

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2023.02.18-29>

Уровень экспрессии и структурные варианты гена толл-подобного рецептора 4 в развитии атеросклероза

Побожева И.А.^{1,2}, Драчева К.В.^{*1,2}, Музалевская М.В.³, Пантелеева А.А.^{1,2}, Уразгильдеева С.А.^{3,4}, Гуревич В.С.^{3,4,5}, Давыденко В.В.¹, Беркович О.А.¹, Баранова Е.И.¹, Пчелина С.Н.^{1,2}, Мирошникова В.В.^{1,2}

- 1 — ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации
197101, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Л.Толстого, д. 6/8
- 2 — ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»
188350, Россия, Ленинградская обл., г. Гатчина, микрорайон Орлова Роща
- 3 — Центр атеросклероза и нарушений липидного обмена ФГБУ «Северо-Западный окружной научно-клинический центр им. Л.Г. Соколова» ФМБА РФ
194291, г. Санкт-Петербург, пр. Культуры, д. 4
- 4 — Научно-клинический и образовательный центр «Кардиология» Санкт-Петербургского государственного университета
199226, г. Санкт-Петербург, ул. Кораблестроителей, д. 20, к.1
- 5 — Северо-западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова
191015, г. Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д. 41

В настоящее время атеросклероз рассматривается как хроническое воспалительное заболевание, характеризующееся нарушением функции эндотелия сосудистой стенки, миграцией иммунных клеток, субэндотелиальным накоплением липидов и пролиферацией гладкомышечных клеток сосудов с дальнейшим образованием атеросклеротической бляшки. Исследования предполагают потенциальную важность толл-подобных рецепторов (TLRs) и других ключевых компонентов врожденной иммунной системы в патологических состояниях, связанных с атеросклерозом. Толл-подобный рецептор 4 (TLR4) может играть ключевую роль в иммунопатогенезе атеросклероза.

Целью данной работы было исследование ассоциации экспрессии гена *TLR4* в макрофагах и полиморфных вариантов rs4986790 и rs4986791 с развитием атеросклероза в популяции Санкт-Петербурга.

В исследование были включены 220 пациентов с атеросклерозом различной локализации (коронарный, церебральный, артерий нижних конечностей); 75 пациентов с семейной гиперхолестеринемией с/без проявлений атеросклероза; 376 лиц без сердечно-сосудистой патологии (контрольная группа). Генотипирование полиморфных вариантов гена *TLR4* было выполнено методом ПЦР с последующим рестрикционным анализом. Сравнительный анализ уровня экспрессии гена *TLR4* в дифференцированных *in vitro* макрофагах был выполнен у пациентов с коронарным атеросклерозом (n=13) и представителей контрольной группы (n=19) методом ПЦР в реальном времени.

Для пациентов с коронарным атеросклерозом характерен более высокий уровень экспрессии гена *TLR4* в макрофагах, чем в контрольной группе. Структурные варианты Asp299Gly и Thr399Ile гена *TLR4* не ассоциированы с развитием атеросклероза у жителей Санкт-Петербурга, в том числе у пациентов с семейной гиперхолестеринемией.

Ключевые слова: атеросклероз, гиперхолестеринемия, макрофаги, толл-подобный рецептор TLR4.

Для цитирования: Побожева И.А., Драчева К.В., Музалевская М.В., Пантелеева А.А., Уразгильдеева С.А., Гуревич В.С., Давыденко В.В., Беркович О.А., Баранова Е.И., Пчелина С.Н., Мирошникова В.В. Уровень экспрессии и структурные варианты гена толл-подобного рецептора 4 в развитии атеросклероза. *Медицинская генетика* 2023; 22(2): 18-29.

Автор для корреспонденции: Драчева Ксения Владимировна; **e-mail:** fatal-ks@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания по теме «Изучение молекулярных и клеточных компонентов патогенеза социально-значимых заболеваний для разработки методов ранней диагностики и лечения» (регистрационный номер №121060200125-2).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 10.02.2023

The Toll-like receptor 4 gene expression level and single nucleotide variants in the development of atherosclerosis

Pobozheva I.A.^{1,2}, Dracheva K.V.^{*1,2}, Muzalevskaya M.V.³, Panteleeva A.A.^{1,2}, Urazgildeeva S.A.^{3,4}, Gurevich V.S.^{3,4,5}, Davydenko V.V.¹, Berkovich O.A.¹, Baranova E.I.¹, Pchelina S.N.^{1,2}, Miroshnikova V.V.^{1,2}

1 — Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University
6/8, L.Tolstogo str., St. Petersburg, 197101, Russian Federation

2 — Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Centre «Kurchatov Institute»
Mkr. Orlova Rostcha, Gatchina, St. Petersburg, 188350, Russian Federation

3 — Department for Atherosclerosis and Lipid Disorders of North-Western district scientific and clinical center named after L. G. Sokolov, Federal Medical and Biological Agency”
4, Kultury Pr., St. Petersburg, 194291, Russian Federation

4 — Scientific, clinical and educational center “Cardiology” of Saint-Petersburg State University
20-1, Korablestroiteley str., Saint-Petersburg, 191226, Russian Federation

5 — North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia
41, Kirochnaya str., Saint-Petersburg, 1911015, Russian Federation

Atherosclerosis is considered as a chronic inflammatory disease characterized by dysfunction of the endothelium of the vascular wall, migration of immune cells, subendothelial accumulation of lipids and proliferation of vascular smooth muscle cells with further formation of atherosclerotic plaques. Research data suggests the potential importance of Toll-like receptors (TLRs) and other key components of the innate immune system in the pathologies associated with atherosclerosis. Toll-like receptor 4 (TLR4) may play a key role in the immunopathogenesis of atherosclerosis.

The aim of this study was to explore the association of *TLR4* gene expression in macrophages and polymorphic variants rs4986790 and rs4986791 with the development of atherosclerosis in the St. Petersburg population.

The study included 671 individuals: 220 patients with atherosclerosis of various localizations (coronary, cerebral, lower extremity artery pool); 75 patients with familial hypercholesterolemia with/without manifestation of atherosclerosis; 376 individuals without cardiovascular pathology as the control group. Genotyping of polymorphic variants of the *TLR4* gene was performed by PCR followed by restriction analysis. Analysis of the *TLR4* gene expression level in was performed in differentiated *in vitro* macrophages of 13 patients with coronary atherosclerosis and 19 representatives of the control group by real-time PCR.

Patients with coronary atherosclerosis were characterized by an increased level of *TLR4* gene expression in macrophages when compared with the control group. The Asp299Gly and Thr399Ile variants of the *TLR4* gene were not associated with atherosclerosis development in the population of St. Petersburg, including patients with familial hypercholesterolemia.

Key words: atherosclerosis, hypercholesterolemia, macrophages, Toll-like receptor TLR4.

For citation: Pobozheva I.A., Dracheva K.V., Muzalevskaya M.V., Panteleeva A.A., Urazgildeeva S.A., Gurevich V.S., Davydenko V.V., Berkovich O.A., Baranova E.I., Pchelina S.N., Miroshnikova V.V. The Toll-like receptor 4 gene expression level and single nucleotide variants in the development of atherosclerosis. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]* 2023; 22(2): 18-29. (In Russ.)

Corresponding author: Ksenia V. Dracheva; **e-mail:** fatal-ks@mail.ru

Funding. The work was carried out according to the state task “Study of the molecular and cellular components of the pathogenesis of socially significant diseases for the development of methods for early diagnosis and treatment” (registration number No. 121060200125-2).

Conflict of interest. The authors declare no conflicts of interest.

