

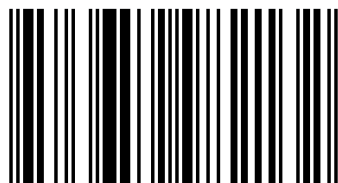
## Атеросклероз

В монографии изложены классические и современные представления о развитии атеросклероза у человека. Обсуждаются слабые стороны современных концепций. Приводятся результаты собственного 35-летнего исследования механизмов атерогенеза. Раскрыты молекулярно-клеточные механизмы этого процесса, в частности, роль пероцитоподобных клеток и модифицированных липопротеидов низкой плотности, открытых автором в крови больных. Показана ключевая роль нарушений межклеточных взаимодействий и первичного накопления липидов в сосудистой стенке в инициации реакции врожденного иммунитета в области ранних атеросклеротических поражений. Установлена связь атеросклероза с дефектами митохондриального генома. Изложена гипотеза участия митохондриальных дисфункций в инициации атеросклеротического поражения. На основании полученных данных разработаны новые способы диагностики атеросклероза и антиатеросклеротической терапии. Эффективность разработок подтверждена клиническими исследованиями. Созданы первые в мире средства прямого антиатеросклеротического действия, эффективность которых не ниже, чем у известных лекарств, применяемых для лечения атеросклеротических заболеваний (клинических проявлений атеросклероза).



**Александр Николаевич Орехов**

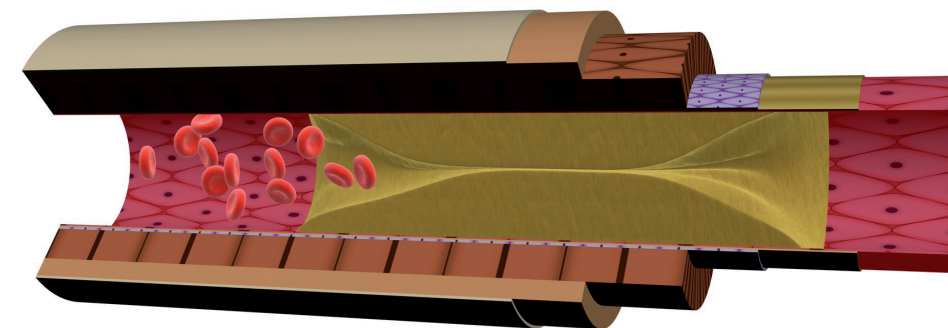
Профессор Александр Николаевич Орехов, доктор биологических наук организовал негосударственный Научно-исследовательский институт атеросклероза, директором которого в настоящее время является. Институт атеросклероза - резидент Инновационного центра Сколково. Деятельность Института связана с фундаментальными исследованиями и практическими разработками



978-3-659-98213-2

Атеросклероз

Орехов



Александр Николаевич Орехов

## Атеросклероз

Молекулярно-клеточные механизмы  
атерогенеза человека;  
антиатеросклеротическая терапия

**Александр Николаевич Орехов**

**Атеросклероз**





**Александр Николаевич Орехов**

## **Атеросклероз**

**Молекулярно-клеточные механизмы  
атерогенеза человека;  
антиатеросклеротическая терапия**

**Palmarium Academic Publishing**

## **Impressum / Выходные данные**

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek: Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Alle in diesem Buch genannten Marken und Produktnamen unterliegen zeichen-, marken- oder patentrechtlichem Schutz bzw. sind Warenzeichen oder eingetragene Warenzeichen der jeweiligen Inhaber. Die Wiedergabe von Marken, Produktnamen, Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen u.s.w. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutzgesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Библиографическая информация, изданная Немецкой Национальной Библиотекой. Немецкая Национальная Библиотека включает данную публикацию в Немецкий Книжный Каталог; с подробными библиографическими данными можно ознакомиться в Интернете по адресу <http://dnb.d-nb.de>.

Любые названия марок и брендов, упомянутые в этой книге, принадлежат торговой марке, бренду или запатентованы и являются брендами соответствующих правообладателей. Использование названий брендов, названий товаров, торговых марок, описаний товаров, общих имён, и т.д. даже без точного упоминания в этой работе не является основанием того, что данные названия можно считать незарегистрированными под каким-либо брендом и не защищены законом о брендах и их можно использовать всем без ограничений.

Coverbild / Изображение на обложке предоставлено: [www.ingimage.com](http://www.ingimage.com)

Verlag / Издатель:

Palmarium Academic Publishing

ist ein Imprint der / является торговой маркой

AV Akademikerverlag GmbH & Co. KG

Heinrich-Böcking-Str. 6-8, 66121 Saarbrücken, Deutschland / Германия

Email / электронная почта: [info@palmarium-publishing.ru](mailto:info@palmarium-publishing.ru)

Herstellung: siehe letzte Seite /

Напечатано: см. последнюю страницу

**ISBN: 978-3-659-98213-2**

Copyright / АВТОРСКОЕ ПРАВО © 2013 AV Akademikerverlag GmbH & Co. KG

Alle Rechte vorbehalten. / Все права защищены. Saarbrücken 2013

## Оглавление

|                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------|----|
| Введение .....                                                   | 9  |
| 1. Научная проблема .....                                        | 10 |
| 2. Современная классификация атеросклеротических поражений ..... | 18 |
| 3. Биология и патология артериальной стенки .....                | 22 |
| 3.1. Развитие архитектуры интимы .....                           | 25 |
| 3.2. Субслои в интимае .....                                     | 26 |
| 3.2.1. Морфология .....                                          | 27 |
| 3.2.2. Толщина интимальных слоев .....                           | 32 |
| 3.2.3. Химические компоненты интимы .....                        | 35 |
| 3.2.3.1. Эластин .....                                           | 35 |
| 3.2.3.2. Коллаген .....                                          | 38 |
| 3.2.3.. Гликозаминогликаны .....                                 | 43 |
| 3.2.3. Фибронектин .....                                         | 44 |
| 3.2.3.5. Липиды .....                                            | 45 |
| 3.3. Цитопатология артериальной стенки .....                     | 49 |
| 3.3.1. Эндотелий .....                                           | 50 |
| 3.3.1.1. Проницаемость и дисфункция эндотелия .....              | 51 |
| 3.3.1.1.1. Эндотелиальная дисфункция .....                       | 52 |
| 3.3.1.1.2. Факторы, влияющие на проницаемость эндотелия .....    | 54 |
| 3.3.1.1.3. Апоптоз и проницаемость эндотелия .....               | 57 |
| 3.3.1.2. Эндотелиальный поверхностный слой .....                 | 60 |
| 3.3.1.3. Гигантские многоядерные эндотелиальные клетки .....     | 63 |
| 3.3.1.3. Гетерогенность эндотелия .....                          | 65 |
| 3.3.1.4. Кластеризованный эндотелий .....                        | 67 |

|          |                                                                       |     |
|----------|-----------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.3.1.5. | Пролиферация эндотелия и атеросклероз                                 | 69  |
| 3.3.1.6. | Функциональные различия клеточных<br>субпопуляций .....               | 74  |
| 3.3.1.7. | Причины неоднородности эндотелия и ее<br>значение в атерогенезе ..... | 76  |
| 3.3.2.   | Субэндотелиальные клетки интимы .....                                 | 80  |
| 3.3.2.1. | Неоднородность интимальных клеток .....                               | 80  |
| 3.3.2.2. | Происхождение клеток прилуминального<br>слоя .....                    | 85  |
| 3.3.2.3. | Иммуноцитохимическое типирование кле-<br>ток интимы .....             | 92  |
| 3.3.2.4. | Субэндотелиальные клетки в первичной<br>культуре .....                | 108 |
| 3.3.2.5. | Гематогенные и оседлые клетки .....                                   | 114 |
| 3.3.2.6. | Звездчатые клетки .....                                               | 122 |
| 3.3.2.7. | Изменение численности интимальной по-<br>пуляции .....                | 126 |
| 3.4.     | Трехмерная цитоархитектоника интимы ...                               | 130 |
| 3.4.1.   | Клеточная сеть в интимае .....                                        | 130 |
| 3.4.2.   | Межклеточная контактная коммуникация                                  | 132 |
| 4.       | Проявления атерогенеза на клеточном<br>уровне .....                   | 139 |
| 4.1.     | Липоидоз .....                                                        | 139 |
| 4.2.     | Пролиферация .....                                                    | 144 |
| 4.3.     | Фиброз .....                                                          | 147 |
| 4.4.     | Связь между липоидозом и другими ате-<br>рогенными проявлениями ..... | 149 |
| 4.5.     | Атерогенные проявления и циклические<br>нуклеотиды .....              | 153 |

|        |                                                                                        |     |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.6.   | Степень межклеточной коммуникации и атерогенные процессы .....                         | 156 |
| 5.     | Клеточные механизмы атерогенеза .....                                                  | 164 |
| 6.     | Роль модифицированных липопротеидов в клеточном липоидозе .....                        | 168 |
| 6.1.   | Циркулирующие модифицированные липопротеиды низкой плотности .....                     | 169 |
| 6.2.   | Индукция атеросклеротических проявлений на клеточном уровне .....                      | 172 |
| 6.3.   | Физико-химические особенности модифицированных липопротеидов .....                     | 174 |
| 6.3.1. | Химический состав .....                                                                | 174 |
| 6.3.2. | Физические параметры .....                                                             | 176 |
| 6.3.3. | Анализ аполипопротеина В .....                                                         | 177 |
| 6.3.4. | Степень окисленности и окисляемость липопротеидов .....                                | 178 |
| 6.4.   | Взаимосвязь между степенью модифицированности ЛНП и атерогенностью липопротеидов ..... | 182 |
| 6.5.   | Множественная модификация липопротеидов .....                                          | 183 |
| 6.6.   | Множественная модификация ЛНП в крови .....                                            | 185 |
| 6.7.   | Природа десиалирующей активности в плазме .....                                        | 188 |
| 6.8.   | Клеточный метаболизм липопротеидов ....                                                | 209 |
| 6.8.1. | Связывание и захват 125I-ЛНП клетками ..                                               | 209 |
| 6.8.2. | Внутриклеточная деградация аполипопротеина В .....                                     | 213 |

|         |                                                                                                           |     |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 6.8.3.  | Метаболизм липидов липопротеидов .....                                                                    | 215 |
| 6.9.    | Механизмы усиления атерогенного потен-<br>циала циркулирующих множественно-<br>модифицированных ЛНП ..... | 216 |
| 6.9.1.  | Ассоциация модифицированных ЛНП .....                                                                     | 217 |
| 6.9.2.  | Образование циркулирующих иммунных<br>комплексов .....                                                    | 218 |
| 6.9.3.  | Формирование комплексов ЛНП с компо-<br>нентами соединительнотканного матрикса                            | 219 |
| 6.10.   | Роль модифицированных липопротеидов<br>в атерогенезе .....                                                | 220 |
| 6.11.   | Особенности атерогенной модификации<br>липопротеидов при сахарном диабете .....                           | 221 |
| 6.11.1. | Атерогенность ЛНП при сахарном диабе-<br>те .....                                                         | 222 |
| 6.11.2. | Неферментативное гликозилирование<br>ЛНП при сахарном диабете .....                                       | 223 |
| 6.11.3. | Десалирированные ЛНП при сахарном<br>диабете .....                                                        | 225 |
| 6.11.4. | Гетерогенность ЛНП при сахарном диабе-<br>те .....                                                        | 226 |
| 7.      | Дефекты митохондриального генома и<br>атеросклероз .....                                                  | 230 |
| 7.1.    | Возможные причины связи дефектов ми-<br>тохондриального генома с атеросклеро-<br>зом .....                | 234 |
| 8.      | Гипотезы, объясняющие развитие атеро-<br>склероза .....                                                   | 238 |
| 8.1.    | Тромбогенная теория атерогенеза .....                                                                     | 238 |

|        |                                                                                                                       |     |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 8.2.   | Реакция сосудистой стенки на повреждение .....                                                                        | 241 |
| 8.3.   | Инфильтративная теория атерогенеза .....                                                                              | 245 |
| 8.4.   | Современные представления о развитии атеросклероза .....                                                              | 252 |
| 8.5.   | Слабые стороны современных представлений об атерогенезе .....                                                         | 263 |
| 8.6.   | Распространенные мифы и заблуждения                                                                                   | 270 |
| 8.6.1. | Миф I – нестабильная бляшка является ключевым типом поражения .....                                                   | 270 |
| 8.6.2. | Миф II - макрофаги являются ключевым клеточным элементом атерогенеза .....                                            | 275 |
| 8.6.3. | Миф III - окисление является важнейшей атерогенной модификацией ЛНП .....                                             | 275 |
| 8.6.4. | Миф IV - атеросклероз является хроническим воспалением .....                                                          | 279 |
| 9.     | Модель атерогенеза человека .....                                                                                     | 284 |
| 10.    | Диагностическая и прогностическая значимость при атеросклерозе циркулирующих иммунных комплексов, содержащих ЛНП .... | 292 |
| 11.    | Анти-ЛНП аферез .....                                                                                                 | 297 |
| 12.    | Перспективы антиатеросклеротической терапии .....                                                                     | 309 |
| 12.1.  | Лекарственные средства .....                                                                                          | 309 |
| 12.2.  | Снижение воздействия факторов риска: достоинства и недостатки .....                                                   | 309 |
| 12.3.  | Современное состояние прямой антиатеросклеротической терапии .....                                                    | 323 |



|         |                                                                                                                          |     |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 13.     | Разработка антиатеросклеротической те-<br>рапии .....                                                                    | 335 |
| 13.1.   | Антиатерогенные и антиатеросклеротиче-<br>ские препараты .....                                                           | 335 |
| 13.2.   | Клеточная модель .....                                                                                                   | 337 |
| 13.4.   | Эффекты сердечнососудистых препаратов<br>на клеточной модели .....                                                       | 341 |
| 13.5.   | Модель ex vivo .....                                                                                                     | 347 |
| 13.6.   | Непрямой антиатерогенный эффект лова-<br>статина .....                                                                   | 348 |
| 13.7.   | Модель in vivo .....                                                                                                     | 350 |
| 14.     | Оптимизация диеты .....                                                                                                  | 356 |
| 14.1.   | Натуральные продукты в антиатеросклеро-<br>тической терапии .....                                                        | 358 |
| 14.2.   | Механизм антиатеросклеротического дей-<br>ствия чеснока .....                                                            | 359 |
| 15.     | Разработка природных антиатеросклероти-<br>ческих препаратов, предотвращающих<br>накопление внутриклеточного холестерина | 366 |
| 15.1.   | Визуализация атеросклероза .....                                                                                         | 367 |
| 15.2.   | Толщина интима-медиа (ТИМ) .....                                                                                         | 368 |
| 15.3.   | Препараты, влияющие на метаболизм ли-<br>пидов .....                                                                     | 369 |
| 15.3.1. | Статины .....                                                                                                            | 370 |
| 15.3.2  | ЛВП-терапия .....                                                                                                        | 375 |
| 15.4.   | Нелипидная антиатеросклеротическая те-<br>рапия .....                                                                    | 376 |
| 15.4.1. | Антагонисты кальция .....                                                                                                | 376 |

|         |                                                                              |     |
|---------|------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 15.4.2. | Ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента .....                           | 378 |
| 15.5.   | Прямая антиатеросклеротическая терапия на основе натуральных продуктов ..... | 378 |
| 15.5.1. | Алликор (чеснок) .....                                                       | 379 |
| 15.5.2. | Инфламинат (календула, бузина, фиалка) ..                                    | 386 |
| 15.5.3. | Каринат (продукт, богатый фитоэстрогенами) .....                             | 387 |
| 15.5.4. | Гранатовый сок .....                                                         | 389 |
| 16.     | Перспективы молекулярной и клеточной терапии .....                           | 393 |
| 16.1.   | Пересадка гена .....                                                         | 393 |
| 16.1.1  | Заболевание периферических сосудов .....                                     | 395 |
| 16.1.2  | Ишемия миокарда .....                                                        | 401 |
| 16.2.   | Антисмысловая (антисенс) технология .....                                    | 411 |
| 16.2.1. | Антисмысловые (антисенс) олигонуклеотиды .....                               | 412 |
| 16.3.   | Рибозимы .....                                                               | 415 |
| 16.4.   | Олигонуклеотидные ловушки .....                                              | 417 |
| 16.5.   | Трансплантация костного мозга .....                                          | 420 |
| 16.6.   | Имплантация клеток .....                                                     | 422 |
| 16.7.   | Предшественники эндотелиальных клеток ..                                     | 425 |
| 16.8.   | Иммуномодуляция .....                                                        | 433 |
| 16.8.1. | Аутоантигены .....                                                           | 434 |
| 16.8.2. | Иммуномодуляционная терапия .....                                            | 435 |
|         | Заключение .....                                                             | 440 |
|         | Список цитированной литературы .....                                         | 441 |



## **Введение**

Болезни, в основе которых лежит атеросклероз, являются главной причиной высокой заболеваемости и смертности в России. Несмотря на определенный прогресс, достигнутый в диагностике, медикаментозном воздействии на факторы риска (в первую очередь — на высокий уровень холестерина в крови) и в хирургическом лечении, радикальных подходов к борьбе с атеросклерозом пока не разработано. Это в основном связано с тем, что атеросклероз не является самостоятельной научной проблемой, но входит в другие медицинские дисциплины, такие как кардиология, неврология, ангиология и прочие. Результатом такого положения дел является преимущественно симптоматическое лечение атеросклеротических заболеваний на фоне отсутствия эффективных методов профилактики возникновения и развития атеросклеротических поражений в сосудистой стенке.

Отделение атеросклероза от его клинических проявлений позволило бы сосредоточить внимание на самом патологическом процессе, на разработке подходов к его диагностике, а также на создании системы эффективной антиатеросклеротической профилактики и терапии.

Среди специалистов распространено мнение, что решение проблемы атеросклероза приведет к увеличению средней продолжительности жизни на 10 лет. Если атеросклерозу суждено стать проблемой, которую можно предупредить, на первое место выступает необходимость лучшего понимания первичных причин и патогенеза атеросклероза.

## 1. Научная проблема

Патогенетически значимые проявления атеросклероза связывают с развитием бляшек в стенке артерий. Ишемическая болезнь сердца, мозговые инсульты, вазоренальная гипертензия, нарушение проходимости сосудов нижних конечностей и многие другие заболевания атеросклеротической этиологии являются следствием резкого снижения скорости кровотока в стратегически значимых участках сосудистого русла (Libby P et al., 2010a; 2011; Soloperto G & Casciaro S, 2012).

Атеросклероз возникает в стенке артерий. На Рисунке 1 схематически изображено строение сосудистой стенки. Артериальная стенка состоит из 3 оболочек: самая внутренняя, ближайшая к просвету сосуда оболочка называется интима. Кнаружи от нее располагается средняя оболочка, называемая медия. Самая наружная оболочка – адвентиция.

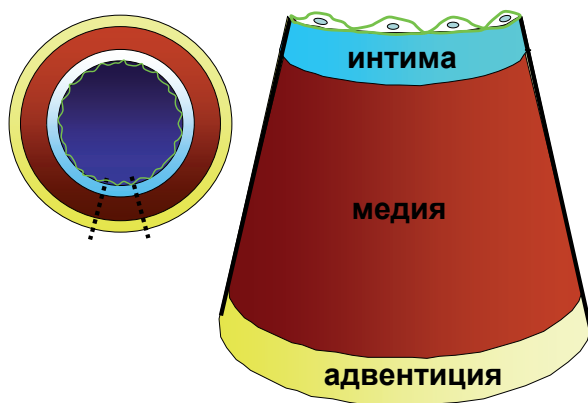


Рисунок 1. Строение сосудистой стенки

Атеросклеротическое поражение возникает и развивается в интима. Интима отделена от просвета сосуда монослоем эндотелиальных клеток, а от меди она отделяется внутренней эластической мембраной (Рисунок 2).

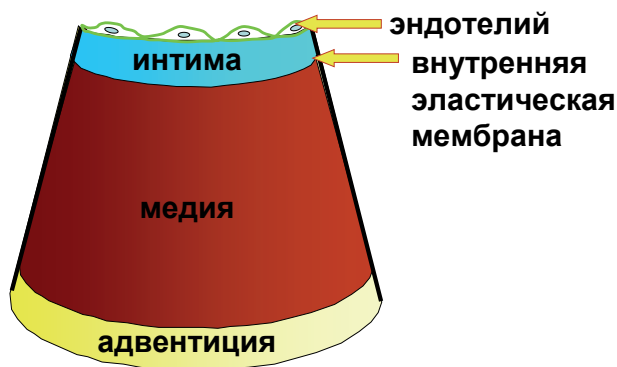


Рисунок 2. Морфологические границы интимы

Основной причиной нарушения кровоснабжения жизненно важных органов при атеросклеротических заболеваниях является атеросклеротическая бляшка. Она представляет собой локальное утолщение интимы, выпячивающееся внутрь просвета сосуда (Рисунок 3).

Атеросклеротическая бляшка состоит из липидного (атеронекротического) ядра, над которым формируется так называемая соединительнотканная покрывка (Libby P, 2012; Siefert SA & Sarkar R, 2012).

Бляшка содержит в своем составе мезенхимальные клетки, окруженные компонентами соединительнотканного матрикса: коллагеновыми и эластическими волокнами, фибронекти-

ном, протеогликанами, микрофибриллами и др. (Businaro R et al., 2012; Libby P, 2012; Quillard T & Libby P, 2012; Wigren M et al., 2012).

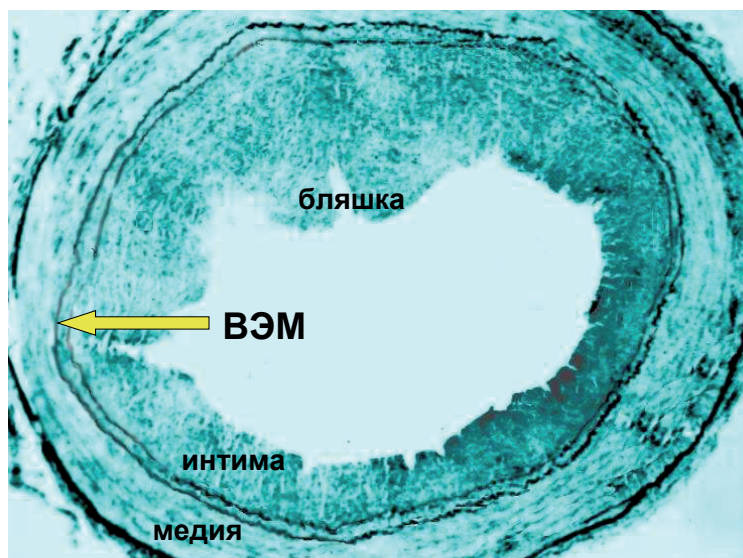


Рисунок 3. Гистологический срез аорты с атеросклеротической бляшкой

Среди многих гипотез развития атерогенеза вплоть до самых последних лет наиболее общепризнанной гипотезой формирования атеросклеротической бляшки считалась концепция «реакция на повреждение», зародившаяся давно и претерпевшая современные модификации (Faggiotto A, 1988; Kim DN et al., 1988; Ross R, 2000; Stemerman MB, 1974a).

Согласно этой концепции, развитие фиброзных изменений при атеросклерозе является реакцией сосудистой стенки на повреждение. В частности, долгое время бытовали представления

(Ross R, 1993a; Ross R, 1995; Ross R & Agius L, 1992; Ross R et al., 1990; Schwartz SM & Ross R, 1984), что в ответ на нарушение целостности эндотелиального покрова происходит адгезия тромбоцитов к интиму артерий и выброс ими специфического фактора роста (PDGF). Считалось, что в результате поступления PDGF в ткань сосудистой стенки происходит миграция гладкомышечных клеток из средней оболочки в интиму, их размножение и изменение фенотипа - превращение способных к сокращению гладкомышечных клеток в синтетически активные клетки (модифицированные гладкомышечные клетки). Модификация гладкомышечных клеток сопровождается секрецией избыточного количества белков внеклеточного матрикса, что приводит к формированию фиброзной покрышки в поверхностных отделах атеросклеротической бляшки (Schwartz SM, 1997; Schwartz SM et al. 1995; Stemerman MB, 1974b).

Гипотеза «реакция на повреждение» была экспериментально обоснована в опытах на обезьянах (Faggiotto A et al., 1984; Faggiotto A & Ross R, 1984; Ross R et al., 1984a), свиньях (Kim DN, 1987; Scott RF et al., 1986a,b), крысах (Stemerman MB, 1974) и кроликах (Takács E et al., 1987). Она соответствовала также результатам, полученным при культивировании гладкомышечных клеток *in vitro* (Bayes-Genis A et al., 2002; Campbell JH & Campbell GR, 1997; Campbell JH et al., 2000; Ross R, 1993b; Thomas AC & Campbell JH, 2001). Однако эта концепция не согласовывалась с результатами изучения динамики развития атеросклеротической бляшки в артериях человека. Так, и в неизмененных участках интимы магистральных артерий человека содержится большое количество мезенхимальных клеток, способных к синтезу и секреции белков внеклеточного матрикса (Geer JC & Haust MD, 1972; Haust MD, 1987; Stary HC, 1994;



2000; Stary HC et al., 1995). Это, однако, не приводит к развитию атеросклеротических бляшек. Кроме того, в местах развития атеросклеротических бляшек артерий человека увеличение численности так называемых «модифицированных гладкомышечных» клеток не столь значительно, как этого можно было бы ожидать, исходя из концепции «реакция на повреждение» (McMahan CA et al., 2006; Tracy RE, 2001). Более того, даже активные приверженцы гипотезы «реакция на повреждение» не смогли установить признаки митотической активности гладкомышечных клеток в областях развития атеросклеротических бляшек у человека (Ross R, 1976). Наконец, было показано, что основной причиной избыточного скопления коллагена и других белков внеклеточного матрикса является не увеличение численности модифицированных гладкомышечных клеток, а возрастание секреторной активности уже предсуществующих в интиме мезенхимальных клеток (Tracy RE, 2005).

Для объяснения последовательности процессов, в результате которых происходит формирование атеросклеротической бляшки, многие исходят из инфильтративной теории атерогенеза, предложенной академиком Н. Н. Аничковым еще в 1913 году. Согласно этой концепции, весь спектр атеросклеротических изменений в интиме артерий индуцируется ускоренным проникновением (инсудацией) липидов из крови в ткань сосудистой стенки.

В последние годы инфильтративная теория атерогенеза подверглась значительной модификации под влиянием данных о роли в атерогенезе липид — транспортирующих частиц — липопротеидов (Riccioni G & Sblendorio V, 2012; Singh M & Bedi US, 2013; Sorci-Thomas MG & Thomas MJ, 2012; Tall AR et al., 2012). Были получены многочисленные доказательства взаимосвязи

между возрастанием в крови атерогенных липопротеидов низкой плотности (ЛНП) и склонностью (риском) развития сердечнососудистых заболеваний атеросклеротической этиологии. Аргументами, подтверждающими правомерность инфильтративной гипотезы Н. Н. Аничкова, являются также и факты об обратно пропорциональной зависимости между уровнем антиатерогенных липопротеидов высокой плотности (ЛВП) и риском развития ишемической болезни сердца (ИБС), инфаркта миокарда и окклюзирующего атеросклероза артерий нижних конечностей (Besler C et al., 2012; Fisher EA et al., 2012). Наконец, наиболее важным аргументом в пользу инсудативной концепции атерогенеза признаются данные об эффективности применения гиполипидемических средств в лечении заболеваний атеросклеротической этиологии (Carroll MD et al., 2012; de Roos B, 2012; Gotto AM Jr & Moon JE, 2012).

Однако, несмотря на существование корреляции между повышенным уровнем содержания липидов в крови и риском развития атеросклероза, остаются недостаточно изученными механизмы взаимосвязи между накоплением липидов в интима артерий и развитием дальнейших атеросклеротических изменений в ткани сосудистой стенки. В частности, в рамках гипотезы, предложенной Н. Н. Аничковым, невозможно объяснить тот факт, что атеросклеротическое поражение возникает и развивается локально или даже фокально. Нельзя объяснить также особую предрасположенность отдельных участков стенки артерий к развитию в них атеросклеротических изменений (Cornhill JF & Roach MR, 1974; Cornhill JF et al., 1990). Действительно, изменения липопротеидного спектра крови отражают общие нарушения процессов секреции этих частиц клетками печени и (или) нарушения их утилизации периферическими тканями. В то

же время атеросклеротические бляшки развиваются лишь в отдельных, как правило - стратегически значимых участках сосудистого русла. Хорошо известно, что атеросклеротические поражения локализуются, преимущественно, в артериях эластического типа, обычно - в местах разветвления крупного артериального ствола на более мелкие ветви. Считают, что формированию атеросклеротических бляшек предшествуют изменения в строении интимы этих артерий. Предполагают, в частности, что развитию атеросклероза способствуют нарушения трехмерной организации коллаген-эластического каркаса стенки магистральных артерий (Lacolley P et al., 2012; Siefert SA & Sarkar R, 2012). Согласно этим представлениям, под воздействием повышенной гемодинамической нагрузки в стратегически значимых участках артериального русла происходят изменения трехмерной организации коллаген-эластического каркаса и это является одной из причин предрасположенности таких участков к избыточному отложению в них липидов.

Следует отметить, что до сих пор факты, аргументирующие правомерность этой, так называемой диффузионной гипотезы атерогенеза, довольно противоречивы. Существенным противоречием инфильтративной теории атерогенеза является невозможность, в рамках этой концепции, объяснить последовательность формирования атеросклеротической бляшки. Как известно, фиброзным изменениям в ткани сосудистой стенки предшествует появление участков с повышенным отложением липидов в интима артерий. Однако строение липидных пятен существенно отличается от структуры фиброзной атеросклеротической бляшки (Stary HC et al., 1995).

