

На правах рукописи

Сухоруков Василий Николаевич

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРОАТЕРОГЕННЫХ ДЕГЛИКОЗИЛИРОВАННЫХ
ЛИПОПРОТЕИДОВ С МАКРОФАГАМИ

3.3.3 – Патологическая физиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук **Собенин Игорь Александрович**

Официальные оппоненты:

Соколов Алексей Викторович: доктор биологических наук, старший научный сотрудник Научно-исследовательского отдела биохимических исследований Центра доклинических и трансляционных исследований Института экспериментальной медицины Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А.Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Макаревич Павел Игоревич: кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией генно-клеточной терапии Института регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «28» апреля 2022 г. в 14 ч. 00 мин. на заседании диссертационного совета 24.1.180.01, созданного на базе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», по адресу: 125315, г. Москва, ул. Балтийская, д. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «НИИОПП», а также на сайте <http://www.niiopp.ru/>.

Автореферат разослан «28» марта 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук



Н.Б. Панкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 одними из главных приоритетов мировых медико-биологических исследований [Libby и др., 2019]. В развитие атеросклероза вовлечено 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 вследствие 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 и др., 2016]. При этом минимальной модификацией, которая превращает нативные ЛНП в атерогенные, считается десиалирование, которое является частным случаем процесса дегликозилирования, то есть удаления остатков сахаров 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 и др., 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 инфильтрируются атерогенные ЛНП, которые попадают в клетку в обход рецептора ЛНП через скавенджер рецепторы (SR-A, CD36, LOX-1), то они вызывают избыточное накопление липидов в макрофагах с их превращением в конечном итоге в пенистые клетки [Давлятшина и др., 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 клеточный 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 каким образом 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 пенных 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 исследования: изучить клеточно-молекулярные механизмы взаимодействия дегликозилированных (десиалированных) липопротеидов низкой и высокой плотности с макрофагами.

Задачи исследования

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 сиалирована, 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, EIF2AK3 (PERK), IL15, ANXA1, IL7 и IL7R) приводит к изменению процессов накопления и обратного транспорта холестерина.

Теоретическая значимость

Исследованные в ходе работы гены, ассоциированные с метаболизмом холестерина макрофагов человека, представляют значительный интерес для раскрытия механизмов патогенеза атеросклероза и в дальнейшем могут быть использованы в качестве терапевтических мишеней.

Практическая значимость

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.

Публикация результатов исследования

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), 1 патент и 14 тезисов в сборниках докладов научных конференций.

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).

Структура и объём работы

Диссертация представлена в виде введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 237 наименований. Работа изложена на 125 страницах и сопровождается 16 рисунками и 18 таблицами.

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 транскриптного 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.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Человеческая кровь и клетки

В работе использовали кровь от здоровых и больных атеросклерозом испытуемых. Кровь использовали для выделения клеток первичных моноцитов/макрофагов, а также для выделения ЛНП и ЛВП. Часть работ проведена на линии человеческих макрофагоподобных клеток THP-1.

Работы проведены в соответствии с письмом ВАК «О порядке проведения биомедицинских исследований у человека» (Бюллетень ВАК 2002 г., №3).

Выделение липопротеидов

Суммарную фракцию ЛНП выделяли последовательным ультрацентрифугированием по методу Lindgren [Kahlon, Glines, Lindgren, 1986].

Подфракции липопротеидов выделяли из плазмы одностадийным, изопикническим, неденатурирующим ультрацентрифугированием в градиенте плотности по методу Chapman [Chapman и др., 1981] с модификациями [Guérin и др., 1996].

Измерение активности лецитин-холестерин ацилтрансферазы (ЛХАТ) в ЛВП

Активность ЛХАТ в ЛВП измеряли с использованием флуоресцентного набора для ЛХАТ-активности плазмы (Roar Biomedical, США), по модифицированному протоколу: 50 мкг ЛВП по белку смешивали с реагентами в соответствии с инструкциями производителя.

Определение гликомного профиля липопротеидов

Предварительно 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 VEN Glycan (150 × 2,1 мм), частицы VEN (Ethylene Bridged Hybrid) 1,7 мкм, со 100 mM формиатом аммония, pH 4,4, в качестве растворителя А и ацетонитрилом в качестве растворителя В.

Идентичность N-гликанов, разделенных HILIC-UHPLC-FLD, определяли с помощью времяпролетной масс-спектрометрией с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией.

Получение модифицированных липопротеидов

Для десиалирования ЛНП и ЛВП использовали нейраминидазу GlycoCleave® (EnzymeBeads, Германия). Для дегликозилирования ЛВП использовали бета-галактозидазу (New England Biolabs, США) и ПНГазу F (New England Biolabs, США).

Ацетилирование ЛНП осуществляли по методу Голдштейн и Браун [Goldstein и др., 1979]. Окисление ЛНП проводили по методу Штайнбрехер [Steinbrecher и др., 1989].

Измерение оттока холестерина при помощи ЛВП

Измерение оттока холестерина проводили на моноцитарных клетках человека THP-1 по стандартному методу [Bellanger и др., 2011].