Accepted: 10.02.2023

Введение

Атеросклероз является сложным многофакторным заболеванием, патогенетические механизмы которого остаются не до конца выясненными. Начальные этапы развития атеросклеротического поражения связаны с проникновением в субэндотелиальное пространство артерий модифицированных, чаще всего окисленных, холестерин-содержащих липопротеинов низкой плотности (мЛНП). Повышение проницаемости и нарушение целостности эндотелия в свою очередь может быть вызвано различными фак-

торами. Как на начальных этапах атерогенеза, так и на стадии дестабилизации и повреждения покрышки атеросклеротической бляшки важную роль в патогенезе атеросклероза играет хроническое воспаление [1, 2]. Активация толл-подобных (toll-like) рецепторов (TLRs), как ключевой компонент врожденного и адаптивного иммунного ответа, имеет важное значение в развитии и прогрессировании атерогенного воспаления [3, 4]. TLRs — клеточные мембранные рецепторы, активация которых происходит через взаимодей-

ствие с консервативными структурами микроорганизмов [5]. Толл-подобный рецептор 4 (TLR4) распознает бактериальный липополисахарид (ЛПС), а также может активироваться некоторыми эндогенными лигандами, например мЛНП [6].

Патологические взаимодействия между липопротеинами плазмы крови и клетками интимы артерий, в том числе моноцитами/макрофагами, приводят к образованию пенистых клеток — основного компонента атеросклеротической бляшки — и играют ключевую роль в развитии атеросклеротического поражения [2]. В этом процессе захват макрофагами мЛНП и трансформация в пенистые клетки является инициирующим этапом формирования атеросклеротических бляшек. Активация рецептора TLR4 при взаимодействии с мЛНП может приводить к развитию чрезмерного воспалительного ответа, и, таким образом, рассматриваться как один из основных механизмов иммунопатогенеза атеросклероза [7, 8]. Ранее было продемонстрировано увеличение экспрессии гена *TLR4* и количества рецепторов на мембране мононуклеарных клеток крови у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) [9–12], а также высокий уровень экспрессии данного рецептора в атеросклеротических бляшках [13, 14], что свидетельствует о гиперактивации TLR4 при атеросклерозе и ассоциированных сердечно-сосудистых заболеваниях. Активация рецептора TLR4 в мононуклеарных клетках крови наблюдается и при гиперлипидемии, в частности при повышенном уровне общего холестерина плазмы крови (ОХС) [15, 16], что, в свою очередь, может говорить о вовлечении TLR4 в развитие и прогрессирование атеросклероза у пациентов с семейной гиперхолестеринемией (СГХС).

Таким образом, уровень экспрессии гена *TLR4* в специфических клетках, а именно в макрофагах, может быть важным фактором в развитии атеросклеротического процесса. Полиморфные варианты гена *TLR4*, меняющие аминокислотную последовательность белка, rs4986790 (с.896A>G; p.(Asp299Gly)) и rs4986791 (с.1196C>T; p.(Thr399Ile)) могут влиять на структуру рецептора, модулировать степень активации TLR4, то есть также вносить вклад в развитие атеросклероза. Вышеперечисленные аминокислотные замены расположены в областях, отвечающих за формирование внешнего распознающего LRR-домена, изменение структуры и функции которого может приводить к снижению распознавания лиганда и нарушению проведения сигнала [17]. Целью данной работы было исследование ассоциации экспрессии гена *TLR4* в макрофагах и полиморфных вариантов rs4986790 и rs4986791 с развитием атеросклероза в популяции Санкт-Петербурга.

Методы

Характеристика обследуемых групп

В исследование были включены лица ($n=671$), обследованные в Первом Санкт-Петербургском Государственном Медицинском Университете (ПСПбГМУ) им. академика И.П. Павлова и в ФГБУ «Северо-Западный окружной научно-клинический центр (СЗОНКЦ) им. Л.Г. Соколова» ФМБА РФ. Работа была одобрена локальными этическими комитетами, все пациенты подписали информированное согласие. В группу пациентов с атеросклерозом вошло 220 пациентов (154 мужчины и 66 женщин; средний возраст 54 ± 9 лет) с атеросклерозом артерий различной локализации (коронарный, церебральный, артерий нижних конечностей), подтвержденным при ангиографическом исследовании. Контрольную группу составили 376 человек (226 мужчин и 150 женщин; средний возраст 47 ± 9 лет соответствовал среднему возрасту начала заболевания у пациентов с атеросклерозом) без нарушений липидного обмена и сердечно-сосудистых заболеваний. Лица, вошедшие в контрольную группу, были осмотрены врачом-кардиологом, а проведенные обследования включали электрокардиографию, велоэргометрию, ЭХО-кардиографию. Группу пациентов СГХС составили 75 человек: 17 мужчин и 58 женщин в возрасте от 26 до 84 лет (средний возраст 54 ± 15 лет), которые наблюдались в Центре атеросклероза и нарушений липидного обмена на базе ФГБУ «СЗОНКЦ им. Л.Г. Соколова». Диагноз СГХС устанавливался на основании Голландских диагностических критериев [18]. Необходимо отметить, что генетическое исследование ранее было проведено лишь 27 пациентам с СГХС, при этом мутации генов *LDLR* и *APOB* были выявлены у 13 и 2 человек, соответственно [19]. Характеристики обследованных групп представлены в табл. 1.

Идентификация полиморфных вариантов гена *TLR4*

Выделение ДНК из лейкоцитов венозной крови выполнялось фенол-хлороформным методом. Типирование полиморфных вариантов гена *TLR4* проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и последующего рестрикционного анализа. Однонуклеотидная замена 896A>G в гене *TLR4* приводит к замещению аспарагиновой кислоты в 299 положении белка на глицин (Asp299Gly). Однонуклеотидная замена 1196C>T в гене *TLR4* приводит к замещению треонина в 399 положении белка на изолейцин (Thr399Ile). ПЦР

проводили в объеме 15 мкл с использованием АВ мастер-микса (2.5X) (Алкор-Био) и специфических праймеров (табл. 2). Фрагменты ДНК подвергали электрофоретическому разделению в 8% ПААГ с последующей окраской бромистым этидием и визуализацией в ультрафиолете.

Получение мононуклеарной фракции и культивирование макрофагов

Мононуклеарную фракцию получали из свежесобранной цельной крови (от 20 до 50 мл) методом градиентного центрифугирования при 1600 об/мин в растворе фикола ($\rho=1.077$, GE Healthcare). Далее мононуклеарные клетки ресуспендировали в культуральной среде (альфаМЕМ, 10% эмбриональная сыворотка, 5 мкг/мл антибиотиков (пенициллин G, стрептомицин)) и инкубировали в CO_2 -инкубаторе при $+37^\circ\text{C}$ в течение 2 ч.

После чего клетки дважды промывали в PBS. Для получения первичной культуры макрофагов прикрепившиеся к чашкам Петри моноциты культивировали в присутствии колоние-стимулирующего фактора макрофагов M-CSF (R&DSYSTEMS; 15 нг/мл) в течение 5 суток с ежедневной заменой питательной среды.