Таким образом, несмотря на значительный прогресс в изучении механизмов атерогенеза, многие ключевые звенья этого

процесса остаются недостаточно ясными. В первую очередь это относится к клеточным механизмам возникновения и развития атеросклеротического поражения. В частности, необходимо ответить на следующие вопросы: 1) какие клетки заселяют непо-  
раженную сосудистую стенку и атеросклеротическую бляшку; 2) какие изменения наблюдаются в клетках сосуда при атеросклерозе; 3) чем вызваны эти изменения; 4) какова их роль в атерогенезе. Отсутствуют детальные сведения о роли мезенхимальных клеток интимы в атерогенезе у человека. Кроме того, важнейшими аспектами атерогенеза, требующими дальнейшего детального изучения являются механизмы локального накопления липидов в интимае, что принято рассматривать как первопричину атеросклероза.

## 2. Современная классификация атеросклеротических поражений

На Рисунке 4 схематически представлены основные типы атеросклеротических поражений в артериях человека. Стрелками показаны гипотетические переходы одного типа поражений в другой. Разумеется, подобные переходы наблюдать у человека невозможно, но, с другой стороны, нет данных, которые противоречили бы таким представлениям о развитии событий.

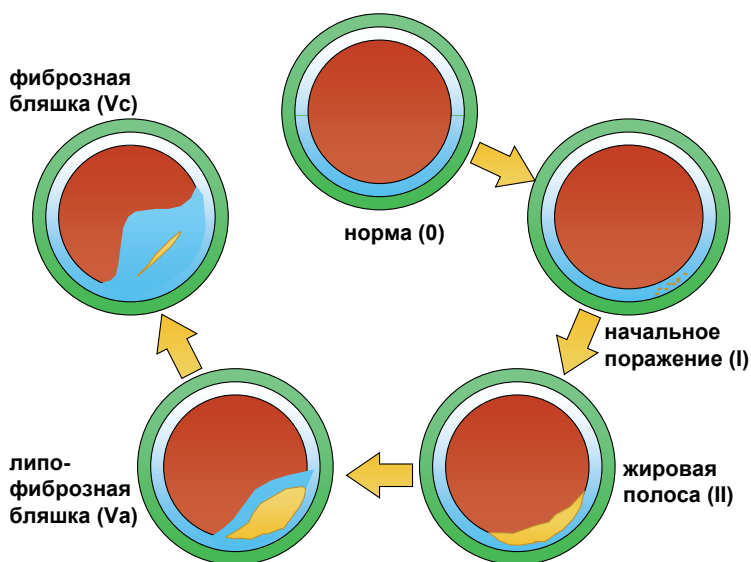


Рисунок 4. Основные типы атеросклеротических поражений человека

Непораженные участки артерий человека и участки с атеросклеротическими поражениями принято идентифицировать макроскопически, а затем микроскопически в соответствии с

классификацией Совета по атеросклерозу Американского Общества по изучению сердца (Stary HC, 1989; 1992; 2000; Stary HC et al, 1994).

Неизменные участки аорты имеют гладкую люминальную поверхность. На вертикальных срезах в интимае выявляют два четко идентифицируемых слоя: прилежащий к просвету протеогликановый слой и примыкающий к медиі мышечно-эластический слой.

Начальные поражения (I тип поражения) макроскопически представляют собой участки с гладкой желтоватой поверхностью, иногда с мелкими желтыми точками. Микроскопические изменения минимальны. Наблюдаются небольшие накопления внеклеточных липидных капель в соединительнотканном матриксе. Помимо оседлых клеток, в участках начальных поражений обнаруживают моноклеарные клетки, количество которых увеличено по сравнению с внешне неизменной интимой. Нарушений в структуре ткани не выявляется. Выявляют единичные пенистые клетки, нагруженные липидами.

Жировые полосы (II тип поражения) макроскопически представляют собой полосы и точки желтого цвета, немного выступающие над поверхностью сосуда. Часто можно обнаружить жировые полосы, сливающиеся между собой в более крупные структуры (кластеры). На срезах ткани липиды выявляются в основном внутриклеточно, как в гладкомышечных клетках, так и в макрофагах. В соединительнотканном матриксе обнаруживают также внеклеточные липиды. Иногда в жировых полосах наблюдают обильное разрастание внеклеточного матрикса. Пенистые клетки образуют слои и скопления.

Липофиброзные бляшки (Va тип поражения). При макроскопическом изучении липофиброзные бляшки выглядят как

сильно выступающие над люминальной поверхностью желтоватые или перламутровые, круглые или эллипсоидные образования. Микроскопически в этих поражениях обнаруживают все изменения, характерные для жировых полос: накопление внутриклеточных липидов, разрастание внеклеточного матрикса. Кроме этого в липофиброзных бляшках выявляют массивное некротическое ядро и расположенную над ним соединительнотканную покрывку. В липофиброзных бляшках имеются участки, по морфологии похожие на участки жировых поражений - плечи липофиброзных бляшек.

Фиброзные бляшки (Vc тип поражения). Фиброзные бляшки макроскопически представляют собой сильно приподнятые жемчужного цвета округлые или овальные образования, микроскопически состоящие в основном из грубого соединительнотканного матрикса, с замурованными в нем клетками. Липидный компонент может быть минимальным или даже отсутствовать.

VI, VII и VIII типы поражений представляют собой осложненные атеросклеротические бляшки со значимыми элементами физического разрыва, тромбоза, кровоизлияний, кальциноза. Такие бляшки имеют значение для определения клинического состояния пациента, а в плане естественного течения атеросклероза являются терминальной стадией атеросклеротического процесса, приводящей к фатальному клиническому исходу. Тем не менее, для разработки патогенетических подходов к профилактике и терапии атеросклероза эти типы поражений в настоящее время не представляют потенциальных возможностей (Stary HC et al., 2000).

Значение современной патоморфологической классификации атеросклеротических поражений заключается в том, что она адекватно отражает естественное течение атеросклероти-

ческого процесса и позволяет определить ключевые этапы формирования поражений на макроскопическом и микроскопическом уровне, и, следовательно, определить возможности терапевтических воздействий даже на этапе субклинического (бессимптомного) атеросклероза.



### 3. Биология и патология артериальной стенки

Следует подчеркнуть, что атеросклероз — явление, характерное только для человека. Экспериментально индуцируемые изменения, имитирующие атерогенные изменения в артериях лабораторных животных, по своему строению и клеточному составу значительно отличаются от зрелых атеросклеротических бляшек артерий человека. При этом атеросклеротические поражения у людей локализуются только в артериях эластического и мышечно-эластического типов. Атеросклеротические бляшки не формируются ни в артериях более мелкого калибра, ни в венах, а также - не развиваются спонтанно в кровеносных сосудах лабораторных животных.

Обычно атеросклеротические изменения развиваются у взрослых людей. У детей от одного года до трех лет возраста часто происходит формирование липидных пятен и полосок, состоящих из пенистых клеток и внеклеточно расположенных липидов. Однако эти изменения, представляющие собой стадию, предшествующую развитию зрелых атеросклеротических бляшек, в большинстве своем практически не трансформируются в участки, содержащие липидное ядро и фиброзную покрышку. Липидные пятна у детей во многих случаях столь же спонтанно исчезают (подвергаются обратному развитию), как и возникают (Stary HC, 1994; 2000).

Липидные пятна в артериях травоядных животных легко индуцировать кормлением их пищей, обогащенной холестерином. Однако в этих случаях (например, у кроликов) липидные пятна не преобразуются в структуры, подобные атеросклеротическим изменениям артерий человека. Изменения в артериях животных, имитирующие атеросклеротическую бляшку у чело-

века, пытаются моделировать с использованием моделей, повреждающих целостность эндотелиальной выстилки. Однако возникающие в ответ на механическую травму поражения стенки артерий этих животных даже отдаленно не напоминают сложно организованную структуру, каковой в действительности является атеросклеротическая бляшка у человека.

Формирование спонтанных атеросклеротических бляшек в артериях взрослого человека связывают с особенностями строения их внутреннего слоя - интимы. Важно, что структурированная интима, содержащая клетки макрофагального и гладкомышечного происхождения, в аорте детей практически отсутствует. С этим фактом связывают невозможность непосредственной трансформации липидных пятен, довольно часто встречающихся у детей раннего возраста, в зрелую атеросклеротическую бляшку (Stary HC, 1994; 2000).

Особого внимания заслуживают данные о том, что и у большинства лабораторных животных интима состоит из эндотелия, расположенного непосредственно на внутренней эластической мембране. Как и у детей, у большинства животных отсутствует именно та структура, в которой и формируется зрелая атеросклеротическая бляшка.

Принципиально иная ситуация возникает в артериях эластического типа у взрослых людей. Уже в ранних морфологических исследованиях было показано, что в аорте и коронарных артериях детей в возрасте от 6 месяцев до 1 года в интиме появляются две эластические мембраны - внутренняя пограничная пластинка и внутренняя эластическая мембрана. Между этими мембранами появляются клеточные элементы. В первой декаде жизни ребенка интима артерий эластического типа становится уже достаточно организованной структурой, достигаю-

щей толщины 25-30 мкм. Морфологически различимая интима появляется, обычно, у людей к 15-16-летнему возрасту, но окончательное формирование этой внутренней оболочки в артериях эластического и мышечно-эластического типа происходит к 20-35 годам. Этот период, как правило, совпадает со временем начала формирования атеросклеротических бляшек у человека.

Как упоминалось выше, атеросклеротические поражения возникают в магистральных артериях эластического и мышечно-эластического типа. Изнутри, со стороны просвета, артерия выстлана монослоем эндотелиальных клеток. Под эндотелием начинается самый внутренний слой артериальной стенки – интима. Наружный слой – адвентиция. Между интимой и адвентицией располагается средний слой – медиа, который населяют преимущественно гладкомышечные клетки.

Субэндотелиальное пространство интимы - это именно та часть артериальной стенки, в которой возникают первые атеросклеротические изменения, в которой в основном происходит развитие атеросклеротического поражения и в которой, в конечном счете, формируется атеросклеротическая бляшка, характеризующаяся скоплением клеточных масс, накоплением липидов, коллагена, гликозаминогликанов, других компонентов соединительнотканного матрикса.

Ниже приведены результаты изучения архитектуры субэндотелиальной интимы аорты взрослого человека, описаны также особенности распределения в ней липидов, коллагена, эластина, гликозаминогликанов, то есть тех химических компонентов, количество которых изменяется при атеросклерозе. Ниже будет дано также описание клеток интимы, имеющих различную морфологию и, возможно, различное происхождение. Будет

рассмотрена локализация этих клеток в интима и изменение их численности при атеросклерозе.

### **3.1. Развитие архитектуры интимы**

Артерии эластического типа, к которым относится аорта, имеют сравнительно хорошо развитую внутреннюю оболочку - интиму. Однако на ранних стадиях эмбрионального развития эндотелий непосредственно примыкает к внутренней эластической мембране и субэндотелиального (интимального) пространства фактически не существует. Морфологически различимая интима появляется в аорте человека иногда еще в эмбриональный период. Определенный субэндотелиальный слой изредка может быть обнаружен в аорте человека уже в 6 месяцев внутриутробной жизни (Geer JC & Haust MD, 1972). Иногда различимая интима (обычно тонкая и имеющая скорее фокальный, чем диффузный характер) присутствует при рождении (Geer JC & Haust MD, 1972). Между 6 месяцами и 1 годом в интима можно различить уже две эластические мембраны с клеточными элементами между ними и эндотелием, покрывающим самую внутреннюю эластическую мембрану (Movat HZ et al., 1958). В первой декаде интимы становится более определенной, имея толщину более 30 мкм (Duggal K et al., 1966). Во второй половине первой декады компоненты соединительной ткани и клеточные элементы имеют тенденцию образовывать два слабо отграниченных слоя - один более компактный и клеточный (толщиной в 2-3 клетки) формирует внешнюю, примыкающую к медию, часть интимы, а другой формирует внутреннюю часть, относительно рыхлую и заселенную редко расположенными клетками. В течение второй декады жизни в аорте появляется хорошо разви-

тая интима. В ней можно ясно различить два слоя - мышечно-эластический и эластико-гиперпластический (Movat HZ et al., 1958). В мышечном слое, примыкающем к меди, клетки ориентируются продольно, то есть параллельно длинной оси аорты. Этот слой ограничен от меди, в которой клетки имеют циркулярную ориентацию, внутренней эластической мембраной. Более внутренний эластико-гиперпластический слой состоит из беспорядочно разбросанных клеток, тонких эластических мембран и основного вещества. В некоторых случаях в этот период жизни можно различить и плохо отграниченный самый внутренний слой, состоящий из нежных коллагеновых сеточек и скудных эластических волокон; клетки в этом слое неоднородны и их мало (Duggal K et al., 1966). В третьей декаде интима продолжает утолщаться, но морфологически мало отличается от интимы второй декады. В четвертой и пятой декаде непораженная атеросклерозом интима имеет толщину более 100 мкм (Duggal K et al., 1966; Schönfelder M, 1969), в ней всегда можно встретить два, а иногда - три слоя.

### **3.2. Субслои в интимае**

Итак, интима аорты взрослого человека состоит из двух слоев, имеющих четкие морфологические границы (Geer JC & Haust MD, 1972; Gross L, 1934; Jores L, 1924; Movat HZ et al., 1958; Velican D & Velican C, 1977; Willens SL, 1951). Схематически границы слоев представлены на Рисунке 5.

### 3.2.1. Морфология

Слои интимы отличаются друг от друга по морфологии. Мышечно-эластический слой содержит хорошо выраженные эластические мембраны и клетки вытянутой формы, ориентированные вдоль длинной оси сосуда. Волокна соединительнотканного матрикса протеогликанового слоя не имеют четкой ориентации относительно оси сосуда, а клетки представляют собой морфологически гетерогенную клеточную популяцию (Stary HC, 1989; Virchow RV, 1856). С помощью классических гистологических и гистохимических методов было показано, что в непораженной интиме мышечно-эластический слой содержит гораздо больше эластиновых волокон, по сравнению с протеогликановым, тогда как в протеогликановом слое выявляется больше волокон коллагена и ретикулина (Velican D & Velican C, 1977). Слои отличаются друг от друга по составу гликозаминогликанов (Velican D & Velican C, 1977).

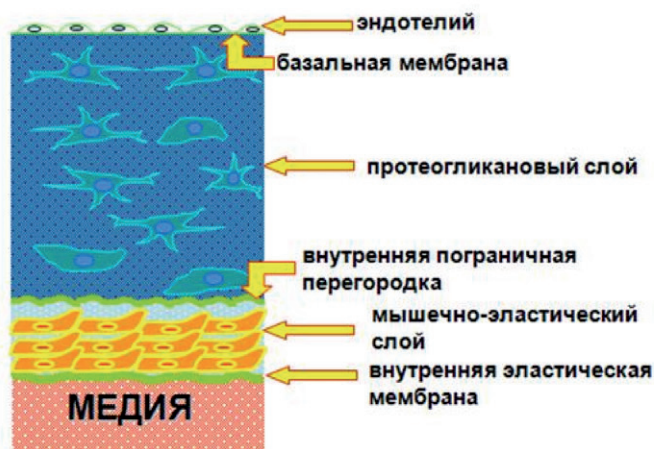


Рисунок 5. Архитектура интимы

Мышечно-эластический слой (Gross L et al., 1934), называемый также слоем Йореса, состоит из нескольких рядов продольно расположенных клеток с пробегающими между ними эластическими волокнами. От меди этот слой отделен внутренней эластической мембраной. Кнутри от мышечно-эластического слоя следует довольно толстая (иногда даже более толстая, чем внутренняя эластическая мембрана) так называемая внутренняя пограничная пластинка (Аничков НН, 1947). За ней, в направлении просвета сосуда, проходит несколько рядов довольно тесно расположенных эластических волокон и пластинок, составляющих, вместе с пограничной пластинкой эластико-гиперпластический слой (Gross L et al., 1934). Этот внутренний интимальный слой, носящий названия: эластико-гиперпластический (Movat HZ et al., 1958), соединительнотканый (Geer JC & Haust MD, 1972; Haust MD, 1986; 1989; Stary HC, 1989), прилуминальный (Velican D & Velican C, 1977), протеогликановый (Stary HC, 1989), находится между внутренней пограничной пластинкой и слоем эндотелия, выстилающего просвет аорты (Рисунок 6).

Эластические волокна гиперпластического слоя по направлению к просвету становятся все тоньше, пластинки исчезают, к эластическим элементам примешивается все большее количество коллагеновых волокон. Таким образом, ближе к просвету артерии гиперпластический слой незаметно переходит в соединительнотканый волокнистый слой.

Наилучшим критерием для идентификации «территории», занимаемой каждым слоем, является направление эластических волокон, особенно в гиперпластическом слое, в котором они всегда расположены в продольном направлении. Волокна коллагена и эластина в мышечном слое имеют циркулярное или

даже спиральное расположение, поэтому на срезах они представлены короткими толстыми волокнами или глыбками.

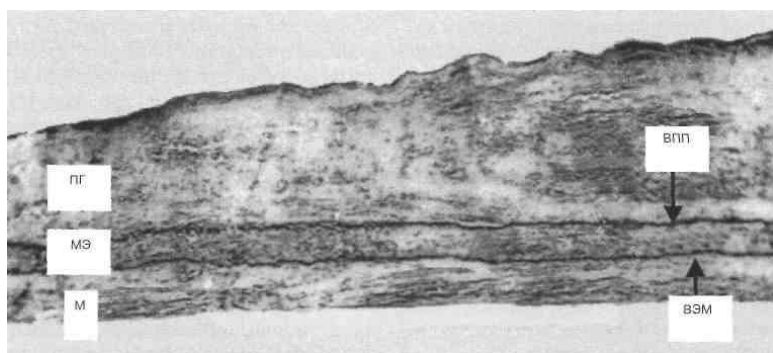


Рисунок 6. Вертикальный срез участка аорты человека без атеросклеротических изменений

Интима отделена от медиі внутренней эластической мембраной (ВЭМ). Протеогликановый слой интимы (ПГ), прилежащий к просвету сосуда, отделен от мышечно-эластического слоя (МЭ), прилежащего к медиі (М), внутренней пограничной пластинкой (ВПП).

Окраска на эластин по Верхофу.  $\times 80$ .

На срезах аорты в большинстве случаев четко видны две упомянутые выше эластические мембраны, которые служат морфологическими границами субслоев (Рисунок 7а). Одна из них - внутренняя эластическая мембрана - отделяет интиму от медиі. Другая - внутренняя пограничная пластинка - отделяет мышечный слой от гиперпластического. Подобной четкой границы между гиперпластическим и соединительнотканым слоем нет.

В некоторых образцах соединительнотканый слой можно локализовать с помощью окраски на ретикулин. На срезах он выглядит светло-коричневым, тогда как в гиперпластическом и



мышечном слое содержатся черные или темно-коричневые волокна (Рисунок 8).

Благодаря различной ориентации волокон соединительной ткани и наличию хорошо развитых пограничных эластических мембран, в большинстве случаев удается легко механически отделить интиму от меди и интиму, в свою очередь, разделить на мышечный и протеогликановый слой, состоящий из гиперпластического и соединительнотканного слоя.

В некоторых случаях можно дополнительно механически разделить протеогликановый слой на два или даже три слоя. Однако, при последующем исследовании под микроскопом, оказывается, что механическое разделение в этих случаях носит случайный характер и не соответствует морфологическому разделению на гиперпластический и соединительнотканый слой. Вследствие того, что соединительнотканый и гиперпластический слой трудно разграничить морфологически и разделить механически, ниже мы будем использовать термин «протеогликановый слой» как совокупность этих двух слоев интимы.

Описанная выше архитектура субэндотелиальной интимы, состоящей из двух или трех слоев характерна для так называемого диффузного интимального утолщения. Этим термином определяются те изменения в толщине артериальной интимы, которые имеют место в течение взрослой жизни (Geer JC & Haust MD, 1972).

Утолщение интимы называется диффузным, поскольку оно, в конечном счете, захватывает всю интиму по окружности и длине артерии и то, что у взрослого человека называют «нормальными», «внешне нормальными», «невовлеченными» или «непораженными» участками интимы, практически во всех случаях надо рассматривать как зоны диффузного интимального

утолщения.

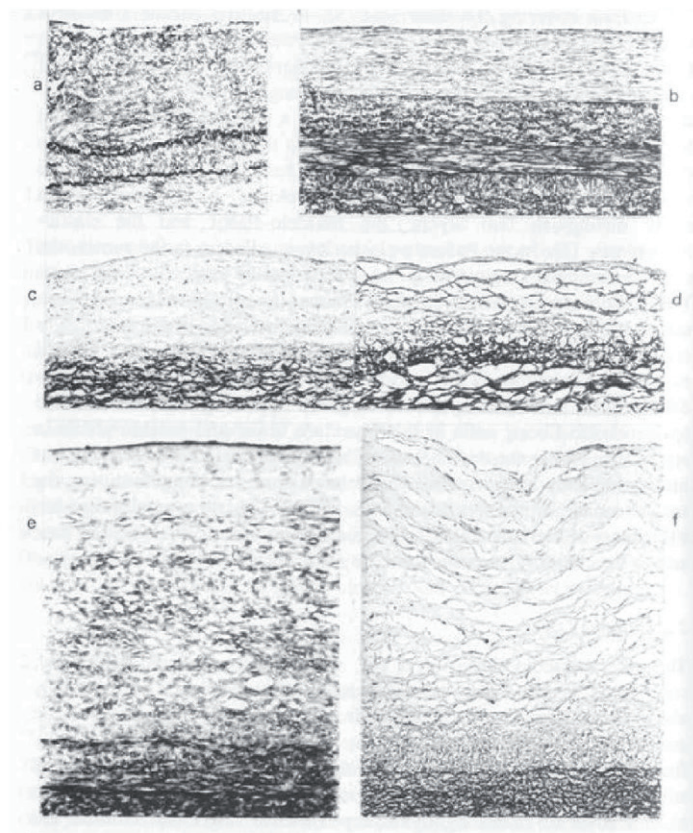


Рисунок 7. Эластин в аорте человека

a – неповрежденный участок, поперечный срез. Две эластические мембраны ограничивают мышечный слой. х 80.

b – неповрежденный участок, продольный срез. Эластин в прилуминальном слое представлен фибриллами. х 80.

c – жировая полоса. Обращают на себя внимание пустоты. х 70.

d – жировая полоса. Вблизи просвета видны крупные пустоты. х 70.

e – фиброзная бляшка. х 100.

f – липофиброзная бляшка. х 100.

Окраска по Верхофу.

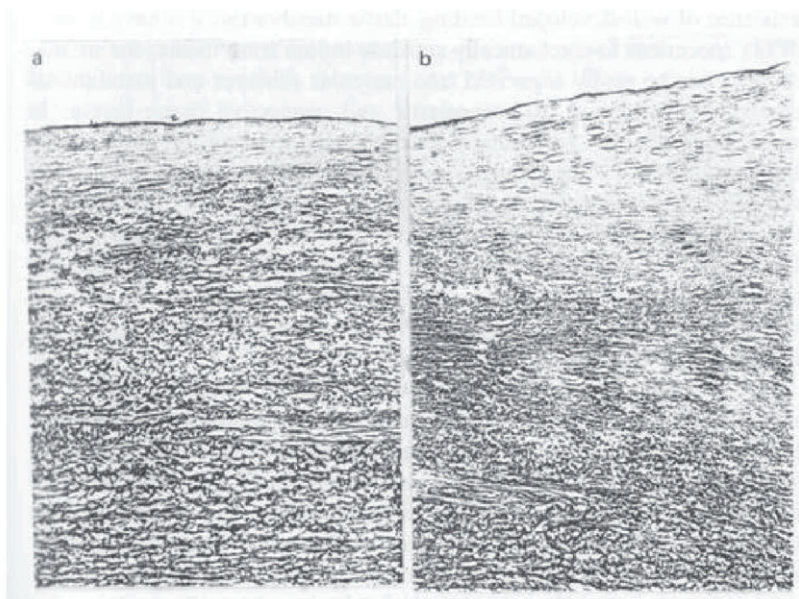


Рисунок 8. Ретикулин в аорте человека

а – непораженный участок.

б – фиброзная бляшка.

Поверхностный соединительнотканый слой светлее, чем остальная интима.

Окраска на ретикулин, х 100.

### 3.2.2. Толщина интимальных слоев

В зонах атеросклеротических поражений толщина интимы, как правило, значительно превосходит толщину внешне нормальных участков аорты. Наибольшей толщины интима достигает в атеросклеротической бляшке.

Отношение атеросклеротической бляшки к слоям нормальной интимы представляется в следующем виде. В пограничных участках между бляшкой и нормальной интимой артерий видно, что ее гиперпластический и мышечный слой про-

долгаются под покрывку (Рисунок 9). Что касается покрывки, то есть пласта из плотной соединительной ткани, то она является, в сущности, продолжением и видоизменением сильно утолщенного соединительнотканного слоя интимы (Аничков НН, 1947). В некоторых случаях в структуру покрывки частично вовлекается гиперпластический слой.

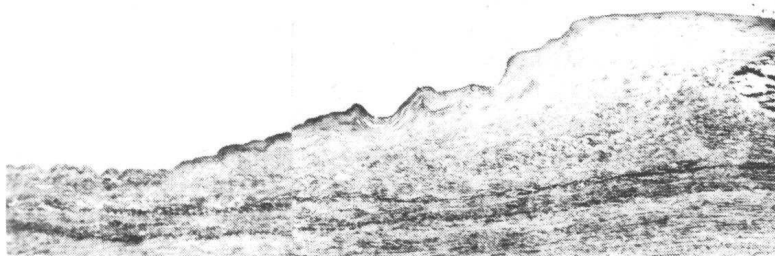


Рисунок 9. Непораженный участок и край бляшки

Видно, что утолщение атеросклеротической интимы происходит в основном за счет разрастания прилуминального слоя, толщина мышечного слоя существенно не изменяется.

Окраска по Верхофу,  $\times 40$ .

Мышечный слой мало изменяется в атеросклеротическом поражении, и имеет приблизительно одинаковую толщину в бляшке и лежащих рядом непораженных участках интимы (Рисунок 9). Аккуратными измерениями большого количества образцов удалось установить, что мышечный слой в бляшке толще, чем в непораженной интиме в среднем всего на 11%, а в таком типе атеросклеротического поражения как жировая полоса мышечный слой имеет такую же толщину, что и в норме (Рисунок 10).



Рисунок 10. Субслои в атеросклеротической бляшке

В отличие от мышечного слоя, протеогликановый слой, состоящий из гиперпластического и соединительнотканного слоев, драматически изменяется в атеросклеротическом поражении. Он резко утолщается в бляшке и составляет, собственно, ту часть интимы, которая выпячивается в просвет, уменьшая проходимость сосуда (Рисунки 3, 10, 11). Толщина этого слоя существенно возрастает в зонах жировой полосы. В этом типе поражения толщина протеогликанового слоя почти в два раза превышает его толщину в норме (Рисунок 11). В бляшке протеогликановый слой еще толще; в среднем он в 4 раза толще, чем в непораженной интиме (Рисунок 11). Толщина протеогликанового слоя в бляшке в некоторых случаях в 10-20 раз превосходит толщину мышечного слоя.

Таким образом, локальное утолщение интимы - одно из основных макро- и микроскопических проявлений атеросклероза - является следствием разрастания протеогликанового слоя. Толщина же мышечного слоя практически не изменяется.

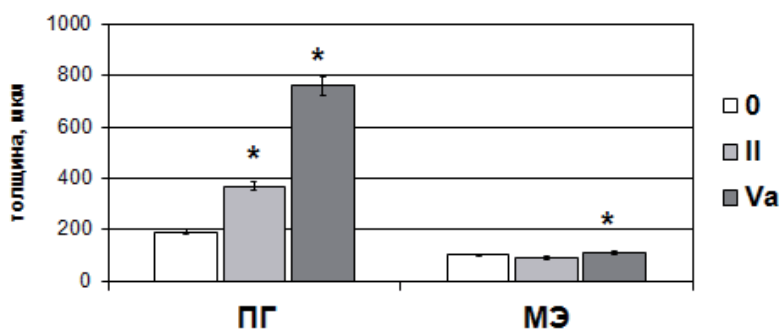


Рисунок 11. Толщина слоев интимы аорты человека в норме и в атеросклеротических поражениях

Толщину слоев интимы измеряли с помощью окуляр-микрометра на вертикальных срезах непораженных участков, жировых полос и липофиброзных бляшек.

0 - норма (106), II - жировые полосы (72), Va - липофиброзные бляшки (177). В скобках указано число проанализированных случаев.

ПГ - протеогликановый слой интимы, МЭ - мышечно-эластический слой интимы.

Внешне непораженные и атеросклеротически измененные участки идентифицировали согласно классификации Совета по атеросклерозу Американской ассоциации по изучению сердца (Stary et al., 1994).

\* - достоверное отличие от толщины в непораженных участках интимы,  $p < 0.05$

### 3.2.3. Химические компоненты интимы

#### 3.2.3.1. Эластин

Мышечный слой содержит гораздо больше эластина по сравнению с протеогликановым. Эластин в нем организован в виде волокон и нешироких пластин, расположенных вдоль

длинной оси сосуда. Волокна эластина в мышечном слое имеют приблизительно такой же вид, что и в меди, однако они более тонкие и извилистые. Вследствие продольного расположения волокон и пластин, их поперечные срезы выглядят как глыбки либо сильноизвилистые и очень короткие волокна (Рисунок 7). Как указывалось выше, мышечный слой с двух сторон ограничен толстыми эластическими мембранами. В грудной аорте обе мембраны состоят из продольно ориентированных поперечно извилистых эластических пластинок. На поперечных срезах они выглядят состоящими из отдельных коротких, волнообразно извилистых волокон (Рисунок 7). В зонах атеросклеротических поражений (жировых полосах и бляшках) организация эластина мышечного слоя несколько не отличается от его организации в зонах свободных от поражений (Рисунок 7с–f).