Выделение первичной культуры макрофагов человека

Моноциты выделяли из крови условно здоровых доноров. Сначала выделяли лейкоцитарную фракцию методом центрифугирования в градиенте плотности с использованием раствора фиколла. Далее клетки сортировали с помощью парамагнитных наночастиц MicroBeads к человеческому CD14 (Miltenyi Biotec, Германия) на магнитных колонках (Miltenyi Biotec, Германия)

по инструкции производителя. Моноциты инкубировали в течение 6 дней и использовали в экспериментах.

Нокдаун генов при помощи siRNA

Нокдаун гена ABCA1 в клетках THP-1 достигался трансфекцией плазмидой shRNA SureSilencing (SABiosciences, США) в соответствии с инструкцией производителя. 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). Нокдаун генов *LDLR*, *INSIG1*, *FADS1*, *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). Нокдаун генов подтверждали при помощи ПЦР-РВ.

Накопление внутриклеточного холестерина в макрофагах, вызванное ЛНП

Моноциты THP-1 дифференцировали в макрофагоподобные клетки с 50 нг/мл PMA (Sigma, США) в течение 48 часов. Затем инкубировали в течение 18 ч с десиалилированным ЛНП (100 мкг белка/мл) или нативным ЛНП (100 мкг белка/мл) или 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). Холестерин нормировали на общий клеточный белок, измеренный по методу Лоури [Lowry и др., 1951].

Стимулирование фагоцитоза

К первичным макрофагам человека добавляли латексные шарики размером 1,1 мкм (LB11, Merck, Германия) в концентрации 0,4 мкл/мл и инкубировали в течение ночи.

Секвенирование тотальной РНК

РНК выделяли набором RNeasy Plus Mini kit (Qiagen, Германия); библиотеки РНК-seq подготавливали набором NEBNext Ultra RNA Library Prep (New England Biolabs, США) согласно инструкции производителя. Секвенировали на секвенаторе HiSeq 1500 (Illumina, США) согласно инструкции производителя.

Статистическая обработка данных

Распределения всех переменных анализировали на нормальность с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. 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, Франция).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние десиаляции ЛНП на накопление эфиров холестерина человеческими макрофагоподобными клетками ТНР-1

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 (рис. 1) 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 липопротеида, повышению способности к агрегации и приобретению способности взаимодействовать со скавенджер рецепторами. Согласно литературным данным десиаляция является самым первым событием в ряду атерогенных модификаций ЛНП, включающих в том числе и окислительные модификации частиц ЛНП, следовательно, десиаляция делает ЛНП атерогенными и способствует образованию пенных клеток [Orekhov и др., 2014].

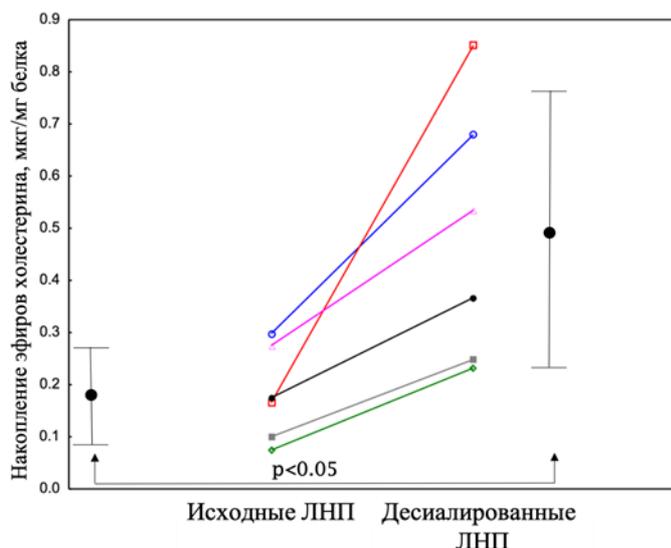


Рисунок 1. Способность вызывать накопление эфиров холестерина в клетках ТНР-1 при инкубации с нативными и обработанными нейраминидазой ЛНП; $n=6$ [Sukhorukov и др., 2019].

Анализ гликанового профиля ЛНП и ЛВП

В результате анализа N-гликанов ЛНП и ЛВП методом HILIC-UHPLC-FLD было выявлено 22 различных хроматографических пика для ЛВП и 18 для ЛНП (рис 2 А и Б). Большинство N-гликанов, присутствующих в ЛВП (~ 70%) и ЛНП (~ 60%), представляли собой сложные сиалированные структуры с одним или двумя остатками сиаловой кислоты. Наиболее распространенными N-гликанами в ЛВП были моно- и десиалированные двухантеннарные структуры A2G2S1 и A2G2S2. Эти данные различаются с данными другого исследования [Huang и др., 2014]., вероятно, из-за различий в методологии выделения ЛВП, а также в отличиях аналитических и/или экспериментальных условий [Vaisar, 2012].

Аналогично, A2G2S1 был наиболее распространенным N-гликаном в N-гликоме ЛВП, 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 резко изменила их N-гликановые профили (рис. 3, А и Б). Относительное содержание пиков, представляющих сиалирированные структуры, уменьшалось при обработке нейраминидазой, тогда как количество пиков, представляющих соответствующие десиазированные структуры, увеличивалось из-за смещения к более раннему времени элюции [Sukhorukov и др., 2019].

