

## Анализ транскриптома макрофагов при атерогенезе

Кубекина М. В.<sup>1,3</sup>, Никифоров Н. Г.<sup>1,2,3</sup>, Карагодин В. П.<sup>4</sup>, Собенин И. А.<sup>2</sup>, Орехов А. Н.<sup>3,5</sup>

Накопление холестерина под влиянием модифицированных липопротеидов низкой плотности является ключевым событием атерогенеза. Известно, что атеросклероз сопровождается хроническим локальным воспалением. Моноциты/макрофаги, ключевые клетки врожденного иммунитета, способны не только захватывать и накапливать липиды в сосудистой стенке, но и секретировать сигнальные молекулы, влияющие на функции других клеток. Для атеросклеротического поражения характерна неспособность благополучно завершить воспалительный ответ, вследствие чего воспаление становится хроническим и вялотекущим. Внутриклеточное накопление липидов является необходимым условием инициации атерогенеза, однако неизвестно, является ли оно достаточным. Анализ транскриптома и биоинформатический аппарат позволили охарактеризовать состояние макрофагов, нагруженных липидами. Исследования, представленные в настоящем обзоре, показывают, что реакция врожденного иммунитета способствует накоплению внутриклеточных липидов и усугубляет его.

Российский кардиологический журнал. 2019;24(2):92–98  
<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2019-2-92-98>

**Ключевые слова:** атеросклероз, макрофаги, транскриптомный анализ, активация, липопротеиды низкой плотности, экспрессия генов.

**Конфликт интересов:** не заявлен.

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 18-34-00997).

<sup>1</sup>Институт биологии гена Российской академии наук, Москва; <sup>2</sup>ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Минздрава

России, Москва; <sup>3</sup>ФГБНУ Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва; <sup>4</sup>Российский экономический университет им. Г. В. Плеханова, Москва; <sup>5</sup>Научно-исследовательский институт атеросклероза, Инновационный центр Сколково, Сколково, Россия.

Кубекина М. В.\* — аспирант, м.н.с., ORCID: 0000-0002-8834-1111, Никифоров Н. Г. — м.н.с., ORCID: 0000-0002-2082-2429, Карагодин В. П. — д.б.н., профессор кафедры товароведения и товарной экспертизы, ORCID: 0000-0003-0501-8499, Собенин И. А. — д.б.н., г.н.с. лаборатории медицинской генетики, ORCID: 0000-0003-0978-6444, Орехов А. Н. — д.б.н., зав. лаборатории клеточных механизмов атерогенеза, ORCID: 0000-0002-6495-1628.

\*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):  
 marykumy@gmail.com

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, ЛНП — липопротеиды низкой плотности, ЛПС — липополисахарид, ПЦР — полимеразная цепная реакция, РНК — рибонуклеиновая кислота, ТДМ — технология ДНК микрочипов, ТСНП — технология секвенирования нового поколения, CD — кластер дифференциации, MR — маннозный рецептор, SRC — не связанная с клеточным рецептором тирозинкиназа, TLR — толл-подобный рецептор.

Рукопись получена 01.07.2018

Рецензия получена 28.08.2018

Принята к публикации 15.11.2018



## Analysis of macrophage transcriptome in atherogenesis

Kubekina M. V.<sup>1,3</sup>, Nikiforov N. G.<sup>1,2,3</sup>, Karagodin V. P.<sup>4</sup>, Sobenin I. A.<sup>2</sup>, Orekhov A. N.<sup>3,5</sup>

The accumulation of cholesterol under the influence of modified low density lipoprotein is a key cause of atherogenesis. It is known that atherosclerosis is accompanied by chronic local inflammation. Monocytes/macrophages, main cells of the innate immunity, may not only capturing and accumulating lipids in the vascular wall, but also secreting signaling molecules that affect the functions of other cells. An atherosclerotic lesion is characterized by the inability to complete the inflammatory response, as a result of which the inflammation becomes chronic. Intracellular lipid accumulation is a necessary condition for the initiation of atherogenesis, but it is not known whether it is sufficient. Analysis of the transcriptome allowed us to characterize the state of macrophages loaded with lipids. Studies presented in this review show that the reaction of innate immunity contributes to the accumulation of intracellular lipids and aggravates it.

Russian Journal of Cardiology. 2019;24(2):92–98  
<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2019-2-92-98>

**Key words:** atherosclerosis, macrophages, transcriptome analysis, activation, low density lipoproteins, gene expression.