Оценка уровня мРНК гена *TLR4*

Сравнительный анализ экспрессии гена *TLR4* проводили в мононуклеарных клетках через 24 часа культивирования в присутствии фактора макрофагов M-CSF и в дифференцированных макрофагах (5 суток культивирования) в подгруппах 13 пациентов с ИБС и подтвержденным при ангиографическом исследовании коронарным атеросклерозом и 19 представителей контрольной группы. Тотальная РНК была выделена с использованием набора для выделения РНК RNeasy

Таблица 1. Характеристика исследуемых групп

Table 1. Characteristics of the studied groups

Параметр	Контрольная группа n=376	Группа пациентов с атеросклерозом n=220	Группа пациентов с семейной гиперхолестеринемией n=75	
			без атеросклероза n=26	с атеросклерозом n=49
Пол (мужчины/женщины)	226/150	154/66	7/19	10/39
Возраст	47 $\pm$ 9	54 $\pm$ 9	50 $\pm$ 16	60 $\pm$ 14
Возраст начала заболевания	-	48 $\pm$ 7	-	51 $\pm$ 11
Курение, n (%)	142 (38%)	101 (46%)	4 (14%)	11 (23%)
ОХС, ммоль/л (максимальный*)	5,3 $\pm$ 0,9	5,5 $\pm$ 1,2	9,2 $\pm$ 1,5 (9,6 $\pm$ 1,3)	8,6 $\pm$ 2,5 (10,6 $\pm$ 2,5)
ХС-ЛВП, ммоль/л	1,4 $\pm$ 0,4	1,2 $\pm$ 0,4	1,7 $\pm$ 0,6	1,6 $\pm$ 0,5
ХС-ЛНП, ммоль/л	3,0 $\pm$ 0,9	3,2 $\pm$ 1,1	6,8 $\pm$ 1,5	6,2 $\pm$ 2,3
Атеросклероз коронарных артерий, n (%)	—	131 (60%)	—	26 (53%)
Атеросклероз церебральных и/или прецеребральных артерий, n (%)	—	55 (25%)	—	43 (88%)
Атеросклероз сосудов нижних конечностей, n (%)	—	73 (33%)	—	3 (6%)
Ксантомы, n (%)	—	—	11 (39%)	25 (53%)
СГХС определенная/ вероятная/возможная (n)	—	—	10/4/12	24/11/14
из них диагноз подтвержден генетическим исследованием	—	—	4	11

Примечание: *максимальный уровень общего холестерина плазмы крови указан для пациентов с СГХС. ОХС — общий холестерин плазмы крови, СГХС — семейная гиперхолестеринемия, ХС-ЛВП — холестерин в составе липопротеинов высокой плотности, ХС-ЛНП — холестерин в составе липопротеинов низкой плотности.

Mini Kit (Qiagen) в соответствии с инструкциями изготовителя. Чистоту выделенных образцов РНК проверяли спектрофотометрически. Если отношение их оптических плотностей при 260 нм и 280 нм было более или равнялось 2,0, а при 260 нм и 230 нм превышало значение 1,7, то образцы РНК считались очищенными от примесей. Целостность фракций рибосомальной РНК проверяли при помощи электрофореза в 1% агарозном геле по соотношению интенсивности полос, соответствующих 28S и 18S рРНК (2:1 в случае отсутствия деградации).

Для получения кДНК использовали набор для обратной транскрипции RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Fisher Scientific) согласно условиям производителя сразу после выделения РНК. Определение уровня мРНК гена *TLR4* проводилось методом количественной ПЦР в режиме реального времени с флуоресцентными зондами TaqMan на приборе CFX96 Touch (Bio-Rad, США). 5'-GAGACCAGAAAGCTGGGAG-3' – прямой праймер, 5'-GTAGAAATTCAGCTCCATGC-3' – обратный праймер, 5'-(FAM)-CCTGCGTGGAG-GTGGTTCCTAA-(RTQ)1-3' зонд. В качестве референсного гена был использован ген β -актина (*ACTB*). 5'-CGTGCTGCTGACCGAGG-3' – прямой праймер, 5'-ACAGCCTGGATAGCAACGTACA-3' – обратный праймер, 5'-(HEX)-CCAACCGC-GAGAAGATGACCCAGAT-(RTQ1)-3' зонд. Амплификационная смесь состояла из 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄; 67 мМ Tris-HCl, pH 8,8; 1,5 мМ MgCl₂; 0,01% Tween 20; 0,2 мМ каждого dNTP; 0,5 мкМ каждого праймера, 0,7 мкМ каждого зонда TaqMan, 5 единиц активности Taq ДНК полимеразы (Силекс). ПЦР для каждого образца проводили в трех повторах, в объеме 25 мкл в сле-

дующем режиме: после денатурации при 95°C в течение 3 мин проводили 45 циклов амплификации в следующем температурно-временном режиме: плавление 95°C – 10 сек, отжиг 57°C – 10 сек, синтез 72°C – 10 сек. Относительное содержание мРНК гена *TLR4* рассчитывали методом стандартных кривых, нормируя по отношению к мРНК референсного гена *ACTB*.

Статистическая обработка данных

Статистический анализ был проведен с использованием программы SPSS версия 17.0. Для сравнения распределения частот генотипов и аллелей между группами применялись таблицы сопряженности с использованием точного двустороннего критерия Фишера и, при необходимости, критерия хи-квадрат с поправкой Йетса для таблиц 2х2. Оценка возможного влияния генотипа *TLR4* на развитие атеросклероза с учетом поправки на пол и возраст выполнялась методом многофакторного логистического регрессионного анализа. Соответствие данных нормальному распределению проверялось с помощью критерия Шапиро-Уилка. При сравнении содержания мРНК *TLR4* в клетках между двумя независимыми группами (пациенты – контроль) использовался непараметрический критерий Манна-Уитни. При сравнении содержания мРНК *TLR4* в клетках в зависимости от времени инкубации использовали парный критерий Уилкоксона. За значимый уровень достоверности принимали $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В данной работе мы впервые оценили вклад вариантов *896A>G* (Asp299Gly) и *1196C>T* (Thr399Ile)

Таблица 2. Последовательность праймеров и принцип идентификации полиморфных вариантов гена *TLR4*

Table 2. Primer sequences and the principle of identification of polymorphic variants of the *TLR4* gene

Вариант	896A>G // Asp299Gly	1196C>T // Thr399Ile
Прямой (F) и обратный (R) праймеры	F: 5'-GATTAGCATACTTAGACTACTACCTCGCCG-3'; R: 5'-CAATAGTCACACTCACCAGGG-3'	F: 5'-GGTTGCTGTTCTCAAAGTGATTTGGGAGAA-3'; R: 5'-GGAAATCCAGATGTTCTAGTTGTTCTAAGCC-3'
Температура отжига	58,5°C	60°C
Размер ПЦР-продукта	96 п.н.	124 п.н.
Рестрикция	MspI («СибЭнзим», Россия) +37°C	HinfI («СибЭнзим», Россия) +37°C
Длины продуктов рестрикции	896A: 96 п.н. 896G: 68 п.н. и 28 п.н.	1196C: 124 п.н. 1196T: 95 п.н. и 29 п.н.

гена *TLR4* в риск развития атеросклероза у жителей Санкт-Петербурга, в том числе у пациентов с СГХС. Частоты полиморфных вариантов гена *TLR4* в исследуемых группах представлены в табл. 3. Распределение генотипов гена *TLR4* находилось в соответствии с распределением Харди-Вайнберга. Исследованные варианты находятся в неравновесном сцеплении, и, как ранее было показано для европейской популяции, ожидаемым является преобладание генотипов *AA-CC*, *AG-CT*, *GG-TT* [20]. Распределение генотипов исследованных вариантов гена *TLR4* между группой пациентов с атеросклерозом и контрольной группой несколько отличалось (табл. 3, $p=0,045$): генотип *GG-TT* был детектирован только у трех пациентов с атеросклерозом и при этом не выявлен в контрольной группе. Однако, частота гаплотипа *G-T* в указанных группах не различалась ($p=0,174$). Можно предположить, что вариант *G-T* гена *TLR4* не ассоциирован с риском развития атеросклероза у жителей Санкт-Петербурга. При СГХС носительство гаплотипа *G-T* было выявлено у 12 из 75 обследованных пациентов, то есть в 16% случаев, однако так же не было установлено связи с развитием атеросклероза (табл. 3).

При проведении анализа методом логистической регрессии с учетом поправки на пол и возраст также не выявлено влияния генотипа *TLR4* на риск разви-

тия атеросклероза ($\beta=0,06$, $p=0,191$ для всей исследуемой выборки; $\beta=-0,04$, $p=0,775$ — отдельно для пациентов с СГХС). В то время как стандартные факторы риска — возраст (отношение шансов (ОШ) 1,021, ДИ 95% 1,017—1,024; $p=2 \times 10^{-16}$), мужской пол (ОШ 1,18, ДИ 95% 1,08—1,30; $p=0,00045$) и концентрация ХС-ЛВП (ОШ 0,87, ДИ 95% 0,79—0,97; $p=0,009$) были независимо связаны с развитием атеросклероза в исследуемой нами выборке. При этом генотип по гену *TLR4* не был ассоциирован с показателями липидного спектра крови. При проведении анализа раздельно в подгруппах пациентов с коронарным, церебральным и периферическим атеросклерозом не выявлено ассоциации генотипа с ангиографически верифицированным характером преимущественной локализации атеросклеротического процесса.