Липопротеиды представляют собой высокосиазированные частицы в соответствии с более ранними исследованиями [Huang и др., 2014; Lindbohm, Gylling, Miettinen, 2000]. При десиазации гликановый состав липопротеидов претерпевает значительные изменения. Эти изменения, по всей вероятности, влияют на атерогенные свойства ЛНП и ЛВП.

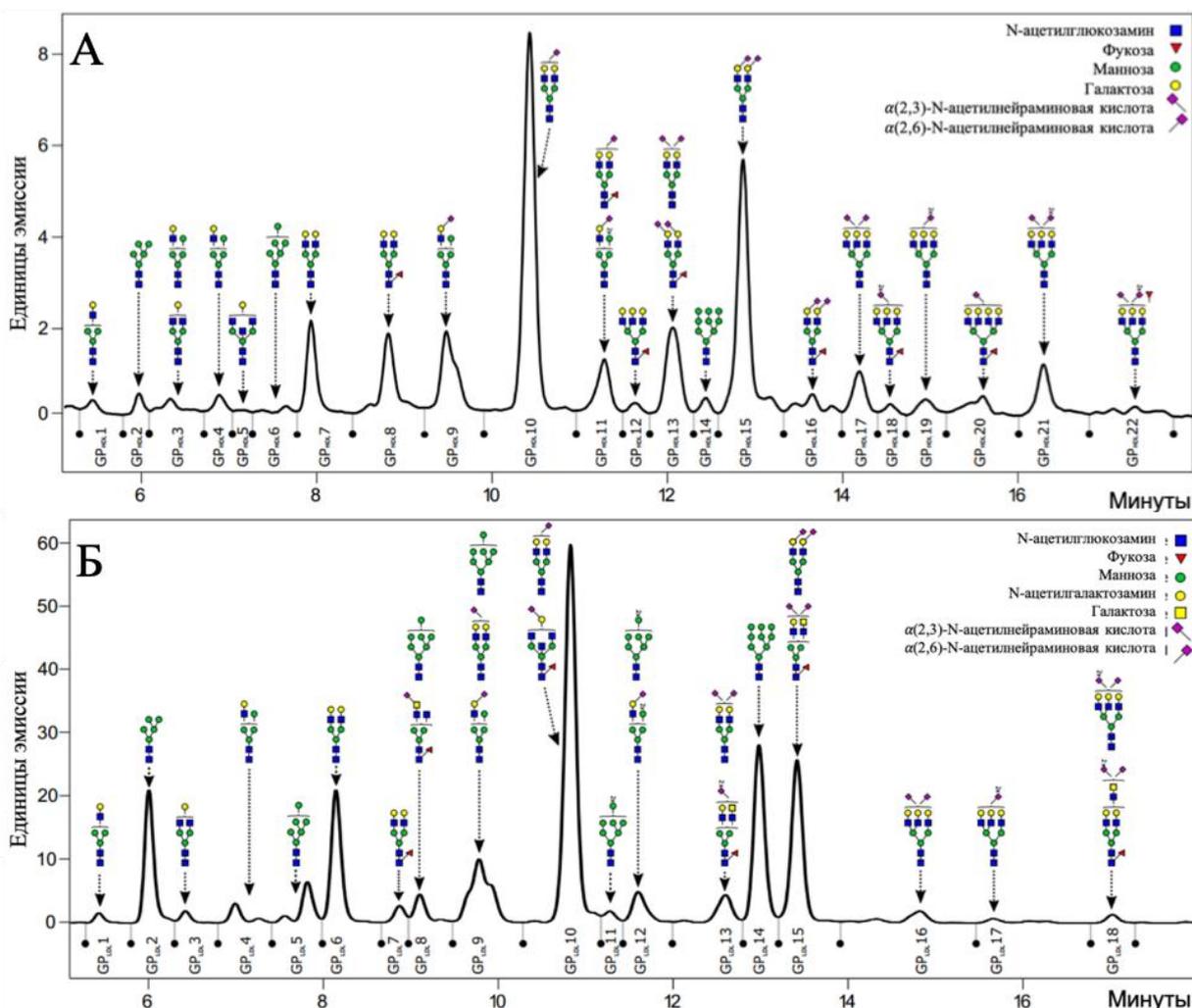


Рисунок 2. Хроматограмма N-связанных гликанов, выделенных из нативных ЛВП (А) и ЛНП (Б). Даны области интеграции вместе с основной структурой, представленной в каждой группе гликанов [Sukhorukov и др., 2019].