**Conflicts of Interest:** nothing to declare.

**Funding.** This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (№ 18-34-00997).

<sup>1</sup>Institute of Gene Biology, Moscow; <sup>2</sup>National Medical Research Center of Cardiology, Moscow; <sup>3</sup>The Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow; <sup>4</sup>Plekhanov Russian University of Economics, Moscow; <sup>5</sup>Scientific Institute of Atherosclerosis Research, Skolkovo, Russia.

Kubekina M. V. ORCID: 0000-0002-8834-1111, Nikiforov N. G. ORCID: 0000-0002-2082-2429, Karagodin V. P. ORCID: 0000-0003-0501-8499, Sobenin I. A. ORCID: 0000-0003-0978-6444, Orekhov A. N. ORCID: 0000-0002-6495-1628.

**Received:** 01.07.2018 **Revision Received:** 28.08.2018 **Accepted:** 15.11.2018

Активность иммунной системы регулируется ее врожденной составляющей, включающей, в первую очередь, макрофаги [1]. Как известно, любое изменение в микроокружении живой клетки сопровожда-

ется изменениями ее транскрипционных программ. Если изменение внешних условий имеет патологический и длительный характер, то адаптация клетки будет сопровождаться значительным изменением

экспрессии генов, ассоциированных с внешним патологическим процессом. Атеросклероз сопровождается хроническим локальным вялотекущим воспалением. Макрофаги, попадающие в атеросклеротическое поражение, захватывают и впоследствии накапливают частицы модифицированных липопротеидов низкой плотности (ЛНП), что приводит к формированию пенистых клеток. Накопление холестерина в интима артерий является ключевым событием атерогенеза. Изучение транскриптома нагруженных липидами макрофагов позволит установить причинно-следственные связи между липидозом и иммунным ответом.

### Фенотипы макрофагов в атерогенезе

Важнейшей структурной особенностью макрофагов является хорошо развитая система, состоящая из большого количества лизосом и фагосом. Основные структурные и функциональные изменения моноцитов во время их развития включают следующие процессы [2]:

1. Существенное увеличение размеров клеток (до 25-50 мкм), увеличение числа митохондрий, пиноцитозных пузырьков (особенно лизосом), увеличение комплексов Гольджи;

2. Изменение клеточных мембран, сопровождающееся увеличением их складчатости и количества рецепторов к IgG;

3. Повышение активности метаболических и лизосомальных ферментов и одновременное снижение активности пероксидазы;

4. Повышение подвижности клеток, их способности к адгезии, пино- и фагоцитозу, а также бактерицидной функции;

5. Изменение чувствительности к гормонам.

Макрофаги способствуют развитию врожденного иммунного ответа на вторжение патогенных микроорганизмов путем их фагоцитоза, распознаванию патоген-ассоциированных молекулярных паттернов, секреции активирующих другие иммунные клетки белков и презентации антигенов лимфоцитам [3, 4].

M1 и M2 — два основных типа активации макрофагов [5]. Они зависят от цитокинов, которые производят Т-хелперы 1 и 2 типов, соответственно. Классическая активация (M1) происходит в ответ на провоспалительные стимулы, например, интерферон- $\gamma$  или липополисахарид (ЛПС). При M1 происходит секреция активных форм кислорода и провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухоли и интерлейкин-1, -6, -12, а также экспрессия Fc- $\gamma$  рецепторов 1, 2, 3. В результате влияния противовоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-4, -10, -13, и трансформирующего фактора роста бета происходит альтернативная активация (M2) [5]. При альтернативной активации макрофагов экспрессируются противовоспалительные цитокины: антагонист

рецептора интерлейкин-1, -10, CCL18, а также рецептор гаптоглобина CD163, маннозный рецептор (MR) и стабиллин-1 [6].

Была изучена локализация M1 и M2 макрофагов в различных типах атеросклеротических поражений. Эти фенотипы обнаружены в различных типах атеросклеротических поражений, причем в различных областях. M1 и M2 фенотипы преобладают в нестабильных поражениях, по сравнению со стабильными бляшками. M1 макрофаги представлены в большом количестве в плечевых областях бляшек, подверженных разрыву, при этом в фиброзных покрышках не было обнаружено существенной разницы между количеством M1 и M2 клеток. Во внешнем слое артериальной стенки (адвентиции) было обнаружено большое количество M2 макрофагов. При этом маркеры как M1, так и M2 фенотипов экспрессировали макрофаги, нагруженные липидами [7].