Представленные в литературе сведения о роли вариантов гена *TLR4* в патогенезе атеросклероза достаточно противоречивы. Так, было показано, что вариант *896A>G* (Asp299Gly) гена *TLR4* потенциально может быть вовлечен в формирование предрасположенности к атеросклерозу. Аминокислотная замена Asp299Gly находится во внеклеточном домене TLR4, отвечающем за связывание лиганда, влияет на функцию TLR4 — на трансдукцию сигнала и активацию фактора NF- κ B, которая, в свою очередь, индуцирует транскрипцию

Таблица 3. Частоты генотипов полиморфных вариантов гена *TLR4* в исследуемых группах

Table 3. Genotype frequencies of polymorphic variants of the *TLR4* gene in the studied groups

Варианты гена <i>TLR4</i>	Контрольная группа n=376	Группа пациентов с атеросклерозом n=220	Пациенты с семейной гиперхолестеринемией n=75	
			без атеросклероза n=26	с атеросклерозом n=49
Генотип <i>AA-CC</i>	334	187	24	39
<i>AG-CT</i>	42	30	1	10
<i>GG-TT</i>	0	3	1	0
	$p=0,045^*$		$p=0,068\text{¥}$	
Генотип <i>AA-CC</i>	334	187	24	39
<i>AG-CT + GG-TT</i>	42	33	2	10
	$p=0,174^*$		$p=0,198\text{¥}$ $p=0,104\text{§}$	
Частоты гаплотипов <i>A-C</i>	0,944	0,918	0,915	0,911
<i>G-T</i>	0,056	0,082	0,085	0,089
	$p=0,080^*$		$p=0,544\text{¥}$ $p=0,116\text{§}$	

Примечание: Уровень значимости при сравнении распределения частот генотипов и аллелей между: *группой пациентов с атеросклерозом и контрольной группой; ¥ подгруппой пациентов с СГХС и клиническими проявлениями атеросклероза и подгруппой пациентов с СГХС без проявлений атеросклероза; § подгруппой пациентов с СГХС и клиническими проявлениями атеросклероза и контрольной группой.

различных воспалительных генов, в том числе фактора некроза опухоли, генов интерлейкинов ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8 и ИЛ-12 и способствует патологическим изменениям в клетках, критичных для развития атеросклероза [5, 17, 21]. Результаты проведенного Ameziane N. и соавт. исследования указывают на то, что аллель 896G гена *TLR4* ассоциирован со сниженным риском острых коронарных событий независимо от стандартных факторов коронарного риска [22]. Согласно метаанализу, проведенному Belforte и соавт., проявление протективных эффектов минорного аллеля 896G гена *TLR4* может быть характерно исключительно для европеоидной расы [23]. В то же время ряд исследований не продемонстрировал ассоциации данного варианта с атеросклерозом и сердечно-сосудистыми заболеваниями (ССЗ) [24,25]. В частности, в исследовании, проведенном в популяции Сибири, не удалось установить связь полиморфных вариантов гена *TLR4* с развитием ИБС, что находится в соответствии с полученными нами данными [26]. Мета-анализ 20 исследований, суммарно включавших более 20 000 участников, не выявил связи варианта 896A>G (Asp299Gly) с ИБС и атеросклерозом коронарных артерий [27]. И хотя исследований взаимосвязи полиморфизма гена *TLR4* с атеросклерозом артерий нижних конечностей или почек крайне мало, протективного влияния вариантов гена *TLR4* на развитие периферического атеросклероза не было показано [28, 29]. В нашем исследовании мы также не наблюдали влияния изученных генотипов на риск развития атеросклероза определенной локализации. Однако не следует исключать, что это влияние может модифицироваться другими генетическими и средовыми факторами и зависеть от этнической группы [29, 30].

Поскольку атеросклероз является сложным многофакторным заболеванием, особый интерес представляло исследование возможного эффекта полиморфных вариантов гена *TLR4* в выборке пациентов с СГХС, которая сопряжена с повышенным риском развития ССЗ. Ранее было показано, что у пациентов с СГХС, носителей аллеля 896G, наблюдается снижение показателя толщины интима-медиа по сравнению с носителями аллеля дикого типа [31]. Однако в настоящем исследовании нами не было установлено влияния вариантов гена *TLR4* на характер проявления атеросклероза у пациентов с СГХС.

Следует заметить, что в настоящее время статины являются ключевым компонентом терапии при дислипидемии и ССЗ, целью которой является, прежде всего, нормализация липидного спектра плазмы кро-

ви и снижение риска осложнений. Кроме того, статины обладают выраженными противовоспалительными эффектами [32]. Большинство обследованных нами пациентов с СГХС получали терапию статинами (84%), что затрудняет оценку вклада вариантов гена *TLR4* в риск развития атеросклероза у пациентов с СГХС. В нескольких проспективных клинических исследованиях изучалась эффективность статинов у носителей различных генотипов *TLR4* [33,34]. Так, применение правастатина у носителей аллеля 896G приводило к более существенному снижению риска сердечно-сосудистых событий по сравнению с носителями аллеля дикого типа [33]. В исследовании Holloway и соавт. было продемонстрировано снижение риска развития инфаркта миокарда у пациентов с атеросклерозом коронарных артерий на фоне лечения статинами в случае носительства аллеля 896G [34].

Одним из механизмов противовоспалительного действия статинов является супрессия сигнального каскада TLR4/MyD88/NF-κB, которая может быть обусловлена подавлением экспрессии гена *TLR4* [35]. В частности, было показано, что статины снижают экспрессию TLR4 в моноцитах/макрофагах человека *in vitro* [36,37]. Исходя из этих данных для проведения исследования экспрессии гена *TLR4* в макрофагах при атеросклерозе были отобраны пациенты с атеросклерозом без СГХС, не принимавшие ранее статины и другие гиполлипидемические препараты (рисунок).

Следует заметить, что экспрессия TLR4 в макрофагах играет важную роль в инициации атеросклеротического повреждения и поддержании воспаления, которое способствует дальнейшей прогрессии атеросклероза [4]. Исследования продемонстрировали повышенный уровень экспрессии TLR4 в атеросклеротических бляшках по сравнению с неповрежденными участками артерий у человека и мышей [13, 14, 35]. Иммуногистохимическое окрашивание показало преимущественную локализацию TLR4 в зонах инфильтрации бляшек макрофагами и другими иммунными клетками [14,38]. Полученные данные дают основание предполагать, что именно макрофаги являются основными клетками, которые обеспечивают повышенный уровень экспрессии TLR4 в атеросклеротических бляшках.

Мы провели сравнительный анализ уровня мРНК гена *TLR4* в макрофагах, полученных при дифференцировке моноцитов периферической крови в присутствии фактора М-CSF, у пациентов с ИБС и ангиографически подтвержденным атеросклерозом коронарных артерий и в контрольной группе. Уровень мРНК гена *TLR4* в макрофагах у пациентов с атеросклерозом был

выше по сравнению с контрольной группой ($p=0,02$) (рис. 1). Также было показано, что содержание мРНК гена *TLR4* у пациентов с атеросклерозом увеличивается в макрофагах на 5-е сутки по сравнению с первыми сутками дифференцировки ($p=0,002$). Повышенный уровень экспрессии гена *TLR4* в макрофагах свидетельствует об активации моноцитов в кровеносном русле в ходе иммунных реакций, запускаемых при развитии атеросклероза [39,40], и их ориентацию на поляризацию по типу M1 (провоспалительный фенотип) [41].