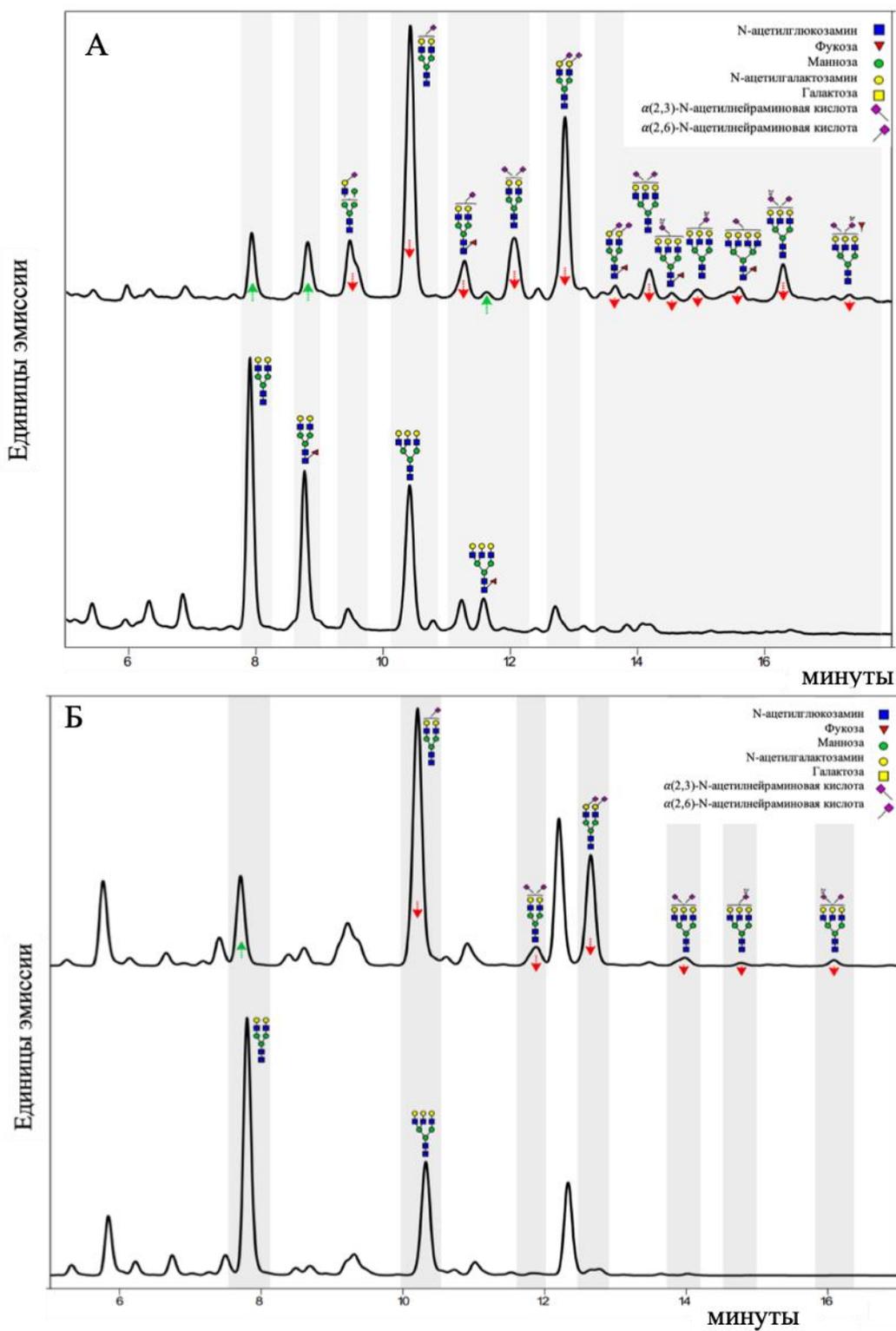


Рисунок 3. Хроматограмма меченных N-связанных гликанов, выделенных из нативных и обработанных нейраминидазой человеческих ЛВП (А) и ЛНП (В). Показана основная структура каждой группы гликанов, которая изменилась после проведения обработки нейраминидазой [Sukhorikov и др., 2019].

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 было обнаружено,

что площадь пика ГП_{ЛНП}16, (сиалилированный N-гликан A3G3S2), положительно коррелировала со способностью десиалированных ЛНП индуцировать накопление эфиров холестерина (табл.1) [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, что соответствует данным других исследований [Orekhov и др., 1989; Mukhin и др., 1990].

Таблица 1. Коэффициенты корреляции между гликомным составом и способностью ЛНП индуцировать накопление эфиров холестерина в клетках [Sukhorukov и др., 2019].

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

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

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

Нативные ЛВП значительно более эффективны в оттоке клеточного холестерина по сравнению с десиалированными ЛВП (рис. 4, А). Напротив, не было существенной разницы в способности нативных и десиалированных ЛВП выводить холестерин из клеток ТНР-1 с нокдауном по гену *SCARB1* или *ABCA1*. Обработка ЛВП бета-галактозидазой десиалированных ЛВП не вызывала дальнейшего снижения способности вызывать отток холестерина. (рис. 4, Б). Обработка только пептид: N-гликозидазой F (ПНГаза F) значительно снижало способность ЛВП к оттоку холестерина (рис. 4, Б).

Активность лецитинхолестеринацилтрансферазы (ЛХАТ) была заметно снижена (на 46%) у десиалированных ЛВП по сравнению с нативными ЛВП (925 ± 412 против 1702 ± 442 нмоль/ч/мл соответственно; $p < 0,01$, $n = 3$).

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., 2017], ЛХАТ [Dobiasova, 1983] и, возможно, апоА-I [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.