Изучена связь между стабильностью атеросклеротических бляшек сонных артерий и количеством M1 и M2 макрофагов в поражениях. В данном исследовании были сформированы 2 группы испытуемых: с симптоматическим и с бессимптомным атеросклерозом. Оказалось, что в поражениях у лиц из симптоматической группы было повышенное содержание M1 макрофагов, а в поражениях у лиц из бессимптомной группы — повышенное количество M2 макрофагов. M1 фенотипы макрофагов были обнаружены только в поражениях пациентов с симптоматическим атеросклерозом [8].

Кроме M1 и M2 в атеросклеротических поражениях могут быть обнаружены также и другие фенотипы макрофагов. Это прежде всего M(Hb), Mhem и M4 [9], накапливающие липиды в атеросклеротическом поражении гораздо в меньшей степени, чем M1 и M2 [10].

В ответ на изменения в микроокружении макрофаги способны изменять фенотип, на что указывают результаты исследований. В атеросклеротических поражениях были обнаружены макрофаги с различными фенотипами. Однако существование различных фенотипов макрофагов в непосредственной близости друг от друга вызывает ряд вопросов. Существуют данные о том, что макрофаги в атеросклеротических поражениях секретируют молекулы, характерные для промежуточных между M1 и M2 фенотипов [11].

Обычно в атеросклеротическом поражении морфологически представлены все основные его типы, и поэтому условия в бляшке нельзя считать однородными. Фенотип макрофагов подвержен влиянию многих внешних факторов: цитокинов, кристаллов холестерина, модифицированных ЛНП, жирных кислот, иммунных комплексов. Несколько десятилетий назад было показано присутствие провоспалительных макрофагов M1 в атеросклеротическом

поражении, но при этом альтернативно активированные макрофаги M2 найдены относительно недавно [12]. Положительно окрашенные на CD68 и MR M2 макрофаги впервые были найдены в периферийных областях атеросклеротической бляшки, а также в более стабильных её областях. Эти макрофаги обнаружены в областях с высоким содержанием интерлейкина-4. Макрофаги CD68+ и MR+ имели меньшее количество и меньшие по размеру липидные включения по сравнению с CD68+ MR- макрофагами [13-15].

Изучена способность макрофагов, нагруженных холестерином, активироваться в про- и противовоспалительном направлениях. Пеннистые клетки образовались после добавления в культуру ацетилованных ЛНП. Макрофаги, нагруженные холестерином, при провоспалительной стимуляции в меньшей степени экспрессировали маркеры воспаления, по сравнению с контрольными макрофагами. При этом, при стимуляции клеток противовоспалительными стимулами эти макрофаги и контрольные клетки не отличались по экспрессии противовоспалительных маркеров [16].

Исходя из вышесказанного, фенотипы макрофагов в атеросклеротической бляшке нельзя разделить на определенные подмножества. Более вероятно, что формирование фенотипов происходит под влиянием микроокружения и активации особых внутриклеточных сигнальных путей в ответ на внешние изменения. Макрофаги стоит рассматривать как клетки, проявляющие широкий спектр фенотипов и, соответственно, функций. Выявлена связь между провоспалительно активированными макрофагами и развитием нестабильных атеросклеротических поражений, при этом противовоспалительно активированные макрофаги связывают с репаративными функциями и стабильными поражениями.

Вышеизложенное наводит на мысли, что дифференцировка макрофагов на специфические фенотипы не может не сказаться на их транскриптоме, который на данный момент активно применяется в биологии и медицине для измерения экспрессии генов, так или иначе вовлеченных в патологический процесс.

Транскриптомный анализ макрофагов различных фенотипов, а также макрофагов, нагруженных холестерином, позволит выявить ключевые транскрипционные программы, ответственные за атерогенез.

#### **Исследование патологий человека с помощью транскриптомного анализа**

В последние десятилетия исследования транскриптомов являются одним из наиболее современных подходов к исследованию заболеваний человека на молекулярном уровне. Через исследования экспрессии генов были обнаружены многие молекуляр-

ные биомаркеры и терапевтические мишени для нескольких патологий человека. И их число постоянно растет. Технология анализа транскриптома позволяет количественно определять уровни экспрессии генов и аллель-специфическую экспрессию в одном эксперименте, а также идентифицировать новые гены, изоформы сплайсинга, исследовать некодирующие РНК. Эти исследования продолжают путь к выявлению новых маркеров заболеваний и молекулярных мишеней для использования в клинической практике.