В протеогликановом слое эластин организован в виде тонких пластин, которые на продольных и поперечных срезах имеют вид волоконца (Рисунок 7а). По направлению к просвету расстояние между пластинками увеличивается, сами пластинки становятся все тоньше. Чем ближе к просвету, тем чаще среди пластинок появляются тонкие фибриллы, не имеющие определенной ориентации. На срезах они выглядят в виде точек и очень коротких фибрилл (Рисунок 7а). В большинстве случаев в тонкой полоске вблизи эндотелия эластин гистохимически вообще не выявляется.

В жировой полосе, структура эластина, характерная для непораженного гиперпластического слоя, вблизи мышечного слоя, в общем, сохраняется, однако расстояние между эластическими пластинками увеличивается. Ближе к просвету, в протеогликановом слое появляются округлые пустоты, которые остаются на месте липидов, экстрагированных их образца в ре-

зультате парафиновой заливки (Рисунок 7с). В некоторых случаях в этих пустотах можно обнаружить остатки клеток, имеющих пенистую цитоплазму. Чем ближе к просвету, тем пустоты становятся крупнее. Между пустотами располагаются редкие и тонкие эластические фибриллы с резко выраженной извилистостью. Часто эластиновые структуры между пустотами вообще не выявляются. Между эндотелиальной выстилкой и ближайшими к просвету пустотами располагается тонкая полоска нежных волнистых эластических фибрилл (Рисунок 7с).

В бляшке, кнутри от мышечного слоя, эластические структуры претерпевают существенные изменения вследствие разрастания соединительной ткани и отложения липидов. Чисто фиброзные бляшки отличаются по архитектуре эластических структур от липидных и липофиброзных бляшек.

Фиброзная бляшка, основным компонентом которой является коллаген, в части, прилегающей к мышечному слою, имеет тонкие эластические пластинки. Вблизи просвета эти пластинки исчезают и заменяются очень тонкими, плотно упакованными фибриллами, которые слабо окрашиваются на эластик (Рисунок 7е). Фибриллы входят в покрывку бляшки, которая часто выглядит плотной однородной массой с большими продольно вытянутыми пустотами. Такие пустоты значительно крупнее, обнаруживаемых в липидной полосе и не содержат клеточного материала.

Та часть липидной или липофиброзной бляшки, которая примыкает к мышечному слою, обычно состоит из тонких плотно упакованных эластических пластинок. Толщина этой части бляшки несколько превосходит толщину мышечного слоя (Рисунок 7f). Далее, ближе к просвету, имеется более или менее значительная область - ядро липидной бляшки, в которой



нарушена организация соединительнотканых компонентов. Эластин в ней представлен короткими волокнами, не имеющими определенной ориентации. Таких областей в липофиброзной бляшке может быть несколько, между ними встречаются одиночные эластические фибриллы. От просвета ядро отделяется соединительнотканной покрывкой, достигающей иногда значительной толщины. Структура эластина в покрывке липофиброзной бляшки такая же, как в покрывке чисто фиброзной бляшки.

### **3.2.3.2. Коллаген**

Общее содержание коллагена в протеогликановом и мышечном слое непораженной аорты приблизительно одинаково (Таблица 1). В жировой полосе содержание коллагена увеличивается в обоих слоях, однако в мышечном слое оно увеличивается всего в 1,5 раза (отличие от нормы статистически незначимо), а в протеогликановом - в 2,7 раза. В атеросклеротической бляшке, в протеогликановом слое коллагена в 3,8 раза больше, чем в норме, а в мышечном - в 2,6 раза.

Слои интимы отличаются друг от друга также характером распределения различных типов коллагена (Orekhov AN et al., 1987a). С помощью иммунофлуоресцентной методики было обнаружено, что различные генетические типы коллагена распределяются в интима по-разному. В частности, коллаген IV и V типа сосредоточен в протеогликановом слое под эндотелием (Madri et al., 1980; McCullagh KG et al., 1980). Коллаген I типа распределен более или менее равномерно по всей интима (McCullagh KG et al., 1980), а коллаген III типа локализуется

преимущественно вблизи меди (Madri et al., 1980; McCullagh KG et al., 1980).

Таблица 1. Распределение коллагена и липидов в субслоях интимы аорты человека

| Слой           | Норма<br>(5)                              | Жировая<br>полоса<br>(7) | Бляшка<br>(6)  |
|----------------|-------------------------------------------|--------------------------|----------------|
|                | Коллаген, мкг на 0,25 см <sup>2</sup>     |                          |                |
| прилуминальный | 162 ,3±8 ,8                               | 442 ,0±10 ,6*            | 622 ,0±8 ,7*   |
| мышечный       | 167 ,8±7 ,0                               | 245 ,7±6 ,5              | 441 ,7±6 ,9*   |
|                | Общие липиды, мкг на 0,25 см <sup>2</sup> |                          |                |
| прилуминальный | 271 ,1±11 ,1                              | 864 ,2±16 ,3*            | 2175 ,5±22 ,9* |
| мышечный       | 140 ,2±5 ,2                               | 362 ,7±12 ,4*            | 609 ,3±22 ,4*  |

В скобках указано число определений. Звездочкой отмечено статистически значимое отличие от нормы ( $p < 0,05$ , критерий Стьюдента).

В мышечном слое непораженной интимы довольно толстые волокна коллагена располагаются рядом с эластическими пластинками. Эти волокна состоят из фибрилл коллагена I и III типа (Рисунок 12а,ф), причем фибриллы коллагена III типа тоньше, чем фибриллы коллагена I типа. Определенной ориентации волокна коллагена не имеют. Иногда основная часть волокон расположена вдоль длинной оси сосуда, либо поперек, в других случаях соседние волокна располагаются и вдоль, и поперек, многие из них извиваются в плоскости параллельной плоскости

эндотелиальной выстилки. В мышечном слое коллагена IV и V типа значительно меньше, чем в протеогликановом (Рисунок 12k,p).

В протеогликановом слое внешне нормальной интимы коллаген I типа организован в виде волокон, большая часть которых имеет продольную ориентацию (Рисунок 12a). Чем ближе к просвету, тем тоньше становятся волокна, непосредственно под эндотелием коллаген I типа сосредоточен в виде узкой полосы, состоящей из плотно упакованных очень тонких фибрилл (Рисунок 12k). Приблизительно такую же архитектуру имеет в протеогликановом слое коллаген III типа, волокна которого несколько тоньше волокон коллагена I типа. Реакция на коллаген IV типа тем ярче, чем ближе к просвету локализуются его структуры. В протеогликановом слое коллаген этого типа окружает отдельные клетки. Значительное его количество выявляется непосредственно под эндотелием в базальной мембране (Рисунок 12k). Коллаген V типа, содержание которого в протеогликановом слое выше, чем в мышечном, образует здесь тончайшую фибриллярную сетку и иногда окружает отдельные клетки (Рисунок 12p). Он, так же как и коллаген IV типа входит в состав субэндотелиальной базальной мембраны.

В мышечном слое коллаген V типа представлен в виде тоненькой сеточки, а коллаген IV типа распределен скорее диффузно, чем имеет определенную структуру. В атеросклеротических поражениях структуры коллагена мышечного слоя не претерпевают никаких изменений.

В жировой полосе, во внутренней части протеогликанового слоя, волокна коллагена I и III типа становятся более рыхлыми, между ними появляются крупные пустоты, соответствующие локализации жировых капель (Рисунок 12b,l). Во многих случаях

ориентация волокон коллагена во внутренней части протеогликанового слоя имеет продольную направленность, а в наружной части - поперечную. Ближе к просвету, рыхло расположенные волокна оплетают множество липидных капель различного размера. В наружной части волокна перемежаются с сильно извивающимися продольно ориентированными тонкими фибриллами; в этой части протеогликанового слоя могут также содержаться жировые капли, но более мелкие, чем вблизи просвета. Подразделение протеогликанового слоя на внутреннюю и наружную части, отличающиеся архитектурой коллагена, не соответствует разделению на соединительнотканый и гиперпластический слой. Коллаген IV и V типа накапливается преимущественно в базальной мембране эндотелия (Рисунок 12l,g), в остальной части интимы, вовлеченной в поражение типа жировой полосы, он распределен довольно равномерно.

В покрышке атеросклеротической бляшки коллагена значительно больше, чем в остальной ее части, причем здесь имеет место накопление коллагена всех типов. В покрышке располагаются очень толстые волокна коллагена I типа и менее толстые - III типа, между волокнами могут быть довольно широкие пространства, в других случаях вся покрышка гиалинизирована. Коллаген IV типа образует довольно толстый субэндотелиальный слой в области базальной мембраны эндотелия, здесь же накапливается и коллаген V типа. Кроме того, коллаген IV и V типа образует толстые капсулы вокруг субэндотелиальных клеток. В ядре липофиброзной бляшки коллагена мало; четко организованных волокон коллагена I и III типа нет. Вокруг отдельных клеток встречаются редкие капсулы, образованные коллагеном IV, в меньшей степени V типа.

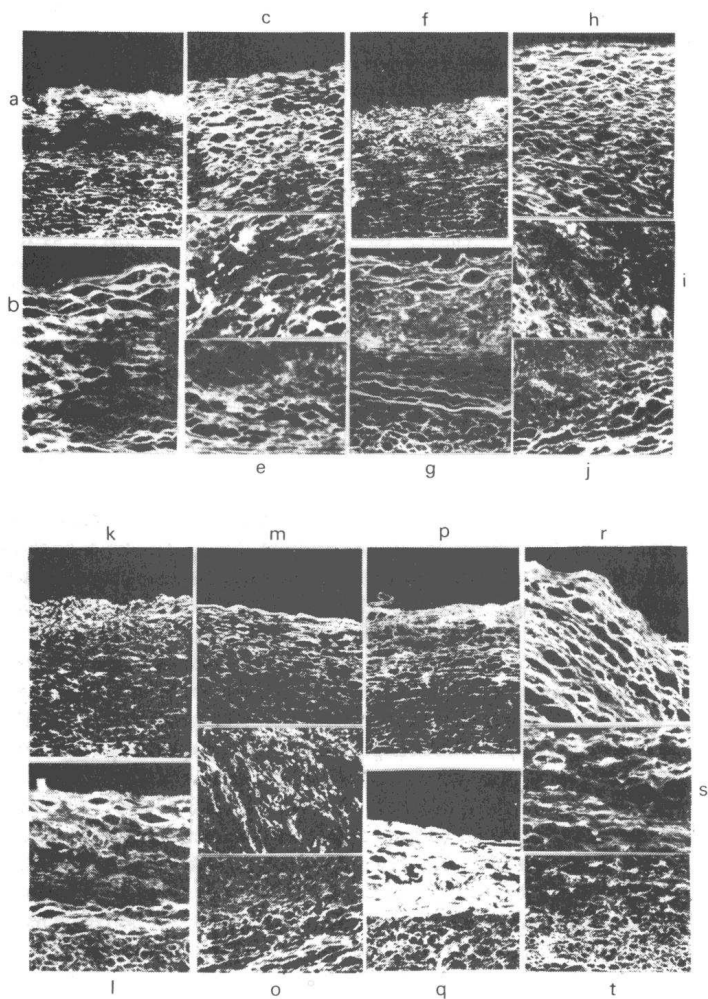


Рисунок 12. Коллаген в аорте человека.

a, f, k, p – непораженные участки; b, c, l, q – жировые полосы; c, h, m, r – покрышки бляшек; d, i, n, s – ядра бляшек; e, j, o, t – основания бляшек.  
a-e – коллаген I типа; f-j – коллаген III типа; k-o – коллаген IV типа; p-t – коллаген V типа.

Иммунофлуоресценция, x 100.

### 3.2.3.3. Гликозаминогликаны

Различные гликозаминогликаны в интима распределяются неодинаково. Это можно выявить, окрашивая срезы гистохимическими красителями. Так, толуидиновый синий (pH 5,0), сафранин, нейтральный красный, альдегид-фуксин Габа, пиронин и коллоидное железо более интенсивно окрашивают поверхностную интимальную зону, по сравнению с более глубокими слоями (Velican C, 1967; 1968). Алциановый синий (pH 2,5) интенсивнее окрашивает примедиальную область, причем такая ситуация имеет место как в непораженной интима, так и в атеросклеротическом поражении (Рисунок 13).

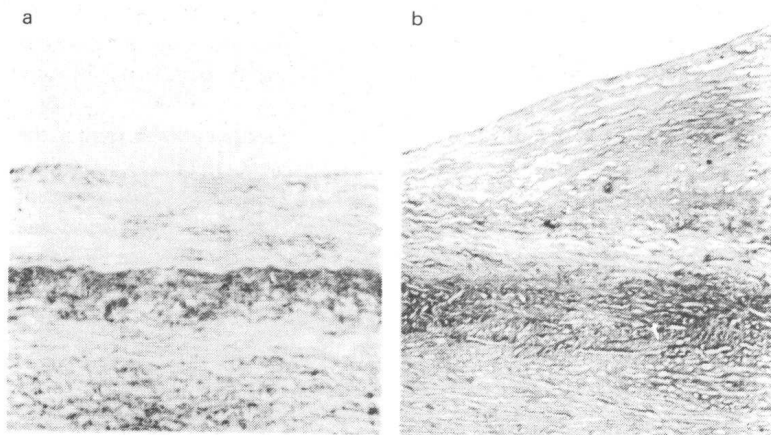


Рисунок 13. Гликозаминогликаны в аорте человека

a – непораженный участок; b – фиброзная бляшка.

Часть интимы, прилежащая к меди, окрашивается более интенсивно.

Алциановый синий, x 100.

В данном случае нельзя определенно утверждать, что окрашивается именно мышечный слой, поскольку часто в об-

ласть более интенсивной окраски частично вовлекается гиперпластический слой. То же самое относится и к окраске другими перечисленными выше красителями - границы более интенсивного окрашивания не всегда совпадают с морфологическими границами мышечного и протеогликанового слоя. Разница в окрашивании гистохимическими красителями позволяет заключить, что в более поверхностной части интимы преимущественно локализуются, по-видимому, гепаран-сульфат и хондроитин-сульфат В, а в более глубоких частях еще встречаются гиалуроновая кислота, хондроитинсульфаты А и С и сиаловая кислота (Velican C, 1967; 1968).

#### **3.2.3.4. Фибронектин**

Многофункциональный гликопротеин фибронектин составляет значительную часть соединительнотканного матрикса в интиме (Chemnitz J & Collatz Christensen B, 1983; Couchman et al., 1979; Jensen BA et al., 1983; Linder E et al., 1978; Natali et al., 1981; Orekhov AN et al., 1984a; Stenman S & Vaheri A, 1978; Stenman S et al, 1980). Его обнаруживают как в непораженных участках, так и в атеросклеротических поражениях. Его роль в нормальной физиологии сосудистой стенки и в патологии не совсем ясна, однако, учитывая то, что фибронектин влияет на многие клеточные свойства, такие как: адгезия, морфология, организация цитоскелета, злокачественные перерождения, миграция, фагоцитоз, тромбоз, дифференцировка и др. (Hynes RO & Yamada KM, 1982), предполагают, что он участвует в возникновении и развитии атеросклеротического поражения (Stenman S & Vaheri A, 1978).

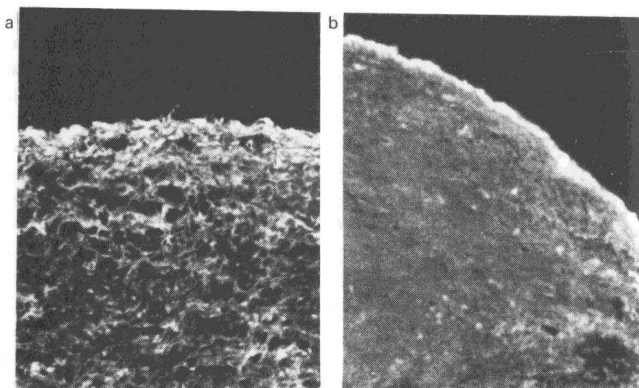


Рисунок 14. Фибронектин в аорте человека

а – непораженный участок; б – фиброзная бляшка.

Иммунофлуоресценция, X 100.

### 3.2.3.5. Липиды

Слои интимы отличаются по локализации и содержанию в них липидов. Содержание и состав липидов в различных слоях интимы существенно различается как в непораженных участках, так и в атеросклеротических поражениях (Smith EB et al., 1967; Smith EB & Slater RS, 1972). Общее содержание липидов в протеогликановом слое выше, чем в мышечном (Таблица 1). Это справедливо как для непораженной интимы, так и для атеросклеротического поражения. В зонах жировых полос выявляются как внутри- так и внеклеточные липиды, которые локализуются в основном в прилежащей к просвету части протеогликанового слоя интимы. По направлению к мышечно-эластическому слою и далее в этом слое окрашенных липидных структур значительно меньше. В липофиброзных бляшках основная часть липидов сосредоточена в протеогликановом слое в ядре и в плечах бляшки.



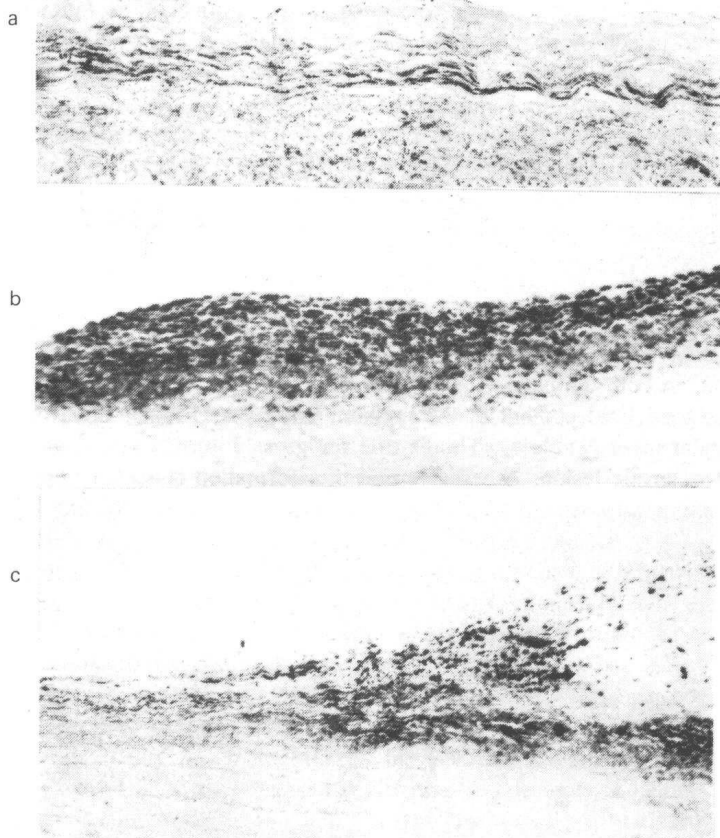


Рисунок 15. Липиды в аорте человека

а - Непораженный участок аорты. Липиды локализуются вдоль эластических фибрилл.

б – Жировая полоса. Крупные липидные капли преимущественно локализуются в прилуминальном слое интимы.

с – Контакт непораженного участка интимы и фиброзной бляшки. В плече бляшки липиды видны в поверхностном слое, а в средней части бляшки липиды локализуются преимущественно в ядре.

Масляный красный, х 150.

Общее количество липидов в протеогликановом слое выше, чем в норме в жировой полосе и в атеросклеротической бляшке и превосходит накопление липидов в мышечно-эластическом слое (Orekhov AN et al., 1987a).

При атеросклерозе накопление жира в протеогликановом слое идет опережающими темпами. Если в зоне жировой полосы и атеросклеротической бляшки в протеогликановом слое общее содержание липидов, соответственно, в 3,2 и 8 раз превышает нормальный уровень, то в мышечном - в 2,6 и 4,4 раза (Таблица 1). Такая же ситуация сохраняется, если в отдельности определять каждый класс липидов: фосфолипиды, триглицериды, холестерин и эфиры холестерина (Таблица 2).

Во внешне непораженных участках аорты липиды накапливаются преимущественно в виде гранул и мелких капель. Эти гранулы и капли всегда локализуются в тесной связи с эластическими структурами. Наибольшее количество липидных капель располагается вдоль самых толстых эластических мембран - внутренней эластической мембраны и внутренней пограничной пластинки (Рисунок 15а). При увеличении липидов в непораженной интимае, они накапливаются преимущественно в наружной части протеогликанового слоя, прилегающей к мышечному слою (Рисунок 15а). Во внутренней субэндотелиальной части липидные гранулы и капли встречаются крайне редко.

В зонах жировых полос накопление липидов идет в основном в протеогликановом слое, количество липидных гранул в мышечном слое увеличивается незначительно. Ближе всего к просвету располагаются довольно крупные липидные капли. Удаляясь от просвета в сторону меди, капли располагаются все реже и становятся меньше в размерах (Рисунок 15b). Отложение липидов в жировой полосе иногда имеет чашеобразную

форму (Рисунок 15b).

Таблица 2. Содержание липидов в слоях непораженной и атеросклеротически измененной интимы аорты человека (мкг на 0,25 см<sup>2</sup>)

|                                | общие<br>липиды | холестерин | эфиры<br>холестерина | триглицериды | фосфолипиды |
|--------------------------------|-----------------|------------|----------------------|--------------|-------------|
| Норма (5)                      |                 |            |                      |              |             |
| ПГ                             | 271,1±11,1      | 14,3±2,9   | 140,8±8,2            | 81,2±7,0     | 30,6±3,9    |
| МЭ                             | 140,2±5,2       | 12,3±2,9   | 64,6±3,1             | 42,8±3,9     | 19,1±3,2    |
| Жировая полоса (7)             |                 |            |                      |              |             |
| ПГ                             | 864,2±16,3*     | 53,0±5,6*  | 421,2±10,5*          | 319,5±15,2*  | 55,1±3,1*   |
| МЭ                             | 62,5±12,4*      | 29,6±2,9*  | 134,6±7,6*           | 146,9±10,6*  | 23,1±3,1*   |
| Атеросклеротическая бляшка (6) |                 |            |                      |              |             |
| ПГ                             | 1755,0±22,9*    | 242,7±8,8* | 760,5±19,7*          | 174,8±11,5*  | 548,5±18,5* |
| МЭ                             | 609,3±22,4*     | 89,0±7,8*  | 233,9±14,8*          | 67,9±8,1*    | 122,1±12,7* |

В скобках указано количество проанализированных случаев.

\* - достоверное отличие от значений в непораженных участках интимы аорты,  $p < 0,05$

ПГ - протеогликановый слой интимы,

МЭ - мышечно-эластический слой интимы.

В мышечном слое локализация липидных гранул и капель и их число не изменяется заметно даже в области бляшки. Протеогликановый слой бляшки фиброзного типа может содержать различные количества жира. Мелкие и среднего размера грану-

лы липидов инфильтрируют всю толщину протеогликанового слоя за исключением покрышки. В покрышке иногда вовсе не обнаруживается липидных гранул, и вся покрышка окрашивается масляным красным. О однородно в розовый цвет (Рисунок 15с).

В липидных и липофиброзных бляшках основная часть липидов сосредоточена в атероматозном ядре, окруженном большим или меньшим количеством соединительной ткани, которая в значительной степени инфильтрирована средними и крупными липидными гранулами. Липидные гранулы обнаруживаются также в покрышке (Рисунок 15с).

### **3.3. Цитопатология артериальной стенки**

Итак, атеросклероз возникает и развивается преимущественно в интима артериальной стенки, причем в самом внутреннем, протеогликановом субслое. Со стороны просвета сосуда интима выстлана монослоем эндотелиальных клеток. Под эндотелием и во всем протеогликановом субслое располагаются клетки, представляющие собой весьма неоднородную популяцию. В мышечном субслое обнаруживаются преимущественно гладкомышечные клетки, подобные типичным гладкомышечным клеткам медиа. Поскольку атеросклеротические поражения возникают и развиваются преимущественно во внутренней части интимы, ниже дано описание атеросклеротических изменений клеток, заселяющих именно эту область.

### 3.3.1. Эндотелий

Эндотелий выполняет в сосуде, прежде всего, барьерную функцию, препятствуя адгезии компонентов крови и их диффундированию в сосудистую стенку. Однако было бы неверно считать, что функции эндотелия сводятся лишь к отделению сосудистой стенки от кровотока. Эндотелий - избирательный барьер. Важнейшей функцией эндотелия является активный транспорт из крови всех компонентов, необходимых для нормальной физиологии сосуда.

При исследовании механизмов атерогенеза, особенно, его начальных стадий, особую роль отводят функциональной активности эндотелиальных клеток и, в первую очередь, их взаимодействию с компонентами крови (Gimbrone MA, 1989; Ross R, 1992; Simionescu M & Simionescu N, 1993). Адгезия лейкоцитов на эндотелии, скопление в субэндотелиальной интиме клеток моноцитарно-макрофагального или лимфоцитарного происхождения, рассматривается большинством исследователей, как начальное звено атерогенеза (Gimbrone MA, 1989; Ross R, 1992). Являясь источником биологически активных веществ, гематогенные клетки способны оказывать воздействие на оседлые субэндотелиальные интимальные клетки (Cassatella MA, 1995; Hamilton JA, 1993; Kishikawa T et al, 1993; Rosenfeld ME et al., 1992.; Yla-Herttuala S, 1992). Изменение адгезивных свойств эндотелия - это лишь часть событий, вовлекающих эндотелиальные клетки в атерогенез. Не менее важным является взаимодействие эндотелия с центральным клеточным компонентом интимы субэндотелиальными оседлыми клетками. Установлено, что эндотелиальные клетки способны продуцировать как активаторы, так и ингибиторы пролиферативной и синтетической активности, такие как PDGF, интерлейкины,

колониестимулирующие факторы, трансформирующий ростовой фактор — TGF- $\beta$ , гепариноподобный фактор и др. (Collins T et al, 1985; Moyer CF et al., 1991; Rosenfeld Meet al., 1992.; Scott-Burden T & Vanhoutte PM, 1994; Yla-Herttuala S, 1992). С другой стороны, можно допустить, что субэндотелиальные клетки - это возможный регулятор эндотелия, секретирующий такие биологически активные соединения как фактор некроза опухолей — TNF- $\alpha$ , интерлейкины, колониестимулирующие факторы и TGF- $\beta$  (Filonzi EL et al., 1993; Schrader JW et al., 1991; Yla-Herttuala S, 1992) Таким образом, в интима сосудистой стенки возможен комплекс взаимных влияний, основными участниками которого являются все три типа клеток, ее населяющих: эндотелий, оседлые субэндотелиальные клетки и клетки гематогенного происхождения.

### **3.3.1.1. Проницаемость и дисфункция эндотелия**

Очевидно, что эндотелий играет центральную роль во многих ранних патофизиологических процессах, участвующих в атеросклерозе (Haller H, 1997). Эндотелий участвует как в физиологической регуляции сосудистого тонуса, так и в структурной трансформации сосуда при патологических условиях. При физиологических условиях эндотелиальные клетки постоянно секретируют окись азота (NO), которая расслабляет гладкомышечные клетки и обеспечивает раскрытое состояние сосудов. Поврежденные или избыточно активированные эндотелиальные клетки могут также секретировать вазоконстрикторные факторы, наиболее известным из которых является эндотелин-1 (ЕТ-1), как и факторы, влияющие на дифференцировку и рост сосудистых гладкомышечных клеток. Эндотелиальные клетки взаимодействуют также с клетками, циркулирующими в кровя-

ном русле. Так, ET-1 и другие факторы высвобождаются из эндотелиальных клеток в кровь, где их хемотаксическое действие может побуждать лейкоциты и тромбоциты мигрировать в сосудистую стенку. Эндотелиальные клетки индуцируют адгезию путем экспрессии специфических молекул адгезии (селектины, интегрины и супергенное семейство иммуноглобулинов), которые могут взаимодействовать с лигандами на лейкоцитах и тромбоцитах. Экспрессия молекул адгезии увеличивается в эндотелиальных клетках, которые подвергаются хроническому повреждению факторами риска атеросклероза. Нарушенная проницаемость эндотелиального слоя ведет к увеличенному притоку циркулирующих компонентов в сосудистую стенку. Кроме того, дисфункция эндотелиальных клеток может вести к ускоренному внутрисосудистому свертыванию крови.

### **3.3.1.1.1. Эндотелиальная дисфункция**

Лучшее понимание точной природы эндотелиальной дисфункции, включая роль секретируемых эндотелием вазоактивных факторов, может обеспечить основу для новых подходов к терапии сосудистых патологий (Lin PJ & Chang CH, 1994). Роль эндотелия в регуляции сосудистого тонуса опосредована освобождением сильных вазоактивных веществ, включая секретируемые эндотелием релаксирующие факторы (один из которых либо окись азота, либо вещество, высвобождающее окись азота), вазоактивные простагландины, выделяемый эндотелием гиперполяризующий фактор и факторы констрикции (такие как тромбоксан  $A_2$ , эндотелин, супероксид анион, L-аргинин-зависимые продукты и др.). Нарушения эндотелиальной регуляции сосудистого тонуса могут вносить вклад в клинические

синдромы, включая атеросклероз. Эндотелиальная дисфункция, характеризующаяся измененным синтезом или секрецией релаксирующих факторов наряду с усилением синтеза или секреции факторов сокращения, может привести к различным патологическим явлениям.

Здоровый эндотелий имеет исключительное значение в контроле сердечнососудистой системы, поэтому эндотелиальная дисфункция, которая характеризуется дисбалансом между факторами релаксации и констрикции, прокоагулянтными и антикоагулянтными субстанциями и между провоспалительными и противовоспалительными медиаторами, может играть особо существенную роль в патогенезе атеросклероза. Эндотелиальная дисфункция тесно связана с различными факторами риска атеросклероза, интенсивностью и продолжительностью их действия. Участие факторов риска в эндотелиальной дисфункции доказано исследованиями, показавшими регрессию эндотелиальной дисфункции при воздействии на факторы риска различных лекарственных средств (Poredos P, 2001). Поскольку действие факторов риска обычно сопровождается уменьшением биодоступности окиси азота, общим знаменателем различных факторов риска, вызывающих эндотелиальную дисфункцию по всей вероятности является окислительный стресс. Эндотелиальная дисфункция может способствовать атерогенезу через разные механизмы, такие, как увеличенная адгезия моноцитов-макрофагов и возросшая проницаемость эндотелиального слоя. Эндотелиальная дисфункция, вероятно, играет важную роль в росте атеросклеротических поражений и в развитии тромботических осложнений на поздних стадиях болезни.

