez D. M., Rahman A. H., Fernandez N. F., Chudnovskiy A., Amir E. D., Amadori L., Khan N. S., Wong C. K., Shamailova R., Hill C. A., Wang Z., Remark R., Li J. R., Pina C., Faries C., Awad A. J., Moss N., Bjorkegren J. L. M., Kim-Schulze S., Gnjatich S., Ma'ayan A., Mocco J., Faries P., Merad M., Giannarelli C. Single-cell immune landscape of human atherosclerotic plaques // *Nat. Med.* 2019. T. 25. № 10. C. 1576–1588.
58. Fournier N., Atger V., Cogny A., Védie B., Giral P., Simon A., Moatti N., Paul J.-L. Analysis of the relationship between triglyceridemia and HDL-phospholipid

- concentrations: consequences on the efflux capacity of serum in the Fu5AH system // *Atherosclerosis*. 2001. T. 157. № 2. C. 315–323.
59. Frisdal E., Lesnik P., Olivier M., Robillard P., Chapman M. J., Huby T., Guerin M., Goff W. Le. Interleukin-6 Protects Human Macrophages from Cellular Cholesterol Accumulation and Attenuates the Proinflammatory Response // *J. Biol. Chem.* 2011. T. 286. № 35. C. 30926–30936.
 60. Fukuchi M., Watanabe J., Kumagai K., Baba S., Shinozaki T., Miura M., Kagaya Y., Shirato K. Normal and Oxidized Low Density Lipoproteins Accumulate Deep in Physiologically Thickened Intima of Human Coronary Arteries // *Lab. Investig.* 2002. T. 82. № 10. C. 1437–1447.
 61. Fusakio M. E., Willy J. A., Wang Y., Mirek E. T., Baghdadi R. J. T. Al, Adams C. M., Anthony T. G., Wek R. C. Transcription factor ATF4 directs basal and stress-induced gene expression in the unfolded protein response and cholesterol metabolism in the liver // *Mol. Biol. Cell.* 2016. T. 27. № 9. C. 1536–1551.
 62. Gencer S., Evans B. R., Vorst E. P. C. van der, Döring Y., Weber C. Inflammatory Chemokines in Atherosclerosis // *Cells*. 2021. T. 10. № 2. C. 226.
 63. Glanz V. Y., Kashirskikh D. A., Grechko A. V., Yet S.-F., Sobenin I. A., Orekhov A. N. Sialidase Activity in Human Blood Serum Has a Distinct Seasonal Pattern: A Pilot Study // *Biology (Basel)*. 2020. T. 9. № 8. C. 184.
 64. Goldstein J. L., Ho Y. K., Basu S. K., 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.* 1979. T. 76. № 1. C. 333–337.
 65. Goo Y., Son S., Yechoor V. K., Paul A. Transcriptional Profiling of Foam Cells Reveals Induction of Guanylate-Binding Proteins Following Western Diet Acceleration of Atherosclerosis in the Absence of Global Changes in Inflammation // *J. Am. Heart Assoc.* 2016. T. 5. № 4.
 66. Gotoh T., Endo M., Oike Y. Endoplasmic Reticulum Stress-Related Inflammation and Cardiovascular Diseases // *Int. J. Inflam.* 2011. T. 2011. C. 1–8.

67. Graham A., Hogg N., Kalyanaraman B., O'Leary V., Darley-Usmar V., Moncada S. Peroxynitrite modification of low-density lipoprotein leads to recognition by the macrophage scavenger receptor // *FEBS Lett.* 1993. T. 330. № 2. C. 181–185.
68. Grewal T., Bartlett A., Burgess J. W., Packer N. H., Stanley K. K. Desialylated LDL uptake in human and mouse macrophages can be mediated by a lectin receptor // *Atherosclerosis.* 1996. T. 121. № 1. C. 151–163.
69. Griffiths B., Lewis C. A., Bensaad K., Ros S., Zhang Q., Ferber E. C., Konisti S., Peck B., Miess H., East P., Wakelam M., Harris A. L., Schulze A. Sterol regulatory element binding protein-dependent regulation of lipid synthesis supports cell survival and tumor growth // *Cancer Metab.* 2013. T. 1. № 1. C. 3.
70. Groenen A. G., Halmos B., Tall A. R., Westerterp M. Cholesterol efflux pathways, inflammation, and atherosclerosis // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2021. C. 1–14.
71. Guérin M., Bruckert E., Dolphin P. J., Turpin G., Chapman M. J. Fenofibrate Reduces Plasma Cholesteryl Ester Transfer From HDL to VLDL and Normalizes the Atherogenic, Dense LDL Profile in Combined Hyperlipidemia // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1996. T. 16. № 6. C. 763–772.
72. Guo C., Ma R., Liu X., Chen T., Li Y., Yu Y., Duan J., Zhou X., Li Y., Sun Z. Silica nanoparticles promote oxLDL-induced macrophage lipid accumulation and apoptosis via endoplasmic reticulum stress signaling // *Sci. Total Environ.* 2018. T. 631–632. C. 570–579.
73. Han P.-F., Che X.-D., Li H.-Z., Gao Y.-Y., Wei X.-C., Li P.-C. Annexin A1 involved in the regulation of inflammation and cell signaling pathways // *Chinese J. Traumatol.* 2020. T. 23. № 2. C. 96–101.
74. Han X., Kitamoto S., Lian Q., Boisvert W. A. Interleukin-10 Facilitates Both Cholesterol Uptake and Efflux in Macrophages // *J. Biol. Chem.* 2009. T. 284. № 47. C. 32950–32958.
75. Hansen I. S., Schoonejans J. M., Sritharan L., Burgsteden J. A. van, Ambarus C. A., Baeten D. L. P., Dunnen J. den. ER stress abrogates the immunosuppressive effect of IL-10 on human macrophages through inhibition of STAT3 activation // *Inflamm. Res.* 2019. T. 68. № 9. C. 775–785.