Полученные данные согласуются с данными об увеличении экспрессии гена *TLR4* и количества рецепторов на мембране мононуклеарных клеток крови у пациентов с ИБС и инфарктом миокарда [9-12, 42]. При этом повышенный уровень экспрессии гена *TLR4* в мононуклеарах крови коррелировал с увеличением содержания провоспалительных цитокинов в сыворотке крови [9, 10]. Также был продемонстрирован повышенный уровень мРНК гена *TLR4* в мононуклеарах на фоне ишемического инсульта [43]. Генетические варианты Asp299Gly и Thr399Ile не были ассоциированы с уровнем экспрессии гена *TLR4* ни в нашем, ни в других исследованиях [44, 45]. Поэтому активация *TLR4* в макрофагах, скорее всего, является характерной чертой развивающегося атеросклеротического воспаления. Ранее было показано, что основной фрак-

цией, экспрессирующей *TLR4*, являются так называемые промежуточные моноциты $CD14^{++}CD16^{+}$ [46], повышение доли которых характерно для пациентов с ИБС, а также для пациентов с СГХС [16,47,48]. Активированные моноциты мигрируют в интиму артерий в местах атеросклеротических повреждений, дифференцируются в макрофаги, что способствует дальнейшей пролонгации воспаления. Активация *TLR4* в макрофагах обеспечивает усиленный захват ЛНП [8, 49] и таким образом способствует прогрессированию атеросклеротического процесса. Неслучайно более высокий уровень экспрессии *TLR4* в атеросклеротических бляшках у пациентов, перенесших инфаркт миокарда, ассоциировался с повторным сердечно-сосудистым событием [38].

Заключение и выводы

Для пациентов с атеросклерозом характерен повышенный уровень экспрессии гена *TLR4* в макрофагах по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует о провоспалительной активации макрофагов и может способствовать повышенной экспрессии *TLR4* в атеросклеротических бляшках и дальнейшей пролонгации атерогенного воспаления. При этом влияния структурных вариантов Asp299Gly и Thr399Ile гена

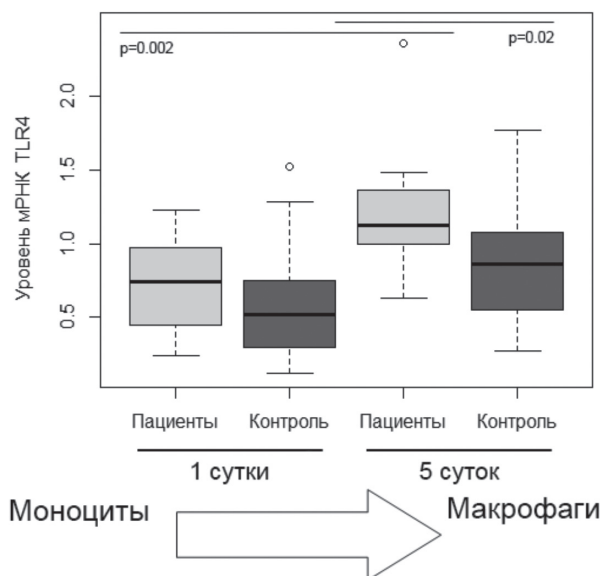


Рис. 1. Уровень мРНК гена *TLR4* в макрофагах у пациентов с атеросклерозом и у представителей контрольной группы.

Fig. 1. The level of mRNA of the *TLR4* gene in macrophages in patients with atherosclerosis and in the control group.

TLR4 на развитие атеросклероза у жителей Санкт-Петербурга не выявлено, что может быть связано с недостаточным размером исследуемой выборки, низкой частотой данных вариантов в популяции, а также применением гиполипидемической терапии обследованными пациентами.

Литература

- Wolf D., Ley K. Immunity and inflammation in atherosclerosis. *Circulation research* 2019; 124(2): 315-327. Doi: 10.1161/CIRCRESA-NA.118.313591
- Аронов Д. М., Лупанов В. П. Некоторые аспекты патогенеза атеросклероза. *Атеросклероз и дислипидемии*. 2011; (1): 48-56.
- Erridge C. The roles of Toll-like receptors in atherosclerosis. *Journal of innate immunity* 2009; 1(4): 340-349. Doi: 10.1159/000191413
- Roshan M. H. K., Tambo A., Pace N. P. The Role of TLR2, TLR4, and TLR9 in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *International Journal of Inflammation* 2016; 2016: 1-11. Doi:10.1155/2016/1532832
- Ипатова В. А., Понасенко А. В., Хуторная М. В., Цепочкина А. В., Головкин А. С. Вклад генов Toll-подобных рецепторов в этиопатогенез ишемической болезни сердца. *Атеросклероз* 2014; 10(4): 10-18.
- Miller Y. I. Toll-like receptors and atherosclerosis: oxidized LDL as an endogenous Toll-like receptor ligand. *Future Cardiology* 2005; 1(6): 785-92. doi: 10.2217/14796678.1.6.785
- Chávez-Sánchez L., Madrid-Miller A., Chávez-Rueda K et al. Activation of TLR2 and TLR4 by minimally modified low-density lipoprotein in human macrophages and monocytes triggers the inflammatory response. *Human immunology* 2010; 71(8): 737-744. Doi: 10.1016/j.humimm.2010.05.005
- Howell K. W., Meng X., Fullerton D. A., et al. Toll-like receptor 4 mediates oxidized LDL-induced macrophage differentiation to foam cells. *Journal of Surgical Research* 2011; 171(1): e27-e31. Doi: 10.1016/j.jss.2011.06.033.
- Xie P., Cao Y. S., Su P., et al. Expression of toll-like receptor 4, tumor necrosis factor- α , matrix metalloproteinase-9 and effects of benazepril in patients with acute coronary syndromes. *Clinical Medicine Insights: Cardiology* 2010; 4: CMC-S5659. Doi:10.4137/CMC.S5659
- Shao L., Zhang P., Zhang Y., Lu Q., Ma A. TLR3 and TLR4 as potential clinically biomarkers of cardiovascular risk in coronary artery disease (CAD) patients. *Heart and vessels* 2014; 29(5): 690-698. Doi: 10.1007/s00380-013-0421-3
- Geng H. L., Lu H. Q., Zhang L. Z., et al. Increased expression of Toll like receptor 4 on peripheral-blood mononuclear cells in patients with coronary arteriosclerosis disease. *Clinical & Experimental Immunology* 2006; 143(2): 269-273. Doi:10.1111/j.1365-2249.2005.02982.x
- Shiraki R., Inoue N., Kobayashi S., et al. Toll-like receptor 4 expressions on peripheral blood monocytes were enhanced in coronary artery disease even in patients with low C-reactive protein. *Life sciences* 2006; 80(1): 59-66. Doi: 10.1016/j.lfs.2006.08.027
- Xu X. H., Shah P. K., Faure E., et al. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. *Circulation* 2001; 104(25): 3103-3108. Doi: 10.1161/hc5001.100631
- Edfeldt K., Swedenborg J., Hansson G. K., Yan Z. Q. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation* 2002; 105(10): 1158-1161. doi:10.1161/circ.105.10.1158
- Ya-Jun Zhu, Chao Wang, Guangyao Song, et al. Toll-like receptor-2 and -4 are associated with hyperlipidemia. *Molecular Medicine Reports* 2015; 12(6): 8241-8246. Doi: 10.3892/mmr.2015.4465.
- Hjuler Nielsen, M., Irvine, H., Vedel, S., et al. Elevated atherosclerosis-related gene expression, monocyte activation and microparticle-release are related to increased lipoprotein-associated oxidative stress in familial hypercholesterolemia. *PLoS One* 2015; 10(4): e0121516. Doi: 10.1371/journal.pone.0121516
- Yamakawa N., Ohto U., Akashi-Takamura S., et al. Human TLR4 polymorphism D299G/T399I alters TLR4/MD-2 conformation and response to a weak ligand monophosphoryl lipid A. *International immunology* 2013; 25(1): 45-52. Doi: 10.1093/intimm/dxs084
- Кухарчук В.В., Ежов М.В., Сергиенко И.В. и соавт. Диагностика и коррекция нарушений липидного обмена с целью профилактики и лечения атеросклероза. Российские рекомендации, VII пересмотр. Атеросклероз и дислипидемии 2020; 1(38): 7-42. DOI: 10.34687/2219-8202.JAD.2020.01.0002
- Miroshnikova V.V., Romanova O.V., Ivanova O.N., et al. Targeted sequencing identified novel variants in the LDLR gene in Russian patients with familial hypercholesterolemia. *Biomedical Reports* 2021; 14(1): 15. Doi: 10.3892/br.2020.1391.
- Ferwerda B., McCall M. B., Alonso S., et al. TLR4 polymorphisms, infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007; 104(42): 16645-16650. Doi: 10.1073/pnas.0704828104
- Long H., O'Connor B. P., Zemans R. L., et al. The Toll-Like Receptor 4 Polymorphism Asp299Gly but Not Thr399Ile Influences TLR4 Signaling and Function. *PLoS ONE* 2014; 9(4): e93550. Doi:10.1371/journal.pone.0093550
- Ameziane, N., Beillat, T., Verpillat, P., et al. Association of the Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism with acute coronary events. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2003; 23(12): e61-e64. Doi: 10.1161/01.ATV.0000101191.92392.1D
- Belforte F.S., Coluccio Leskow F., Poskus E., Penas Steinhardt A. Toll-like receptor 4 D299G polymorphism in metabolic disorders: a meta-analysis. *Molecular biology reports* 2013; 40(4): 3015-3020. Doi: 10.1007/s11033-012-2374-5
- Wu B. W., Zhu J., Shi H. M., et al. Association between Toll-like receptor 4 Asp299Gly polymorphism and coronary heart disease susceptibility. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2017; 50. Doi: 10.1590/1414-431X20176306
- Yang I. A., Holloway J. W., Ye S. TLR4 Asp299Gly polymorphism is not associated with coronary artery stenosis. *Atherosclerosis* 2003; 170(1): 187-190. Doi: 10.1016/S0021-9150(03)00286-7
- Барбараш О.Л., Головкин А.С., Понасенко А.В. и соавт. Роль полиморфизма генов Toll-подобных рецепторов в развитии атеросклероза. *Российский кардиологический журнал* 2015; 12 (128): 72-79. Doi: 10.15829/1560-4071-2015-12-72-79
- Wu B.W., Zhu J., Shi H.M., et al. Association between Toll-like receptor 4 Asp299Gly polymorphism and coronary heart disease susceptibility. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2017; 50(9):e6306. Doi: 10.1590/1414-431X20176306
- Hommels M.J., Kroon A.A., Netea M.G., et al. The Asp299Gly Toll-like receptor 4 polymorphism in advanced aortic atherosclerosis. *Netherlands Journal of Medicine* 2007; 65(6):203-7.
- Vainas T., Stassen F.R.M., Bruggeman C.A., et al. Synergistic effect of Toll-like receptor 4 and CD14 polymorphisms on the total atherosclerosis burden in patients with peripheral arterial disease. *Journal of Vascular Surgery* 2006; 44(2):326-32. Doi: 10.1016/j.jvs.2006.04.035
- Xie X., Shi X., Liu M. The Roles of TLR Gene Polymorphisms in Atherosclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis of 35,317