Транскриптом содержит полную информацию обо всех РНК, транскрибируемых геномом в определенной ткани или клеточном типе, на определенной стадии и при определенном физиологическом или патологическом состоянии [17]. Таким образом, анализ транскриптома не только позволяет нам понять геном человека на уровне транскрипции, но также обеспечивает понимание структуры и функции гена, регуляции экспрессии генов и пластичности генома. Что еще более важно, он может раскрывать ключевые изменения биологических процессов, вызывающих болезни человека, тем самым предлагая новые инструменты, полезные не только для понимания их основных механизмов, но также для их молекулярной диагностики и клинической терапии.

Анализ дифференциально экспрессирующихся генов как транскрипционного ответа генома на различные экологические раздражители или физиологические/патологические состояния всегда был одной из основных целей исследований транскриптома [17]. Первый подход к исследованию транскриптома человека начался с публикации базы данных с EST человека, коротких последовательностей клонов кДНК, полученных с помощью первых секвенсоров ДНК. Впоследствии с помощью других методов, таких как SAGE (последовательный анализ экспрессии генов) и технология ДНК микрочипов (ТДМ), с использованием комплементарной гибридизации зонда, ученые пытались количественно определить экспрессию генов на глобальной основе. Многие важные дифференциально экспрессирующиеся гены, относящиеся к ключевым молекулярным путям, были идентифицированы в нескольких патологиях человека посредством этих стратегий; в частности, в последующие годы применение ТДМ оказалось ценным и стало наиболее часто используемым для исследования транскрипции, хотя первоначально оно показало некоторые недостатки в отношении количественной оценки [18]. Метод количественной ПЦР с обратной транскрипцией (qRT-PCR) часто применялся для проверки результатов высокопроизводительных платформ [19]. Действительно, этот метод считается золотым стандартом для измерения уровня транскрипции, поскольку он является быстрым, надежным, воспроизводимым, чувствительным и точным.

Но при этом, данный метод может предоставлять неполные или вводящие в заблуждение данные, если присутствуют альтернативные изоформы сплайсинга; в этих случаях правильная конструкция праймеров становится важнейшим шагом в процедуре валидации [20]. Интересно отметить, что в клинических условиях было разработано несколько анализов qRT-PCR для диагностики и прогнозирования, мониторинга лечения, выявления патогенов и биологии трансплантата [21]. По-видимому, новый метод цифровой полимеразной цепной реакции (dPCR) может стать новым золотым стандартом, поскольку он позволяет лучше определять уровни всех нуклеиновых кислот, включая транскрипты. Действительно, несколько коммерческих устройств dPCR уже доступны, а некоторые другие устройства находятся в разработке; они основаны на разных принципах дисперсии, амплификации и количественной оценки образцов, и позволяют дать абсолютную количественную оценку мишенной микроРНК (miRNA), а также проверку последовательности РНК (РНК-Seq) [22]. Кроме того, несмотря на некоторую озабоченность по поводу воспроизводимости, различные анализы на основе микрочипов, измеряющие несколько целей РНК за один раз, также стали доступны для клинического применения. Эти многогранные панели имеют широкое клиническое применение и особенно используются в качестве диагностической поддержки в онкологии в сочетании с клинико-патологическими факторами для прогнозирования рецидива заболевания и ответа на различные виды лечения.

Общая схема анализа транскриптома активированных макрофагов включает несколько этапов:

- 1) Получение образцов биологического материала индивидов;
- 2) Выделение РНК;
- 3) Синтез кДНК;
- 4) Создание кДНК библиотек;
- 5) Анализ полного транскриптома.

Дополнительно, данные могут быть обработаны такими методами, как:

- ПЦР-анализ генов-кандидатов;
- Гибридизация микрочипов с генами;
- Секвенирование нового поколения.

Современные технологии анализа полного транскриптома включают ДНК-микрочипы и секвенирование транскриптома. Они позволяют за короткий промежуток времени сравнить уровень экспрессии десятков тысяч генов. Параллельный сравнительный анализ экспрессии генов позволяет проследить все закономерности изменений и определить меж- и внутриклеточные сигнальные пути. Использование методов системной биологии может помочь понять, каким образом те или иные клетки вовлечены в патогенетические механизмы, которые приводят к заболеваниям у людей.