- 76.Hao X., Cao D., Hu Y., Li X., Liu X., Xiao J., Liao D., Xiang J., Tang C. IFN- γ down-regulates ABCA1 expression by inhibiting LXR α in a JAK/STAT signaling pathway-dependent manner // *Atherosclerosis*. 2009. T. 203. № 2. C. 417–428.
- 77.Hara A., Radin N. S. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent // *Anal. Biochem*. 1978. T. 90. № 1. C. 420–426.
- 78.Harada L. M., Carvalho M. D. ., Passarelli M., Quintão E. C. . Lipoprotein desialylation simultaneously enhances the cell cholesterol uptake and impairs the reverse cholesterol transport system: in vitro evidences utilizing neuraminidase-treated lipoproteins and mouse peritoneal macrophages // *Atherosclerosis*. 1998. T. 139. № 1. C. 65–75.
- 79.Hashizume M., Mihara M. Atherogenic effects of TNF- α and IL-6 via up-regulation of scavenger receptors // *Cytokine*. 2012. T. 58. № 3. C. 424–430.
- 80.Henriksen T., Mahoney E. M., Steinberg D. Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins. // *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1981. T. 78. № 10. C. 6499–6503.
- 81.Ho M.-M., Fraser D. A. Transcriptome data and gene ontology analysis in human macrophages ingesting modified lipoproteins in the presence or absence of complement protein C1q // *Data Br*. 2016. T. 9. C. 362–367.
- 82.Hong D., Bai Y.-P., Gao H.-C., Wang X., Li L.-F., Zhang G.-G., Hu C.-P. Ox-LDL induces endothelial cell apoptosis via the LOX-1-dependent endoplasmic reticulum stress pathway // *Atherosclerosis*. 2014. T. 235. № 2. C. 310–317.
- 83.Hoppstädter J., Ammit A. J. Role of Dual-Specificity Phosphatase 1 in Glucocorticoid-Driven Anti-inflammatory Responses // *Front. Immunol*. 2019. T. 10.
- 84.Hu Q., Mao Y., Liu M., Luo R., Jiang R., Guo F. The active nuclear form of SREBP1 amplifies ER stress and autophagy via regulation of PERK // *FEBS J*. 2020. T. 287. № 11. C. 2348–2366.

85. Huang J., Lee H., Zivkovic A. M., Smilowitz J. T., Rivera N., German J. B., Lebrilla C. B. Glycomic Analysis of High Density Lipoprotein Shows a Highly Sialylated Particle // *J. Proteome Res.* 2014. T. 13. № 2. C. 681–691.
86. Itabe H., Yamamoto H., Imanaka T., Shimamura K., Uchiyama H., Kimura J., Sanaka T., Hata Y., Takano T. Sensitive detection of oxidatively modified low density lipoprotein using a monoclonal antibody // *J. Lipid Res.* 1996. T. 37. № 1. C. 45–53.
87. Jaakkola O., Solakivi T., Tertov V. V., Orekhov A. N., Miettinen T. A., Nikkari T. Characteristics of low-density lipoprotein subfractions from patients with coronary artery disease // *Coron. Artery Dis.* 1993. T. 4. № 4. C. 379–386.
88. Jessup W., Simpson J. A., Dean R. T. Does superoxide radical have a role in macrophage-mediated oxidative modification of LDL? // *Atherosclerosis.* 1993. T. 99. № 1. C. 107–120.
89. Jiang Y., Wang M., Huang K., Zhang Z., Shao N., Zhang Y., Wang W., Wang S. Oxidized low-density lipoprotein induces secretion of interleukin-1 β by macrophages via reactive oxygen species-dependent NLRP3 inflammasome activation // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012. T. 425. № 2. C. 121–126.
90. Jones N. L., Reagan J. W., Willingham M. C. The pathogenesis of foam cell formation: Modified LDL stimulates uptake of co-incubated LDL via macropinocytosis // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000. T. 20. № 3. C. 773–781.
91. Kahlon T. S., Glines L. A., Lindgren F. T. Analytic ultracentrifugation of plasma lipoproteins. , 1986. C. 26–45.
92. Kailemia M. J., Wei W., Nguyen K., Beals E., Sawrey-Kubicek L., Rhodes C., Zhu C., Sacchi R., Zivkovic A. M., Lebrilla C. B. Targeted Measurements of O- and N-Glycopeptides Show That Proteins in High Density Lipoprotein Particles Are Enriched with Specific Glycosylation Compared to Plasma // *J. Proteome Res.* 2018. T. 17. № 2. C. 834–845.

93. Karagodin V. P., Sukhorukov V. N., Myasoedova V. A., Grechko A. V., Orekhov A. N. Diagnostics and Therapy of Human Diseases - Focus on Sialidases // *Curr. Pharm. Des.* 2018. T. 24. № 24. C. 2870–2875.
94. Kattoor A. J., Goel A., Mehta J. L. LOX-1: Regulation, Signaling and Its Role in Atherosclerosis // *Antioxidants*. 2019. T. 8. № 7. C. 218.
95. Keser T., Gornik I., Vučković F., Selak N., Pavić T., Lukić E., Gudelj I., Gašparović H., Biočina B., Tilin T., Wennerström A., Männistö S., Salomaa V., Havulinna A., Wang W., Wilson J. F., Charutvedi N., Perola M., Campbell H., Lauc G., Gornik O. Increased plasma N-glycome complexity is associated with higher risk of type 2 diabetes // *Diabetologia*. 2017. T. 60. № 12. C. 2352–2360.
96. Kim J., Kim J., Kim D. W., Ha Y., Ihm M. H., Kim H., Song K., Lee I. Wnt5a Induces Endothelial Inflammation via β -Catenin–Independent Signaling // *J. Immunol.* 2010. T. 185. № 2. C. 1274–1282.
97. Kim K., Shim D., Lee J. S., Zaitsev K., Williams J. W., Kim K.-W., Jang M.-Y., Seok Jang H., Yun T. J., Lee S. H., Yoon W. K., Prat A., Seidah N. G., Choi J., Lee S.-P., Yoon S.-H., Nam J. W., Seong J. K., Oh G. T., Randolph G. J., Artyomov M. N., Cheong C., Choi J.-H. Transcriptome Analysis Reveals Nonfoamy Rather Than Foamy Plaque Macrophages Are Proinflammatory in Atherosclerotic Murine Models // *Circ. Res.* 2018. T. 123. № 10. C. 1127–1142.
98. Kontush A., Chantepie S., Chapman M. J. Small, Dense HDL Particles Exert Potent Protection of Atherogenic LDL Against Oxidative Stress // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003. T. 23. № 10. C. 1881–1888.
99. Kontush A., Faria E. C. de, Chantepie S., Chapman M. J. Antioxidative Activity of HDL Particle Subspecies Is Impaired in Hyperalphalipoproteinemia: Relevance of Enzymatic and Physicochemical Properties // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004. T. 24. № 3. C. 526–533.
100. Kotelianskiĭ V. E., Orekhov A. N., Tertov V. V., Khashimov K. A., Glukhova M. A. Effect of components of the extracellular matrix on the accumulation of lipids in human cells // *Biull. Eksp. Biol. Med.* 1987. T. 104. № 11. C. 562–564.