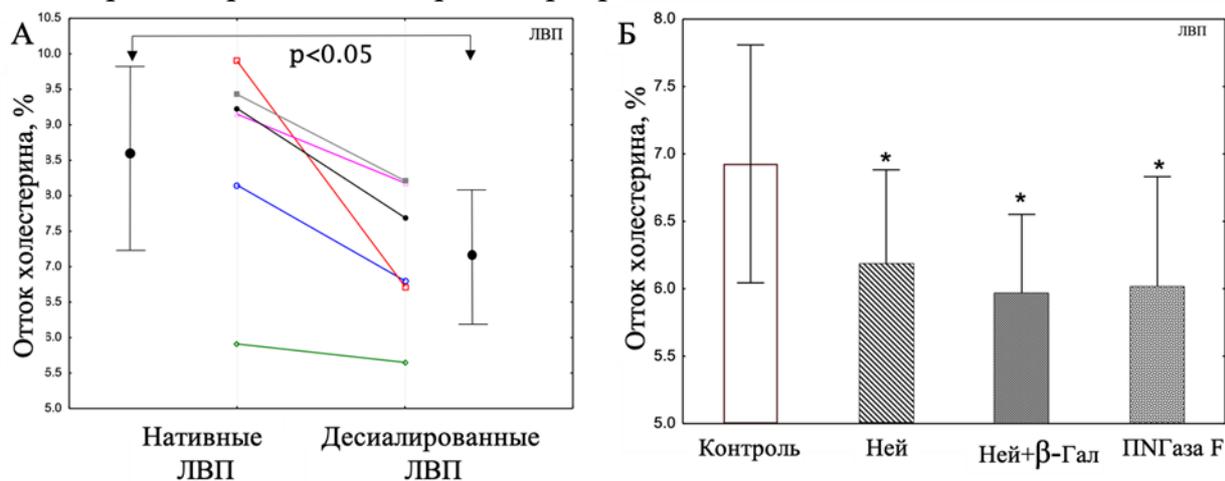


Рисунок 4. Способность вызывать отток клеточного холестерина из макрофагоподобных клеток THP-1 у нативных ЛВП и ЛВП обработанных нейраминидазой ЛВП (А). Способность вызывать отток клеточного холестерина из макрофагоподобных клеток THP-1 у нативных ЛВП и ЛВП обработанных нейраминидазой, β-галактозидазой и ПНГазой F (Б). А: N=6. Б: M ± SE, n = 3; *p < 0,05. t-критерий Стьюдента [Sukhorukov и др., 2019].

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

Положительная корреляция со способностью ЛВП вызывать отток холестерина была показана для пиков, содержащих моно- и десиалилированные 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 (табл. 2). В десиалированных ЛВП 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 (табл. 2) [Sukhorukov и др., 2019].

Полученные данные позволяют предположить, что способность ЛВП вызывать отток холестерина зависит от наличия на поверхности липопротеида сиаловой кислоты, что согласуется с результатами ранних исследований [Harada и др., 1998].

Выявление ключевых сигнальных путей, участвующих в фагоцитозе модифицированных ЛНП

Для выявления ключевых сигнальных путей, участвующих в фагоцитозе модифицированных ЛНП было проведено секвенирование РНК из 21 образца культуры человеческих макрофагов (3 повторности в 7 группах: с добавлением нативных, десиалированных, ацетилованных, 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® [Orekhov и др., 2020a].

Таблица 2. Коэффициенты корреляции между гликомным составом ЛВП и их способностью вызывать отток холестерина из клеток THP-1 [Sukhorukov и др., 2019].

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

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

На рисунке 5 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. При сравнении сигнальных путей с однонаправленной регуляцией при взаимодействии с шариками латекса и атерогенными ЛНП были выявлены общие сигнальные пути (4 было с повышенной регуляцией и 8 с пониженной).

В таблице 3 представлены сигнальные пути с измененной регуляцией при взаимодействии макрофагов с модифицированными ЛНП и шариками латекса. Все сигнальные пути, регулируемые атерогенными ЛНП, имели сходную регуляцию хотя бы с одним сигнальным путем для *in vitro* модифицированных ЛНП. Было обнаружено, что 10 из 12 сигнальных путей регулируются одинаково в случае атерогенных ЛНП и десалирированных ЛНП. Для атерогенных и ацетилованных ЛНП общими были 5 из 12 сигнальных путей. Только 2 из 12 путей были общими для окисленных и атерогенных ЛНП.

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., 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.

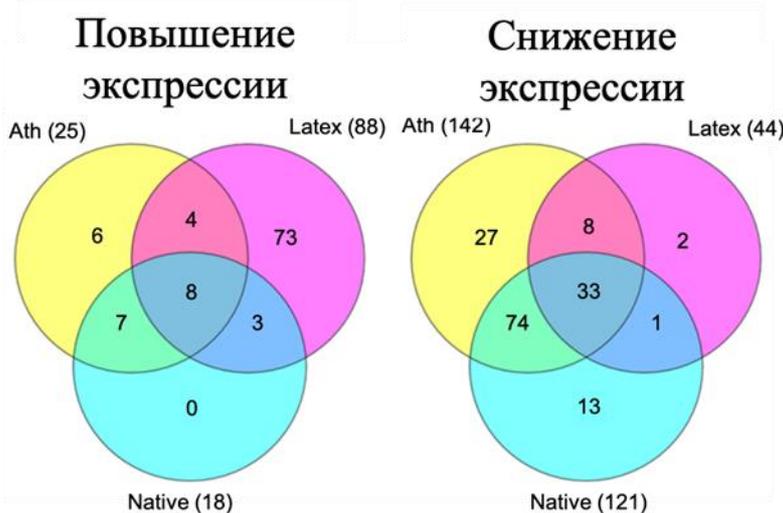


Рисунок 5. Диаграмма Венна для сигнальных путей. *Native* – сигнальные пути, выявленные при инкубации культуры макрофагов с нативными ЛНП. *Ath* – сигнальные пути, выявленные при инкубации культуры макрофагов с естественными атерогенными ЛНП из крови пациентов с атеросклерозом. *Latex* – сигнальные пути, выявленные при инкубации культуры макрофагов с шариками латекса. Количество выявленных сигнальных путей указано в скобках [Orekhov и др., 2020b].