С начала 21 века повсеместно для анализа транскриптов начала использоваться ТДМ. Данная технология основана на принципах комплементарной гибридизации. Используемый носитель может быть как нитроцеллюлозной мембраной, так и из натуральных материалов. Последовательности ДНК помещают в строго определенном порядке на носители и проводят гибридизацию с флуоресцентными ДНК-зондами. Среди флуоресцентных красителей, в основном, используются Cy3-dUTP и Cy5-dUTP, которые обладают высоким процентом встраивания, хорошей фотостабильностью, высоким квантовым выходом и значительными отличиями в спектрах возбуждения и флуоресценции [18].

После сканирования предварительно гибридизованных микрочипов получается набор данных уровня интенсивности флуоресценции в каждом пикселе аналогичного образа подобного микрочипа. Специальное программное обеспечение отличает пиксели, соответствующие точкам с зондами, и фоновые пиксели. Дифференциальная экспрессия различных генов детектируется программой, согласно интенсивности флуоресценции отдельного пятна.

Технология секвенирования нового поколения (ТСНП) является одной из новейших разработок в области молекулярной биологии. Данная технология, в различных вариантах, была разработана в 2005г компаниями 454 Life Sciences и Illumina. В 2008г ТСНП была использована для анализа транскриптома [23]. С тех пор эта технология широко используется и к 2013г оценка активности транскрипции гена была применена уже более чем в 1500 исследованиях.

В настоящее время для секвенирования транскриптома используются три основные платформы: Illumina, 454 Life Sciences и SOLiD. Эти платформы применяют различные стратегии подготовки ДНК, секвенирования и визуализации данных:

- 1) Секвенирование путем синтеза (Illumina);
- 2) Секвенирование путем лигирования (SOLiD);
- 3) Пиросеквенирование (454 Life Sciences).

Технические и методологические особенности различных секвенаторов рассмотрены в статье Farkas и Grant [24].

ТСНП имеет несколько преимуществ по сравнению с микрочипами, которые, в основном, использовались последние 15 лет. В технологии микрочипов набор проанализированных генов предопределен на основе уже известных данных о геноме исследуемого организма. В то же время с помощью ТСНП происходит определение уровня транскрипции гена. При этом нет необходимости предоставлять данные о его первичной структуре. Эта технология позволяет детектировать транскрипт с разницей в один нуклеотид и может быть использована для выявления однонуклеотидных замен в геноме и анализа альтернативного сплайсинга и созревания РНК [25].

ТСНП обладает очень низким уровнем фона. Динамический спектр и чувствительность данной технологии выше, чем у ДНК-микрочипов, которые обеспечивают измерение широкого спектра уровней экспрессии генов. Результаты секвенирования с помощью ТСНП обладают высоким уровнем воспроизводимости. Кроме того, ТСНП не требует различных экспериментов по стандартизации таких параметров, как нелинейный эффект, обычный для микрочипов, из-за химического и оптического насыщения реакции гибридизации [26].

В отличие от ТДМ, при которой анализируются известные последовательности РНК организма, при секвенировании полного транскриптома с помощью ТСНП можно получить данные обо всем транскрипционном содержании генома. По сравнению с микрочипами, полное секвенирование транскриптома обеспечивает объективное цифровое считывание данных с более широким количественным динамическим диапазоном и улучшенное распознавание на крайних значениях количественного спектра. Секвенирование транскриптома позволяет выявить не только РНК, кодирующие белки, и транспортные РНК, но и некодирующие РНК (микро- и интерферирующие РНК). Кроме того, анализ полного транскриптома облегчает идентификацию данных альтернативного сплайсинга и транскрипционных изоформ, а также содействует обнаружению новых генов. Определение уровня экспрессии различных генов позволяет провести корреляцию между экспрессией генов и фенотипом.

#### **Изменения транскриптома макрофагов в процессе их дифференцировки**

Дифференцировка моноцитов в макрофаги, обусловленная М-CSF, сопровождается значительными изменениями в профилях экспрессии генов. Большая часть изменений в культивируемых моноцитах происходит в течение первых 3 дней, экспрессия некоторых генов может вернуться к исходному уровню. Исследуя транскриптом с помощью анализа микрочипов, Martinez и др. показали значительные (>3 раз) изменения уровней экспрессии 868 транскриптов (2,2% от общего транскриптома) при дифференцировке моноцитов и макрофагов. Из них уровни экспрессии 390 (1%) генов были изменены только во время процесса дифференцировки, но вернулись к базальным уровням в полностью дифференцированных макрофагах. Это гены белков, регулирующих клеточный цикл, такие как циклины; белков, сгруппированных вокруг циклинзависимой киназы 1, хемокинов, и кластер генов, связанный с снижением регуляции человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) [27].