101. Krishnan S., Huang J., Lee H., Guerrero A., Berglund L., Anuurad E., Lebrilla C. B., Zivkovic A. M. Combined High-Density Lipoprotein Proteomic and Glycomic Profiles in Patients at Risk for Coronary Artery Disease // *J. Proteome Res.* 2015. T. 14. № 12. C. 5109–5118.
102. Krishnan S., Shimoda M., Sacchi R., Kailemia M. J., Luxardi G., Kaysen G. A., Parikh A. N., Ngassam V. N., Johansen K., Chertow G. M., Grimes B., Smilowitz J. T., Maverakis E., Lebrilla C. B., Zivkovic A. M. HDL Glycoprotein Composition and Site-Specific Glycosylation Differentiates Between Clinical Groups and Affects IL-6 Secretion in Lipopolysaccharide-Stimulated Monocytes // *Sci. Rep.* 2017. T. 7. № 1. C. 43728.
103. Krull M. TRANSPATH(R): an information resource for storing and visualizing signaling pathways and their pathological aberrations // *Nucleic Acids Res.* 2006. T. 34. № 90001. C. D546–D551.
104. Kühn H., Chan L. The role of 15-lipoxygenase in atherogenesis: Pro- and antiatherogenic actions // *Curr. Opin. Lipidol.* 1997. T. 8. № 2. C. 111–117.
105. Lada A. T., Rudel L. L. Dietary monounsaturated versus polyunsaturated fatty acids: which is really better for protection from coronary heart disease? // *Curr. Opin. Lipidol.* 2003. T. 14. № 1. C. 41–46.
106. Larrede S., Quinn C. M., Jessup W., Frisdal E., Olivier M., Hsieh V., Kim M.-J., Eck M. Van, Couvert P., Carrie A., Giral P., Chapman M. J., Guerin M., Goff W. Le. Stimulation of Cholesterol Efflux by LXR Agonists in Cholesterol-Loaded Human Macrophages Is ABCA1-Dependent but ABCG1-Independent // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2009. T. 29. № 11. C. 1930–1936.
107. Lee J.-G., Lim E.-J., Park D.-W., Lee S.-H., Kim J.-R., Baek S.-H. A combination of Lox-1 and Nox1 regulates TLR9-mediated foam cell formation // *Cell. Signal.* 2008. T. 20. № 12. C. 2266–2275.
108. Lee S. D., Tontonoz P. Liver X receptors at the intersection of lipid metabolism and atherogenesis // *Atherosclerosis.* 2015. T. 242. № 1. C. 29–36.

109. Lehmann F., Tiralongo E., Tiralongo J. Sialic acid-specific lectins: occurrence, specificity and function // *Cell. Mol. Life Sci. C.* 2006. T. 63. № 12. C. 1331–1354.
110. Leonhardt W., Bergmann R., Hanefeld M. Initiation of LDL oxidation by copper ions or AAPH yields different kinetic parameters which are correlated // *Clin. Chim. Acta.* 1997. T. 259. № 1–2. C. 195–197.
111. Libby P. Inflammation in Atherosclerosis—No Longer a Theory // *Clin. Chem.* 2021. T. 67. № 1. C. 131–142.
112. Libby P., Buring J. E., Badimon L., Hansson G. K., Deanfield J., Bittencourt M. S., Tokgözoğlu L., Lewis E. F. Atherosclerosis // *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2019. T. 5. № 1. C. 56.
113. Lin J., Hu Y., Nunez S., Foulkes A. S., Cieply B., Xue C., Gerelus M., Li W., Zhang H., Rader D. J., Musunuru K., Li M., Reilly M. P. Transcriptome-Wide Analysis Reveals Modulation of Human Macrophage Inflammatory Phenotype Through Alternative Splicing // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2016. T. 36. № 7. C. 1434–1447.
114. Lindberg G., Eklund G. A., Gullberg B., Rastam L. Serum sialic acid concentration and cardiovascular mortality. // *BMJ.* 1991. T. 302. № 6769. C. 143–146.
115. Lindbohm N., Gylling H., Miettinen T. A. Sialic acid content of low density lipoprotein and its relation to lipid concentrations and metabolism of low density lipoprotein and cholesterol // *J. Lipid Res.* 2000. T. 41. № 7. C. 1110–1117.
116. Linnskog R., Jönsson G., Axelsson L., Prasad C. P., Andersson T. Interleukin-6 drives melanoma cell motility through p38 α -MAPK-dependent up-regulation of WNT5A expression // *Mol. Oncol.* 2014. T. 8. № 8. C. 1365–1378.
117. Liu H., Deng Y., Wu L., Li Y., Lin N., Li W., Dong X., Ma L. Interleukin-1 β Regulates Lipid Homeostasis in Human Glomerular Mesangial Cells // *J. Nutr. Health Aging.* 2020. T. 24. № 3. C. 246–250.

118. Liu Q., Fan J., Bai J., Peng L., Zhang T., Deng L., Wang G., Zhao Y., Nong J., Zhang M., Wang Y. IL-34 promotes foam cell formation by enhancing CD36 expression through p38 MAPK pathway // *Sci. Rep.* 2018. T. 8. № 1. C. 17347.
119. Liu Y., Atkinson D. Enhancing the Contrast of ApoB to Locate the Surface Components in the 3D Density Map of Human LDL // *J. Mol. Biol.* 2011. T. 405. № 1. C. 274–283.
120. Loewen C. J. , Levine T. P. Cholesterol Homeostasis: Not until the SCAP Lady INSIGs // *Curr. Biol.* 2002. T. 12. № 22. C. R779–R781.
121. LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L., RANDALL R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. // *J. Biol. Chem.* 1951. T. 193. № 1. C. 265–275.
122. Ma J. H., Wang J. J., Li J., Pfeffer B. A., Zhong Y., Zhang S. X. The role of IRE-XBP1 pathway in regulation of retinal pigment epithelium tight junctions // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2016. T. 57. № 13. C. 5244–5252.
123. Májek P., Pecankova K., Maly M., Oravec M., Riedel T., Dyr J. E. N-Glycosylation of apolipoprotein A1 in cardiovascular diseases // *Transl. Res.* 2015. T. 165. № 2. C. 360–362.
124. Marmillot P., Rao M. N., Liu Q.-H., Lakshman M. R. Desialylation of human apolipoprotein E decreases its binding to human high-density lipoprotein and its ability to deliver esterified cholesterol to the liver // *Metabolism.* 1999. T. 48. № 9. C. 1184–1192.
125. Meares G. P., Liu Y., Rajbhandari R., Qin H., Nozell S. E., Mobley J. A., Corbett J. A., Benveniste E. N. PERK-Dependent Activation of JAK1 and STAT3 Contributes to Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Inflammation // *Mol. Cell. Biol.* 2014. T. 34. № 20. C. 3911–3925.
126. Mezentsev A., Bezsonov E., Kashirskikh D., Baig M. S., Eid A. H., Orekhov A. Proatherogenic Sialidases and Desialylated Lipoproteins: 35 Years of Research and Current State from Bench to Bedside // *Biomedicines.* 2021. T. 9. № 6. C. 600.
127. Mihailovic P. M., Lio W. M., Yano J., Zhou J., Zhao X., Chyu K.-Y., Shah P. K., Cercek B., Dimayuga P. C. IL-7R blockade reduces post-myocardial