- Subjects. *Scandinavian Journal of Immunology* 2017; 86(1):50-58. Doi:10.1111/sji.12560
31. Netea M. G., Hijmans A., van Wissen S., et al. Toll-like receptor-4 Asp299Gly polymorphism does not influence progression of atherosclerosis in patients with familial hypercholesterolaemia. *European Journal of Clinical Investigation* 2004; 34(2): 94–99. Doi:10.1111/j.1365-2362.2004.01303.x
 32. Шалаев С. В., Сафиуллина З. М., Кремнева Л. В., Абатурова О. В. Сравнительная эффективность статинов в профилактике и лечении ишемической болезни сердца. *Рациональная фармакотерапия в кардиологии* 2010; 6(6): 865-869. Doi: 10.20996/1819-6446-2010-6-6-865-869.
 33. Boekholdt S. M., Agema W. R., Peters R. J., et al. Variants of toll-like receptor 4 modify the efficacy of statin therapy and the risk of cardiovascular events. *Circulation* 2003; 107(19): 2416-2421. Doi:10.1161/01.cir.0000068311.40
 34. Holloway J. W., Yang I. A., Ye, S. Variation in the toll-like receptor 4 gene and susceptibility to myocardial infarction. *Pharmacogenetics and genomics* 2005; 15(1): 15-21. Doi: 10.1097/01213011-200501000-00003
 35. Koushki K., Shahbaz S. K., Mashayekhi K., et al. Anti-inflammatory action of statins in cardiovascular disease: the role of inflammasome and toll-like receptor pathways. *Clinical reviews in allergy & immunology* 2021; 60(2): 175-199. Doi: 10.1007/s12016-020-08791-9.
 36. Yang S. S., Li R., Qu X., et al. Atorvastatin decreases Toll-like receptor 4 expression and downstream signaling in human monocytic leukemia cells. *Cellular immunology* 2012; 279(1): 96-102. Doi:10.1016/j.cellimm.2012.09.008
 37. Methe H., Kim J. O., Kofler S., Nabauer M., Weis M. Statins decrease Toll-like receptor 4 expression and downstream signaling in human CD14+ monocytes. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2005; 25(7): 1439-1445. Doi: 10.1161/01.ATV.0000168410.44722.86
 38. Ishikawa Y., Satoh M., Itoh T., et al. Local expression of Toll-like receptor 4 at the site of ruptured plaques in patients with acute myocardial infarction. *Clinical Science* 2008; 115(4): 133–140. Doi:10.1042/cs20070379
 39. Kashiwagi M., Imanishi T., Ozaki Y., et al. Differential expression of Toll-like receptor 4 and human monocyte subsets in acute myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2012; 221(1): 249-253. Doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.12.030
 40. Du P., Gao K., Cao Y., et al. RFX1 downregulation contributes to TLR4 overexpression in CD14+ monocytes via epigenetic mechanisms in coronary artery disease. *Clinical epigenetics* 2019; 11(1): 1-19. Doi: 10.1186/s13148-019-0646-9
 41. Jaguin M., Houlbert N., Fardel O., Lecureur V. Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cellular Immunology* 2013; 281(1): 51–61. Doi: 10.1016/j.cellimm.2013.01.010
 42. Tapp L. D., Shantsila E., Wrigley B. J., Montoro-Garcia S., Lip G. Y. TLR 4 expression on monocyte subsets in myocardial infarction. *Journal of internal medicine* 2013; 273(3): 294-305. Doi: 10.1111/joim.12011
 43. Ганковская Л.В., Стаховская Л.В., Греченко В.В., и соавт. Гиперэкспрессия TLR2 и TLR4 у больных с ишемическим инсультом в остром периоде заболевания. *Медицинская иммунология* 2020; 22(4): 665-674. Doi: 10.15789/1563-0625-HOT-1971
 44. Kania K.D., Hareza D, Wilczynski J.R., et al. The Toll-like Receptor 4 Polymorphism Asp299Gly Is Associated with an Increased Risk of Ovarian Cancer. *Cells* 2022, 11, 3137. Doi.org/10.3390/cells11193137
 45. Proença M.A., de Oliveira J.G., Cadamuro A.C., et al. TLR2 and TLR4 polymorphisms influence mRNA and protein expression in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology* 2015; 21(25):7730-41. Doi: 10.3748/wjg.v21.i25.7730.
 46. Ozaki Y., Imanishi T., Hosokawa S., et al. Association of toll-like receptor 4 on human monocyte subsets and vulnerability characteristics of coronary plaque as assessed by 64-slice multidetector computed tomography. *Circulation Journal* 2017; CJ-16. Doi: 10.1253/circj.CJ-16-0688
 47. Ozaki Y., Imanishi T., Taruya A., et al. Circulating CD14+ CD16+ monocyte subsets as biomarkers of the severity of coronary artery disease in patients with stable angina pectoris. *Circulation Journal* 2012; CJ-12. Doi: 10.1253/circj.cj-12-0412
 48. Rogacev K.S., Cremers B., Zawada A.M., Seiler S., Binder N., Ege P., et al. CD14++ CD16+ monocytes independently predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography. *Journal of the American College of Cardiology* 2012; 60(16): 1512-1520. Doi: 10.1016/j.jacc.2012.07.019
 49. Singh R.K., Haka A.S., Asmal A., Barbosa-Lorenzi V.C., Grosheva I., Chin H.F., et al. TLR4 (toll-like receptor 4)-dependent signaling drives extracellular catabolism of LDL (low-density lipoprotein) aggregates. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2020; 40(1): 86-102. Doi:10.1161/ATVBAHA.119.313200