При эндотелиальной дисфункции баланс продукции эндотелием сосудорасширяющих и сосудосуживающих субстан-



ций меняется, в результате чего уменьшается эндотелий-зависимая релаксация. Тестирование и мониторингирование эндотелиальной дисфункции включает тесты эндотелий-зависимой подвижности сосудов, также как и оценку циркулирующих маркеров эндотелиального повреждения (Nagy J et al., 2001). Своевременная модификация факторов риска и фармакологическое вмешательство, которые способны обратить эндотелиальную дисфункцию, могут уменьшить сердечнососудистые осложнения у пациентов с высоким риском (Bell DM, 2001).

Чрезмерная продукция супероксидных анионов в сосудистой стенке вносит вклад в эндотелиальную дисфункцию при сосудистой патологии. Истощение эндотелиальной продукции окиси азота идет параллельно с увеличением образования супероксида в сосудах на различных стадиях (Jiang F et al., 2003).

### **3.3.1.1.2. Факторы, влияющие на проницаемость эндотелия**

Эндотелиальный барьер во всех органах позволяет проходить свободному обмену воды, но ограничивает в различной степени транспорт растворов, таких, как раствор альбумина. Проницаемость эндотелия связана с молекулярным весом, а также зависит от заряда растворенных веществ. Увеличенная проницаемость эндотелия по отношению к растворенным веществам и воде зависит от формы и конфигурации эндотелиальных клеток, определяемых изменениями в элементах цитоскелета, таких, как  $\alpha$ -актин, и регулируется внутриклеточными вторичными мессенджерами, такими, как свободный цитозольный кальций (Malik AB et al., 1989).

Гемодинамические факторы влияют на целостность и функцию сосудистого эндотелия. Показано, что изменения в по-

токе вблизи артериальной стенки от нескольких минут до нескольких часов, вызывают адаптивные ответы, которые временно повышают проницаемость эндотелия (Friedman MH et al., 2000). Барьерная функция эндотелия и его проницаемость регулируется пространственными вариациями в силе растяжения сосуда и сдвига (Phelps JE & DePaola N, 2000). При вычислении пульсирующего потока было установлено, что проницаемость эндотелия по отношению к альбумину уменьшается с увеличением реакции эндотелия на гемодинамическое растяжение сосуда и сдвиг (Himburg HA et al., 2004). Значительная часть поглощения макромолекул сосудистой стенкой имеет место, когда эндотелий приспосабливается к изменениям в гемодинамическом окружении (Hazel AL et al., 2003.). Когда адаптированная артерия попадает в новое механохимическое окружение, в ней происходит последовательность адаптивных процессов, которые сопровождаются формированием локальной эдемы в интимае, потерей матрикса в интимае и развитием отчетливо приподнятых желатиноподобных поражений в интимае, имеющих потенциально преатероматозную структуру (Fry DL, 2002).

Гипертония, фактор риска атеросклероза, увеличивает поглощение липопротеидов низкой плотности стенкой артерии. Компьютерное моделирование предсказывает увеличение концентрации липопротеидов низкой плотности в артериальной стенке, когда артериальное давление возрастает с 120 до 160 мм Hg. Однако это ведет только к небольшому увеличению концентрации липопротеидов в стенке артерии. Если проницаемость эндотелия для липопротеидов низкой плотности изменяется одновременно с внутриаrтериальным давлением, тогда модель предсказывает увеличение поглощения липопротеидов в 1.9-2.6 раза при повышении давления (Stangeby DK & Ethier

CR, 2002). Накопление приходящих из плазмы макромолекул, вызванное давлением, минимизируется в норме интактностью эндотелия. Вследствие острого, либо хронического повреждения эндотелия, транспорт в интиму возрастает, но эластиновые структуры продолжают препятствовать транспорту макромолекул вглубь, что приводит к накоплению их в интиме (Penn MS et al., 1997). Таким образом, гипертония способствует увеличению проницаемости эндотелия и накоплению липопротеидов в интиме.

*Chlamydia pneumoniae* является респираторным патогеном, но каким-то образом связана с атеросклерозом. Было показано, что инфекция *C. pneumoniae* может вести к повреждению эндотелия и нарушению его проницаемости (MacIntyre A et al., 2002).

Продemonстрировано, что липопротеиды высокой плотности, основная антиатерогенная фракция липопротеидов, защищают эндотелиальные клетки от апоптоза (Nofer JR et al., 2001).

В сосудистой системе была выявлена локализация кининовых B1 и B2 рецепторов. В больших эластичных артериях и венах кининовые рецепторы присутствуют только в эндотелиальных клетках, следовательно, кинины могут модулировать сосудистую проницаемость (Raidoo DM et al., 1997).

Факторы, влияющие на развитие атеросклероза, включают метаболические изменения, вызываемые определенными липидами и воспалительными цитокинами. Присутствие ненасыщенных жирных кислот может усилить повреждающие эффекты воспалительных цитокинов. Так, определенные ненасыщенные жирные кислоты могут потенцировать TNF-опосредованную дисфункцию эндотелиальных клеток, при этом

окислительный стресс может быть частично ответственен за эти метаболические события (Toborek M et al., 1996).

Гиперхолестеринемия вызывает эндотелиальную дисфункцию, модулируя экспрессию генов в эндотелиальных клетках сосуда (Rodriguez C et al., 2002). Продукты окисления холестерина даже при нормохолестеринемических условиях могут вызывать эндотелиальную дисфункцию, увеличенную проницаемость для макромолекул и увеличенное накопление холестерина в сосудистой стенке (Rong JX et al., 1998). Мононенасыщенные жирные кислоты способны прямо изменять реакцию сосудистых эндотелиальных клеток на окисленные липопротеиды низкой плотности и могут замедлять процесс атеросклероза путем уменьшения потока макромолекул в сосудистую стенку (Karman RJ et al., 1997). Показано также, что кратковременные ослабления контактов между эндотелиальными клетками, претерпевающими митоз, обеспечивают пути, через которые липопротеиды низкой плотности входят в субэндотелиальное пространство, что приводит к накоплению липидов при атеросклерозе (Chen YL et al., 1996).

### **3.3.1.1.3. Апоптоз и проницаемость эндотелия**

Различные формы клеточного повреждения, индуцированного иммунными эффекторными клетками, аберрантными метаболическими процессами, хемотерапевтическими лекарствами или температурными сдвигами приводят к общим морфологическим изменениям, состоящим в образовании и сбрашивании мембранных везикул с поверхностями поврежденной клетки, то есть апоптозу (программируемой смерти клетки). Это динамическое поведение поверхности клеточной мембраны за-

висит от разрушения цитоплазматических микротубул. Совместно с измененной морфологией поверхности клетки определенные физиологические и биохимические события также связаны с повреждением клетки. Они включают изменения в проницаемости мембраны, увеличенное потребление кислорода и фрагментацию ДНК.

Умирающие эндотелиальные клетки, подвергающиеся апоптозу (запрограммированной гибели) и клетки в состоянии митоза встречаются в эндотелиальной выстилке довольно редко, однако абсолютное большинство таких клеток связано с фокальным увеличением проницаемости (Chen YL et al., 1997). При этом на долю этих находящихся в состоянии митоза и умирающих клеток приходится только сравнительно небольшая часть от общего числа мест проницаемости. Это указывает на то, что высокая проницаемость имеет место и для в нормальных эндотелиальных клеток, морфологически не определенных в состоянии митоза или смерти. Число мест проницаемости, связанных с митозом или клеточной смертью, выше для высокомолекулярных структур, включая липопротеиды низкой плотности, которые вероятно используют изменение числа клеток, как свой основной путь проникновения через эндотелиальный барьер (Chen YL et al., 1997). Это обстоятельство крайне важно, учитывая тот факт, что атеросклероз первоначально возникает не диффузно, а локально или даже фокально. Точечное увеличение проницаемости эндотелия могло бы объяснить локальность возникновения атеросклеротических поражений.

Для понимания причин фокального повышения проницаемости эндотелия важно знать, какие из биологических изменений определяют необратимое повреждение клетки и/или ее программируемую смерть. Инкубация эндотелиальных клеток с

окисленными липопротеидами низкой плотности индуцирует морфологические изменения в клетках и фрагментацию хроматина, характерные для программируемой клеточной смерти (Seelos C et al., 1997). Сжатие клеток становилось очевидным через 6-8 часов инкубации и сопровождалось конденсацией ядерного хроматина, внутринуклеосомальной сегментацией и освобождением лактатдегидрогеназы – маркера клеточной проницаемости. Таким образом, индуцируя активную смерть эндотелиальных клеток, окисленные липопротеиды низкой плотности могут негативно влиять на тканевой гомеостаз эндотелия и могут способствовать развитию атеросклеротических бляшек.

Реактивные радикалы кислорода вызывают апоптозную клеточную смерть у различных типов клеток. В клеточной стенке радикалы кислорода могут образовываться при адгезии моноцитов или лейкоцитов на эндотелии, а также синтезироваться NAD(P)H оксидазами эндотелиальных клеток. В эндотелиальных клетках эндогенная генерация реактивных радикалов кислорода индуцируется различными провоспалительными и проатеросклеротическими факторами, такими как ангиотензин II, окисленные липопротеиды низкой плотности и фактор некроза опухоли альфа, которые все вызывают программируемую клеточную смерть. Синтез радикалов причинно связан с индукцией апоптоза, поскольку антиоксиданты предотвращают смерть эндотелиальных клеток (Dimmeler S & Zeiher AM, 2000).

Гипергомоцистеинемия представляет собой независимый фактор риска атеросклероза, но механизмы, ведущие к клеточной дисфункции, остаются неизвестными. На эндотелиальных клетках было обнаружено, что гомоцистеин обладает цитотоксичными эффектами, такими как потеря клеточной адгезии, увеличенная проницаемость, появление морфологически

апоптозных клеток. Эта форма апоптоза связана с потерей митохондриального потенциала, цитозольным освобождением цитохрома С, активацией каспазы-3 и втринуклеосомной фрагментацией ДНК (Bessede G et al., 2001).

### **3.3.1.2. Эндотелиальный поверхностный слой**

Эндотелиальные клетки покрыты поверхностным слоем связанных с мембраной протеогликанов, гликозаминогликанов, гликопротеинов, гликолипидов и ассоциированных белков плазмы. Этот слой является суперструктурой, лимитирующей доступ некоторых растворов, коллоидов и высокомолекулярных соединений к находящимся в нем мебраносвязанным ферментам и рецепторам, регулируя тем самым проницаемость сосудов (Ryan US, 1986). Поверхностный слой может лимитировать транспорт липопротеидов, его повреждение может быть ранним событием в атерогенезе (Klimov AN & Nagornev VA, 1983; van Haaren PM et al., 2003). Установлено, что изменение поверхностного слоя, вызванное, например, удалением части сиаловых кислот с поверхности эндотелия, влияет на его функции, такие как синтез простагландинов и захват липопротеидов (Gorog P & Pearson JD, 1984; 1985). Показано, что накопление липопротеидов в эндотелиальных клетках во многом зависит от строения и химического состава их поверхностного слоя (Gorog P & Pearson JD, 1985; Gorog P & Kakkar VV, 1987). В свою очередь, нарушение химического состава этого слоя может влиять на перекисное окисление липидов (Gorog et al., 1988).

В норме трансэндотелиальный транспорт атерогенных липопротеидов низкой плотности осуществляется либо через рецептор с помощью окаймленных везикул (Nestel PI, 1980; Wil-

liams SK et al., 1979), либо нерецепторным путем неспецифического эндоцитоза в неокаймленных везикулах (Silverstein SC et al., 1977). При атеросклерозе резко активизируется неспецифический эндоцитоз липопропротеидов путем связывания липопропротеидов с участками поверхностного слоя.

С помощью электронной микроскопии сравнивался поверхностный слой эндотелия в зонах аорты человека, предрасположенных и не предрасположенных к атеросклерозу. Выявлено, что эндотелиальный поверхностный слой состоит из двух субслоев – внутреннего электронноплотного, прилегающего к цитолемме, и наружного, тонкофибриллярного, открывающегося в просвет сосуда. Была обнаружена тенденция к утолщению слоя в зонах, предрасположенных к атеросклерозу, а также некоторое увеличение числа пиноцитарных везикул (Тарарак ЭМ и Сухова ГК, 1999).

Существенное утолщение эндотелиального поверхностного слоя было выявлено в жировой полосе. При этом он становится более плотным и часто лишен внешнего тонкофибриллярного субслоя. Одновременно с изменением структуры наблюдается увеличение числа везикул, что свидетельствует об усилении эндоцитоза. Перемещаясь сквозь эндотелий, везикулы сливаются в кавеолы. Иногда пиноцитарные пузырьки выстраиваются в цепочки, образуя внутриклеточные каналы. В этих местах клетки обладают повышенной проницаемостью (Тарарак ЭМ и Сухова ГК, 1999).

Иная картина наблюдается в атеросклеротической бляшке. На поверхности бляшки эндотелиальный поверхностный слой ни по структуре, ни по количеству везикул почти не отличается от непораженных участков. В эндотелии краевых отделов бляшки происходит значительное утолщение поверх-



ностного слоя обычно за счет увеличения тонкофибриллярной части, количество пиноцитарных пузырьков и кавеол увеличивается в 2,4 раза по сравнению с вершиной бляшки. Межклеточные пространства между эндотелием атеросклеротической бляшки иногда сильно расширены (Тарарак ЭМ и Сухова ГК, 1999).

В фиброзной бляшке эндотелиальный поверхностный слой становится в 2 раза тоньше по сравнению с нормой, разрыхляется, делается менее электронноплотным, а местами совсем исчезает, обнажая цитолемму клетки. Эндоцитарная активность эндотелиальных клеток фиброзной бляшки существенно снижена, пиноцитарные пузырьки встречаются редко. Эндотелиальный поверхностный слой, покрывающий клетки краевых отделов фиброзной бляшки по толщине не отличается от нормального, но более электронноплотный, обычно лишен тонкофибриллярной части. В эндотелиальных клетках краевых отделов фиброзной бляшки содержится довольно много пиноцитарных пузырьков и кавеол (Тарарак ЭМ и Сухова ГК, 1999). В этих участках межклеточные контакты часто нарушаются. В фиброзной бляшке большая часть макромолекулярных соединений, в том числе атерогенных липопротеидов, по-видимому, поступает в интиму через расширенные межклеточные контакты, а не трансцеллюлярным путем. В этих участках происходит переключение путей транспорта высокомолекулярных компонентов плазмы крови с трансэндотелиального на межклеточный, что отмечалось и в опытах на животных (Klimov AN & Nagornev VA, 1983).

Таким образом, наивысшее количество эндоцитозных везикул и кавеол наблюдается в краевых отделах атеросклеротических бляшек, что свидетельствует о максимально интен-

сивном трансэндотелиальном транспорте макромолекул. Важно отметить, что именно в краевых отделах бляшки имеет место повышенная проницаемость эндотелиального монослоя (Adams CWM, 1981; Friedman M & Byers SO, 1963; Owens GK & Hollis TM, 1979). Именно в этих зонах периферического роста бляшки накапливаются избытки атерогенных липопротеидов низкой плотности, именно здесь чаще всего встречаются кластеры полиморфного эндотелия, содержащие, в том числе, гигантские многоядерные эндотелиальные клетки (Романов ЮА и Антонов АС, 1991), о которых пойдет речь ниже.

### **3.3.1.3. Гигантские многоядерные эндотелиальные клетки**

В отличие от эндотелия животных, в магистральных сосудах человека наблюдается морфологическая гетерогенность эндотелиальных клеток по размеру, ploидности, содержанию ядер и клеточного белка (Antonov AS et al., 1986; Bystrevskaya VB et al., 1992; Tokunaga O et al., 1989; Watanabe T & Tokunaga O, 1990; Романов ЮА и Антонов АС, 1991). В частности, в эндотелиальном монослое, выстилающем поверхность аорты взрослого человека, имеется, по крайней мере, две субпопуляции эндотелиальных клеток: мелкие одноядерные и гигантские многоядерные клетки (Antonov AS et al., 1986; Tokunaga O et al., 1989; Романов ЮА и Антонов АС, 1991). Было установлено, что содержание гигантских многоядерных эндотелиальных клеток значительно возрастает как с увеличением возраста, так и с развитием атеросклеротических поражений: липидных полос и бляшек (Antonov AS et al., 1986; Romanov YuA et al., 1995; Tokunaga O et al., 1989; Watanabe T & Tokunaga O, 1990; Романов ЮА и Антонов АС, 1991). Появление видимых атеросклеротических поражений сопровождается не

только изменением количественных соотношений двух клеточных популяций, но и существенной реорганизацией эндотелиального пласта в целом (Романов ЮА и Антонов АС, 1991). Так, в участках аорты с высокой предрасположенностью к атеросклерозу был обнаружен особый «кластеризованный» монослой, состоящий из четко отграниченных групп клеток (кластеров), состоящих из эндотелиальных клеток приблизительно равного размера и формы.

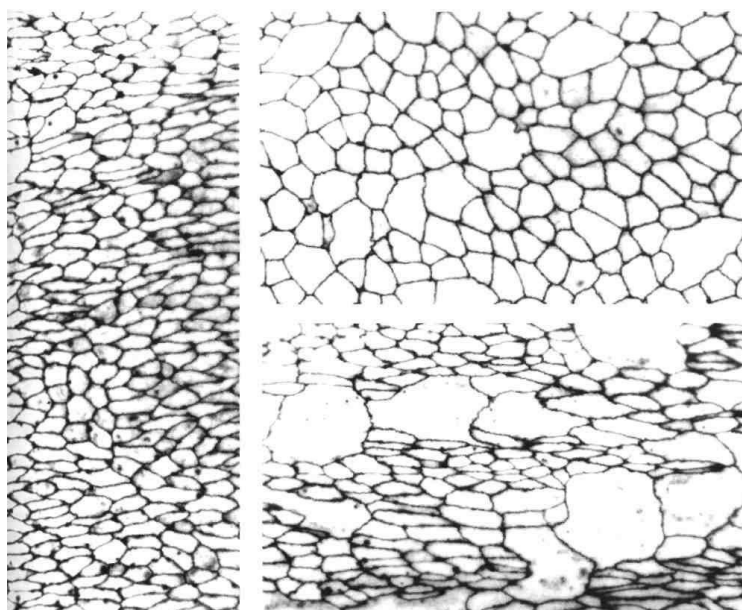


Рисунок 16. Организация эндотелиального монослоя в аортах детей и молодых доноров

Слева – гомогенный эндотелий аорты ребенка 5 лет; справа – умеренно гетерогенный монослой в зоне с низкой предрасположенностью к атеросклерозу (вверху) и появление групп крупных и гигантских клеток эндотелия в зоне с высокой предрасположенностью к атеросклерозу (внизу) аорты 25-летнего мужчины.

Импрегнация нитратом серебра, x200.

Постоянство, с которым кластеризованный эндотелий встречается в пораженных атеросклерозом сосудах взрослых людей и молодых лиц в макроскопически непораженных зонах предрасположенных к атеросклерозу, позволяет предполагать, что именно эта морфологическая разновидность эндотелия может иметь непосредственное отношение к процессам атерогенеза.

### **3.3.1.3. Гетерогенность эндотелия**

Уже к 20—25 годам морфологическая однородность эндотелиального монослоя, характерная для сосудов детей (Рисунок 16), нарушается за счет появления крупных и гигантских (площадью более 1200 мкм<sup>2</sup>), большей частью многоядерных эндотелиальных клеток, число которых с возрастом увеличивается (Рисунок 16 и 17).

В молодом возрасте, наибольшее количество таких клеток выявляется в дуге аорты (Bystrevskaya VB et al., 1992; Romanov YuA et al., 1995; Романов ЮА и Антонов АС, 1991) и в зонах предрасположенных к атеросклерозу, где их содержание примерно в 2—3 раза выше, чем в расположенных рядом участках с низкой предрасположенностью к атеросклерозу (Романов ЮА и др., 1999).

Среди гигантских клеток, присутствующих в дуге аорты, следует особо отметить популяцию, представленную симпластообразными образованиями площадью до 1—2 мм<sup>2</sup>, содержащими до нескольких десятков ядер (Рисунок 17).

Подобные гиганты практически никогда не встречаются в других участках аорты. В возрасте 30—35 лет, в зонах предрасположенных к атеросклерозу макроскопически нормальных сосудов, наряду с нарастанием содержания крупных и гигантских эндоте-

лиальных клеток, можно наблюдать некоторое изменение в пространственном распределении различных клеточных популяций: появляются ориентированные вдоль направления кровотока группы, состоящие из 5— 15 крупных клеток (Рисунок 16). В зонах предрасположенных к атеросклерозу тех же аорт подобные клетки располагаются, как правило, поодиночке, что создает картину «рандомически» гетерогенного монослоя.

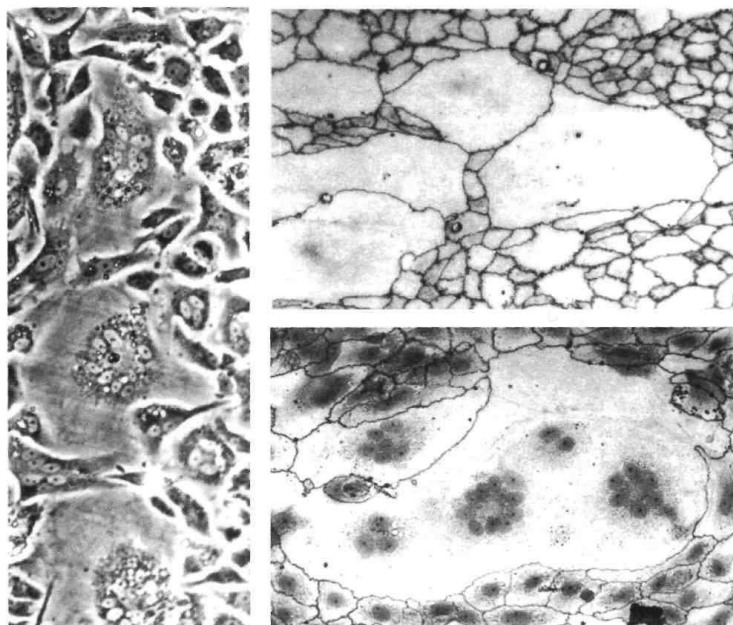


Рисунок 17. Многоядерные эндотелиальные клетки в культуре и *in situ*

Слева – первичная культура эндотелиальных клеток грудного отдела аорты. Фазовый контраст, х350.

Справа – фрагмент эндотелиальной выстилки *in situ* (вверху) и первичная культура (внизу) эндотелиальных клеток дуги аорты, содержащих симпластообразные многоядерные клетки. Импрегнация нитратом серебра, х300.

Дальнейшее накопление крупных и гигантских клеток приводит к тому, что в зонах предрасположенных к атеросклерозу появляются четко отграниченные участки, состоящие преимущественно либо из крупных и гигантских, либо из мелких и средних клеток, иными словами, формируется кластеризованный монослой.

#### **3.3.1.4. Кластеризованный эндотелий**

Наиболее выраженная кластеризация эндотелиальных клеток выявлена в аортах взрослых лиц (35-55 лет), где она может быть обнаружена как в макроскопически нормальных, так и атеросклеротических участках сосудов (Романов ЮА и Антонов АС, 1991). Обычно кластеризованный монослой представлен чередующимися участками с высокой и низкой плотностью клеток (Рисунок 18). Такие участки иногда имеют значительную протяженность.

Относительное содержание крупных и гигантских эндотелиальных клеток кластеризованного монослоя в среднем вдвое выше, чем в участках случайно организованного монослоя (Романов ЮА и Антонов АС, 1991). Примечательно, что, несмотря на относительную немногочисленность (5—15%), популяция гигантских эндотелиальных клеток может занимать существенную (до 50—80%) долю луминальной поверхности сосуда, особенно в зонах высокой предрасположенности к атеросклерозу (Романов ЮА и др., 1999).

В макроскопически нормальных сосудах молодых лиц кластеризованный тип организации эндотелия выявляется практически только в зонах высокой предрасположенности к атеросклерозу. В аортах с атеросклеротическими бляшками кластеризованный эндотелий покрывает более протяженные участки и иногда обна-

руживается также в зонах низкой предрасположенности к атеросклерозу.

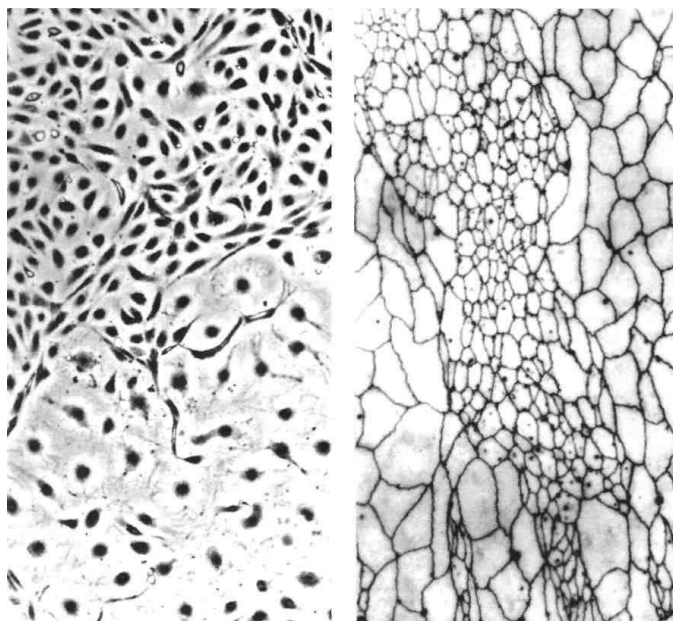


Рисунок 18. Морфологическая гетерогенность эндотелиальных клеток в колониях, выросших в культуре из различных клеток-предшественников

Слева – два граничащих эндотелиальных клона, различающихся по форме и размеру клеток. Фазовый контраст, x200.

Справа – фрагмент кластеризованного монослоя эндотелия аорты взрослого человека *in situ*. Импрегнация нитратом серебра, x100.

Другой постоянной локализацией кластеризованного эндотелия в атеросклеротических сосудах являются области, прилегающие к фиброзным бляшкам, и их склоны. В отличие от склонов и периферии, центральная область фиброзной покрывки бляшек покрыта, как правило, гомогенной популяцией клеток среднего размера

(Romanov YuA et al., 1995). Примечательно, что в легочных артериях и венах, где атеросклеротические поражения никогда не встречаются, ни в одном из исследованных образцов не было выявлено участков кластеризации эндотелия.

### **3.3.1.5. Проплиферация эндотелия и атеросклероз**

Любое повреждающее воздействие на эндотелий стимулирует пролиферативную активность клеток, что сопровождается увеличением скорости обновления монослоя (Coutard M & Osborn-Pilleggrin MJ, 1986). Повышение скорости регенерации эндотелиального монослоя рассматривается как возможный этиологический фактор атеросклероза, поскольку участки с наиболее активной регенерацией эндотелиальных клеток обычно совпадают с зонами повышенной проницаемости и накопления липидов. Такие участки располагаются, как правило, в местах отхождения сосудистых ветвей, бифуркаций, а также в дуге аорты (Coutard M & Osborn-Pilleggrin MJ, 1986.; Schwartz SM, 1984; Schwartz SM & Benditt EP, 1976; Wright HP, 1972). В участках, окружающих устья межреберных артерий (фактически, в зонах высокой предрасположенности к атеросклерозу), были выявлены области, где скорость обновления монослоя могла достигать 50—80% в сутки (Schwartz SM, 1984;).

Установлено, что относительное содержание многоядерных (содержащих 2 и более ядер) эндотелиальных клеток в культурах, полученных из зон аорты человека с высокой предрасположенностью к атеросклерозу в 2-3 раза выше (Романов ЮА и др., 1999), чем в культурах из зон низкой предрасположенности к атеросклерозу (Romanov YuA, 1995), что согласуется с упомянутыми выше



данными о содержании гигантских эндотелиальных клеток в этих зонах *in situ*.

С помощью автордиографии препаратов, меченых [ $^3\text{H}$ ]-тимидином, не удалось обнаружить меченых многоядерных клеток, двоядерные эндотелиальных клеток с одним или обоими мечеными ядрами встречались крайне редко (Романов ЮА и др., 1999). Аналогичные результаты были получены при анализе «вариантных» многоядерных эндотелиальных клеток аорты человека в культуре (Tokunaga O et al., 1989; Watanabe T & Tokunaga O, 1990). Популяция одноклеточных эндотелиальных клеток, напротив, имела высокую пролиферативную активность: индекс мечения клеток мог достигать 40—60% в сутки (Романов ЮА и др., 1999). Проллиферативная активность эндотелиальных клеток в первичных культурах, полученных из зон с низкой и высокой предрасположенностью к атеросклерозу макроскопически нормальных сосудов, существенно не отличалась - тимидиновый индекс составил  $30,1 \pm 12,8\%$  и  $26,3 \pm 8,7\%$ , соответственно (Романов ЮА и др., 1999). Однако, в культурах из зон высокой предрасположенности к атеросклерозу, полученных из нормальных аорт, клетки имели низкую скорость роста и обладали пониженной способностью к длительному субкультивированию по сравнению с культурами из зон низкой предрасположенности к атеросклерозу (Romanov YuA et al., 1995). В культурах из зон высокой предрасположенности к атеросклерозу, полученных из аорт с атеросклеротическими бляшками, был выявлен более низкий митотический индекс ( $11,4 \pm 4,9\%$ , против  $18,7 \pm 7,5\%$  в зонах низкой предрасположенности к атеросклерозу). В культурах из зон низкой предрасположенности к атеросклерозу тех же аорт тимидиновый индекс был также более низким, чем в зонах низкой предрасположенности к атеросклерозу нормальных сосудов ( $18,7 \pm 7,5\%$  и  $30,1 \pm 12,8\%$ , соответ-

ственно).