- infarction-induced atherosclerotic plaque inflammation in ApoE^{-/-} mice // *Biochem. Biophys. Reports*. 2019. T. 19. C. 100647.
128. Miller Y. I., Viriyakosol S., Worrall D. S., Boullier A., Butler S., Witztum J. L. Toll-Like Receptor 4–Dependent and –Independent Cytokine Secretion Induced by Minimally Oxidized Low-Density Lipoprotein in Macrophages // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005. T. 25. № 6. C. 1213–1219.
 129. Moore K. J., Freeman M. W. Scavenger Receptors in Atherosclerosis // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006. T. 26. № 8. C. 1702–1711.
 130. Mukhin D. N., Tertov V. V., Kacharava A. G., Orekhov A. N. Desialylated low density lipoproteins--atherogenic lipoproteins occurring in blood of patients with coronary atherosclerosis // *Biull. Eksp. Biol. Med.* 1990. T. 110. № 8. C. 138–13840.
 131. MURAKAMI M., HORIUCHI S., TAKATA K., MORINO Y. Distinction in the Mode of Receptor-Mediated Endocytosis between High Density Lipoprotein and Acetylated High Density Lipoprotein: Evidence for High Density Lipoprotein Receptor-Mediated Cholesterol Transfer // *J. Biochem.* 1987. T. 101. № 3. C. 729–741.
 132. Natella F., Nardini M., Ursini F., Scaccini C. Oxidative modification of human low-density lipoprotein by horseradish peroxidase in the absence of hydrogen peroxide // *Free Radic. Res.* 1998. T. 29. № 5. C. 427–434.
 133. Navazo M. D. P., Daviet L., Ninio E., McGregor J. L. Identification on Human CD36 of a Domain (155-183) Implicated in Binding Oxidized Low-Density Lipoproteins (Ox-LDL) // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1996. T. 16. № 8. C. 1033–1039.
 134. Nikifirov N. G., Zakiev E. R., Elizova N. V., Sukhorukov V. N., Orekhov A. N. Multiple-modified low-density lipoprotein as atherogenic factor of patients' blood: Development of therapeutic approaches to reduce blood atherogenicity // *Curr. Pharm. Des.* 2017. T. 23. № 6.
 135. Noguchi N., Gotoh N., Niki E. Effects of ebselen and probucol on oxidative modifications of lipid and protein of low density lipoprotein induced by free

- radicals // *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* 1994. T. 1213. № 2. C. 176–182.
136. Orekhov A. N., Bobryshev Y. V., Sobenin I. A., Melnichenko A. A., Chistiakov D. A. Modified Low Density Lipoprotein and Lipoprotein-Containing Circulating Immune Complexes as Diagnostic and Prognostic Biomarkers of Atherosclerosis and Type 1 Diabetes Macrovascular Disease // *Int. J. Mol. Sci.* 2014. T. 15. № 7. C. 12807–12841.
 137. Orekhov A. N., Markin A. M., Sukhorukov V. N., Khotina V. A., Ivanova E. Pro-inflammatory molecules induce cholesterol accumulation in macrophages: Role of inflammatory response in foam cell formation // *Atherosclerosis*. 2021. T. 320. C. 129–130.
 138. Orekhov A. N., Nikiforov N. G., Sukhorukov V. N., Kubekina M. V., Sobenin I. A., Wu W.-K., Foxx K. K., Pintus S., Stegmaier P., Stelmashenko D., Kel A., Gratchev A. N., Melnichenko A. A., Wetzker R., Summerhill V. I., Manabe I., Oishi Y. Role of Phagocytosis in the Pro-Inflammatory Response in LDL-Induced Foam Cell Formation; a Transcriptome Analysis // *Int. J. Mol. Sci.* 2020a. T. 21. № 3. C. 817.
 139. Orekhov A. N., Oishi Y., Nikiforov N. G., Zhelankin A. V., Dubrovsky L., Sobenin I. A., Kel A., Stelmashenko D., Makeev V. J., Foxx K., Jin X., Kruth H. S., Bukrinsky M. Modified LDL Particles Activate Inflammatory Pathways in Monocyte-derived Macrophages: Transcriptome Analysis // *Curr. Pharm. Des.* 2018a. T. 24. № 26. C. 3143–3151.
 140. Orekhov A. N., Pushkarsky T., Oishi Y., Nikiforov N. G., Zhelankin A. V., Dubrovsky L., Makeev V. J., Foxx K., Jin X., Kruth H. S., Sobenin I. A., Sukhorukov V. N., Zakiev E. R., Kontush A., Goff W. Le, Bukrinsky M. HDL activates expression of genes stimulating cholesterol efflux in human monocyte-derived macrophages // *Exp. Mol. Pathol.* 2018b. T. 105. № 2. C. 202–207.
 141. Orekhov A. N., Sukhorukov V. N., Nikiforov N. G., Kubekina M. V., Sobenin I. A., Foxx K. K., Pintus S., Stegmaier P., Stelmashenko D., Kel A., Poznyak A. V., Wu W.-K., Kasianov A. S., Makeev V. Y., Manabe I., Oishi Y.

Signaling Pathways Potentially Responsible for Foam Cell Formation: Cholesterol Accumulation or Inflammatory Response—What is First? // *Int. J. Mol. Sci.* 2020b. T. 21. № 8. C. 2716.