References

1. Wolf D., Ley K. Immunity and inflammation in atherosclerosis. *Circulation research* 2019; 124(2): 315-327. Doi: 10.1161/CIRCRESA-HA.118.313591
2. Aronov D.M., Lupanov V.P. Nekotoryye aspekty patogeneza ateroskleroza. [Some aspects of the pathogenesis of atherosclerosis]. *Ateroskleroz i dislipidemii [The Journal of Atherosclerosis and Dyslipidemias]*. 2011; 1:48-56 (In Russ.).
3. Erridge C. The roles of Toll-like receptors in atherosclerosis. *Journal of innate immunity* 2009; 1(4): 340-349. Doi: 10.1159/000191413
4. Roshan M. H. K., Tambo A., Pace N. P. The Role of TLR2, TLR4, and TLR9 in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *International Journal of Inflammation* 2016; 2016: 1–11. Doi:10.1155/2016/1532832
5. Ipatova V.A., Ponasenko A.V., Khutornaya M.V., Tsepokina A.V., Golovkin A.S. Vklad genov Toll-podobnykh retseptorov v etiopatogenez ishemicheskoy bolezni serdtsa [The contribution of Toll-like receptor genes in the etiopathogenesis of coronary artery disease]. *Ateroskleroz [Atherosclerosis]*. 2014;10(4):10-18. (In Russ.)
6. Miller Y. I. Toll-like receptors and atherosclerosis: oxidized LDL as an endogenous Toll-like receptor ligand. *Future Cardiology* 2005; 1(6): 785-92. doi: 10.2217/14796678.1.6.785
7. Chávez-Sánchez L., Madrid-Miller A., Chávez-Rueda K., Legorreta-Haquet M. V., Tesoro-Cruz E., Blanco-Favela F. Activation of TLR2 and TLR4 by minimally modified low-density lipoprotein in human macrophages and monocytes triggers the inflammatory response. *Human immunology* 2010; 71(8): 737-744. Doi: 10.1016/j.humimm.2010.05.005
8. Howell K. W., Meng X., Fullerton D. A., et al. Toll-like receptor 4 mediates oxidized LDL-induced macrophage differentiation to foam cells. *Journal of Surgical Research* 2011; 171(1): e27-e31. Doi: 10.1016/j.jss.2011.06.033.
9. Xie P., Cao Y. S., Su P., et al. Expression of toll-like receptor 4, tumor necrosis factor-alpha, matrix metalloproteinase-9 and effects of benazepril in patients with acute coronary syndromes. *Clinical Medicine Insights: Cardiology* 2010; 4: CMC-S5659. Doi:10.4137/CMC.S5659