Таблица 3. Сигнальные пути, регулируемые при инкубации макрофагов с шариками латекса и модифицированными ЛНП [Orekhov и др., 2020b].

Модификация	Регуляция экспрессии	Сигнальный путь
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
	повышение	Apo2L pathway

Десиалированные ЛНП		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
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
		Tiam1 → p38alpha TLR2 —Rac1→AKT TLR2-mediated signaling TLR3 pathway TLR9 pathway tuberin pathway VEGF-A pathway
	понижение	Aurora-B cell cycle regulation
Окисленные ЛНП	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.

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

Ранее в результате биоинформационного анализа, выполненного моими коллегами было идентифицировано три мастер-регулятора оттока холестерина из клеток: *FADS1*, *INSIG1* и *LDLR* [Orekhov и др., 2018b].

В моём исследовании оценивали способность ЛВП вызывать отток холестерина после нокдауна генов *LDLR*, *INSIG1*, *FADS1* в клетках THP-1 (рис. 6). Было показано, что нокдаун гена *FADS1* не приводит к изменению оттока холестерина (рис. 6). Далее 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* (рис. 7). При этом экспрессия гена *SCARB1* осталась без изменений во всех трёх типах клеток с нокдауном (рис. 7) [Orekhov и др., 2018b].

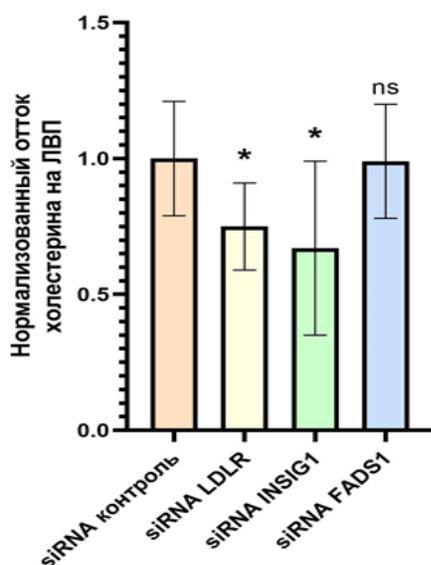


Рисунок 6. Изменение оттока холестерина при нокдауне генов [Orekhov и др., 2018b]. (M ± SE, n = 3; *p < 0,05), t-критерий Стьюдента.

Исходя из проведенных экспериментов можно заключить, что выявленные биоинформационным методом мастер-регуляторы (*LDLR* и *INSIG1*) действительно играют роль в регулировании оттока 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. По литературным данным известно, что подавление экспрессии *INSIG1* и *LDLR* может изменять содержание оксистероинов 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 [Hu и др., 2020; Sørensen и др., 2006; Tekavec и др., 2020].

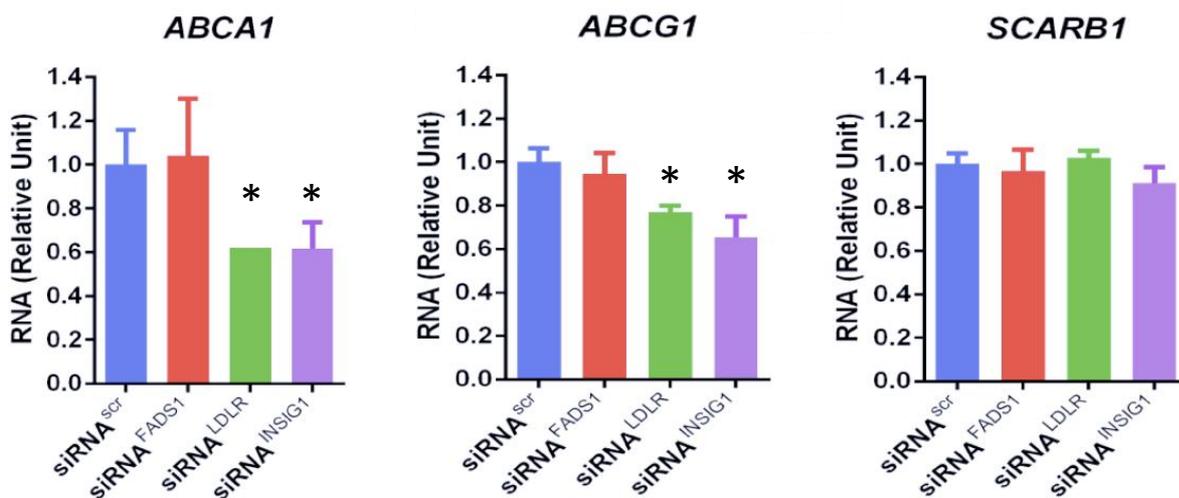


Рисунок 7. Уровень экспрессии генов *ABCA1*, *ABCG1*, *SCARB1* при нокдауне генов *FADS1*, *LDLR* или *INSIG1* в клетках THP-1 [Orekhov и др., 2018b]. ($M \pm SE$, $n = 3$; $*p < 0,05$), t-критерий Стьюдента.