142. Orekhov A. N., Tertov V. V., Kabakov A. E., Adamova IYu, Pokrovsky S. N., Smirnov V. N. Autoantibodies against modified low density lipoprotein. Nonlipid factor of blood plasma that stimulates foam cell formation. // *Arterioscler. Thromb. A J. Vasc. Biol.* 1991. T. 11. № 2. C. 316–326.
143. Orekhov A. N., Tertov V. V., Kudryashov S. A., Smirnov V. N. Triggerlike stimulation of cholesterol accumulation and DNA and extracellular matrix synthesis induced by atherogenic serum or low density lipoprotein in cultured cells. // *Circ. Res.* 1990. T. 66. № 2. C. 311–320.
144. Orekhov A. N., Tertov V. V., Mukhin D. N. Desialylated low density lipoprotein - naturally occurring modified lipoprotein with atherogenic potency // *Atherosclerosis.* 1991. T. 86. № 2–3. C. 153–161.
145. Orekhov A. N., Tertov V. V., Mukhin D. N., Koteliansky V. E., Glukhova M. A., Khashimov K. A., 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 - Mol. Cell Res.* 1987. T. 928. № 3. C. 251–258.
146. Orekhov A. N., Tertov V. V., Mukhin D. N., Mikhailenko I. A. Modification of low density lipoprotein by desialylation causes lipid accumulation in cultured cells: Discovery of desialylated lipoprotein with altered cellular metabolism in the blood of atherosclerotic patients // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989. T. 162. № 1. C. 206–211.
147. Orekhov A. N., Tertov V. V., Sobenin I. A., Smirnov V. N., Via D. P., Guevara J., Gotto A. M., Morrisett J. D. Sialic acid content of human low density lipoproteins affects their interaction with cell receptors and intracellular lipid accumulation // *J. Lipid Res.* 1992. T. 33. № 6. C. 805–817.

148. Ouimet M., Barrett T. J., Fisher E. A. HDL and reverse cholesterol transport: Basic mechanisms and their roles in vascular health and disease // *Circ. Res.* 2019. T. 124. № 10. C. 1505–1518.
149. Palinski W., Hörkö S., Miller E., Steinbrecher U. P., Powell H. C., Curtiss L. K., Witztum J. L. Cloning of monoclonal autoantibodies to epitopes of oxidized lipoproteins from apolipoprotein E-deficient mice. Demonstration of epitopes of oxidized low density lipoprotein in human plasma. // *J. Clin. Invest.* 1996. T. 98. № 3. C. 800–814.
150. Palinski W., Ylä-Herttuala S., Rosenfeld M. E., Butler S. W., Socher S. A., Parthasarathy S., Curtiss L. K., Witztum J. L. Antisera and monoclonal antibodies specific for epitopes generated during oxidative modification of low density lipoprotein. // *Arterioscler. An Off. J. Am. Hear. Assoc. Inc.* 1990. T. 10. № 3. C. 325–335.
151. Panasenko O. M., Briviba K., Klotz L.-O., Sies H. Oxidative Modification and Nitration of Human Low-Density Lipoproteins by the Reaction of Hypochlorous Acid with Nitrite // *Arch. Biochem. Biophys.* 1997. T. 343. № 2. C. 254–259.
152. Park Y.-J., Luger K. Structure and function of nucleosome assembly proteins This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled 27th International West Coast Chromatin and Chromosome Conference, and has undergone the Journal's usual peer review // *Biochem. Cell Biol.* 2006. T. 84. № 4. C. 549–549.
153. Parthasarathy S., Fong L. G., Quinn M. T., Steinberg D. Oxidative modification of LDL: Comparison between cell-mediated and copper-mediated modification // *Eur. Heart J.* 1990. T. 11. № suppl E. C. 83–87.
154. Parthasarathy S., Raghavamenon A., Garelnabi M. O., Santanam N. Oxidized Low-Density Lipoprotein. , 2010. C. 403–417.
155. Perera P.-Y., Lichy J. H., Waldmann T. A., Perera L. P. The role of interleukin-15 in inflammation and immune responses to infection: implications for its therapeutic use // *Microbes Infect.* 2012. T. 14. № 3. C. 247–261.

156. Phillips M. C. Molecular Mechanisms of Cellular Cholesterol Efflux // J. Biol. Chem. 2014. T. 289. № 35. C. 24020–24029.
157. Phillips M. C., Johnson W. J., Rothblat G. H. Mechanisms and consequences of cellular cholesterol exchange and transfer // Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr. 1987. T. 906. № 2. C. 223–276.
158. Pirillo A., Norata G. D., Catapano A. L. LOX-1, OxLDL, and Atherosclerosis // Mediators Inflamm. 2013. T. 2013. C. 1–12.
159. Poznyak A. V., Nikiforov N. G., Markin A. M., Kashirskikh D. A., Myasoedova V. A., Gerasimova E. V., Orekhov A. N. Overview of OxLDL and Its Impact on Cardiovascular Health: Focus on Atherosclerosis // Front. Pharmacol. 2021. T. 11.
160. Poznyak A. V., Wu W.-K., Melnichenko A. A., Wetzker R., Sukhorukov V., Markin A. M., Khotina V. A., Orekhov A. N. Signaling Pathways and Key Genes Involved in Regulation of foam Cell Formation in Atherosclerosis // Cells. 2020. T. 9. № 3. C. 584.
161. Rahaman S. O., Lennon D. J., Febbraio M., Podrez E. A., Hazen S. L., Silverstein R. L. A CD36-dependent signaling cascade is necessary for macrophage foam cell formation // Cell Metab. 2006. T. 4. № 3. C. 211–221.
162. Rahaman S. O., Zhou G., Silverstein R. L. Vav Protein Guanine Nucleotide Exchange Factor Regulates CD36 Protein-mediated Macrophage Foam Cell Formation via Calcium and Dynamin-dependent Processes // J. Biol. Chem. 2011. T. 286. № 41. C. 36011–36019.
163. Rauner M., Stein N., Winzer M., Goettsch C., Zwerina J., Schett G., Distler J. H., Albers J., Schulze J., Schinke T., Bornhäuser M., Platzbecker U., Hofbauer L. C. WNT5A is induced by inflammatory mediators in bone marrow stromal cells and regulates cytokine and chemokine production // J. Bone Miner. Res. 2012. T. 27. № 3. C. 575–585.
164. Reaven P. D., Witztum J. L. Oxidized Low Density Lipoproteins in Atherogenesis: Role of Dietary Modification // Annu. Rev. Nutr. 1996. T. 16. № 1. C. 51–71.