Несмотря на более низкую пролиферативную активность клеток, особенно, в зонах высокой предрасположенности к атеросклерозу в сосудах с атеросклеротическими поражениями, в эндотелиальном монослое все же присутствует популяция клеток, обладающих высоким пролиферативным потенциалом. С существованием подобной популяции можно связать тот факт, что при субкультивировании начинают преобладать мелкие одноядерные эндотелиальные клетки, вытесняющие другие клеточные популяции и придающие культурам гомогенный вид. Метод посадки с низкой плотностью позволил выявить особую популяцию эндотелиальных клеток, названную «камбиальными» клетками эндотелия (Romanov YuA et al., 1995). Характерной особенностью данной популяции является их высокая пролиферативная активность и способность формировать дискретные клеточные колонии, содержащие от десятков до сотен и даже тысяч клеток. В культурах из зон высокой предрасположенности к атеросклерозу число формируемых колоний всегда ниже, чем в культурах из зон низкой предрасположенности к атеросклерозу тех же сосудов. Число колоний достоверно снижалось, как с увеличением возраста доноров, так и с большей выраженностью атеросклеротического поражения (Романов ЮА и др., 1999).

Индекс мечения эндотелиальных клеток, определенный с помощью автордиографии, в этих колониях был чрезвычайно высок и достигал 60—80%. Наибольшее включение метки выявлялось по периферии колоний, тогда как в центре формировались участки контактно ингибированных эндотелиальных клеток полигональной формы, не включающих [ $^3\text{H}$ ]-тимидин. Колонии второго типа, как правило, меньших размеров, содержали много крупных и гигантских клеток. Тимидиновый индекс в них был ниже, чем в ко-

лониях первого типа и составлял в среднем 10—30%. В обоих типах колоний включение [ $^3\text{H}$ ]-тимидина происходило преимущественно в мелкие одноядерные эндотелиальных клеток, хотя, особенно в колониях второго типа, были выявлены меченые двуядерные клетки, а также гигантские клетки с одним крупным ядром. Удалось обнаружить несколько колоний эндотелиальных клеток, состоящих практически исключительно из гигантских клеток, причем часть из них включала [ $^3\text{H}$ ] –тимидин. Клетки, формирующие колонии, как первого, так и второго типа (в том числе, гигантские), содержат антиген VIII-фактора, то есть являются эндотелиальными (Романов ЮА и др., 1999).

Было условно выделено два типа колоний. К первому типу были отнесены крупные (до нескольких сотен или тысяч эндотелиальных клеток) колонии, состоящие из мелких плотно упакованных клеток (Рисунок 19).



Рисунок 19. Фрагмент колонии эндотелиальных клеток первого типа в 20-дневной культуре эндотелия аорты взрослого человека  
Авторадиографический препарат, х300.

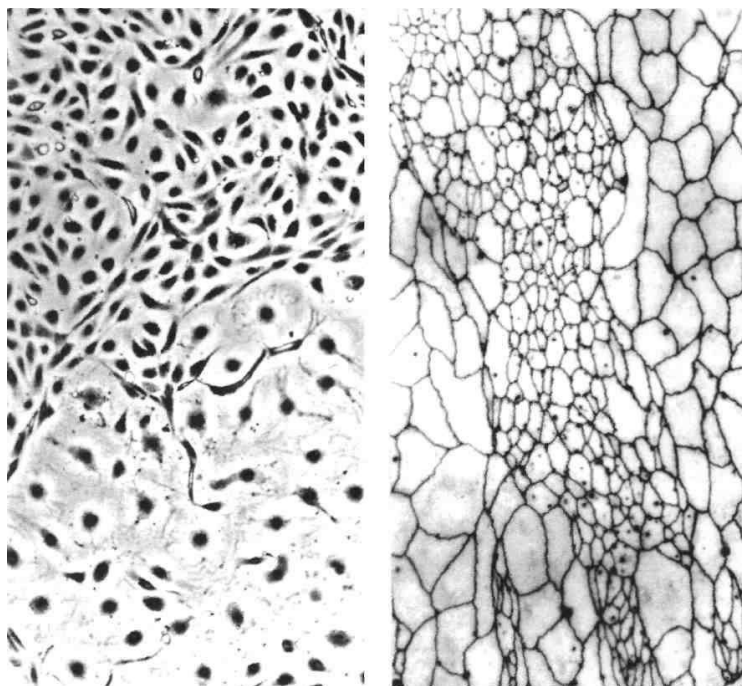


Рисунок 20. Морфологическая гетерогенность эндотелиальных клеток в колониях, выросших в культуре из различных клеток-предшественников

Слева – два граничащих эндотелиальных клона, различающиеся по форме и размеру клеток. Фазовый контраст, x200.

Справа – фрагмент кластеризованного монослоя эндотелия аорты взрослого человека *in situ*. Импрегнация нитратом серебра, x100.

Популяция «камбиальных» клеток неоднородна - эндотелиальные клетки, формирующие отдельные колонии, различаются как по морфологии, так и по пролиферативной активности, что особенно заметно при слиянии близко расположенных клонов. При культивировании морфологические различия между отдель-

ными клонами сохраняются, и монослой в культуре напоминает картину кластеризованного монослоя, выявляемой *in situ*, как показано на Рисунке 20 (Bevilacqua MP, 1993; Романов ЮА и др., 1999).

### **3.3.1.6. Функциональные различия клеточных субпопуляций**

Все клетки, составляющие отдельные клоны, содержат антиген VIII-фактора. Тем не менее, различные клоны сильно варьируют как по количеству телец Вейбеля-Паладе, так и по содержанию антигена VIII-фактора. При этом на одном препарате могут быть выявлены и слабоокрашенные и участки с высоким содержанием антигена в клетках. Такая же картина наблюдалась и при окрашивании клеток антителами к Р-селектину (Wood KM et al., 1993). Примечательно, что внутри отдельных клонов клетки гомогенны, то есть практически не различаются по содержанию выявляемых антигенов. Это справедливо для колоний, как первого, так и второго типа. На Рисунке 21 показано, что похожий характер распределения антигена наблюдался и при окрашивании антителами к ICAM-1, белку клеточной адгезии семейства иммуноглобулинов (Романов ЮА и др., 1999). Это позволяет предположить существование функциональных различий между морфологически различимыми клеточными субпопуляциями.

Известно, что эндотелиальные клетки обладают способностью подавлять пролиферацию гладкомышечных клеток (Scott-Burden T & Vanhoutte PM, 1994). Десять эндотелиальных клонов первого типа культивировали совместно с гладкомышечными клетками. Большинство эндотелиальных клонов в разной степени подавляло пролиферацию гладкомышечных клеток. При этом клетки двух клонов не только не подавляли, но, напротив, стиму-

лировали включение [ $^3\text{H}$ ]-тимидина в гладкомышечные клетки (Романов ЮА и др., 1999). Можно предположить, что клетки этих клонов активно синтезируют ростовые факторы.

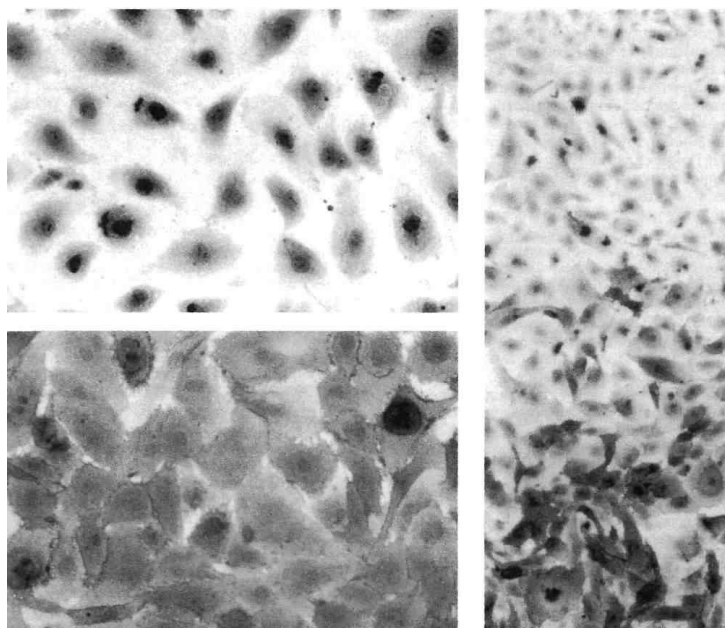


Рисунок 21. Экспрессия ICAM-1 в колониях эндотелиальных клеток, полученных из различных клеток-предшественников

Слева – два эндотелиальных клона, слабо и резко положительные.  $\times 300$ .

Справа – область границы между соседними колониями.  $\times 150$ .

В качестве физиологического активатора клеток была использована среда, кондиционированная культурой гладкомышечных клеток интимы аорты человека.

### **3.3.1.7. Причины неоднородности эндотелия и ее значение в атерогенезе**

Обнаружение неоднородности эндотелия и кластеризации определенных морфотипов является интригующей находкой. Как отмечалось, атеросклероз возникает и развивается в сосудистой стенке локально и даже фокально. Наличие в эндотелиальной выстилке субпопуляции клеток, отличающихся морфологически и функционально, способных формировать локальные скопления (кластеры) может быть причиной локального возникновения и формирования атеросклеротического поражения.

Возникновения в эндотелиальной выстилке ограниченных участков различной протяженности (клеточных кластеров), обладающих проатерогенными или провоспалительными особенностями метаболизма может привести к локальному повышению экспрессии молекул клеточной адгезии, синтезу и депонированию компонентов субэндотелиального матрикса, цитокинов, ростовых факторов и т.д. На уровне клеточной стенки это может проявляться избыточной адгезией клеточных элементов крови, их миграцией и накоплением в субэндотелиальном пространстве, равно как прямой или опосредованной активации интимальных субэндотелиальных клеток, приводящей к нарушениям их синтетической и пролиферативной активности и формированию миоинтимальных утолщений и атеросклеротических бляшек. Подтверждением выказанного предположения можно считать существование в эндотелиальной выстилке популяций эндотелиальных клеток, несущих на своей поверхности избыточные количества различных классов молекул клеточной адгезии в участках атеросклеротических поражений сосудов (Childs B & Emanuel D, 1993; Cybulsky ML & Gim-

brone MA, 1991; Poston RN et al., 1992; Richardson M, 1994; Van der Wall AC et al., 1992).

Вопрос о возможных индукторах изменений, приводящих к неоднородности эндотелия и способных передаваться на протяжении многих клеточных генераций, остается открытым. Одним из таких индукторов может быть вирусная инфекция. С этой точки зрения наибольший интерес представляют вирусы семейства герпес-вирусов, в частности, цитомегаловирус. Именно эти вирусы принято считать основной причиной ускоренного развития атеросклеротических поражений (Melnick JL et al., 1993; Persoons MCJ et al., 1994; Sedmak DD et al., 1994a), в том числе в сосудах трансплантированных органов, где атеросклероз быстро развивается на фоне иммуносупрессивной терапии. Кроме этого, наряду с клиническими наблюдениями, существуют данные, свидетельствующие о серьезных функциональных отклонениях, в том числе, изменении адгезивных свойств и синтетической активности, возникающих в эндотелиальных, гладкомышечных и других типах клеток при их инфицировании цитомегаловирусом (Sedmak DD et al, 1994b).

Наиболее ярким проявлением неоднородности эндотелиальных клеток является наличие в эндотелиальной выстилке гигантских многоядерных клеток. Их появление в эндотелиальном монослое неоднократно пытались связать с развитием атеросклеротических поражений (Antonov AS et al., 1986; Cotton R & Wartman WB, 1961; Sinapius D, 1952; Tokunaga O et al., 1989; Романов ЮА и Антонов АС, 1992). Известно, что по мере старения эндотелиальных культур в них существенно увеличивается число высокоплоидных клеток, содержащих иногда несколько ядер, появление которых связано с нарушением митоза (Johnson TE et al., 1992; Romanov



YuA et al., 1995; Ильинская ОП и др., 1996). Однако в культуре никогда не образуются клетки, содержащие значительного количества ядер подобно тому, что наблюдается в эндотелиальной выстилке в сосуде. Некоторые многоядерные клетки эндотелия представляют собой своеобразные симпласты, содержащие до нескольких десятков ядер (Sinapius D, 1952; Каменская НЛ, 1952). Имеются указания на то, что гигантские многоядерные клетки образуются путем слияния соседних одноядерных (Brodsky VYa & Uryvaeva IB, 1985). Можно предположить, что высокоплоидные эндотелиальные клетки относятся к двум разным субпопуляциям, одна из которых с малым числом ядер образуется в основном путем нарушения митоза (Brodsky VYa & Uryvaeva IB, 1985; Заварзин АА, 1976), а другая, состоящая из гигантских многоядерных клеток, образуется путем слияния соседних клеток (Bystrevskaya VB et al., 1992).

Около 1/3 популяции эндотелия аорты взрослого человека – это полиплоидные клетки (Ильинская ОП и др., 1999). Большинство полиплоидных клеток (более 90%) представлено 1-3 ядерными клетками, образующимися за счет нарушения митоза, а меньшая часть, составляющая менее 10% - это клетки, содержащие от 4 до 24 ядер, образующиеся путем слияния. Плоидность эндотелиальных клеток, число полиплоидных ядер, доля многоядерных клеток, а также среднее число ядер на одну клетку коррелирует с возрастом. Полиплоидизация эндотелия распространяется на весь период онтогенеза человека, однако ее темпы существенно выше в первой половине жизни, чем во второй (Ильинская ОП и др., 1999). После 40 лет содержание полиплоидных клеток стабилизируется, составляя более 30% клеток эндотелия. При этом гигантские многоядерные клетки, образующиеся путем слияния, появляются в более позднем возрасте, их число нарастает

тает существенно медленнее, но растет линейно без видимой стабилизации, что отличает их от полиплоидных клеток, образующихся вследствие нарушения митоза (Ильинская ОП и др., 1999). Макроскопически нормальные и атеросклеротические аорты не отличаются существенно по средней ploидности ядер и числу ядер высокой ploидности, однако высокоploидных клеток в атеросклеротических аортах в 1,5 раза меньше, чем в нормальных (Ильинская ОП и др., 1999). При этом снижением происходит в большей степени за счет гигантских многоядерных клеток.

Степень полиploидизации эндотелиальных клеток существенно варьирует у людей, принадлежащих к одной возрастной группе, что может быть связано с разной предрасположенностью к атеросклерозу. Важно также, что степень полиploидизации достигает максимума после 35-40 лет, когда начинаются клинические проявления атеросклероза (Цинзерлинг ВД, 1937). Можно предположить, что возрастное увеличение числа высокоploидных эндотелиальных клеток является одним из факторов, ведущим к нарушению нормального гомеостаза сосудистой стенки и предрасполагающим к развитию атеросклероза. Например, одним из инициирующих атерогенез факторов может быть локальное усиление адгезии и трансэндотелиальной миграции лейкоцитов на фоне действия других атерогенных фактов, в частности гиперлипидемии (Maier JAM et al., 1993; Molenaar R et al., 1989; Romanov YuA et al., 1995; Ross R, 1993b).

Деплоиплоидизация эндотелия в атеросклеротических аортах хорошо согласуется с описанным выше снижением числа многоядерных клеток в эндотелии, покрывающем атеросклеротические бляшки (Romanov YuA et al., 1995). Это свидетельствует как о сохранении высоких репликативных возможностей эндотелиальных клеток, так и об ускорении обновления эндотелия при фибро-

зировании бляшек. Ускоренное обновление эндотелия, скорее всего, вызвано увеличением площади люминальной поверхности в связи с выпячиванием бляшек в просвет сосуда, репарацией эндотелия на поверхности изъязвленных бляшек, а также действием возникающих при росте бляшки турбулентных потоков крови, стимулирующих пролиферацию эндотелиальных клеток (Davies PF, 1986). При этом с покрышек бляшек к их подошвам вытесняются непролиферирующие, медленно накапливающиеся в онтогенезе полиплоидные гигантские многоядерные клетки (Romanov YuA et al., 1995; Романов ЮА и Антонов АС, 1992).

### **3.3.2. Субэндотелиальные клетки интимы**

Несмотря на то, что клетки субэндотелиальной интимы аорты человека изучаются уже 120 лет, проблемы, связанные с их идентификацией, все еще не разрешены окончательно.

#### **3.3.2.1. Неоднородность интимальных клеток**

Идентифицированы и полностью охарактеризованы только клетки мышечного слоя интимы. Они являются гладкомышечными клетками, что не вызывало сомнений даже у ранних исследователей, которые первыми описали этот слой и дали ему соответствующее наименование (Jones L, 1924). С развитием техники морфологических исследований мнение относительно гладкомышечной природы этих клеток укрепилось. Наиболее убедительными оказались данные электронной микроскопии, полученные в 60-х годах. Было установлено, что клетки мышечного слоя имеют все ультраструктурные признаки типичных дифференцированных гладкомышечных клеток: огра-

ничающую базальную мембрану, множество миофиламентов с плотными тельцами, заполняющие почти всю цитоплазму (Bails JU et al., 1964; Parker F & Odland GF, 1966; Sachs ES, 1967).

Клетки мышечного слоя имеют вытянутую форму, ориентированы вдоль длинной оси сосуда и тесно соприкасаются друг с другом, образуя плотно упакованные пучки (Рисунок 22).

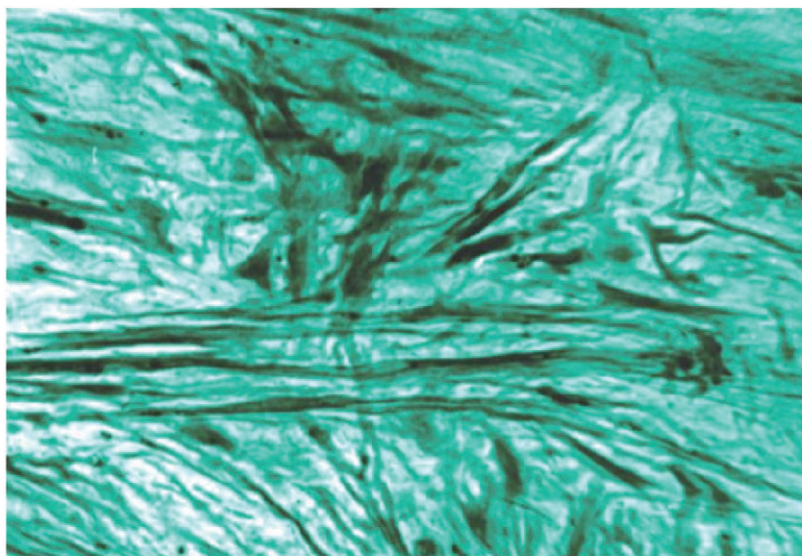


Рисунок 22. Клетки мышечного слоя интимы аорты человека

Применение методики щелочной диссоциации фиксированной аорты, позволило установить, что клетки этого слоя весьма однородны в морфологическом отношении и очень похожи на гладкомышечные клетки меди, имеющие вытянутую биполярную форму (Orekhov AN et al., 1984b). В суспензии, популяции диссоциированных клеток меди и мышечного слоя ин-

тимы почти неразличимы (Рисунок 23).

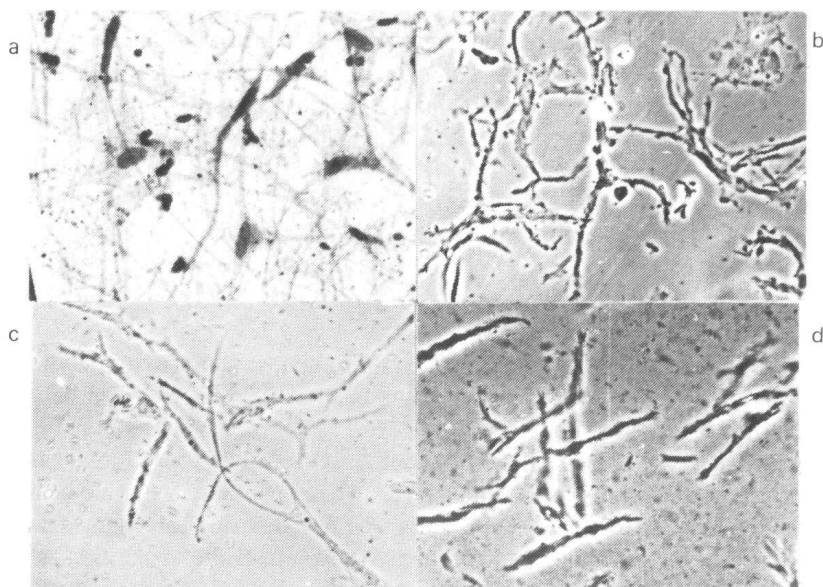


Рисунок 23. Полиморфизм клеток аорты человека

а – Прилуминальный слой. Плоскостной препарат.

б – Суспензия клеток из прилуминального слоя.

с - Суспензия клеток из мышечного слоя.

д – Суспензия медиальных клеток.

а - Гематоксилин, х 200.

b-d – Фазовый контраст. х 200.

В отличие от клеточной популяции мышечного слоя, популяция протеогликанового субэндотелиального слоя весьма неоднородна в морфологическом отношении (Orekhov AN et al., 1984b). Полиморфизм субэндотелиальных клеток отчетливо выявляется на плоскостных препаратах, приготовленных параллельно плоскости эндотелиальной выстилки (Рисунок 24).

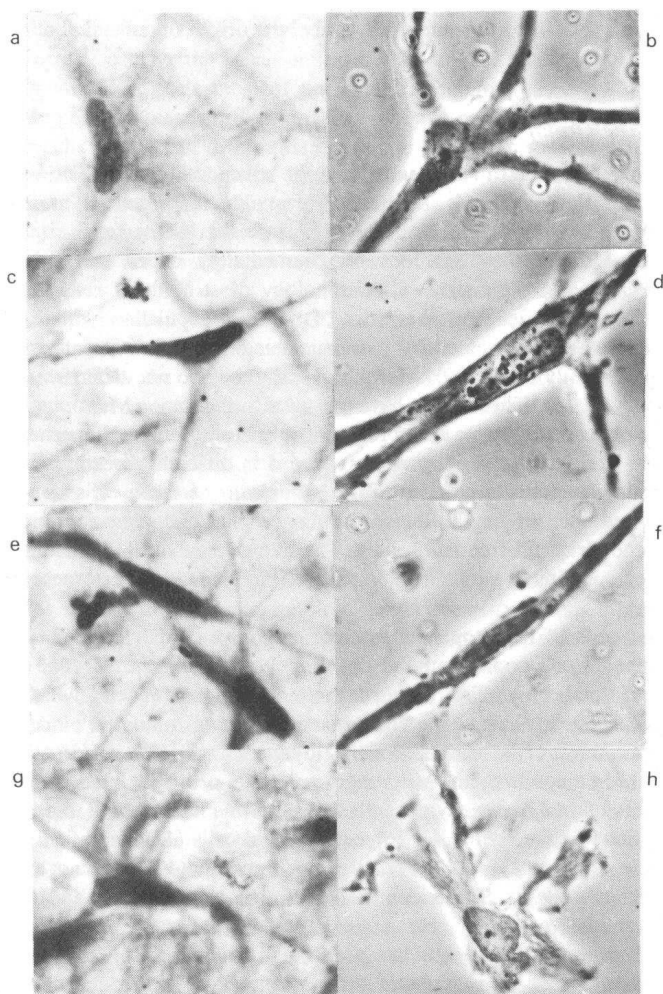


Рисунок 24. Морфологические формы интимальных клеток в аорте человека

a, b – звездчатые клетки;

c, d – вытянутые клетки с отростками;

e, f – биполярные вытянутые клетки;

g, h – клетки неправильной формы.

a, c, e, g – плоскостные препараты, гематоксилин, x 500.

b, d, f, h – суспензия, фазовый контраст, x 500.

На таких препаратах можно встретить клетки разнообразной формы: вытянутые с длинными тонкими отростками, клетки звездчатой формы, имеющие относительно небольшое тело и длинные ветвящиеся радиальные отростки, число которых колеблется от 3 до 12 и более, клетки неправильной формы, а также овоидные и круглые клетки (Рисунок 24). Клетки с отростками и клетки неправильной формы уплощены, их отростки располагаются в плоскости параллельной плоскости эндотелиального монослоя, поэтому на обычных вертикальных срезах невозможно увидеть все многообразие морфологических форм субэндотелиальных клеток - все клетки на вертикальных срезах выглядят более или менее вытянутыми веретеновидными.

Клетки протеогликанового слоя не так плотно заселяют субэндотелиальное пространство, как гладкомышечные клетки мышечный слой или медию. На плоскостных препаратах можно видеть, что отростки одних субэндотелиальных клеток соединяются с отростками других, образуя сетку в интиме. Сами клетки представляют собой узловые точки в этой сетке. На плоскостном препарате можно разглядеть пространства, окруженные отростками. Эти пространства в виде каналов проникают вглубь в направлении меди (Schönfelder M, 1969). Каналы, стенки которых образованы отростками сравнительно рыхло расположенных клеток, можно также обнаружить с помощью сканирующего электронного микроскопа после полного удаления внеклеточного матрикса протеогликанового слоя (Рисунок 25).

Морфологическую неоднородность субэндотелиальной клеточной популяции отмечал еще в 1866 году Langhans (Langhans Th, 1866), именем которого называют клетки протеогликанового слоя (Doerr W, 1978; Schönfelder M, 1969; Хав-

кин ТН, 1950), а иногда и сам слой (Аничков НН, 1947; Щелкунов СИ, 1935). После него этот факт подтверждался многими исследователями (Branwood AW, 1963; Geer JC, 1965; Geer JC & Haust MD, 1972) и ни у кого не вызывает сомнения. Однако происхождение субэндотелиальных клеток не может считаться выясненным до сих пор.

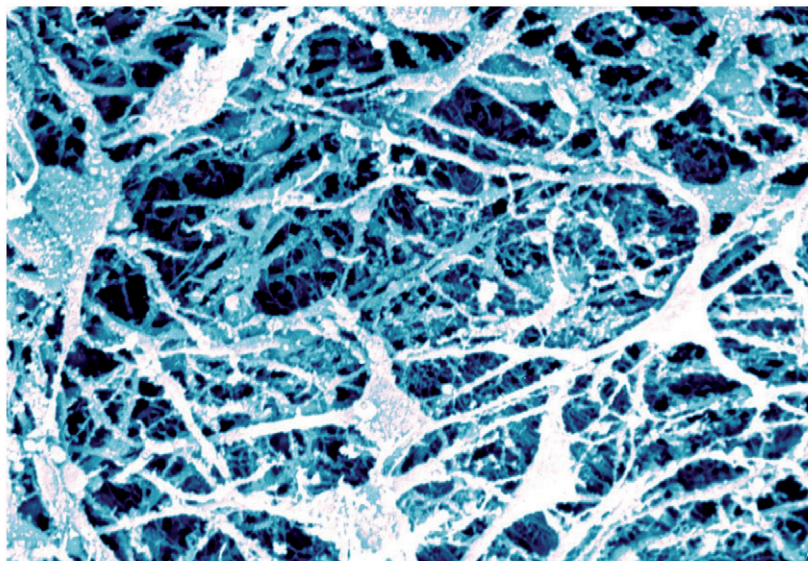


Рисунок 25. Клеточная сеть протеогликанового слоя интимы аорты человека

Можно видеть вертикальные каналы, образованные отростками клеток.

Сканирующая электронная микроскопия.

### **3.3.2.2. Происхождение клеток прилуминального слоя**

Идентификация некоторых клеток субэндотелиальной популяции не вызывает трудностей. Речь идет о круглых или овоидных клетках, которые, скорее всего, являются клетками гема-



тогенного происхождения и проникают в интиму из циркулирующей крови. Они обычно локализуются непосредственно под эндотелиальной выстилкой. Большая часть таких клеток по морфологическим признакам и по своим размерам напоминает лимфоциты крови. Другая, менее значительная часть представлена одноядерными клетками различной величины и формы, преимущественно овоидной (Хавкин ТН, 1950). Морфологически они не отличаются от моноцитов крови (Geer JC & Haust MD, 1972). Эти клетки не имеют базальной мембраны. Возле плазматической мембраны микропиноцитарные пузырьки встречаются редко. Многочисленные короткие пальцеобразные выросты цитоплазмы простираются во все стороны в окружающую соединительную ткань. Цитоплазма содержит мало органелл, в основном это агранулярный эндоплазматический ретикулум, митохондрии и свободные рибосомы. Ядро обычно имеет форму почки, содержит единственное ядрышко и заполнено гетерохроматином (Geer JC & Haust MD, 1972).

Клетки гематогенного происхождения составляют небольшую часть субэндотелиальной популяции и не превышают 5% в непораженной интиме (Orekhov AN et al., 1984с). Основу же популяции составляют клетки, существенно варьирующие по форме и содержанию органелл. Со времени открытия этих клеток Langhans (Langhans Th, 1866) им присваивали самые разнообразные названия: миоинтимальные клетки (Díaz-Flores L et al., 2009; Orlandi A et al., 2006), мультипотентные и мультифункциональные мезенхимальные клетки (Wissler RW & Vesselinovitch D, 1968), промежуточные гладкомышечные клетки (Scott RF et al., 1967), промежуточные клетки (Altschul R, 1950), миоэндотелиальные клетки (Puchtler H et al., 1969), модифицированные гладкомышечные клетки (Geer JC & Haust MD, 1972;

Thomas WA et al., 1963), камбиальные клетки субэндотелия (Заварзин АА и Щелкунов СИ, 1954), интимациты (O'Neal RM, 1977), клетки Лангханса (Schönfelder M, 1969; Хавкин ТН, 1950), неидентифицированные клетки (Thomas WA et al.), примитивные клетки (Scott RF et al., 1967), слабо дифференцированные клетки (Lee KT et al., 1970) и т.д.