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

Ранее в результате биоинформационного анализа, выполненного моими коллегами было выявлено 10 мастер-генов накопления холестерина: *IL7*, *IL7R*, *IL15*, *ANXA1*, *CXCL8*, *DUSP1*, *EIF2AK3*, *F2RL1*, *TIGIT* и *TSPYL2* [Orekhov и др., 2018a].

При помощи нокдауна 10 выявленных мастер-генов определяли способность этих генов влиять на отток холестерина из клеток первичных моноцитов-макрофагов. При нокдауне генов *PERK*, *IL15* и *ANXA1* (табл. 4-6) макрофаги не накапливают холестерин при инкубации с атерогенными ЛНП.

При нокдауне гена *ANXA1* (табл. 5) 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* (табл. 7 и 8) при инкубации с атерогенными ЛНП. Нокдаун генов *F2RL1*, *TSPYL2* [Orekhov и др., 2020a], *DUSP1*, *TIGIT* и *CXCL8* не приводил к значимому изменению в уровне накопления холестерина при инкубации клеток с атерогенными ЛНП.

Таблица 4. 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 5. 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 6. 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 7. 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 8. 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

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

Согласно общепринятой модели взаимодействие модифицированных ЛНП с макрофагами приводит к образованию пенистых клеток и продукции провоспалительных молекул [Tall, Yvan-Charvet, 2015]. 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 [Orekhov и др., 2021]. ИЛ-7 по нашим неопубликованным данным способствует снижению накопления холестерина в макрофагах, что соответствует наблюдаемому нами эффекту усиления накопления внутриклеточного холестерина при нокдауне генов IL7 и IL7R.

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 указывают данные полученные нами при сравнении активации сигнальных путей при взаимодействии макрофагов с модифицированными ЛНП [Orekhov и др., 2020b; Poznyak и др., 2020]. 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. В результате можно говорить о том, что первичным в этой последовательности является провоспалительный ответ, а не накопление холестерина.

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 ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

Статьи в рецензируемых научных изданиях по специальности 3.3.3 – патологическая физиология и приравненные к ним публикации

1. 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. Т. 320. С. 129–130.
2. **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*. 2020. Т. 8. № 8. С. 262.
3. **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. Т. 8. № 7. С. 210.
4. 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. Т. 9. № 3. С. 584.
5. 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. Т. 21. № 8. С. 2716.
6. 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. Т. 21. № 3. С. 817.
7. **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. Т. 1864. № 5. С. 643–653.
8. 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. Т. 24. № 24. С. 2870–2875.
9. 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. Т. 105. № 2. С. 202–207.
10. **Sukhorukov V. N.**, Karagodin V. P., Zakiev E. R., Grechko A. V., Orekhov A. N. Sialidases: Therapeutic and Antiatherogenic Potential. // *Curr. Pharm. Des.* 2017. Т. 23. № 31. С. 4696–4701.
11. 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. Т. 26. № 1. С. 49-52.

12. 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. Т. 23. № 6. С. 932-936.
13. 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. Т. 12. С. 379-385
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. 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.
16. Рыжкова А. И., Карагодин В. П., **Сухоруков В. Н.**, Сазонова М. А., Орехов А. Н. Десилированные липопротеины низкой плотности в крови человека // *Клиническая медицина.* 2017. Т. 95. № 3. С. 216–221.
17. Патент № 2698199 «Средство для подавления экспрессии генов, связанных с накоплением холестерина макрофагами человека». 2019 год. Карагодин В. П., Орехов А. Н., Колмычкова К. И., Кубекина М. В., Никифоров Н. Г., Закиев Э. Р., Романенко Е. Б., **Сухоруков В. Н.**

Материалы конференций (тезисы)