165. Reiding K. R., Blank D., Kuijper D. M., Deelder A. M., Wuhler M. High-Throughput Profiling of Protein N-Glycosylation by MALDI-TOF-MS Employing Linkage-Specific Sialic Acid Esterification // *Anal. Chem.* 2014. T. 86. № 12. C. 5784–5793.
166. Reiss A. B., Siegert N. M., Leon J. De. Interleukin-6 in atherosclerosis: atherogenic or atheroprotective? // *Clin. Lipidol.* 2017. T. 12. № 1. C. 14–23.
167. Ricci R. Requirement of JNK2 for Scavenger Receptor A-Mediated Foam Cell Formation in Atherogenesis // *Science (80-.)*. 2004. T. 306. № 5701. C. 1558–1561.
168. Riksen N. P., Stienstra R. Metabolism of innate immune cells // *Curr. Opin. Lipidol.* 2018. T. 29. № 5. C. 359–367.
169. Ruhaak L. R., Huhn C., Waterreus W.-J., Boer A. R. de, Neusüss C., Hokke C. H., Deelder A. M., Wuhler M. Hydrophilic Interaction Chromatography-Based High-Throughput Sample Preparation Method for N-Glycan Analysis from Total Human Plasma Glycoproteins // *Anal. Chem.* 2008. T. 80. № 15. C. 6119–6126.
170. Sánchez-Quesada J. L., Camacho M., Antón R., Benítez S., Vila L., Ordóñez-Llanos J. Electronegative LDL of FH subjects: Chemical characterization and induction of chemokine release from human endothelial cells // *Atherosclerosis*. 2003. T. 166. № 2. C. 261–270.
171. Sánchez-Quesada J. L., Villegas S., Ordóñez-Llanos J. Electronegative low-density lipoprotein. A link between apolipoprotein B misfolding, lipoprotein aggregation and proteoglycan binding // *Curr. Opin. Lipidol.* 2012. T. 23. № 5. C. 479–486.
172. Savenkova M. I., Mueller D. M., Heinecke J. W. Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase is a physiological catalyst for the initiation of lipid peroxidation in low density lipoprotein // *J. Biol. Chem.* 1994. T. 269. № 32. C. 20394–20400.
173. Savinova O. V., Fillaus K., Jing L., Harris W. S., Shearer G. C. Reduced Apolipoprotein Glycosylation in Patients with the Metabolic Syndrome // *PLoS One*. 2014. T. 9. № 8. C. e104833.

174. Schauer R. Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2009. T. 19. № 5. C. 507–514.
175. Schroeder F., Kinden D. A. Measurement of phagocytosis using fluorescent latex beads // J. Biochem. Biophys. Methods. 1983. T. 8. № 1. C. 15–27.
176. Sever N., Yang T., Brown M. S., Goldstein J. L., DeBose-Boyd R. A. Accelerated Degradation of HMG CoA Reductase Mediated by Binding of Insig-1 to Its Sterol-Sensing Domain // Mol. Cell. 2003. T. 11. № 1. C. 25–33.
177. Shen M. M. S., Krauss R. M., Lindgren F. T., Forte T. M. Heterogeneity of serum low density lipoproteins in normal human subjects // J. Lipid Res. 1981. T. 22. № 2. C. 236–244.
178. Shiffman D., Mikita T., Tai J. T. N., Wade D. P., Porter J. G., Seilhamer J. J., Somogyi R., Liang S., Lawn R. M. Large Scale Gene Expression Analysis of Cholesterol-loaded Macrophages // J. Biol. Chem. 2000. T. 275. № 48. C. 37324–37332.
179. Shiotsugu S., Okinaga T., Habu M., Yoshiga D., Yoshioka I., Nishihara T., Ariyoshi W. The Biological Effects of Interleukin-17A on Adhesion Molecules Expression and Foam Cell Formation in Atherosclerotic Lesions // J. Interf. Cytokine Res. 2019. T. 39. № 11. C. 694–702.
180. Singh R. K., Haka A. S., Asmal A., Barbosa-Lorenzi V. C., Grosheva I., Chin H. F., Xiong Y., Hla T., Maxfield F. R. TLR4 (Toll-Like Receptor 4)-Dependent Signaling Drives Extracellular Catabolism of LDL (Low-Density Lipoprotein) Aggregates // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2020. T. 40. № 1. C. 86–102.
181. Sobenin I. A., Salonen J. T., Zhelankin A. V., Melnichenko A. A., Kaikkonen J., Bobryshev Y. V., Orekhov A. N. Low Density Lipoprotein-Containing Circulating Immune Complexes: Role in Atherosclerosis and Diagnostic Value // Biomed Res. Int. 2014. T. 2014. C. 1–7.
182. Sørensen S., Ranheim T., Bakken K. S., Leren T. P., Kulseth M. A. Retention of Mutant Low Density Lipoprotein Receptor in Endoplasmic Reticulum (ER) Leads to ER Stress // J. Biol. Chem. 2006. T. 281. № 1. C. 468–476.

183. Sorrentino R., Morello S., Chen S., Bonavita E., Pinto A. The activation of liver X receptors inhibits toll-like receptor-9-induced foam cell formation // *J. Cell. Physiol.* 2010. T. 223. № 1. C. 158–167.
184. Sozen E., Ozer N. K. Impact of high cholesterol and endoplasmic reticulum stress on metabolic diseases: An updated mini-review // *Redox Biol.* 2017. T. 12. C. 456–461.
185. Stark R., Grzelak M., Hadfield J. RNA sequencing: the teenage years // *Nat. Rev. Genet.* 2019. T. 20. № 11. C. 631–656.
186. Steinbrecher U. P., Lougheed M., Kwan W. C., 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. № 26. C. 15216–15223.
187. Steinbrecher U. P., Zhang H., Lougheed M. Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis // *Free Radic. Biol. Med.* 1990. T. 9. № 2. C. 155–168.
188. Stewart C. R., Stuart L. M., Wilkinson K., Gils J. M. van, Deng J., Halle A., Rayner K. J., Boyer L., Zhong R., Frazier W. A., Lacy-Hulbert A., Khoury J. El, Golenbock D. T., Moore K. J. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer // *Nat. Immunol.* 2010. T. 11. № 2. C. 155–161.
189. Sukhorukov V. N. V. N., Karagodin V. P. V. P., Zakiev E. R. E. R., Grechko A. V. A. V., Orekhov A. N. A. N. Sialidases: Therapeutic and Antiatherogenic Potential. // *Curr. Pharm. Des.* 2017. T. 23. № 31. C. 4696–4701.
190. Sukhorukov V. N., Khotina V. A., Bagheri Ekta M., Ivanova E. A., Sobenin I. A., Orekhov A. N. Endoplasmic Reticulum Stress in Macrophages: The Vicious Circle of Lipid Accumulation and Pro-Inflammatory Response // *Biomedicines.* 2020a. T. 8. № 7. C. 210.
191. Sukhorukov V. N., Khotina V. A., Chegodaev Y. S., Ivanova E., Sobenin I. A., Orekhov A. N. Lipid Metabolism in Macrophages: Focus on Atherosclerosis // *Biomedicines.* 2020b. T. 8. № 8. C. 262.