Martinez и др. обнаружили второй кластер из 478 генов (1,2%) со значительными изменениями экспрессии во время дифференцировки, которые сохра-

няются в зрелых макрофагах. Эти гены, вероятно, участвуют в индукции и поддержании специфических особенностей макрофагов. Это гены белков IL-1 $\beta$ , IL-8 и ApoE [27].

Наиболее выраженные изменения коснулись экспрессии генов, участвующих в липидном обмене [27]. Метаболизм липидов играет решающую роль в функции макрофагов, поскольку макрофаги реагируют и выделяют широкий спектр биоактивных липидных продуктов [28]. В частности, дифференцировка влияет на профили экспрессии ферментов, участвующих в биосинтезе эйкозаноидов и связанных с постепенным снижением циклооксигеназы 1 и 2, лейкотриен-А4-гидролазы и арахидонат-5-липоксигеназы. Вероятно, снижающаяся регуляция ферментов, участвующих в производстве эйкозаноидов, при созревании макрофагов, отражает неактивное состояние макрофагов M0.

С помощью современных технологий анализа транскриптома существует возможность выявить гены, участвующие в различных стадиях активации макрофагов. Например, исследователь из Австралии Zhang YP сосредоточился на изменениях в количестве транскриптов, связанных с функционированием иммунной системы. В результате исследования транскриптома микобактерий с высокой кратностью заражения удалось определить базовую модель патогеноспецифичной экспрессии генов. Были выявлены два интегрин (ITGA5 и ITGAV), которые оказались неизвестными ранее мембранными рецепторами, опосредующими захват макрофагами микобактерий с высокой кратностью заражения. Zhang YP сделал вывод о том, что гены не связанных с клеточным рецептором тирозинкиназ (SRC) играют центральную роль в регулировании нескольких уникальных сигнальных путей, активируемых при инфекции *Mycobacterium tuberculosis*. Ученым удалось выявить перекрестные биохимические пути между сигнальным каскадом толл-подобного рецептора 4 (TLR4) и тремя факторами транскрипции NF- $\kappa$ B, C/EBP Omega и ATF3 [29].

SRC участвует во многих внутриклеточных сигнальных путях, инициированных разнообразным набором рецепторов от интегринов до TLR [29]. SRC-тирозинкиназы передают интегринозависимые сигналы для пролиферации клеток и их перемещения. Обнаруженные мишени могли бы стать кандидатами для многоцелевой антимикобактериальной терапии.

Кроме того, был осуществлен количественный фосфопротеомный анализ при обработке ЛПС. Выявлены высокодинамичные процессы фосфорилирования в некоторых сигнальных путях и за их пределами, которые могли быть связаны с киназами, как действующими по общепринятым TLR-путям, так и участвующими в регулировании клеточного цикла (ATM/ATR киназами) и росте клеток (mTOR киназами). Не было обнаружено изменения уровней экс-

прессии транскриптов или белков, однако выявлено улучшение секреции с помощью пузырьков и экзо-сом, специально индуцированных ЛПС. В этом отношении представляет интерес белок Grnmb, участвующий в подавлении провоспалительных цитокинов и маркеров белка для меланосом. Полагают, что образование меланосом и секреция являются неотъемлемой частью врожденного иммунного ответа [29].