1. **Vasily Sukhorukov**, Igor Sobenin, Nikita Nikiforov, Alexander Orekhov. Endoplasmic Reticulum Stress Related Genes and the Foam Cell Formation // SAT-1001-2-2. APSAVD 2019, Taipei, Taiwan, September 20-22, 2019
2. **Vasily Sukhorukov**, Alexander Orekhov, Nikita Nikiforov. Genes potentially responsible for intracellular cholesterol accumulation caused by atherogenic modified LDL // European Lipoprotein Club, 42th Annual Meeting, September 9-12, 2019, Tutzing, Germany; С. 42
3. **V. Sukhorukov**, E. Zakiev, I. Sobenin, A. Kontush, M. Iltchuk, A. Novokreshchenova, A. Orekhov. The Role Of Effector Proteins In Cellular Cholesterol Efflux // EAS 2019, Atherosclerosis, Т. 287, e222, August 5, 2019
4. Nikiforov N.G., **Sukhorukov V.N.**, Kubekina M.V., Bukrinsky M.Y., Oishi, A. Orekhov A.N. Modified Ldls Activate Er-Stress-Induced Inflammation In Monocyte-Derived Macrophages // EAS 2019, Atherosclerosis, Т. 287, e82 - e83, August 3, 2019
5. **VN Sukhorukov**, IA Sobenin, NG Nikiforov, E Zakiev, KI Kolmychkova, MV Kubekina, A Kontush, AN Orekhov. RNA Analysis Revealed Genes Related to Cellular Cholesterol Metabolism// The 3rd International Symposium on Frontiers in Molecular Science—RNA Regulatory Networks, June 26-28, 2019; С.95.
6. **Vasily Sukhorukov**, Nikita Nikiforov, Kira Kolmychkova, Igor Sobenin, Marina Kubekina, Alexander Orekhov. Role of inflammation-related genes in macrophage cholesterol accumulation // 25th Annual Scandinavian Atherosclerosis Conference, Krogerup Hojskole, Humlebaek, Denmark, April 10-13, 2019; С.104
7. **Sukhorukov VN**, Orekhov AN, Oishi Y. Transcriptome analysis revealed genes related to cholesterol efflux // The 11th Asian-Pacific Society of Atherosclerosis and Vascular Disease Congress, Iloilo, Philippines, February 27 – March 1, 2018, Abstract.
8. **Sukhorukov V**, Zakiev E, Nikiforov N, Oishi Y, Zhelankin A, Sobenin I, Makeev V, Kontush A, Le Goff W, Foxx K, Kruth H, Jin X, Bukrinsky M, Orekhov A. Transcriptome analysis of human macrophages reveals genes regulating cellular cholesterol efflux // 86th Congress of the European Atherosclerosis Society (EAS), Lisbon, Portugal, May 05-08, 2018, poster SAG19.1. Atherosclerosis 2018, Т. 275: e48.

9. Orekhov AN, **Sukhorukov VN**, Oishi Y. Genes Related to Cholesterol Efflux (Transcriptome Analysis) // International Symposium on Atherosclerosis (ISA), Toronto, Canada, June 09-12, 2018, poster 3.123. Atherosclerosis Suppl 2018, T. 32:124-125.
10. **Sukhorukov V**, Zakiev E, Oishi Y, Kontush A, Orekhov A. Transcriptome analysis of monocyte-derived macro-phages revealed genes associated with cellular cholesterol efflux // European Lipoprotein Club, 41th Annual Meeting, September 10-13, 2018, Tutzing, Germany; p. 81
11. Orekhov AN, Nikiforov NG, **Sukhorukov VN**. Transcriptome analysis of macrophages interacting with lipoproteins // World Congress of Cardiology & Cardiovascular Health 2018, December 5-8, 2018, Dubai, United Arab Emirates; Global Heart 2018, T. 13, №4, C. 411
12. Nikiforov NG, **Sukhorukov VN**, Kubekina MV, Kolmychkova KI, Oishi Y, Orekhov AN. Inflammatory genes regulate cholesterol metabolism // World Congress of Cardiology & Cardiovascular Health 2018, December 5-8, 2018, Dubai, United Arab Emirates; Global Heart 2018, T.13. №4, C. 396
13. **Vasily Sukhorukov**, Maja Pučić Baković, Emile Zakiev, Alexander Orekhov, Anatol Kontush, Gordan Lauc. Glycome of Human Plasma Lipoproteins: High Diversity and Biological Implications // Congrès NSFA 2017, June 21-23, 2017, Biarritz, France; C.52
14. Bakovic MP, **Sukhorukov V**, Zakiev E, Orekhov A, Lauc G, Kontush A. Sialylation of human plasma lipoproteins as a key determinant of biological function // 85th EAS Congress, Prague, Czech Republic, Atherosclerosis, T. 263, e91–e92, August 2017

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ИЛ – интерлейкин

ИНФ гамма – интерферон гамма

ЛВП – липопротеиды высокой плотности

ЛНП – липопротеиды низкой плотности

ЛХАТ – лецитинхолестеринацилтрансфераза

ммЛНП – множественно-модифицированные ЛНП

ПЦР-РВ – ПЦР в реальном времени

ПНГаза F – пептид-N-гликозидаза F

РНБ – реакция несвернутых белков

ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания

ФНО – фактор некроза опухоли

ЭПР стресс – стресс эндоплазматического ретикулума

A2G2S1 – 2 ветви с 2 галактозами и с одной сиаловой кислотой

A2G2S2 – 2 ветви с 2 галактозами и двумя сиаловыми кислотами

ABCA1 – АТФ-связывающий кассетный транспортер A1

ABCG1 – АТФ-связывающий кассетный транспортер G1

ANXA1 – ген, кодирующий белок аннексин A1, связывающий ионы кальция и фосфолипиды

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

IL15 – ген кодирующий ИЛ-15

IL7 – ген, кодирующий ИЛ-7

IL7R – ген, кодирующий рецептор к ИЛ-7

INSIG1 – ген, регулирующий концентрацию холестерина в клетке.

LDLR – ген, кодирующий рецептор к ЛНП

LXR – X-рецептор печени

PERK – протеин киназа, активирующая РНБ и ЭПР стресс

SCARB1 – скавенджер рецептор класс В тип 1