192. Sukhorukov V., Gudelj I., Pučić-Baković M., Zakiev E., Orekhov A., Kontush A., Lauc G. Glycosylation of human plasma lipoproteins reveals a high level of diversity, which directly impacts their functional properties // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*. 2019. T. 1864. № 5. C. 643–653.
193. Summerhill, Grechko, Yet, Sobenin, Orekhov. The Atherogenic Role of Circulating Modified Lipids in Atherosclerosis // *Int. J. Mol. Sci*. 2019. T. 20. № 14. C. 3561.
194. Sun Y., Zhang D., Liu X., Li X., Liu F., Yu Y., Jia S., Zhou Y., Zhao Y. Endoplasmic Reticulum Stress Affects Lipid Metabolism in Atherosclerosis Via CHOP Activation and Over-Expression of miR-33 // *Cell. Physiol. Biochem*. 2018. T. 48. № 5. C. 1995–2010.
195. Swaminathan N., Aladjem F. The monosaccharide composition and sequence of the carbohydrate moiety of human serum low density lipoproteins // *Biochemistry*. 1976. T. 15. № 7. C. 1516–1522.
196. Tall A. R., Yvan-Charvet L. Cholesterol, inflammation and innate immunity // *Nat. Rev. Immunol*. 2015. T. 15. № 2. C. 104–116.
197. Tekavec S., Sorčan T., Giacca M., Režen T. VLDL and HDL attenuate endoplasmic reticulum and metabolic stress in HL-1 cardiomyocytes // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*. 2020. T. 1865. № 8. C. 158713.
198. Tertov V. ., Kaplun V. ., Sobenin I. ., Orekhov A. . Low-density lipoprotein modification occurring in human plasma // *Atherosclerosis*. 1998. T. 138. № 1. C. 183–195.
199. Tertov V. V, Orekhov A. N., Sobenin I. A., Gabbasov Z. A., Popov E. G., Yaroslavov A. A., Smirnov V. N. Three types of naturally occurring modified lipoproteins induce intracellular lipid accumulation due to lipoprotein aggregation. // *Circ. Res*. 1992b. T. 71. № 1. C. 218–228.
200. Tertov V. V, Sobenin I. A., Orekhov A. N. Modified (desialylated) low-density lipoprotein measured in serum by lectin-sorbent assay. // *Clin. Chem*. 1995. T. 41. № 7. C. 1018–21.

201. Tertov V. V., Kaplun V. V., Sobenin I. A., Boytsova E. Y., Bovin N. V., Orekhov A. N. Human plasma trans-sialidase causes atherogenic modification of low density lipoprotein // *Atherosclerosis*. 2001. T. 159. № 1. C. 103–115.
202. Tertov V. V., Orekhov A. N., Kacharava A. G., Sobenin I. A., Perova N. V., Smirnov V. N. Low density lipoprotein-containing circulating immune complexes and coronary atherosclerosis // *Exp. Mol. Pathol.* 1990a. T. 52. № 3. C. 300–308.
203. Tertov V. V., Orekhov A. N., Martsenyuk O. N., Perova N. V., Smirnov V. N. Low-density lipoproteins isolated from the blood of patients with coronary heart disease induce the accumulation of lipids in human aortic cells // *Exp. Mol. Pathol.* 1989a. T. 50. № 3. C. 337–347.
204. Tertov V. V., Orekhov A. N., Ryong L. H., Smirnov V. N. Intracellular cholesterol accumulation is accompanied by enhanced proliferative activity of human aortic intimal cells // *Tissue Cell*. 1988. T. 20. № 6. C. 849–854.
205. Tertov V. V., Sobenin I. A., Gabbasov Z. A., Popov E. G., Jaakkola O., Solakivi T., Nikkari T., Smirnov V. N., Orekhov A. N. Multiple-modified desialylated low density lipoproteins that cause intracellular lipid accumulation: Isolation, fractionation and characterization // *Lab. Investig.* 1992a. T. 67. № 5. C. 665–675.
206. Tertov V. V., Sobenin I. A., Gabbasov Z. A., Popov E. G., Orekhov A. N. Lipoprotein aggregation as an essential condition of intracellular lipid accumulation caused by modified low density lipoproteins // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989b. T. 163. № 1. C. 489–494.
207. Tertov V. V., Sobenin I. A., Orekhov A. N. Similarity Between Naturally Occurring Modified Desialylated, Electronegative and Aortic Low Density Lipoprotein // *Free Radic. Res.* 1996. T. 25. № 4. C. 313–319.
208. Tertov V. V., Sobenin I. A., Tonevitsky A. G., Orekhov A. N., Smirnov V. N. Isolation of atherogenic modified (desialylated) low density lipoprotein from blood of atherosclerotic patients: Separation from native lipoprotein by affinity chromatography // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990b. T. 167. № 3. C. 1122–1127.

209. Thomas C. E., Jackson R. L., Ohlweiler D. F., Ku G. Multiple lipid oxidation products in low density lipoproteins induce interleukin-1 beta release from human blood mononuclear cells // *J. Lipid Res.* 1994. T. 35. № 3. C. 417–427.
210. Thuahnai S. T., Lund-Katz S., Dhanasekaran P., la Llera-Moya M. de, Connelly M. A., Williams D. L., Rothblat G. H., Phillips M. C. Scavenger Receptor Class B Type I-mediated Cholesteryl Ester-selective Uptake and Efflux of Unesterified Cholesterol // *J. Biol. Chem.* 2004. T. 279. № 13. C. 12448–12455.
211. Trbojević Akmačić I., Ugrina I., Štambuk J., Gudelj I., Vučković F., Lauc G., Pučić-Baković M. High-throughput glycomics: Optimization of sample preparation // *Biochem.* 2015. T. 80. № 7. C. 934–942.
212. Tribble D. L., Rizzo M., Chait A., Lewis D. M., Blanche P. J., Krauss R. M. Enhanced oxidative susceptibility and reduced antioxidant content of metabolic precursors of small, dense low-density lipoproteins // *Am. J. Med.* 2001. T. 110. № 2. C. 103–110.
213. Trpkovic A., Resanovic I., Stanimirovic J., Radak D., Mousa S. A., Cenic-Milosevic D., Jevremovic D., Isenovic E. R. Oxidized low-density lipoprotein as a biomarker of cardiovascular diseases // *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2015. T. 52. № 2. C. 70–85.
214. Vaisar T. Proteomics Investigations of HDL: Challenges and Promise // *Curr. Vasc. Pharmacol.* 2012. T. 10. № 4. C. 410–421.
215. Varki A. Sialic acids in human health and disease // *Trends Mol. Med.* 2008. T. 14. № 8. C. 351–360.
216. Vauhkonen M., Viitala J., Parkkinen J., Rauvala H. High-mannose structure of apolipoprotein-B from low-density lipoproteins of human plasma // *Eur. J. Biochem.* 1985. T. 152. № 1. C. 43–50.
217. Ville A. E. La, Sola R., Balanya J., Turner P. R., Masana L. In vitro oxidised HDL is recognised by the scavenger receptor of macrophages: implications for its protective role in vivo // *Atherosclerosis.* 1994. T. 105. № 2. C. 179–189.
218. Virani S. S., Alonso A., Benjamin E. J., Bittencourt M. S., Callaway C. W., Carson A. P., Chamberlain A. M., Chang A. R., Cheng S., Delling F. N., Djousse