### Транскриптом нагруженных холестерином макрофагов

Нами было проведено исследование транскриптома макрофагов, инкубированных с окисленными и ацетилированными ЛНП для оценки влияния накопления холестерина при взаимодействии с модифицированными ЛНП на экспрессию генов. Инкубация модифицированных ЛНП с макрофагами отразилась на активности нескольких сотен генов макрофагов. Были идентифицированы связанные с накоплением липидов гены, многие из которых связаны с функцией врожденного иммунитета. Это наводит на мысли, что активация макрофагов происходит при накоплении холестерина в процессе инкубации их с модифицированными ЛНП. Были отобраны 27 факторов транскрипции, потенциально ответственные за изменения экспрессии генов в макрофагах под влиянием модифицированных ЛНП. Гены, активность которых существенно изменяется при взаимодействии макрофагов с модифицированными ЛНП, удалось обнаружить с помощью транскриптомного анализа. Значительно изменялась активность генов, непосредственно вовлеченных в процессы воспаления. Благодаря транскриптомному анализу, проведенному в данной работе, выявлены гены-регуляторы, влияющие на накопление внутриклеточного холестерина. Было идентифицировано 9 генов, потенциально ответственных за накопление холестерина макрофагами человека: *IL7R*, *IL7*, *TIGIT*, *CXCL8*, *F2RL1*, *TSPYL2*, *ANXA1*, *DUSP1* и *IL15*.

Удивительно, но ни один из выявленных генов непосредственно не участвует в метаболизме холестерина. Семь из девяти генов вовлечены в иммунный

ответ. Полученные данные свидетельствуют о том, что взаимодействие макрофагов с модифицированными ЛНП запускает повышение экспрессии выявленных генов, которые влияют и кардинальным образом меняют внутриклеточный метаболизм холестерина. Такое изменение приводит к внутриклеточному накоплению липидов.

### Заключение

Транскриптомный анализ подводит нас к новой эре исследований заболеваний человека. Он позволяет диагностировать заболевания, прогнозировать рецидив заболевания, изучать ответ на различные виды лечения. С помощью транскриптомного анализа удалось установить изменения в экспрессии генов макрофагов при взаимодействии их с модифицированными ЛНП и определить ключевые маркеры, которые характеризуют различные фенотипы макрофагов, присутствующих при атеросклеротических поражениях. Выявлены гены, на активность которых влияет взаимодействие макрофагов с модифицированными ЛНП и гены, связанные с накоплением липидов. Установлено, что взаимодействие макрофагов с ЛНП может приводить к активации макрофагов.

Вырисовывается очевидная значимость анализа транскриптома макрофагов для понимания механизмов атеросклероза. С его помощью определены ключевые изменения в экспрессии генов макрофагов, ведущие к накоплению ими липидов. Целесообразно и дальше развивать данный метод анализа, и, возможно, в будущем анализ транскриптома макрофагов также обретет прогностическую значимость, и с его помощью можно будет устанавливать течение атеросклероза, степень его тяжести, оценивать эффективность терапии.

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 18-34-00997).

**Конфликт интересов:** все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

### Литература/References

- Gratchev AV, Sobenin IA, Orekhov AN, et al. Monocytes as a diagnostic marker of cardiovascular diseases. *Immunobiology*. 2012;217(5):476-82. doi:10.1016/j.imbio.2012.01.008.
- Chistiakov DA, Bobryshev YV, Orekhov AN. Macrophage-mediated cholesterol handling in atherosclerosis. *J Cell Mol. Med.* 2016;20(1):17-28. doi:10.1111/jcmm.12689.
- Orekhov AN, Nikiforov NG, Elizova NV, et al. Phenomenon of individual difference in human monocyte activation. *Exp. Mol. Pathol.* 2015;99(1):151-4. doi:10.1016/j.yexmp.2015.06.011.
- Gratchev A, Ovsy I, Manousaridis I, et al. Novel Monocyte Biomarkers of Atherogenic Conditions. *Curr. Pharm. Des.* 2013;19(33):5859-64.
- Varin A, Gordon S. Alternative activation of macrophages: immune function and cellular biology. *Immunobiology*. 2009;214:630-41. doi:10.1016/j.imbio.2008.11.009.
- Brocheriou I, Maouche S, Durand H, et al. Antagonistic regulation of macrophage phenotype by M-CSF and GM-CSF: implication in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2011;214:316-24. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2010.11.023.
- Stöger JL, Gijbels MJ, van der Velden S, et al. Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2012;225(2):461-8. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2012.09.013.
- Cho KY, Miyoshi H, Kuroda S, et al. The phenotype of infiltrating macrophages influences arteriosclerotic plaque vulnerability in the carotid artery. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2013;22(7):910-8. doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2012.11.020.
- Aladinsky VA, Nikiforov NG, Orekhova VA, et al. Direct antiatherosclerotic therapy: possible approaches, results of clinical trials. *Patol Fiziol Eksp Ter.* 2013;(4):76-83. (In Russ) Аладинский ВА, Никифоров НГ, Орехова МА и др. Прямая антиатеросклеротическая терапия: возможные подходы, результаты клинических исследований. *Патол. физиол. и эксп. Тер.* 2013;(4):76-83.
- Chinetti-Gbaguidi G, Colin S, Staels B. Macrophage subsets in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol.* 2015;12:10-7. doi:10.1038/nrcardio.2014.173.
- Biswas SK, Chittethath M, Shalova IN, et al. Macrophage polarization and plasticity in health and disease. *Immunol Res.* 2012;11-24. doi:10.1007/s12026-012-8291-9.