10. Shao L., Zhang P., Zhang Y., Lu Q., Ma A. TLR3 and TLR4 as potential clinically biomarkers of cardiovascular risk in coronary artery disease (CAD) patients. *Heart and vessels* 2014; 29(5): 690-698. Doi: 10.1007/s00380-013-0421-3
11. Geng H. L., Lu H. Q., Zhang L. Z., et al. Q. Increased expression of Toll like receptor 4 on peripheral-blood mononuclear cells in patients with coronary arteriosclerosis disease. *Clinical & Experimental Immunology* 2006; 143(2): 269-273. Doi:10.1111/j.1365-2249.2005.02982.x
12. Shiraki R., Inoue N., Kobayashi S., et al.. Toll-like receptor 4 expressions on peripheral blood monocytes were enhanced in coronary artery disease even in patients with low C-reactive protein. *Life sciences* 2006; 80(1): 59-66. Doi:10.1016/j.lfs.2006.08.027
13. Xu X. H., Shah P. K., Faure E., et al. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. *Circulation* 2001; 104(25): 3103-3108. Doi: 10.1161/hc5001.100631
14. Edfeldt K., Swedenborg J., Hansson G. K., Yan Z. Q. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation* 2002; 105(10): 1158-1161. doi:10.1161/circ.105.10.1158
15. Ya-Jun Zhu, Chao Wang, Guangyao Song, et al. Toll-like receptor-2 and -4 are associated with hyperlipidemia. *Molecular Medicine Reports* 2015; 12(6): 8241-8246. Doi: 10.3892/mmr.2015.4465.
16. Hjuler Nielsen, M., Irvine, H., Vedel, S., et al. Elevated atherosclerosis-related gene expression, monocyte activation and microparticle-release are related to increased lipoprotein-associated oxidative stress in familial hypercholesterolemia. *PLoS One* 2015; 10(4): e0121516. Doi: 10.1371/journal.pone.0121516
17. Yamakawa N., Ohto U., Akashi-Takamura S., Takahashi K., Saitoh S. I., Tanimura N., et al. Human TLR4 polymorphism D299G/T399I alters TLR4/MD-2 conformation and response to a weak ligand monophosphoryl lipid A. *International immunology* 2013; 25(1): 45-52. Doi: 10.1093/intimm/dxs084
18. Kukharchuk V.V., Ezhov M.V., Sergienko I.V. et al. Diagnostika i korrektsiya narusheniy lipidnogo obmena s tsel'yu profilaktiki i lecheniya ateroskleroza. Rossiyskiye rekomendatsii, VII peresmotr [Diagnosis and correction of lipid metabolism disorders in order to prevent and treat atherosclerosis. *Russian recommendations VII revision*] Ateroskleroz i dislipidemii [Atherosclerosis and dyslipidemia]. 2020; 1(38): 7-42. DOI: 10.34687/2219-8202.JAD.2020.01.0002 (In Russ.)
19. Miroshnikova V.V., Romanova O.V., Ivanova O.N., et al. Targeted sequencing identified novel variants in the LDLR gene in Russian patients with familial hypercholesterolemia. *Biomedical Reports* 2021; 14(1): 15. Doi: 10.3892/br.2020.1391.
20. Ferwerda B., McCall M. B., Alonso S., et al. TLR4 polymorphisms, infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007; 104(42): 16645-16650. Doi: 10.1073/pnas.0704828104
21. Long H., O'Connor B. P., Zemans R. L., et al. The Toll-Like Receptor 4 Polymorphism Asp299Gly but Not Thr399Ile Influences TLR4 Signaling and Function. *PLoS ONE* 2014; 9(4): e93550. Doi:10.1371/journal.pone.0093550
22. Ameziane, N., Beillat, T., Verpillat, P., et al. Association of the Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism with acute coronary events. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2003; 23(12): e61-e64. Doi: 10.1161/01.ATV.0000101191.92392.1D
23. Belforte F.S., Coluccio Leskow F., Poskus E., Penas Steinhardt A. Toll-like receptor 4 D299G polymorphism in metabolic disorders: a meta-analysis. *Molecular biology reports* 2013; 40(4): 3015-3020. Doi: 10.1007/s11033-012-2374-5
24. Wu B. W., Zhu J., Shi H. M., Jin B., Wen Z. C. Association between Toll-like receptor 4 Asp299Gly polymorphism and coronary heart disease susceptibility. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2017; 50. Doi: 10.1590/1414-431X20176306
25. Yang I. A., Holloway J. W., Ye S. TLR4 Asp299Gly polymorphism is not associated with coronary artery stenosis. *Atherosclerosis* 2003; 170(1): 187-190. Doi: 10.1016/S0021-9150(03)00286-7
26. Barbarash O.L., Golovkin A.S., Ponasenko A.V., et al. Rol' polimorfizma genov Toll-podobnykh retseptorov v razvitiy oslozhneniy ateroskleroza The role of Toll-like receptors polymorphism in atherosclerosis complications development. Rossiyskiy kardiologicheskii zhurnal *Russian Journal of Cardiology* 2015; (12):72-79. (In Russ.) Doi: 10.15829/1560-4071-2015-12-72-79
27. Wu B.W., Zhu J., Shi H.M., et al. Association between Toll-like receptor 4 Asp299Gly polymorphism and coronary heart disease susceptibility. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2017; 50(9):e6306. Doi: 10.1590/1414-431X20176306
28. Hommels M.J., Kroon A.A., Netea M.G., et al. The Asp299Gly Toll-like receptor 4 polymorphism in advanced aortic atherosclerosis. *Netherlands Journal of Medicine* 2007; 65(6):203-7.
29. Vainas T., Stassen F.R.M., Bruggeman C.A., et al. Synergistic effect of Toll-like receptor 4 and CD14 polymorphisms on the total atherosclerosis burden in patients with peripheral arterial disease. *Journal of Vascular Surgery* 2006; 44(2):326-32. Doi: 10.1016/j.jvs.2006.04.035
30. Xie X., Shi X., Liu M. The Roles of TLR Gene Polymorphisms in Atherosclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis of 35,317 Subjects. *Scandinavian Journal of Immunology* 2017; 86(1):50-58. Doi:10.1111/sji.12560
31. Netea M. G., Hijmans A., van Wissen S., et al. Toll-like receptor-4 Asp299Gly polymorphism does not influence progression of atherosclerosis in patients with familial hypercholesterolaemia. *European Journal of Clinical Investigation* 2004; 34(2): 94-99. Doi:10.1111/j.1365-2362.2004.01303.x
32. Shalaev S.V., Safiullina Z.M., Kremneva L.V., Abaturova O.V. Sravnitel'naya effektivnost' statinov v profilaktike i lechenii ishemicheskoy bolezni serdtsa [Comparative efficacy of the statins in the preventing and treating of the coronary heart disease]. *Ratsional'naya farmakoterapiya v kardiologii* [Rational Pharmacotherapy in Cardiology]. 2010; 6(6): 865-869. (In Russ.) Doi: 10.20996/1819-6446-2010-6-6-865-869.
33. Boekholdt S. M., Agema W. R., Peters R. J., Zwinderman A. H., et al. Variants of toll-like receptor 4 modify the efficacy of statin therapy and the risk of cardiovascular events. *Circulation* 2003; 107(19): 2416-2421. Doi:10.1161/01.cir.0000068311.40
34. Holloway J. W., Yang I. A., Ye, S. Variation in the toll-like receptor 4 gene and susceptibility to myocardial infarction. *Pharmacogenetics and genomics* 2005; 15(1): 15-21. Doi: 10.1097/01213011-200501000-00003
35. Koushki K., Shahbaz S. K., Mashayekhi K., et al. Anti-inflammatory action of statins in cardiovascular disease: the role of inflammation and toll-like receptor pathways. *Clinical reviews in allergy & immunology* 2021; 60(2): 175-199. Doi: 10.1007/s12016-020-08791-9.
36. Yang S. S., Li R., Qu X., Fang W., Quan Z. Atorvastatin decreases Toll-like receptor 4 expression and downstream signaling in human monocyctic leukemia cells. *Cellular immunology* 2012; 279(1): 96-102. Doi: 10.1016/j.cellimm.2012.09.008
37. Methe H., Kim J. O., Kofler S., Nabauer M., Weis M. Statins decrease Toll-like receptor 4 expression and downstream signaling in human CD14+ monocytes. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2005; 25(7): 1439-1445. Doi: 10.1161/01.ATV.0000168410.44722.86

38. Ishikawa Y., Satoh M., Itoh T., Minami Y., Takahashi Y., Akamura M. Local expression of Toll-like receptor 4 at the site of ruptured plaques in patients with acute myocardial infarction. *Clinical Science* 2008; 115(4): 133–140. Doi:10.1042/cs20070379
39. Kashiwagi M., Imanishi T., Ozaki Y., Satogami K., Masuno T., Wada T., et al. Differential expression of Toll-like receptor 4 and human monocyte subsets in acute myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2012; 221(1): 249–253. Doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.12.030
40. Du P., Gao K., Cao Y., Yang S., et al. RFX1 downregulation contributes to TLR4 overexpression in CD14+ monocytes via epigenetic mechanisms in coronary artery disease. *Clinical epigenetics* 2019; 11(1): 1–19. Doi: 10.1186/s13148-019-0646-9
41. Jaguin M., Houlbert N., Fardel O., Lecureur V. Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cellular Immunology* 2013; 281(1): 51–61. Doi: 10.1016/j.cellimm.2013.01.010
42. Tapp L. D., Shantsila E., Wrigley B. J., Montoro-Garcia S., Lip G. Y. TLR 4 expression on monocyte subsets in myocardial infarction. *Journal of internal medicine* 2013; 273(3): 294–305. Doi: 10.1111/joim.12011.
43. Gankovskaya L.V., Stakhovskaya L.V., Grechenko V.V., et al. Giperexpressiya TLR2 i TLR4 u bol'nykh s ishemicheskim insultom v ostrom periode zabolevaniya Hyperexpression of TLR2 and TLR4 in patients with ischemic stroke in acute period of the disease. *Meditsinskaya immunologiya Medical Immunology* 2020; 22(4): 665–674. (In Russ.) Doi: 10.15789/1563-0625-HOT-1971
44. Kania K.D., Hareza D, Wilczynski J.R., et al. The Toll-like Receptor 4 Polymorphism Asp299Gly Is Associated with an Increased Risk of Ovarian Cancer. *Cells* 2022, 11, 3137. Doi.org/10.3390/cells11193137
45. Proença M.A., de Oliveira J.G., Cadamuro A.C., et al. TLR2 and TLR4 polymorphisms influence mRNA and protein expression in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology* 2015; 21(25):7730–41. Doi: 10.3748/wjg.v21.i25.7730.
46. Ozaki Y., Imanishi T., Hosokawa S., et al. Association of toll-like receptor 4 on human monocyte subsets and vulnerability characteristics of coronary plaque as assessed by 64-slice multidetector computed tomography. *Circulation Journal* 2017; CJ-16. Doi: 10.1253/circj. CJ-16-0688
47. Ozaki Y., Imanishi T., Taruya A., et al. Circulating CD14+ CD16+ monocyte subsets as biomarkers of the severity of coronary artery disease in patients with stable angina pectoris. *Circulation Journal* 2012; CJ-12. Doi: 10.1253/circj.cj-12-0412
48. Rogacev K.S., Cremers B., Zawada A.M., et al. CD14++ CD16+ monocytes independently predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography. *Journal of the American College of Cardiology* 2012; 60(16): 1512–1520. Doi: 10.1016/j.jacc.2012.07.019
49. Singh R.K., Haka A.S., Asmal A., et al. TLR4 (toll-like receptor 4)-dependent signaling drives extracellular catabolism of LDL (low-density lipoprotein) aggregates. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2020; 40(1): 86–102. Doi:10.1161/ATVBAHA.119.313200