- L., Elkind M. S. V., Ferguson J. F., Fornage M., Khan S. S., Kissela B. M., Knutson K. L., Kwan T. W., Lackland D. T., Lewis T. T., Lichtman J. H., Longenecker C. T., Loop M. S., Lutsey P. L., Martin S. S., Matsushita K., Moran A. E., Mussolino M. E., Perak A. M., Rosamond W. D., Roth G. A., Sampson U. K. A., Satou G. M., Schroeder E. B., Shah S. H., Shay C. M., Spartano N. L., Stokes A., Tirschwell D. L., VanWagner L. B., Tsao C. W. Heart Disease and Stroke Statistics—2020 Update: A Report From the American Heart Association // *Circulation*. 2020. T. 141. № 9.
219. Volmer R., Ron D. Lipid-dependent regulation of the unfolded protein response // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2015. T. 33. C. 67–73.
220. Vorst E. P. C. van der, Theodorou K., Wu Y., Hoeksema M. A., Goossens P., Bursill C. A., Aliyev T., Huitema L. F. A., Tas S. W., Wolfs I. M. J., Kuijpers M. J. E., Gijbels M. J., Schalkwijk C. G., Koonen D. P. Y., Abdollahi-Roodsaz S., McDaniels K., Wang C.-C., Leitges M., Lawrence T., Plat J., Eck M. Van, Rye K.-A., Touqui L., Winther M. P. J. de, Biessen E. A. L., Donners M. M. P. C. High-Density Lipoproteins Exert Pro-inflammatory Effects on Macrophages via Passive Cholesterol Depletion and PKC-NF- κ B/STAT1-IRF1 Signaling // *Cell Metab.* 2017. T. 25. № 1. C. 197–207.
221. Wang M.-D., Kiss R. S., Franklin V., McBride H. M., Whitman S. C., Marcel Y. L. Different cellular traffic of LDL-cholesterol and acetylated LDL-cholesterol leads to distinct reverse cholesterol transport pathways // *J. Lipid Res.* 2007. T. 48. № 3. C. 633–645.
222. Wang T., Yuan Y., Zou H., Yang J., Zhao S., Ma Y., Wang Y., Bian J., Liu X., Gu J., Liu Z., Zhu J. The ER stress regulator Bip mediates cadmium-induced autophagy and neuronal senescence // *Sci. Rep.* 2016. T. 6.
223. Weigel P. Glycans as endocytosis signals: the cases of the asialoglycoprotein and hyaluronan/chondroitin sulfate receptors // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 2002. T. 1572. № 2–3. C. 341–363.
224. Willemsen L., Winther M. P. Macrophage subsets in atherosclerosis as defined by single-cell technologies // *J. Pathol.* 2020. T. 250. № 5. C. 705–714.

225. Winkels H., Ehinger E., Ghosheh Y., Wolf D., Ley K. Atherosclerosis in the single-cell era // *Curr. Opin. Lipidol.* 2018. T. 29. № 5. C. 389–396.
226. Wood J. L., Graham A. The role of thiols in oxidation of low-density lipoprotein by macrophages // *Biochem. Soc. Trans.* 1995. T. 23. № 2. C. 242S–242S.
227. Xu Z., Dong A., Feng Z., Li J. Interleukin-32 promotes lipid accumulation through inhibition of cholesterol efflux // *Exp. Ther. Med.* 2017. T. 14. № 2. C. 947–952.
228. Yang T., Espenshade P. J., Wright M. E., Yabe D., Gong Y., Aebersold R., Goldstein J. L., Brown M. S. Crucial Step in Cholesterol Homeostasis // *Cell*. 2002. T. 110. № 4. C. 489–500.
229. Yao S., Miao C., Tian H., Sang H., Yang N., Jiao P., Han J., Zong C., Qin S. Endoplasmic Reticulum Stress Promotes Macrophage-derived Foam Cell Formation by Up-regulating Cluster of Differentiation 36 (CD36) Expression // *J. Biol. Chem.* 2014. T. 289. № 7. C. 4032–4042.
230. Yla-Herttuala S., Palinski W., Rosenfeld M. E., Steinberg D., Witztum J. L. Lipoproteins in normal and atherosclerotic aorta // *Eur. Heart J.* 1990. T. 11. № suppl E. C. 88–99.
231. Yokoyama H., Jensen J. S., Jensen T., Deckert T. Serum sialic acid concentration is elevated in IDDM especially in early diabetic nephropathy // *J. Intern. Med.* 1995. T. 237. № 5. C. 519–523.
232. Yu X. H., Fu Y. C., Zhang D. W., Yin K., Tang C. K. Foam cells in atherosclerosis // *Clin. Chim. Acta.* 2013. T. 424. C. 245–252.
233. Yu X., Harden K., C Gonzalez L., Francesco M., Chiang E., Irving B., Tom I., Ivelja S., Refino C. J., Clark H., Eaton D., Grogan J. L. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells // *Nat. Immunol.* 2009. T. 10. № 1. C. 48–57.
234. Zakiev E. R., Sobenin I. A., Sukhorukov V. N., Myasoedova V. A., Ivanova E. A., Orekhov A. N. Carbohydrate composition of circulating multiple-modified low-density lipoprotein // *Vasc. Health Risk Manag.* 2016. T. 12.

235. Zakiev E. R., Sukhorukov V. N., Ivanova E. A., Orekhov A. N. Analysis of Apolipoprotein B Protein of Circulating Multiple-Modified Low-Density Lipoprotein // *Int. J. Angiol.* 2017. T. 26. № 1.
236. Zhang Y., Ma K. L., Ruan X. Z., Liu B. C. Dysregulation of the Low-Density Lipoprotein Receptor Pathway Is Involved in Lipid Disorder-Mediated Organ Injury // *Int. J. Biol. Sci.* 2016. T. 12. № 5. C. 569–579.
237. Zhao B., Li Y., Buono C., Waldo S. W., Jones N. L., Mori M., Kruth H. S. Constitutive Receptor-independent Low Density Lipoprotein Uptake and Cholesterol Accumulation by Macrophages Differentiated from Human Monocytes with Macrophage-Colony-stimulating Factor (M-CSF) // *J. Biol. Chem.* 2006. T. 281. № 23. C. 15757–15762.