Существенно расходились мнения исследователей и по вопросу о природе этих клеток. Langhans, впервые описавший клетки субэндотелия, считал их фибробластами или фиброцитами (Langhans Th, 1866). В течение длительного времени исследователи, пользовавшиеся техникой световой микроскопии, придерживались в основном того же мнения. Даже спустя почти 100 лет, клетки, обнаруживаемые в субэндотелиальном пространстве, классифицировали как фибробласты (Prior JT & Jones DB, 1952), фиброциты, а также гистиоциты и моноцитоподобные клетки (Duff GL et al., 1957.). Наряду с этим, отстаивалась точка зрения, что эти клетки происходят от эндотелиальных клеток, которые трансформируются, занимают пространство под эндотелиальной выстилкой и начинают выполнять несвойственные типичному эндотелию функции (Branwood AW, 1963; Puchtler H et al., 1969; Takebayashi S et al., 1972). Высказывались также предположения, что субэндотелиальные клетки - это недавно разделившиеся клетки, которые дифференцируются либо в гладкомышечные, либо в эндотелиальные клетки (Scott RF et al., 1967; Thomas WA et al., 1968). Некоторые исследователи считали их мезенхимными клетками промежуточными между фибробластами и гладкомышечными (Хавкин ТН, 1950). Предполагалось также, что они возникают из плюрипотентных фибробластов или сами являются плюрипотентными клетками, которые могут превращаться в фибробласты, эндотелиальные

клетки и гладкомышечные клетки в зависимости от потребностей органа или соответствующих стимулов (Branwood AW, 1963). Ham и Cormack (Ham AW & Cormack DH, 1979) видели в этих клетках не покоящиеся фибробласты, но клетки, которые в случае необходимости преобразуются, например, в стволовые клетки клеточной защиты, эндотелиальные клетки, фибробласты и макрофаги. Щелкунов причислял их к недифференцированным элементам мезенхимального резерва организма (Щелкунов СИ, 1977).

Применение электронномикроскопической техники в морфологических исследованиях изменило представление многих в отношении природы субэндотелиальных клеток. Вот описание ультраструктуры этих клеток, заимствованное у Geer (Geer JC, 1965) и Geer, Haust (Geer JC & Haust MD, 1972).

«Субэндотелиальные клетки имеют варьирующую форму, обычно звездчатую. Цитоплазматические отростки простираются в окружающую соединительную ткань иногда на значительное расстояние от тела клетки. Плазматическая мембрана содержит переменное число микропиноцитарных пузырьков. Некоторые клетки имеют частичную ограничивающую базальную мембрану. Цитоплазма содержит рассеянные митохондрии, профили гранулярного эндоплазматического ретикулума и свободные рибосомы. Цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума содержат тонкий волокнистый материал. Цитоплазма может содержать рассеянные мелкие филаменты, напоминающие миофиламенты гладкомышечных клеток: иногда среди них попадаются участки электронной плотности подобные плотным тельцам в пучках миофиламентов. Филаменты располагаются обычно в довольно узкой краевой зоне вблизи плазматической мембраны. Эти клетки отличаются от типичных

гладкомышечных более многочисленными цитоплазматическими органеллами и значительно меньшим числом цитоплазматических филаментов. Некоторые из субэндотелиальных клеток, обычно звездчатой или неправильной формы, не имеют никаких признаков гладкомышечных и неотличимы от фибробластов или фиброцитов (Geer JC, 1965). У них нет ограничивающей базальной мембраны. Вдоль плазматической мембраны очень мало пиноцитарных пузырьков. В цитоплазме присутствуют, главным образом, мембраны гладкого и шероховатого эндоплазматического ретикулума.»

Наличие в цитоплазме субэндотелиальных клеток некоторого числа филаментов, напоминающих миофиламенты, а также базальной мембраны, прилегающей к части плазматической мембраны, позволило некоторым исследователям считать эти факты решающим аргументом в пользу высказываемого ранее предположения о гладкомышечной природе этих клеток (Haust MD et al., 1960). С момента обнаружения в них некоторых ультраструктурных признаков гладкомышечных клеток (Balis JU et al., 1964; Parker F & Odland GF, 1966; Sachs ES, 1967) широкое распространение для обозначения субэндотелиальных клеток получил термин «модифицированные гладкомышечные клетки», а значительные различия во внешнем виде этих клеток представлялись как разные степени дифференцировки одного единственного типа (Geer JC & Haust MD, 1972). Представления о гладкомышечной природе субэндотелиальных клеток являются в настоящее время доминирующими (Geer JC & Haust MD, 1972; Ross R et al., 1984b). Предшественником этих клеток принято считать гладкомышечные клетки медиа, которые, попадая в интиму путем миграции, претерпевают модификацию (Pietilä K & Nikkari T, 1983; Ross R, Glomset JA, 1973).

Ранее отмечалось, что «многие субэндотелиальные клетки по ультраструктуре существенно отличаются от типичных гладкомышечных клеток настолько, чтобы заключить, что они представляют другой тип клеток в интиме» (Geer JC, 1965). Сейчас такая возможность практически не обсуждается. Однако, достаточных оснований для того, чтобы полностью ее отвергать, по-видимому, нет. Наличие у субэндотелиальных клеток отдельных морфологических признаков гладкомышечных клеток не противоречит высказываемым ранее представлениям о том, что эти клетки - плюрипотентные малодифференцированные мезенхимальные клетки, которые при необходимости могут дифференцироваться в фибробласты, макрофаги, эндотелиальные или гладкомышечные клетки (Branwood AW, 1963; Still WJ & O'Neal RM, 1962; Аничков НН, 1947). Эти предложения имеют под собой реальные основания, поскольку известно, что среди клеток взрослого организма имеются такие, которые могли бы служить примером плюрипотентных малодифференцированных клеток - это, например, перициты.

Перициты обнаруживаются вдоль капилляров, а также самых мелких прекапиллярных артериол и посткапиллярных вен (Ham AW, 1974). Эти клетки обладают длинными и тонкими ветвящимися отростками и часто имеют звездчатую форму. Они оплетают эндотелиальную трубку мелких сосудов снаружи, непосредственно контактируя с эндотелием. По мере удаления сосудистого русла от капилляров и увеличения просвета артериол, перициты вокруг эндотелия заменяются гладкомышечными клетками. В отличие от гладкомышечных клеток, в перицитах органеллы расположены более диффузно, в их цитоплазме не выявляются филаменты или плотные тельца. Однако, подобно гладкомышечным клеткам, каждый перицит ограничен базаль-

ной мембраной (Ham AW & Cormack DH, 1979). Теперь известно, что гладкомышечные клетки при переходе от капилляров к артериолам, вероятнее всего, образуются из перицитов (Ham AW & Cormack DH, 1979). Предполагается, что перициты могут дифференцироваться не только в гладкомышечные клетки. Если где-то в рыхлой соединительной ткани разовьется кость, то это можно объяснить наличием в соединительной ткани перицитов, которые способны превращаться в остеобласты. Ham и Cormack (Ham AW & Cormack DH, 1979) утверждают также, что многие из делящихся клеток, видимых в местах восстановления обычной соединительной ткани (например, сухожилия), развиваются из перицитов. Они же утверждают, что в жировой ткани взрослого организма присутствуют клетки, способные давать новые жировые клетки и что такими предшественниками могут быть перициты. Предполагается также, что тучные клетки происходят от клеток в значительной степени сохраняющих мезенхимные потенции; вероятными кандидатами на эту роль считают перициты (Ham AW & Cormack DH, 1979). При некоторых патологиях, в частности при гемангиомах, перициты приобретают определенные ультраструктурные признаки эндотелия, гладкомышечных клеток или фибробластов, вследствие чего в области поражения обнаруживают фибробласто-подобные, эндотелиально-подобные и гладкомышечно-подобные перициты (Kojimahara M et al., 1981).

Ультраструктурные особенности, характерная звездчатая форма, локализация вблизи эндотелия - это те признаки субэндотелиальных клеток аорты, которые наталкивают на мысль о связи между ними и перицитами.

Предположение о том, что в сосудистой стенке взрослого человека могут быть малодифференцированные мезенхималь-

ные клетки сходные по свойствам с перицитами, высказывалось давно. Щелкунов (Щелкунов СИ, 1935) выделял под эндотелием сосудов клетки, создающие камбиальный слой интимы, продуцирующий все тканевые элементы как снаружки в сторону меди, так и кнутри в сторону эндотелия. Он считал, что этот слой является остатками той прилегающей к эндотелию в период эмбриональной жизни мезенхимы, наружная часть которой в результате дифференцировки превратилась в соединительнотканые и гладкомышечные элементы сосуда. По мнению Щелкунова, по истечению определенного времени, клетки эндотелия, выстилающего изнутри сосудистое ложе, погибают. На смену им приходят более молодые стадии развития клеток субэндотелиального слоя. Он утверждал, что с жизнедеятельностью этих клеток связаны все гиперпластические процессы в интимах. Эти клетки являются источником бурного новообразования ткани при эндартериитах и при различных гипертрофиях сосудистого ложа, в том числе при атеросклерозе. Они активно участвуют в возрастном преобразовании сосудов от момента их появления до глубокой старости.

### **3.3.2.3. Иммуноцитохимическое типирование клеток интимы**

Современные подходы к идентификации клеток базируются в основном на выявлении клеточных антигенов, специфичных для данного типа клеток. Настоящая революция в определении типа (типировании) клеток произошла в связи с развитием технологии получения моноклональных антител. Использование моноклональных антител для иммуноцитохимического типирования клеток наряду с другими высокотехнологичными современными методиками стало основным инструментом при

определении клеточного состава ткани. Разумеется, как любой метод, иммуноцитохимия не лишена определенных недостатков и ограничений, однако на настоящий момент формальное отнесение клетки к тому или другому типу, как правило, основывается на данных именно этого метода.

Изучению клеточного состава артерий человека и животных с использованием иммуноцитохимической техники посвящено большое количество работ. Первоначально в задачу исследователей входила собственно идентификация клеточных типов с помощью антител (показано наличие в интиме гладкомышечных клеток, макрофагов, лимфоцитов, тучных клеток), определение зон их локализации, подбор антител для выявления субпопуляций клеток одного типа (обнаружены Т-супрессоры и Т-хелперы), изучение природы различных клеточных фенотипов (показано, что источниками пенистых клеток служат как гладкомышечные клетки, так и макрофаги) и т.п. Таким образом, применение иммуноцитохимических методов позволяет дать качественную характеристику клеточного состава непораженной и атеросклеротической стенки сосуда.

Использование антител, специфичных к различным типам мезенхимальных клеток, позволило расширить представления о клеточном составе интимы крупных артерий в норме и в атеросклеротических поражениях.

Кроме гладкомышечных клеток, экспрессирующих мышечный  $\alpha$ -актин (Katsuda S et al., 1992; 1993; Nakamura H & Sakurai I, 1992; Tsukada T et al., 1987), в интиме были идентифицированы клетки гематогенного происхождения: макрофаги (Aqel NM et al., 1985; Gown AM et al., 1986; Jonasson L et al., 1988; Munro JM et al., 1987; Roessner A et al., 1987), лимфоциты (Emeson EE & Robertson AL, 1988; Hansson GK et al., 1988; 1989; Jonasson L et



al., 1986; 1988; Munro JM et al., 1987; Wal AC et al., 1989), тучные клетки (Kaartinen M et al, 1994), дендритные клетки (Bobryshev YV et al., 1996).

Детальный иммуноцитохимический анализ клеточного состава интимы аорты в норме и в атеросклеротических поражениях был проведен с использованием набора антител против различных типов клеток (Таблица 3). Используя набор этих иммуноцитохимических маркеров различных клеточных типов, были охарактеризованы клетки нормальной и пораженной интимы (Таблица 4).

Гладкомышечные клетки интимы были идентифицированы с помощью антител против мышечного  $\alpha$ -актина. На пленочных препаратах клетки, содержащие данный маркер, имеют округлые ядра и цитоплазму с двумя и более отростками (Рисунок 26).

В участках жировых поражений мышечный актин выявляется преимущественно в отростках клеток. Для количественной оценки доли клеток определенного фенотипа были использованы вертикальные срезы сосудистой стенки. На вертикальных срезах в протеогликановом слое клетки, содержащие  $\alpha$ -актин, имеют вытянутую форму и располагаются параллельно люминальному краю среза; в мышечно-эластическом слое положительно окрашенная цитоплазма клеток имеет вид широкого кольца (или полукольца) вокруг ядра (Рисунок 27а).

Около 50% клеток, как в непораженной интиме, так и в атеросклеротических поражениях, положительно окрашивается антителами против мышечного  $\alpha$ -актина (Таблица 4). Соответственно остальные клетки (около 50% общей популяции) невозможно было идентифицировать с помощью этого маркера гладкомышечных клеток.

Таблица 3. Антитела и реагенты для иммуноцитохимии

| Антитела и конъюгаты                                                  | Источник                                    | Рабочее разведение     | Условия инкубации |
|-----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------|-------------------|
| 2B11,PD7/26 (CD45) антиген лейкоцитов                                 | DAKO                                        | 1:200                  | 1час, 20°C        |
| TÜK4 (CD14) антиген клеток моноцитарно-макрофагальной дифференцировки | DAKO                                        | 1:20                   | 1час, 20°C        |
| 3G5 антиген перицитов капилляров мозга                                | ATCC, Rockville, MD, USA                    | 1:50                   | 1час, 20°C        |
| 2A7 антиген перицитов в областях активного ангиогенеза                | Dr. M. Verbeek                              | культуральная жидкость | 1час, 20°C        |
| asm-1 $\alpha$ -актин гладких мышц                                    | Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany | 1:200                  | 1час, 20°C        |
| IgG лошади против IgG мыши, биотинилированные                         | Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA    | 1:200                  | 30 мин., 20°C     |
| Стрептавидин-пероксидаза                                              | Vector                                      | 1:100                  | 30 мин., 20°C     |
| Стрептавидин-щелочная фосфатаза                                       | Vector                                      | 1:1000                 | 30 мин., 20°C     |
| Стрептавидин-ФИТЦ                                                     | Vector                                      | 1:200                  | 30 мин., 20°C     |

Таблица 4. Иммуноцитохимическая характеристика клеток интимы аорты человека

| Антиген                              | Доля положительно окрашенных клеток,<br>% от общего числа клеток |                       |                         |                        |
|--------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-----------------------|-------------------------|------------------------|
|                                      | 0                                                                | I                     | II                      | Va                     |
| гладкомышечный<br>$\alpha$ -актин    | 47,6 $\pm$ 2,3<br>(4)                                            | 47,2 $\pm$ 3,1<br>(3) | 42,2 $\pm$ 3,1<br>(4)   | 47,0 $\pm$ 10,9<br>(5) |
| CD45                                 | 2,2 $\pm$ 0,4<br>(3)                                             | 6,2 $\pm$ 1,2<br>(4)  | 5,0 $\pm$ 0,9*<br>(3)   | 6,2 $\pm$ 1,8*<br>(9)  |
| CD68                                 | 3,9 $\pm$ 0,4<br>(5)                                             | 6,1 $\pm$ 1,4<br>(4)  | 13,2 $\pm$ 0,8*<br>(5)  | 13,1 $\pm$ 2,3*<br>(4) |
| 3G5                                  | 31,3 $\pm$ 7,0<br>(4)                                            | 6,3 $\pm$ 1,0*<br>(3) | 11,7 $\pm$ 2,0*<br>(8)  | 5,0 $\pm$ 0,7*<br>(5)  |
| 2A7                                  | 0,0 $\pm$ 0,0<br>(3)                                             | 1,2 $\pm$ 0,3<br>(3)  | 3,0 $\pm$ 0,7<br>(3)    | 27,0 $\pm$ 3,1<br>(3)  |
| гематогенные<br>клетки CD45+<br>CD14 | 5,5 $\pm$ 1,2<br>(8)                                             | 9,6 $\pm$ 1,4*<br>(6) | 13,4 $\pm$ 1,5*<br>(10) | 18,7 $\pm$ 2,0*<br>(8) |
| оседлые клетки                       | 97,3 $\pm$ 0,6<br>(8)                                            | 90,9 $\pm$ 1,2<br>(6) | 90,9 $\pm$ 1,2<br>(6)   | 84,7 $\pm$ 1,4<br>(8)  |

На вертикальных срезах участков непораженной аорты и областей с атеросклеротическими изменениями было проведено иммуноцитохимическое выявление различных клеток с использованием соответствующих антител против различных типов клеток.

Ядра клеток были докрашены метиловым зеленым. В каждом образце определяли общее число клеток и число клеток, положительно окрашенных соответствующими антителами.

В скобках указано количество проанализированных случаев.

0 – норма; I - начальные поражения; II - жировая полоса; Va - липофиброзная бляшка.

\* - достоверное отличие от количества положительно окрашенных клеток в непораженных участках интимы аорты человека,  $p < 0,05$ .

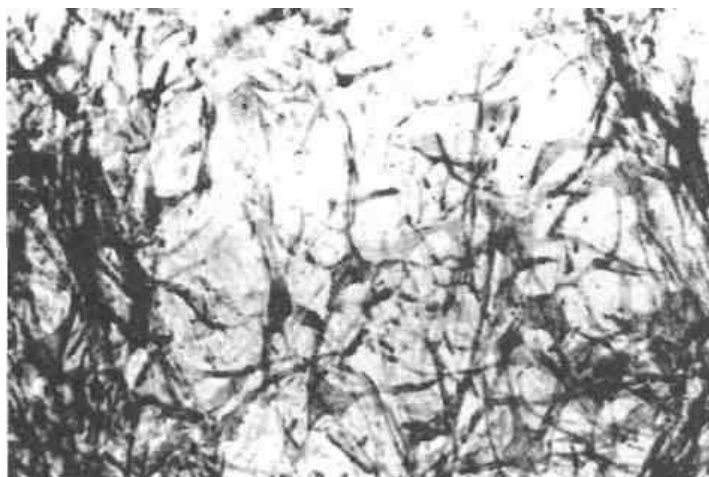


Рисунок 26. Пленочный препарат протеогликанового слоя интимы аорты человека

Иммуноцитохимическое выявление гладкомышечного  $\alpha$ -актина. АВС-пероксидаза.  $\times 150$ .

При этом около двух третей мышечно-эластического слоя экспрессируют мышечный  $\alpha$ -актин, тогда как в протеогликановом слое доля клеток, содержащих  $\alpha$ -актин, значительно ниже. Клетки гематогенного происхождения (лимфоциты и макрофаги) локализованы только в субэндотелиальной части интимы в протеогликановом слое. Их доля увеличивается в атеросклеротических поражениях и составляет около 20% всех клеток.

Важно, что существенная часть оседлых субэндотелиальных клеток не несет маркера гладкомышечных клеток -  $\alpha$ -актина. Можно предположить, что это результат фенотипической модуляции, которую претерпевают клетки интимы, как в процессе физиологической адаптации, так и патологических изменений сосудистой стенки. Наличие хорошо выраженного со-

кратительного аппарата не является столь существенным для клеток интимы аорты и других крупных артерий, так как функция поддержания тонуса сосуда осуществляется в крупных артериях с помощью других механизмов. В таких условиях интимальные оседлые клетки, возможно, адаптированы к выполнению других функций, таких, как питание, поддержание метаболизма или иммунный ответ в сосудистой стенке.

Можно предположить, вслед за авторами классических работ по морфологии сосудистой стенки (Langhans Th, 1866; Maximow A, 1927; Аничков НН, 1947; Заварзин АА, Щелкунов СИ, 1954; Щелкунов СИ, 1935), что эти клетки представляют собой популяцию, отличную функционально, а может быть и по происхождению от типичных гладкомышечных клеток меди. Так, Bobryshev и др. (Bobryshev YV et al., 1996) описали в интиме аорты человека звездчатые клетки, экспрессирующие антигены дендритических клеток S-100 и CD1a.

У оседлых интимальных клеток удалось обнаружить антигены, несвойственные типичным гладкомышечным клеткам меди. В участках выраженных атеросклеротических поражений были выявлены клетки, имеющие перицитарный антиген 2A7, характерный для перицитов из областей активного ангиогенеза, (Рисунок 27в). В непораженной интиме такие клетки идентифицировать не удалось. Максимального значения доля 2A7-положительных клеток достигает в липофиброзных бляшках, где они локализуются, в основном, в фиброзных участках покрышки (Таблица 4). Антитела 2A7 против высокомолекулярного антигена, ассоциированного с меланомой (HMW-MAA), представляющего собой хондроитинсульфатированный протеогликан, также известный как протеогликан меланомы, выявляют этот антиген на перицитах не только в опухолевых тканях, но

также и в тех участках, где происходит активный ангиогенез (Schlingemann RO et al., 1990). Это, к примеру, формирование грануляционной ткани при заживлении ран, синовит и т.д. Этот антиген экспрессирован на «активированных», способных к росту перицитах.

Учитывая возможную связь интимальных клеток с перицитами, для идентификации субэндотелиальных клеток помимо 2A7 использовались другие антиперицитарные антитела 3G5. Антигеном антител 3G5 является О-сиалоганглиозид клеточной мембраны перицитов капилляров мозга - очень стабильной, медленно обновляющейся клеточной популяции. Предполагается, что этот антиген характерен для покоящихся перицитов (Nayak RC et al., 1988). С помощью антител 3G5 перицитоподобные клетки были выявлены в непораженной интима аорты человека и быка, а также в осложненных атеросклеротических бляшках с эктопическим костеобразованием (Bostrom K et al., 1993). С помощью 3G5 было продемонстрировано наличие перицитоподобных оседлых клеток в интима аорты человека в норме и в атеросклеротических поражениях. В непораженной интима 3G5-положительные перицитоподобные клетки составляют более трети всей клеточной популяции (Таблица 4). На вертикальных срезах клетки, содержащие 3G5 антиген, обнаруживаются только в самом поверхностном субэндотелиальном слое интимы. На пленочных горизонтальных препаратах показано, что отростчатые клетки, содержащие антиген перицитов 3G5, непосредственно под эндотелием образуют сеть (Andreeva ER et al., 1997a, 1998). Такое субэндотелиальное расположение перицитоподобных клеток позволяет предположить, что в крупных артериях, таких как аорта, эти клетки выполняют функции, близкие функциям перицитов капилляров.

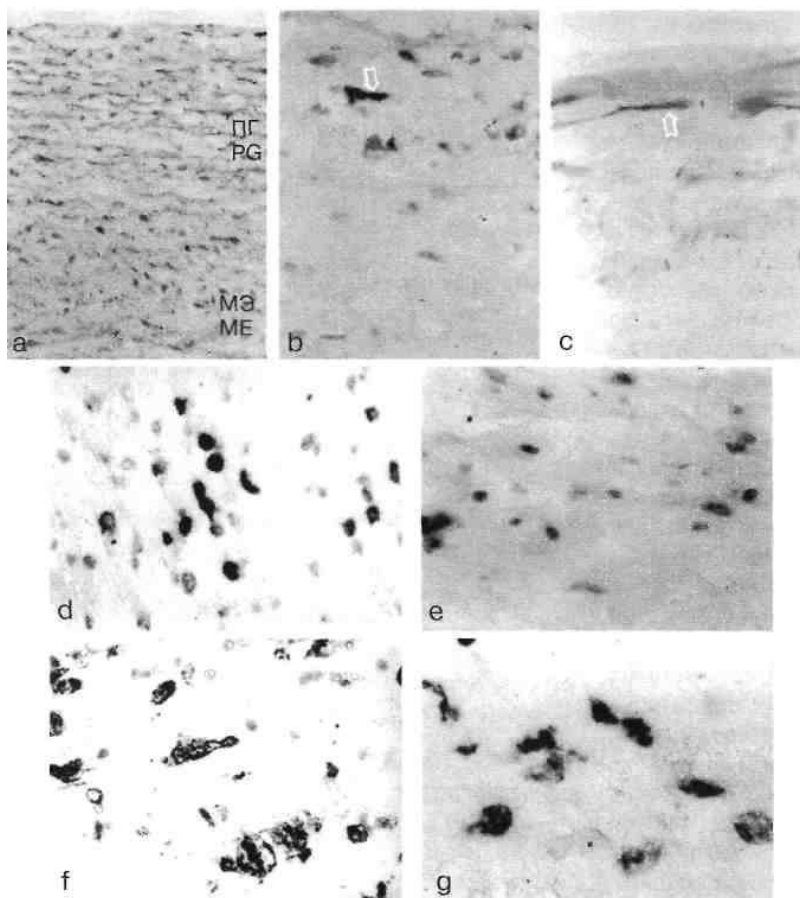


Рисунок 27. Иммуноцитохимическое выявление клеток в интима аорты человека

Вертикальные срезы.

а - Гладкомышечный  $\alpha$ -актин в клетках интимы. АВС-пероксидаза, метиловый зеленый.  $\times 300$ .

ПГ - протеогликановый слой интимы,

МЭ - мышечно-эластический слой интимы.

б - Клетки, содержащие антиген перицитов 3G5 (указано стрелкой). АВС-пероксидаза, метиловый зеленый.  $\times 450$ .

(продолжение на следующей странице)

в - Клетки, содержащие антиген перицитов 2A7 (указано стрелкой). АВС-пероксидаза, метиловый зеленый. х 450.

г - Лимфоциты в протеогликановом слое интимы. Для идентификации были использованы антитела против общего антигена лейкоцитов CD45. АВС-пероксидаза, метиловый зеленый. х 450.

д - Макрофаги интимы, содержащие CD14 антиген. Щелочная фосфатаза, метиловый зеленый. х 450.

е - Клетки, экспрессирующие CD68 антиген, ассоциированный с макрофагами. АВС-пероксидаза, метиловый зеленый. х 450.

ж - Макрофаги интимы, имеющие MAC3 антиген тканевых макрофагов. Щелочная фосфатаза, метиловый зеленый. х 450.

В мышечно-эластическом слое 3G5-положительные клетки встречаются крайне редко, основная часть таких клеток обнаружена в субэндотелиальном пространстве протеогликанового слоя интимы (Рисунок 27б). Доля клеток, имеющих антиген перицитов 3G5, падает в участках жировых поражений по сравнению с непораженной интимой с 31% до 5% в фиброатероме (Таблица 4).

Предполагается, что перициты активно вовлечены в различные процессы, сопровождаемые нарушением микроциркуляции: диабет, воспаление, заживление ран, гипертония, неоплазия (Sims DE, 1991), а также могут координировать функции эндотелия, включая пролиферацию эндотелиальных клеток и обмен молекул и ионов (Diaz Flores L et al., 1991; Shepro D & Morel NM, 1993; Sheridan JD & Larson DM, 1982). Одной из важнейших особенностей перицитов является их способность становиться клетками-предшественниками для других клеток мезенхимального происхождения: гладкомышечных клеток (Sims DE, 1991), остеобластов (Diaz Flores L et al., 1992; Brighton CT et al., 1992; Shepro D & Morel NM, 1993), хондроци-



тов (Sims DE, 1991), адипоцитов (Iyama K et al., 1989). Это хорошо согласуется с ранними представлениями о субэндотелиальных клетках, как плюрипотентных камбиальных клетках (Щелкунов СИ, 1935), клетках мезенхимального резерва (Maximow A, 1927).

В атеросклеротических поражениях количество клеток, имеющих антиген перицитов 3G5, значительно меньше, чем в непораженной интиме. При этом число оседлых интимальных клеток в атеросклеротических поражениях увеличивается. Можно было бы предположить, что перицитоподобных клеток становится в атеросклеротических поражениях меньше. Однако, результаты, полученные при изучении другого антигена перицитов, выявленного с помощью антител 2A7, опровергают это предположение. Было обнаружено, что количество клеток, положительно окрашенных антителами 2A7, увеличивается именно в атеросклеротических бляшках, тогда как в непораженных участках таких клеток не выявлено (Таблица 4). Такой характер экспрессии двух антигенов перицитов позволяет сделать предположение, что при формировании атеросклеротических поражений происходит изменение функционального состояния перицитоподобных клеток протеогликанового слоя интимы, сопровождаемое изменением антигенов, которые они экспрессируют.

Правомерно задать и другой вопрос, свойственна ли экспрессия разных антигенов перицитов одним и тем же субэндотелиальным клеткам, или это различные клеточные типы? Для того чтобы ответить на этот вопрос, была использована однородная клеточная популяция - культивируемые перициты капилляров мозга. Около 40% клеток в таких культурах экспрессируют 3G5 антиген и 80% - 2A7 антиген. При одновременном выявлении антигенов 3G5 и 2A7 доля положительно окрашенных

клеток также составляет около 80%, что позволяет утверждать следующее: все клетки, имеющие антиген 3G5, экспрессируют 2A7 антиген, но есть субпопуляция перицитов, имеющих только антиген 2A7. Как уже упоминалось выше, 3G5 и 2A7 антигены перицитов были описаны для клеток, находящихся в различном функциональном состоянии. Антиген 3G5 характерен для «покоящихся» перицитов, а 2A7 - для «активированных» перицитов, способных, в частности, к интенсивному размножению. Можно предположить, что в условиях культуры клеток значительная часть перицитов «активирована» (вследствие стимуляции пролиферативной активности факторами сыворотки), поэтому лишь часть этих клеток еще сохраняет антиген покоящихся перицитов - 3G5.

Как известно, накопление липидов - одно из наиболее заметных проявлений атеросклероза. Было предположено, что накопление липидов также может влиять на экспрессию антигенов перицитов в субэндотелиальных клетках. Действительно, 1,5-2 кратное увеличение внутриклеточного содержания липидов, индуцированное модифицированными липопротеидами низкой плотности, приводило к значительному уменьшению доли клеток, экспрессирующих антиген 3G5 (Рисунок 28).