12. Bouhlej MA, Derudas B, Rigamonti E, et al. PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab.* 2007;6:137-43.
13. Chinetti-Gbaguidi G, Baron M, Bouhlej MA, et al. Human atherosclerotic plaque alternative macrophages display low cholesterol handling but high phagocytosis because of distinct activities of the PPARgamma and LXRalpha pathways. *Circ Res.* 2011;108:985-95. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.233775.
14. Tall AR, Yvan-Charvet L. Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2015;15:104-16. doi:10.1038/nri3793.
15. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol.* 2010;11:889-96. doi:10.1038/ni.1937.
16. da Silva RF, Lappalainen J, Lee-Rueckert M, Kovanen PT. Conversion of human M-CSF macrophages into foam cells reduces their proinflammatory responses to classical M1-polarizing activation. *Atherosclerosis.* 2016;248:170-8. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.012.
17. Byron SA, van Keuren-Jensen KR, Engelthaler DM, et al. Translating RNA sequencing into clinical diagnostics: Opportunities and challenges. *Nat. Rev. Genet.* 2016;17:257-71. doi:10.1038/nrg.2016.10.
18. Barrans JD, Allen PD, Stamatou D, et al. Global gene expression profiling of end-stage dilated cardiomyopathy using a human cardiovascular-based cDNA microarray. *Am. J. Pathol.* 2002;160:2035-43.
19. Malone JH, Oliver B. Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome. *BMC Biol.* 2011;9:34. doi:10.1186/1741-7007-9-34.
20. Rienzo M, Casamassimi A, Schiano C, et al. Distinct alternative splicing patterns of mediator subunit genes during endothelial progenitor cell differentiation. *Biochimie.* 2012;94:1828-32. doi:10.1016/j.biochi.2012.04.008.
21. Murphy J, Bustin SA. Reliability of real-time reverse-transcription PCR in clinical diagnostics: Gold standard or substandard? *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2009;9:187-97. doi:10.1586/14737159.9.2.187.
22. Cao L, Cui X, Hu J, et al. Advances in digital polymerase chain reaction (dPCR) and its emerging biomedical applications. *Biosens. Bioelectron.* 2017;90:459-74. doi:10.1016/j.bios.2016.09.082.
23. Rai G, Rai R, Saeidian AH, et al. Microarray to deep sequencing: transcriptome and miRNA profiling to elucidate molecular pathways in systemic lupus erythematosus. *Immunol Res.* 2016;64(1):14-24. doi:10.1007/s12026-015-8672-y.
24. Farkas MH, Grant GR, White JA, et al. Transcriptome analyses of the human retina identify unprecedented transcript diversity and 3.5 Mb of novel transcribed sequence via significant alternative splicing and novel genes. *BMC Genomics.* 2013;14:486. doi:10.1186/1471-2164-14-486.
25. Lyu Y, Yang Y, Liu Y, et al. Analysis of a patient with X-linked mental retardation by next generation sequencing. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 2018;35(2):257-60. doi:10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2018.02.025.
26. Keshewani V, Shahshahan HR, Mishra PK. Cardiac transcriptome profiling of diabetic Akita mice using microarray and next generation sequencing. *PLoS One.* 2017;12(8). doi:10.1371/journal.pone.0182828. eCollection 2017.
27. Martinez FO, Gordon S, Locati M, et al. Transcriptional profiling of the human monocyto-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol.* 2006;177:7303-11.
28. Adamson S, Leitinger N. Phenotypic modulation of macrophages in response to plaque lipids. *Curr Opin Lipidol.* 2011;22:335-42. doi:10.1097/MOL.0b013e32834a97e4.
29. Zhang YP, Pan CS, Yan L, et al. Catalpol restores LPS-elicited rat microcirculation disorder by regulation of a network of signaling involving inhibition of TLR-4 and SRC. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2016;311(6):G1091-G1104. doi:10.1152/ajpgi.00159.2016.