Общее количество клеток при этом не изменялось, что позволяет говорить о том, что снижение доли клеток, имеющих антиген 3G5, это не результат селективной гибели клеток, несущих этот антиген, а исчезновение антигена у клеток, как следствие увеличения содержания липидов внутри клеток, что характерно именно для атеросклеротического поражения, где клеток с антигеном 3G5 меньше, чем в норме. Таким образом, можно предположить, что при формировании атеросклеротических поражений происходит изменение функционального состо-

яния перicyтоподобных клеток протеогликанового слоя интимы, сопровождаемое изменением антигенов, которые они экспрессируют.

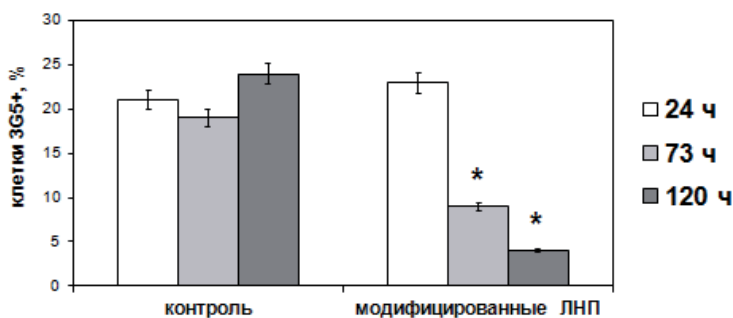


Рисунок 28. Влияние внутриклеточного накопления липидов на экспрессию антигена 3G5 в первичной культуре клеток непораженной интимы аорты человека

На 4-й день культивирования клетки непораженной интимы аорты человека промывали от среды культивирования и добавляли среду 199, содержащую: 10%FCS (контроль); 10%FCS + 100 мкг/мл апоВ нативных ЛНП; 10%FCS + 100 мкг/мл апоВ модифицированных ЛНП на 24, 72 и 120 ч. После окончания инкубаций клетки отмывали и окрашивали антителами против 3G5 антигена, ассоциированного с перицитами. Общее количество клеток и количество положительно окрашенных клеток определяли в каждой культуре в трех повторах. Приведены репрезентативные результаты одного из 3 сходных экспериментов.

\* - достоверное отличие от контроля в соответствующей временной точке,  $p < 0,05$ .

Удалось обнаружить еще одно важное свойство субэндотелиальных интимацитов, которое может обуславливать их во-

влечение в атеросклеротические изменения. Оказалось, что антиген макрофагов CD68 могут экспрессировать не только клетки гематогенного происхождения, но и оседлые субэндотелиальные клетки. В первичной культуре клеток интимы аорты человека количество клеток, имеющих одновременно антиген гладкомышечных клеток  $\alpha$ -актин и CD68 антиген, увеличивается при индукции внутриклеточного накопления липидов в таких клетках с помощью модифицированных липопротеидов (Andreeva ER et al., 1997). Это позволяет предположить, что наличие антигена CD68 не является признаком моноцитарного происхождения клеток, но маркером их фагоцитарной активности, возрастающей при формировании атеросклеротических поражений. В сосуде среди клеток, содержащих CD68 антиген, удалось обнаружить отростчатые клетки, отличающиеся по морфологии от типичных макрофагов. При двойном окрашивании с использованием антител против  $\alpha$ -актина и CD68 в отростках этих клеток выявляются актиновые филаменты. В интиме атеросклеротически измененных участков доля CD68-положительных клеток увеличивается по сравнению с непораженными областями (Таблица 4). Вместе с тем, в областях жировых поражений растет и количество клеток, имеющих одновременно два антигена: CD68 и  $\alpha$ -актин.

Как в непораженной интиме, так и в областях атеросклеротических поражений удастся идентифицировать клетки гематогенного происхождения. С помощью антител CD45 часть клеток была определена как Т и В лимфоциты (Рисунок 27г). Клетки, окрашенные этими антителами, имеют типичную для лимфоцитов форму: округлое ядро, окруженное тоненьким ободком цитоплазмы (Рисунок 27г). CD45-положительные клетки выявляются как в непораженной интиме, так и в атеросклеротически

измененных участках. Наибольшая доля клеток, экспрессирующих CD45 антиген, обнаружена в липофиброзной бляшке (Рисунок 29).

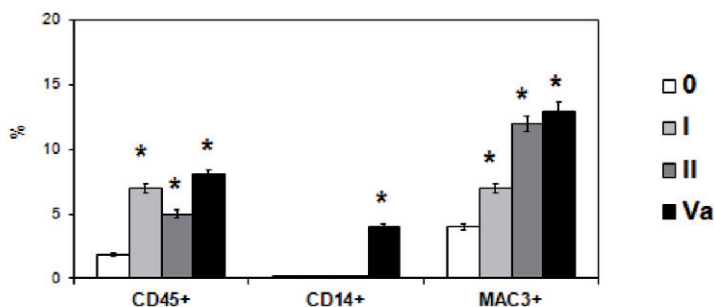


Рисунок 29. Гематогенные клетки интимы

\* - Достоверное отличие от количества положительно окрашенных клеток в непораженных участках интимы аорты человека,  $p < 0,05$ .

Для идентификации другого типа гематогенных клеток - моноцитов-макрофагов было использовано несколько антител. Макрофагальные клетки пытались идентифицировать с помощью упомянутых выше антител CD68. Большая часть CD68-положительных клеток по морфологии представляет собой те же клетки, что имеют и CD14 антиген (Рисунок 27е). Антитела против CD14 антигена выявили клетки моноцитарного происхождения, которые имеют типичную для макрофагов морфологию: округлое или бобовидное ядро, овальная со слегка неровными краями цитоплазма (Рисунок 27д). Показано, что по сравнению с непораженной интимой в атеросклеротических поражениях доля клеток, имеющих CD14 антиген, увеличивается не-

значительно и остается низкой даже в липофиброзной бляшке (Рисунок 29).

Поскольку, как показано выше, антиген CD68 не является специфичным для идентификации тканевых макрофагов в сосудистой стенке, в качестве специфического маркера тканевых макрофагов использовались антитела MAC3, которые не давали перекреста с гладкомышечными клетками. Клетки, экспрессирующие антиген MAC3, имеют округлое или бобовидное ядро, овальную или с небольшими отростками цитоплазму (Рисунок 29ж). Доля MAC3-положительных клеток возрастает в интиме атеросклеротических участков по сравнению с непораженной интимой с максимумом, приходящимся на липофиброзные поражения (Рисунок 29). Однако даже в атеросклеротическом поражении число моноцитов-макрофагов и других гематогенных клеток не является доминирующим, то есть превышающим долю перицитов и гладкомышечных клеток.

Использование набора антител, охватывающего большую часть клеток, встречающихся в интиме, дало возможность охарактеризовать качественные и количественные изменения, происходящие с оседлыми клетками интимы и клетками гематогенного происхождения в одних и тех же участках сосуда. Показано, что гладкомышечные клетки, макрофаги и лимфоциты присутствуют как в интиме внешне непораженных участков, так и в участках атеросклеротических поражений интимы аорты человека. В отличие от распространенных представлений не обнаружено доминирования моноцитов-макрофагов среди клеток, популирующих атеросклеротическое поражение. Обнаружен особый тип клеток, имеющих перицитарные антигены, численность которых составляет существенную долю клеток интимы. Именно эти перицитоподобные клетки вкупе с гладкомышечными

ми клетками составляют основу клеточной популяции субэндотелиальной интимы. В зонах атеросклеротического поражения поведение перицитоподобных клеток изменяется – они захватывают липиды и начинают пролиферировать. Это сопровождается изменением антигенов, специфичных для перицитов.

Таким образом, изучение клеточного состава интимы артерий человека имеет уже более чем вековую историю (Langhans Th, 1866; Maximow A, 1927; Virchow RV, 1856; Аничков НН, 1947). В классических работах обращалось внимание, что популяция клеток сосудистой стенки гетерогенна и представлена двумя большими субпопуляциями: отростчатыми субэндотелиальными клетками - оседлыми клетками, и округлыми клетками, по морфологии сходными с лейкоцитами периферической крови, - пришлыми гематогенными клетками. Было отмечено, что субэндотелиальные оседлые клетки отличаются от типичных гладкомышечных клеток меди.

#### **3.3.2.4. Субэндотелиальные клетки в первичной культуре**

Культура клеток – удобный инструмент для изучения механизмов атерогенеза. Особый интерес представляет первичная культура, в которой клетки еще не начали делиться и сохраняют основные свойства, присущие им *in vivo*. Выявлено, что субэндотелиальные клетки аорты человека начинают пролиферировать в первичной культуре лишь с 10-14 дня (Orekhov AN et al., 1983a), что позволяет рассматривать ранние первичные культуры (5-7 дней после посадки клеток в культуру) как максимально отражающие состояние клеток в сосудах.

На 7-й день культивирования в первичных культурах из непораженных и атеросклеротических участков интимы аорты

человека была проведена иммуноцитохимическая идентификация клеток с помощью антител против различных клеточных типов (Таблица 3). Во всех исследованных культурах большая часть клеток экспрессировала мышечный  $\alpha$ -актин (Рисунок 30а).

Были также выявлены клетки, положительно окрашенные антителами 3G5 против перицитов. Морфологически эти клетки представляли собой крупные хорошо распластанные клетки полигональной формы (Рисунок 30б). Доля 3G5-положительных клеток достигала 50% в культурах из непораженных участков и значительно уменьшалась в атеросклеротических поражениях (Таблица 5). Двойное типирование с помощью антител к 3G5 антигену и к  $\alpha$ -актину продемонстрировало, что 3G5-положительные клетки экспрессируют также и антиген гладкомышечных клеток.

В культурах были идентифицированы клетки, экспрессирующие и другой антиген перицитов - 2A7. Это также крупные клетки, напоминающие 3G5-положительные перициты (Рисунок 7в). Доля этих клеток значительно варьировала в культурах, как из нормальных, так и из атеросклеротических участков (Таблица 5).

В исследованных культурах были обнаружены также клетки, сходные с моноцитами периферической крови и положительно окрашенные антителами CD14 (Рисунок 30г), а также CD45-положительные клетки (Рисунок 30д). Интересными оказались результаты по выявлению CD68 антигена макрофагов в культурах из нормальных и атеросклеротических участков интимы аорты человека. В клетках антиген CD68 был локализован в мелких цитоплазматических гранулах, количество которых варьировало. В культурах из нормальных участков большая часть



CD68-положительных клеток по своей морфологии напоминала моноциты-макрофаги периферической крови (Рисунок 30е).

Кроме того, в культурах из непораженных участков интимы аорты можно было видеть клетки, отличные от моноцитов-макрофагов. Эти клетки были крупнее, имели обычно вытянутое хорошо распластанное тело с отростками (Рисунок 30е). По форме такие клетки были похожи на гладкомышечные клетки интимы. В интимацитах из непораженных участков CD68-положительные гранулы были немногочисленны (Рисунок 30е). В культурах из жировых полос и атеросклеротических бляшек можно было обнаружить крупные круглые или овальные клетки, цитоплазма которых была заполнена CD68-положительными гранулами, а также сходные с типичными гладкомышечными клетки, в перинуклеарной области которых было расположено значительное количество CD68-положительных гранул. С помощью двойного окрашивания было продемонстрировано, что эти клетки, содержащие CD68-положительные гранулы, экспрессируют также мышечный  $\alpha$ -актин.

В культурах из нормальных и атеросклеротических поражений было оценено количество клеток, имеющих CD68 антиген, мышечный  $\alpha$ -актин и оба антигена одновременно (Таблица 6). В культурах, полученных из атеросклеротических поражений, доля клеток, имеющих CD68 антиген, увеличивается по сравнению с культурами из непораженных участков. Увеличивается также и количество клеток, содержащих антигены CD68 и  $\alpha$ -актин одновременно. Доля клеток, экспрессирующих только  $\alpha$ -актин, в культурах из атеросклеротических поражений пропорционально падает.

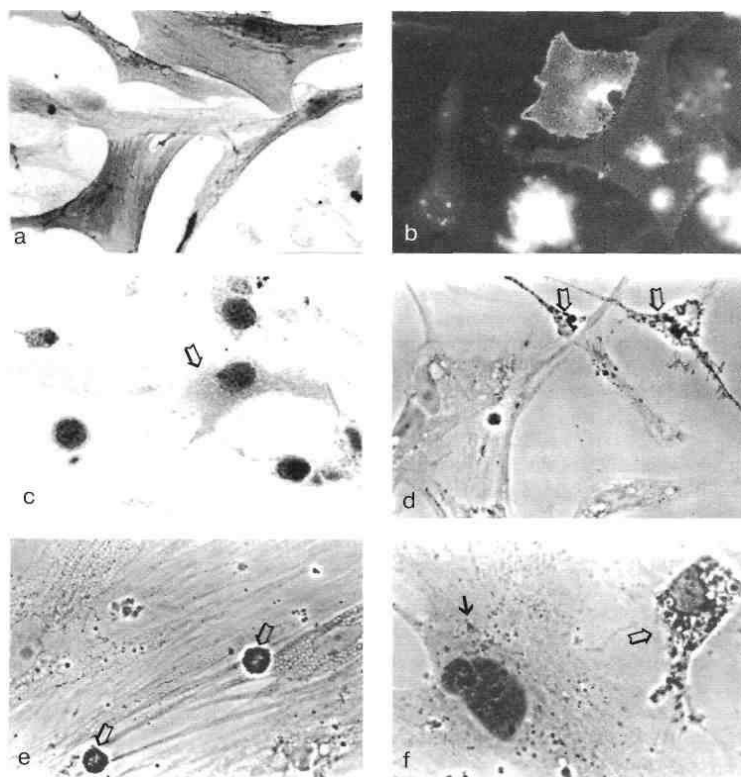


Рисунок 30. Иммуноцитохимическое выявление клеток в первичной культуре интимы аорты

а - Гладкомышечный  $\alpha$ -актин в клетках первичной культуры интимы. АВС-пероксидаза.  $\times 500$ .

б - Клетки, содержащие антиген перицитов 3G5. Иммунофлуоресценция ФИТЦ.  $\times 500$ .

в - Клетки, содержащие антиген перицитов 2A7 (указано стрелкой). АВС-пероксидаза, гематоксилин.  $\times 500$ .

г - Макрофаги интимы, содержащие CD14 антиген (указано стрелками). АВС-пероксидаза. Фазовый контраст.  $\times 500$ .

*(продолжение на следующей странице)*

д - Лимфоциты в первичной культуре (указано стрелками). Для идентификации были использованы антитела против общего антигена лейкоцитов CD45. Щелочная фосфатаза. Фазовый контраст. x 500.

е - Клетки, экспрессирующие CD68 антиген, ассоциированный с макрофагами. АВС-пероксидаза, гематоксилин. x 600.

→ - оседлая клетка

➔ - гематогенная клетка

Таблица 5. Иммуноцитохимическая характеристика клеток интимы аорты человека в первичной культуре

| Антиген                   | Доля положительно окрашенных клеток,<br>% от общего числа клеток |           |           |
|---------------------------|------------------------------------------------------------------|-----------|-----------|
|                           | 0                                                                | II        | Va        |
| гладкомышечный<br>α-актин | 89,6±6,7                                                         | 77,5±15,5 | 77,7±11,8 |
| CD45                      | 3,6±0,4                                                          | 6,7±1,1*  | 12,8±2,8* |
| CD68                      | 5,2±1,3                                                          | 14,5±1,9* | 13,9±3,1* |
| 3G5                       | 45,8±10,9                                                        | 17,3±3,2* | 7,8±1,9*  |
| 2A7                       | 24,1±9,9                                                         | 13,3±4,0* | 9,2±2,2*  |

0 – норма; I - начальные поражения; II - жировая полоса; Va - липофиброзная бляшка.

\* - Достоверное отличие от количества положительно окрашенных клеток в непораженных участках интимы аорты человека,  $p < 0,05$ .

Таблица 6. Экспрессия гладкомышечного  $\alpha$ -актина и CD68 антигена макрофагов в первичной культуре клеток интимы

| Тип поражения             | Гладкомышечный $\alpha$ -актин (%) | CD68 антиген (%) | неидентифицированные клетки (%) | $\alpha$ -актин + CD68 (%) |
|---------------------------|------------------------------------|------------------|---------------------------------|----------------------------|
| Норма (0)                 | 75,1 $\pm$ 2,6                     | 5,2 $\pm$ 1,3    | 5,7 $\pm$ 1,2                   | 14,5 $\pm$ 4,1             |
| Жировая полоса (II)       | 52,4 $\pm$ 8,5*                    | 14,5 $\pm$ 1,9*  | 8,0 $\pm$ 1,1                   | 25,1 $\pm$ 3,3*            |
| Липофиброзная бляшка (Va) | 63,1 $\pm$ 7,0*                    | 13,9 $\pm$ 3,1*  | 8,4 $\pm$ 1,8                   | 14,6 $\pm$ 4,8             |

\* - Достоверное отличие от количества положительно окрашенных клеток в непораженных участках интимы аорты человека,  $p < 0,05$ .

Итак, используя культуру клеток, удалось обнаружить важное свойство субэндотелиальных интимацитов, которое может обуславливать их вовлечение в атеросклеротические изменения. Оказалось, что CD68 антиген макрофагов могут экспрессировать не только клетки гематогенного происхождения, но и оседлые субэндотелиальные клетки интимы. Показано, что количество клеток, имеющих одновременно антиген гладкомышечных клеток  $\alpha$ -актин и CD68 антиген, выше в первичной культуре клеток, выделенных из атеросклеротических поражений. Это позволяет предположить, что наличие CD68 антигена является не маркером моноцитарного происхождения клеток, но

маркером фагоцитарной активности, возрастающей при формировании атеросклеротических поражений.

### **3.3.2.5. Гематогенные и оседлые клетки**

Таким образом, иммуноцитохимический анализ клеточного состава слоев интимы показал, что клетки мышечно-эластического слоя - это гомогенная клеточная популяция, представленная, в основном, гладкомышечными клетками. Эти клетки сходны с гладкомышечными клетками меди, которые практически все окрашиваются антителами против мышечного  $\alpha$ -актина. Протеогликановый слой интимы населен как оседлыми клетками, так и клетками гематогенного происхождения. В атеросклеротическом поражении доля оседлых клеток, экспрессирующих мышечный  $\alpha$ -актин, практически не изменяется по сравнению с непораженной интимой, а доля гематогенных клеток возрастает, но не становится преобладающей. Наиболее вовлеченными в атеросклеротические изменения оказываются оседлые клетки протеогликанового слоя интимы аорты. Именно эти клетки обладают иммуноцитохимическими признаками, заметно отличающими их от типичных гладкомышечных - наличие антигенов перицитов и способность экспрессировать CD68 антиген макрофагов.

Каковы же особенности популяции оседлых интимальных клеток? Морфологическая гетерогенность этой популяции, состоящей из отростчатых клеток различной формы, была описана в работах Langhans (Langhans Th, 1866), Schönfelder (Schönfelder M, 1969), Щелкунова (Щелкунов СИ, 1935; 1977), Хавкина (Хавкин ТН, 1950), Geer & Haust (Geer JC & Haust MD, 1972) и др. Для выявления клеток различной формы был также

использован метод спиртово-щелочной диссоциации фиксированной ткани (Orekhov AN et al., 1984d; 1986a).



Рисунок 31. Гетерогенность клеток протеогликанового слоя интимы

Суспензия клеток после спиртово-щелочной диссоциации фиксированной ткани. Толуидиновый синий. х 350.

В суспензии клеток после диссоциации внеклеточного матрикса можно видеть отмеченную ранее многими авторами (Geer JC & Haust MD, 1972; Langhans Th, 1866; Krushinsky AV et al., 1983; Schönfelder M, 1969; Хавкин ТН, 1950) морфологическую гетерогенность клеток интимы (Рисунок 31). Клетки мышечно-эластического слоя имеют, в основном, вытянутую bipolarную форму, характерную для клеток меди. В то же время, среди клеток протеогликанового слоя можно обнаружить клетки, имеющие различную форму от вытянутой до звездчатой. Именно наличие отростчатых клеток «звездчатой» (Langhans Th,

1866) формы и является основной особенностью клеточной популяции протеогликанового слоя интимы.

Крайние морфологические формы субэндотелиальных оседлых клеток - вытянутые и звездчатые - можно охарактеризовать следующим образом. Вытянутые клетки имеют удлиненное тело, обычно без отростков или с небольшими боковыми отростками, они плотно упакованы в клеточные пласты, экспрессируют маркер гладкомышечных клеток -  $\alpha$ -актин, содержат хорошо выраженный сократительный аппарат (Orekhov AN et al., 1986a). Звездчатые (пероцитоподобные) клетки - это клетки, имеющие округлое тело, три и более боковых отростка. В рыхлом соединительнотканном матриксе субэндотелиальной интимы они располагаются без видимой ориентации. В части интимы, прилежащей к эндотелиальной выстилке, кроме маркера гладкомышечных клеток -  $\alpha$ -актина, они экспрессируют антигены пероцитов 3G5 и 2A7, антиген макрофагов CD68 (Andreeva ER et al., 1997b), сквенджер-рецептор (Назарова ВЛ и др., 1995). В атеросклеротических поражениях именно они наиболее перегружены липидами (пенистые клетки) (Andreeva ER et al., 1991). Электронная микроскопия выявляет в их цитоплазме значительное количество синтетических органелл (Orekhov AN et al., 1986a). В атеросклеротических поражениях при увеличении общего числа клеток в два раза, число звездчатых клеток возрастает более чем в шесть раз (Orekhov AN et al., 1984d). В результате происходит не только увеличение общего числа интимацитов, но и качественное изменение клеточного состава интимы в областях атеросклеротических поражений.

Данные разных авторов о количестве гематогенных клеток в интиме атеросклеротически измененных участков артерий весьма противоречивы. Результаты исследований на экспери-

ментальных животных говорят о преобладающем количестве макрофагов в интима пораженных участков (Stadius ML et al., 1992; Tsukada T et al., 1986). Макрофагам отводится особая роль в атерогенезе как клеткам, способным перегружаться липидами и превращаться в пенистые клетки (Stary HC et al., 1994; Aqel NM et al., 1985; Roessner A et al., 1987). Обнаружение значительного количества CD68-положительных клеток на вертикальных срезах атеросклеротических участков артерий человека породило представление, что именно макрофаги представляют основной тип клеток, определяющих формирование и прогрессирование атеросклеротических поражений (Gown AM et al., 1986; Wal AC et al., 1989). В работе Kaartinen с сопр. (Kaartinen M et al., 1994), связанной с изучением интимы брюшной аорты человека, получены данные о высоком содержании макрофагов в участках жировых полос и в липофиброзных бляшках (23% и 42% соответственно), на основании чего делается вывод об основной роли клеток гематогенного происхождения в развитии атеросклеротических изменений. В других работах также обнаружено увеличение относительного числа макрофагов в поражениях. Однако доля макрофагов не превышала 17%, то есть изменения численности макрофагов не носили такого выраженного характера, как было обнаружено в других исследованиях (Aqel NM et al., 1985). Не оспаривая участия макрофагов в формировании атеросклеротических поражений, необходимо отметить, что в интима аорты человека они не являются преобладающим типом клеток. Возможно, различие данных о процентном содержании макрофагов в пораженных участках связаны с тем, что эти результаты получены на различных артериях (коронарной, сонной артериях, аорте). Можно предположить, что различия клеточного состава атеросклеротических поражений



отражают существование отличий в механизмах формирования изменений в разных участках сосудистого русла. Кроме того, использование антител против разных антигенов макрофагов может объяснять различия в определении доли клеток макрофагального происхождения. Антитела CD14 против рецептора к липополисахариду идентифицируют моноциты периферической крови и макрофаги гематогенного происхождения. В непораженных участках интимы обнаружено очень мало CD14-положительных клеток, но их число значительно в атеросклеротических поражениях. Антитела MAC3, выявляющие тканевые макрофаги и активированные моноциты, позволяют идентифицировать клетки, имеющие MAC3 антиген, как в непораженной, так и в атеросклеротически измененной интиме. Количество таких клеток максимально в жировых поражениях (жировые полосы и липофиброзные бляшки) и значительно выше, чем число клеток, экспрессирующих CD14 антиген.

Вопрос о соотношении гематогенных и оседлых элементов в интиме непораженных и атеросклеротически измененных участков интимы до сих пор до конца не ясен. В некоторых работах было показано, что доля гладкомышечных клеток в поражениях существенно падает, а увеличение популяции происходит за счет гематогенных клеток. Так, Aqel с сотр. (Aqel NM et al., 1985) показал, что в поражениях интимы аорты человека количество макрофагов увеличивается по сравнению с нормой и становится равным числу гладкомышечных клеток. Получено и другое соотношение гладкомышечных клеток и макрофагов. В жировой полосе, например, оно составляет 3:1, что согласуется с результатами работы Katsuda с сотр. (Katsuda S et al., 1992) по изучению клеточного состава интимы участков жировых по-

лос грудной аорты человека, в которой показано соотношение 23:9.

Идентификации в сосудистой стенке другого типа гематогенных клеток - лимфоцитов – посвящено большое количество работ (Alpers CE et al., 1990; Emeson EE et al., 1988; Hansson GK et al., 1988; 1991), однако получено мало данных о количестве этих клеток в интиме артерий человека. В работе Kaartinen с сотр. (Kaartinen M et al., 1994) по изучению клеточного состава интимы брюшной аорты человека приведены следующие данные: в интиме непораженных участков лимфоциты составляют 2%, в жировых полосах - 8%, в липофиброзных бляшках - 7%.

Для оценки изменения клеточности оседлых и гематогенных элементов в интиме аорты, был использован коктейль антител CD45+CD14, то есть антител против лимфоцитов и макрофагов, позволяющий выявлять общее число клеток гематогенного происхождения. Показано, что в атеросклеротических поражениях происходит увеличение количества как оседлых, так и гематогенных клеток, причем в количественном отношении доля гематогенных клеток увеличивается значительно (в 8 раз в поражениях по сравнению с непораженной интимой), чем оседлых (количество клеток увеличивается в 3 раза). Однако даже при таком резком увеличении численности гематогенные клетки в атеросклеротических поражениях они не становятся преобладающим клеточным типом и доля их не превышает 20% клеточной популяции.

Используя гематогенный коктейль CD45+CD14, на вертикальных срезах аорты человека было определено количество клеток, составляющих популяции оседлых и гематогенных клеток в субэндотелиальной интиме. Выявлено, что в ряду: непораженная интима - начальные поражения - жировые полосы -

липофиброзные бляшки - фиброзные бляшки, имеет место колоколообразное увеличение клеточности интимы с максимумом, приходящимся на выраженные жировые поражения. Такая зависимость характерна как для гематогенных клеток, так и для оседлых интимацитов (Рисунок 32). Как в непораженной интиме, так и в атеросклеротических поражениях основную часть клеточной популяции составляют оседлые интимацинты.

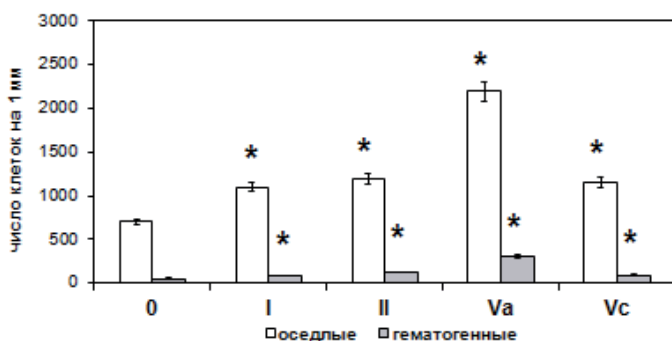


Рисунок 32. Количество оседлых и гематогенных клеток в интиме аорты человека

Количество оседлых и гематогенных клеток в интиме определяли на вертикальных срезах аорты, окрашенных коктейлем антител против гематогенных клеток (CD45+CD14), в расчете на 1 мм люминальной поверхности сосуда. Оседлыми клетками считали все клетки на таких срезах, неокрашенные антителами гематогенного коктейля.

0 - норма (4), I - начальные поражения (5), II - жировые полосы (4), Va - липофиброзные бляшки (5), Vc - фиброзные бляшки (6). В скобках указано число проанализированных случаев.

\* - достоверное отличие от количества клеток в непораженных участках интимы,  $p < 0,005$

Вопрос о количестве гладкомышечных клеток в атеросклеротически пораженной и неизменной интима является одним из основных для понимания процесса формирования атеросклеротических поражений. С помощью иммуноцитохимического типирования показано, что при общем увеличении клеточности в процессе атерогенеза доля гладкомышечных клеток остается постоянной (Таблица 4). В жировой полосе было выявлено некоторое снижение количество гладкомышечных клеток по сравнению с непораженной интимой. Это снижение числа гладкомышечных клеток может быть связано с тем, что, во-первых, накопление внутриклеточных липидов в данных клетках сопровождается уменьшением количества сократительных филаментов, против которых были использованы антитела для идентификации гладкомышечных клеток. Во-вторых, возможно, что при накоплении липидов актиновые филаменты выявляются только по периферии клеток, и поэтому положительно окрашенные участки цитоплазмы не идентифицируются как ассоциированные с ядрами, а, следовательно, не учитываются.

Выше указывалось, что слои, из которых состоит интима аорты человека, в разной степени вовлечены в атерогенез (Orekhov AN et al., 1984b). Мышечно-эластический слой, прилежащий к меди, мало подвержен изменениям, а основные процессы, связанные с развитием атеросклероза (накопление липидов, отложение коллагена, увеличение клеточности), происходят в ближайшем к просвету протеогликановом слое интимы. Качественные и количественные изменения клеточного состава также связаны с протеогликановым слоем. Именно в этом слое локализуются все гематогенные клетки, в этом же слое локализованы оседлые клетки, экспрессирующие антигены перицитов, несвойственные типичным гладкомышечным клеткам, здесь же

обнаружены гладкомышечные клетки, экспрессирующие антиген макрофагов CD68. Таким образом, атеросклеротические изменения протеогликанового слоя интимы сопровождаются качественными и количественными изменениями клеточного состава, которые, возможно, и обуславливают формирование и прогрессирование атеросклеротических поражений.

### **3.3.2.6. Звездчатые клетки**

Важно выяснить, существует ли какая-либо связь между изменениями клеточного состава и хорошо известными атеросклеротическими нарушениями, такими как: утолщение интимы, накопление липидов и коллагена. Как видно из Таблицы 7, наивысшие значения коэффициентов корреляции выявляются при сопоставлении этих параметров с числом звездчатых клеток. Наиболее тесная связь была обнаружена между числом звездчатых клеток и содержанием эфиров холестерина, а также между числом этих клеток и общим содержанием липидов. Коэффициенты корреляции между числом звездчатых клеток и содержанием коллагена, а также толщиной интимы были несколько ниже, однако, и эти показатели превосходили по значению коэффициенты корреляции для клеток вытянутой формы, а также для общего числа клеток (Orekhov AN et al., 1986a).

Звездчатые клетки располагаются в интимае сосуда в непосредственной близости к просвету и оказываются вторым после эндотелия барьером на пути веществ, попадающих в сосудистую стенку из кровеносного русла. По-видимому, именно таким местоположением и обуславливается наибольшая вовлеченность звездчатых клеток в самые ранние атеросклеротические изменения в сосудистой стенке.

Наиболее ярким примером таких клеток являются нейроны и другие клетки нервной ткани, дендритные клетки лимфатических фолликулов, клетки Ито в печени, мезангиальные клетки в почечных клубочках и т.д. Звездчатая форма позволяет клеткам обеспечивать коммуникационные связи в соответствующих тканях с помощью системы отростков. Можно предположить, что звездчатые клетки субэндотелиальной интимы обладают сходными функциями, а наличие у них длинных ветвящихся отростков способствует формированию целостной коммуникационной сети в интимае.

Таблица 7. Корреляционная зависимость между количеством клеток в интимае и накоплением липидов, коллагена и утолщением интимы

|                   | звездчатые<br>клетки | вытянутые<br>клетки | общее<br>число клеток |
|-------------------|----------------------|---------------------|-----------------------|
| коллаген          | 0,80                 | 0,54*               | 0,63*                 |
| общие липиды      | 0,95                 | 0,66*               | 0,81*                 |
| холестерин        | 0,86                 | 0,53*               | 0,68*                 |
| эфиры холестерина | 0,96                 | 0,72*               | 0,76*                 |
| триглицериды      | 0,94                 | 0,64*               | 0,80*                 |
| фосфолипиды       | 0,90                 | 0,57*               | 0,72*                 |
| толщина интимы    | 0,73                 | 0,50*               | 0,58*                 |

\* - достоверное отличие от коэффициента корреляции для звездчатых клеток,  $p < 0,05$ .

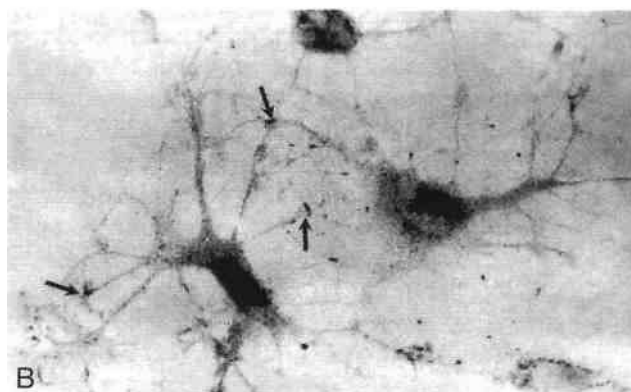
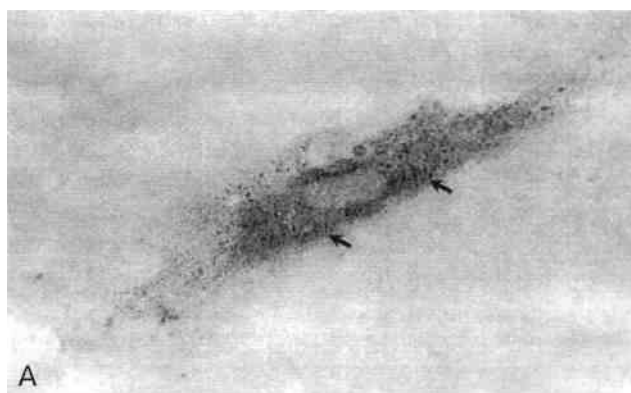


Рисунок 33. Коннексин 43 (Cx43) в клетках интимы аорты человека в первичной культуре. АВС-пероксидаза, гематоксилин, х 200

На 7-й день культивирования к клеткам непораженной интимы аорты человека добавляли метилизобутилксантин (MIX)  $10^{-4}$ М. Через 3 часа инкубации клетки отмывали, фиксировали 4% формальдегидом и окрашивали антителами против Cx43.

а - клетки до добавления MIX, Cx43 локализован на поверхности клеток в виде мелких точек,

б - арборизированные клетки через 3 часа инкубации с MIX, Cx43 в виде крупных бляшек расположен, в основном, на концах клеточных отростков арборизированных клеток.

В первичной культуре клеток интимы, где клетки обычно имеют уплощенную полигональную форму, удалось вызвать арборизацию, то есть индуцировать образование звездчатых клеток, повышая внутриклеточный уровень цАМФ (Рисунок 33). Причем, в культурах из протеогликанового слоя интимы практически 100% клеток приобретало звездчатую форму, тогда как в культурах мышечно-эластического слоя доля арборизующихся клеток не превышала 50%, а среди клеток меди их было около 10% (Andreeva ER et al., 1992).

Обнаружено, что арборизация клеток сопровождается перераспределением коннексина 43 (Cx43) - основного белка высокоспециализированных межклеточных контактов - щелевых контактов. Этот белок локализован на клеточной поверхности в структурах, называемых коннексиновыми бляшками (бляшки Cx43). На неарборизированных клетках бляшки Cx43 мелкие и располагаются равномерно по поверхности клеток. На арборизированных клетках, которые приобретали при этом звездчатую форму, в дополнение к мелким бляшкам Cx43, появлялись крупные бляшки Cx43, расположенные, в основном, на концах клеточных отростков в местах контактов с соседними клетками (Рисунок 33).

Таким образом, повышение внутриклеточного уровня цАМФ приводит к арборизации клеток субэндотелиальной интимы, сопровождаемой перераспределением коннексиновых бляшек и, возможно, увеличением степени межклеточной коммуникации через щелевые контакты. Можно предположить, что звездчатая форма клеток является существенной для формирования межклеточных контактов в интиме. Способность клеток интимы к образованию отростков отличает их от типичных глад-



комышечных клеток меди, которые арборизуются плохо или не арборизуются вовсе.

В дополнение к многочисленным фактам, изложенным выше, способность арборизоваться является дополнительным аргументом в пользу закономерного предположения, что клетки субэндотелиальной интимы представляют собой особый клеточный тип, отличный от типичных гладкомышечных клеток.

### **3.3.2.7. Изменение численности интимальной популяции**

Общее число клеток было определено в участках непораженной интимы и в областях атеросклеротических поражений на вертикальных срезах аорты. В атеросклеротических поражениях количество интимальных клеток выше, чем в норме, при этом толщина интимы также существенно увеличивается. Для того чтобы оценить изменение клеточности в интиме, а не плотность клеток на срезе, в расчет принималась часть среза шириной 1 мм, захватывающую всю интиму от эндотелиальной выстилки до меди. По сравнению с неизмененными участками число клеток в начальных поражениях в 1,5 раза выше и это различие значимо (Таблица 8). Значимое увеличение клеточности выявляется также в жировой полосе и в липофиброзной бляшке (фиброатероме), где клеток более чем в 3 раза больше, чем в непораженной интиме. В то же время, количество клеток в фиброзной бляшке ниже, чем в фиброатероме и сравнимо с числом клеток в начальных поражениях.

Таким образом, в ряду: непораженная интима - начальное поражение - жировая полоса - фиброатерома - фиброзная бляшка, имеет место колоколообразное увеличение клеточно-

сти интимы с максимумом, приходящимся на выраженные жировые поражения.

Клетки протеогликанового слоя - наиболее динамичная часть клеточной популяции аорты. С увеличением толщины интимы с возрастом, прежде всего, увеличивается число именно этих клеток. Наибольшая плотность клеток протеогликанового слоя наблюдается от 30 до 55 лет, а затем их число уменьшается.

Таблица 8. Количество клеток в интима аорты человека

| Тип поражения | Общее количество клеток на 1 мм | Количество оседлых клеток на 1 мм | Количество гематогенных клеток на 1 мм |
|---------------|---------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------------|
| 0             | 780 $\pm$ 60                    | 660 $\pm$ 60                      | 40 $\pm$ 6                             |
| I             | 1120 $\pm$ 40*                  | 1040 $\pm$ 40*                    | 80 $\pm$ 6*                            |
| II            | 1320 $\pm$ 60*                  | 1180 $\pm$ 40*                    | 120 $\pm$ 20*                          |
| Va            | 2560 $\pm$ 220*                 | 2200 $\pm$ 180*                   | 360 $\pm$ 60*                          |
| Vc            | 1160 $\pm$ 100*                 | 1060 $\pm$ 80*                    | 80 $\pm$ 80*                           |

0 – норма; I - начальное поражение; II - жировая полоса; Va - липофиброзная бляшка; Vc - фиброзная бляшка.

\* - Достоверное отличие от количества положительно окрашенных клеток в непораженных участках интимы аорты человека,  $p < 0,05$ .

Увеличение числа клеток протеогликанового слоя аорты имеет место также при различных болезнях. Наиболее существенные изменения в числе этих клеток обнаруживаются при общих тяжелых септических и токсических процессах, при тяжелых терминальных пневмониях, при диффузном гнойном перитоните и менингитах. Увеличение числа клеток протеоглика-

нового слоя наблюдается также при гломерулонефрите и длительной гипертонии. В противоположность этому, при карциномах, миелозах и сахарном диабете число этих клеток снижается (Schönfelder M, 1969).

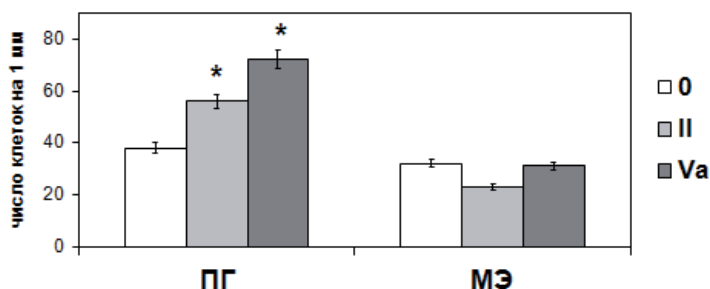


Рисунок 34. Количество клеток в слоях интимы аорты человека

Количество клеток в слоях интимы определяли на вертикальных срезах аорты, окрашенных гематоксилин-эозином, в расчете на 1 мм люминальной поверхности сосуда

0 - норма (5), II - жировые полосы (7), Va - липофиброзные бляшки (6). В скобках указано число проанализированных случаев.

ПГ - протеогликановый слой интимы, МЭ - мышечно-эластический слой интимы.

\* - достоверное отличие от количества клеток в неповрежденных участках интимы,  $p < 0,05$ .

С помощью метода спиртово-щелочной диссоциации фиксированной ткани (Krushinsky AV et al., 1983) было определено число клеток в слоях неповрежденной интимы и в атеросклеротических поражениях. В протеогликановом слое интимы число клеток в жировой полосе в полтора, а в бляшке в два раза выше по сравнению с нормой, тогда как в мышечно-эластическом слое атеросклеротических поражений, по сравнению с неизме-

ненными участками, число клеток существенно не различается (Orekhov AN et al., 1987a). Аналогичные результаты были получены с использованием вертикальных срезов аорты. Число клеток в мышечно-эластическом слое интимы сходно в неповрежденной интиме и в атеросклеротических поражениях, а в протеогликановом слое - превышает значения в норме в два раза (Рисунок 34). Таким образом, атеросклеротические изменения сопровождаются увеличением клеточности протеогликанового слоя.

При существенном увеличении числа клеток протеогликанового слоя в атеросклеротическом поражении изменяется соотношение основных морфологических типов клеток, составляющих популяцию интимы (Orekhov AN et al., 1984c). Изменение соотношения морфотипов связано с тем, что с увеличением общего числа интимальных клеток, которое сопровождает атеросклероз, число звездчатых клеток, локализующихся в протеогликановом слое, увеличивается очень резко по сравнению с клетками других морфологических форм. Число вытянутых гладкомышечных клеток мышечного слоя увеличивается в бляшке по сравнению с нормой в 1,5 раза, в то же время число звездчатых клеток протеогликанового слоя возрастает в 13 раз (Orekhov AN et al., 1984b).

Изучение клеточного состава интимы артерий человека имеет более чем вековую историю (Langhans Th, 1866; Maximow A, 1927; Orekhov AN et al., 1984b; Аничков НН, 1947). Субэндотелиальные оседлые клетки, отличающиеся от типичных гладкомышечных клеток меди, называли фибробластами интимы (Langhans Th, 1866), клетками мезенхимального резерва организма (Maximow A, 1927), перицитами или сосудистым камбием (Щелкунов СИ, 1935) и т.д. Однако, после проведения серии

электронномикроскопических исследований, доминирующим стало представление о том, что интимацинты крупных артерий представляют собой в той или иной мере модифицированные гладкомышечные клетки (Campbell JH & Campbell GR, 1989; Haust MD et al., 1960).

Итак, количество клеток в интима пораженных участков увеличивается по сравнению с неизмененными участками аорты. Однако, вопреки широко распространенному мнению о гиперцеллюлярности как о ключевом звене атерогенеза (Stadius ML et al., 1992; Tsukada T et al., 1986), это увеличение не так значительно, как представлялось прежде.

### **3.4. Трехмерная цитоархитектоника интимы**

#### **3.4.1. Клеточная сеть в интима**

Более 40 лет назад Schönfelder (Schönfelder M, 1969), изучая плоскостные препараты интимы, предположил, что интимальные звездчатые клетки объединены в общую сеть. Между переплетающимися отростками он наблюдал свободные пространства, которые, по его мнению, представляют собой каналы, уходящие вглубь интимы.

Представления о единой сети в интима были подтверждены современными исследованиями. С помощью сканирующей электронной микроскопии показано, что в протеогликановом слое непораженной интимы аорты все клетки контактируют друг с другом в горизонтальной плоскости, образуя сеть (Rekhter MD et al., 1991). Клетки, расположенные на разных уровнях, также связаны между собой, образуя соединения между сетями, расположенными на разных уровнях, формируя таким образом

трехмерную клеточную сеть. Не было обнаружено ни одного клеточного отростка, который не контактировал бы с отростком или телом другой клетки. Следовательно, протеогликановый слой интимы можно рассматривать не как совокупность изолированных клеток, а как единую клеточную систему. Между отростками клеток имеются свободные пространства, заполненные соединительнотканым матриксом.

Установлено, что клетки, входящие в состав мышечно-эластического слоя не образуют сети, характерной для звездчатых клеток протеогликанового слоя. С помощью сканирующей электронной микроскопии показано, что большинство клеток имеет вытянутую биполярную форму, характерную для гладкомышечных клеток меди. Клетки мышечно-эластического слоя плотно упакованы в пласты, которые расположены под небольшим углом друг к другу.

Существует непрерывный вертикальный градиент изменения соотношения количества отростчатых «звездчатых» субэндотелиальных клеток и типичных вытянутых гладкомышечных клеток. По направлению от глубоко расположенного мышечно-эластического слоя к эндотелию происходит уменьшение числа вытянутых клеток и, одновременно, увеличение числа звездчатых клеток, составляющих общую клеточную сеть.

Клеточная система интимы претерпевает существенные изменения при атеросклерозе. В жировых полосах звездчатые клетки обычно сильно нагружены липидами (Andreeva ER et al., 1991; Orekhov AN et al., 1986a; Андреева ЕР и др., 1985). С этим, по-видимому, связано увеличение их размеров и образование на их поверхности выпуклостей, из-за находящихся в клетках липидных капель и везикул. Везикулы обнаруживаются и вне клеток, что может быть результатом их отпочковывания от

клеточных отростков. Не исключено, что отпочковывание везикул с концов клеточных отростков приводит к разрушению межклеточных контактов и разобщению клеток.

В атеросклеротических бляшках изменения в клеточной системе проявляются в еще большей степени. В поверхностных слоях соединительнотканной покрышки атеросклеротической бляшки звездчатые клетки всегда расположены поодиночке или небольшими группами. Иногда эти клетки содержат липидные включения. В более глубоких слоях интимы число отростчатых клеток увеличивается, но единой сети они не формируют. Интересно отметить, что в участках интимы, расположенных рядом с плечами атеросклеротических бляшек, но не имеющих внешних признаков атеросклеротического поражения, имеется трехмерная клеточная сеть, характерная для непораженных участков. Клетки, составляющие эту сеть, не образуют контактов с фрагментами клеточной сети, которые можно видеть в самой атеросклеротической бляшке.

### **3.4.2. Межклеточная контактная коммуникация**

Таким образом, в протеогликановом слое атеросклеротических поражений происходит разобщение клеточной сети, которое приводит в конце концов к полной изоляции клеток друг от друга в атеросклеротических бляшках. Хорошо известно, что регуляция жизнедеятельности клеток, входящих в единую тканевую систему, осуществляется через специализированные межклеточные соединения - щелевые контакты (Trautmann A, 1988). Показано, что щелевые контакты играют существенную роль в регулировании тканевого гомеостаза, так как через них происходит транспорт клеточных метаболитов, вторичных мес-

сенджеров и других биологически активных молекул непосредственно из клетки в клетку, минуя внеклеточное пространство. Наличие таких специализированных клеточных контактов является чертой, характерной для дифференцированных клеточных систем с высокой степенью межклеточной интеграции (Beny J-L et al., 1992; Beny J-L & Gribi F, 1989; Davies PF, 1986; Gabella G, 1979; Loewenstein WR, 1979). Выше упоминалось о том, что звездчатая форма интимальных клеток и их взаимодействие с помощью отростков может быть существенным фактором, регулирующим функционирование сосудистой стенки. Можно предположить, что одной из возможных причин, лежащих в основе нарушения целостности клеточной сети, сформированной интимацитами протеогликанового слоя при атеросклерозе, могут быть нарушения в функционировании именно щелевых контактов.

Степень межклеточной коммуникации, осуществляемой с помощью щелевых контактов, можно оценить по экспрессии белков, формирующих эти контакты. Основным белком щелевых контактов является коннексин 43 (Cx43), который локализуется на поверхности клеток в виде так называемых коннексиновых бляшек. В жировых полосах на клетку приходится в среднем в 3 раза меньше бляшек Cx43, чем в непораженных участках интимы.

Важно, что в участках атеросклеротических поражений клетки с липидными включениями имеют меньше бляшек Cx43, чем клетки без липидных включений (Рисунок 35).

В то же время в непораженных участках интимы выявляется приблизительно равное количество бляшек Cx43 в пересчете на одну клетку, независимо от удаленности клеток от просвета сосуда (Рисунок 36). В атеросклеротических поражениях



количество бляшек Sx43 на клетку уменьшается по мере приближения к просвету сосуда, но на границе протеогликанового и мышечно-эластического слоев оно такое же, как в непораженных участках интимы (Рисунок 36). Эти данные хорошо согласуются с описанными выше наблюдениями, указывающими на то, что в глубоких участках атеросклеротических поражений целостная клеточная сеть интактна, однако нарушается в поверхностных участках.

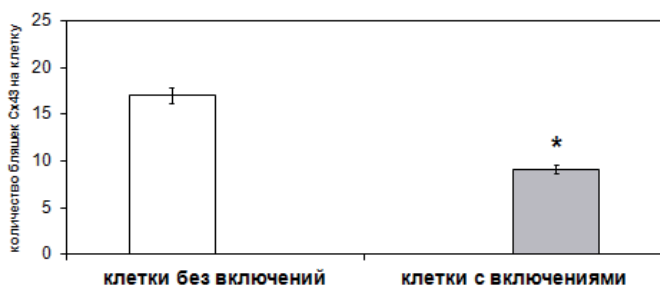


Рисунок 35. Количество бляшек коннексина 43 (Cx43) на клетках с липидными включениями и без липидных включений в участках жировых полос в интиме аорты человека

Sx43 выявляли иммуноцитохимически на срезах. Затем срезы окрашивали филипином - флуоресцентным красителем, выявляющим эфиры холестерина, что позволило выявить клетки, имеющие внутриклеточные липидные включения. На клетках, свободных от включений и клетках с включениями определяли количество бляшек Sx43.

\* - достоверное отличие от клеток без липидных включений,  $p < 0,05$

Для изучения возможных причин снижения межклеточной коммуникации в участках атеросклеротических поражений использовалась первичная культура клеток аорты. В культуре клеток, помимо выявления Sx43, для оценки степени межкле-

точной коммуникации можно использовать другой подход: метод переноса флуоресцентного красителя из одной инъекцированной клетки в соседние. Флуоресцентный краситель специфично распространяется только через щелевые контакты, и эффективность коммуникации оценивается по количеству флуоресцентно связанных друг с другом клеток.

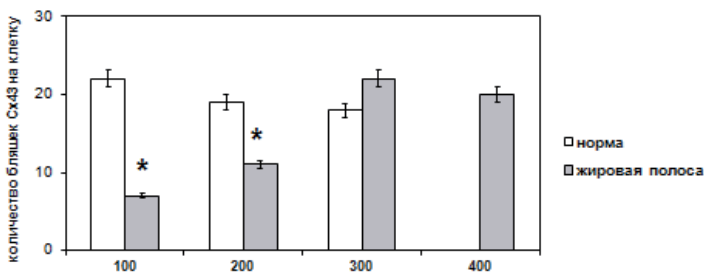


Рисунок 36. Количество бляшек коннексина 43 (Cx43) на клетках непораженной и атеросклеротически измененной интимы аорты человека

Cx43 выявляли иммуноцитохимически на срезах непораженных и атеросклеротически измененных участков интимы аорты человека и определяли количество бляшек Cx43, приходящихся на одну клетку. Количество бляшек Cx43 было определено на клетках, находящихся на различном удалении от просвета сосуда. На оси абсцисс указано расстояние от просвета сосуда в мкм.

\* - достоверное отличие от непораженной интимы,  $p < 0,05$ .

Степень контактной коммуникации в культурах с различной плотностью была оценена с помощью обоих методов – оценки числа коннексиновых бляшек и переноса флуоресцентного красителя из инъекцированной клетки. Оказалось, что результаты, полученные двумя методами, тесно коррелируют между собой. При сравнении межклеточной коммуникации в

культурах из нормальных и атеросклеротических участков интимы аорты человека было обнаружено, что степень контактной коммуникации в культурах, полученных из непораженной интимы в 1,5 раза выше, чем в культурах из атеросклеротических участков (Andreeva ER et al., 1995).

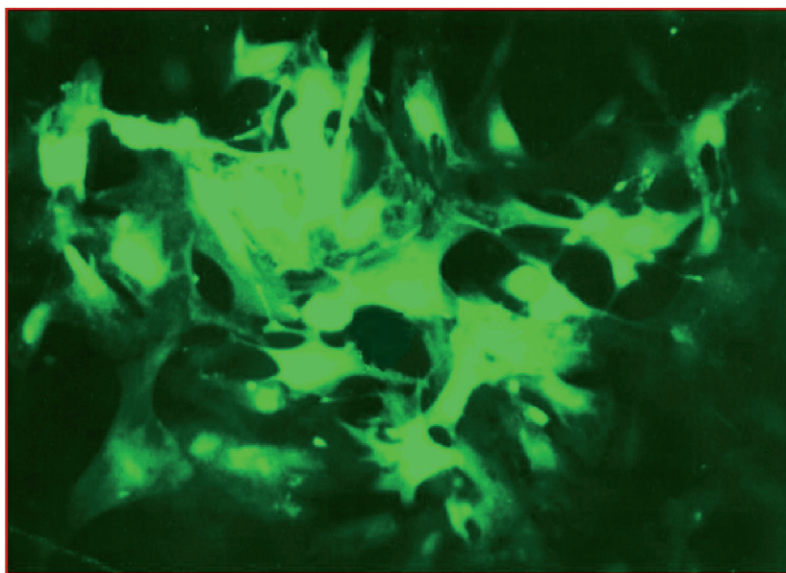


Рисунок 37. Распределение флуоресценции в первичной культуре субэндотелиальных клеток интимы аорты человека после инъекции отдельной клетки кальцеином

Характерной особенностью клеточных культур, полученных из атеросклеротических поражений, является наличие клеток, насыщенных липидами, часто имеющих пенистую структуру. Для проверки предположения, что существует связь между насыщенностью клеток липидами и степенью их контактной коммуникации, флуоресцентный краситель инъецировали в

клетки, внешне свободные от включений и в клетки, заполненные включениями (Рисунок 37). При инъектировании флуоресцентного красителя в клетки без включений, степень их контактной коммуникации с соседями была примерно такой же, как у клеток, культивируемых из непораженных участков (Andreeva ER et al., 1995). Степень контактной коммуникации пенистых клеток с соседями была в два раза ниже, чем у клеток без включений (Рисунок 38). Количество Sx43 бляшек на клетках с липидными включениями также оказалось ниже, чем на клетках без липидных включений (Рисунок 38). Можно предположить, что накопление внутриклеточных липидов - возможная причина снижения степени межклеточной коммуникации в клеточной системе интимы.



На основании приведенных данных, можно сделать следующее заключение: принципиальным клеточным типом протеогликанового слоя являются звездчатые клетки. Звездчатые клетки субэндотелиальной интимы отличаются от типичных гладкомышечных клеток меди по ряду признаков. В отличие от гладкомышечных клеток, имеющих вытянутую форму, звездчатые клетки имеют несколько длинных отростков, что позволяет им формировать сеть. В них мало или нет совсем сократительных органелл, но хорошо развит шероховатый эндоплазматический ретикулум. Звездчатые клетки экспрессируют ряд антигенов, которых нет в типичных гладкомышечных клетках, и которые могут определять функциональные особенности звездчатых клеток: антигены перидцитов 3G5 и 2A7, антиген макрофагов CD68, сквенджер-рецептор. Их число увеличивается в атеро-

склеротических поражениях и тесно коррелирует с основными проявлениями атеросклероза.

В непораженных участках интимы клетки протеогликанового слоя, контактируя друг с другом с помощью отростков, образуют трехмерную сеть. В атеросклеротических поражениях степень межклеточной коммуникации снижается и происходит физическое нарушение контактов между клетками, по-видимому, как результат накопления липидов в клетках.

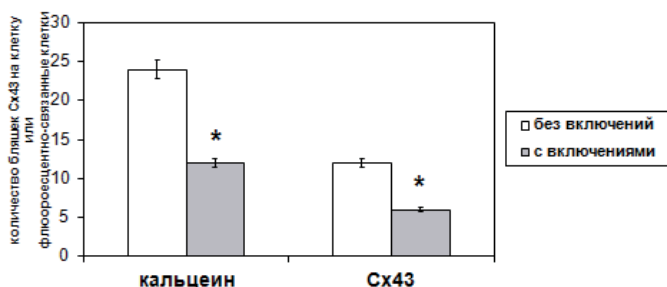


Рисунок 38. Межклеточная коммуникация в клетках без липидных включений и в клетках с липидными включениями

Межклеточную коммуникацию в первичной культуре клеток интимы аорты человека оценивали с помощью метода микроионофореза флуоресцентного красителя кальцеина (левая диаграмма), как описано ранее (Andreeva ER et al., 1995), и по количеству бляшек Sx43 - основного белка щелевых контактов (правая диаграмма).

Флуоресцентный краситель инъецировали в клетки без липидных включений и в клетки, содержащие липидные включения, и определяли количество клеток, флуоресцентно связанных с одной инъецированной клеткой.

Sx43 выявляли иммуноцитохимически на клетках, содержащих липидные включения и клетках без включений. Липидные включения в клетках выявляли с помощью филипина.

\* - достоверное отличие от клеток без липидных включений,  $p < 0,05$ .

## 4. Проявления атерогенеза на клеточном уровне

Основные проявления атеросклероза связаны с изменениями на уровне клеток, а именно: накопление липидов приводит к формированию пенистых клеток; локальное увеличение клеточности - это результат пролиферации или миграции клеток; накопление соединительнотканного матрикса - это результат синтетической активности клеток.

### 4.1. Липоидоз

Во внешне неизмененных участках интимы липиды накапливаются, в основном, внеклеточно. Характерной чертой даже самых начальных стадий атеросклеротического поражения является появление в них клеток с липидными включениями (Schönfelder M, 1969; Аничков НН, 1947; Хавкин ТН, 1950). Больше всего клеток с липидными включениями наблюдается в жировых полосах (до 25%) и располагаются они в поверхностной части протеогликанового слоя, составляющей около 2/3 общей толщины этого слоя (Andreeva ER et al., 1991). Напротив, в атеросклеротических бляшках наибольшая часть клеток с липидными включениями расположена глубже и обнаруживается в трети протеогликанового слоя, прилежащей к внутренней пограничной пластинке.

В мышечно-эластическом слое доля клеток, нагруженных липидами, выше всего в атеросклеротических бляшках, но даже в бляшках не превышает 5%. Клетки с липидными включениями обнаруживаются среди клеток, принадлежащих ко всем морфологическим типам, описанным в интиме аорты, однако, среди клеток звездчатой формы доля клеток с липидными включени-

ями составляет до 30%, что существенно выше, чем среди клеток других морфологических форм (Рисунок 39).

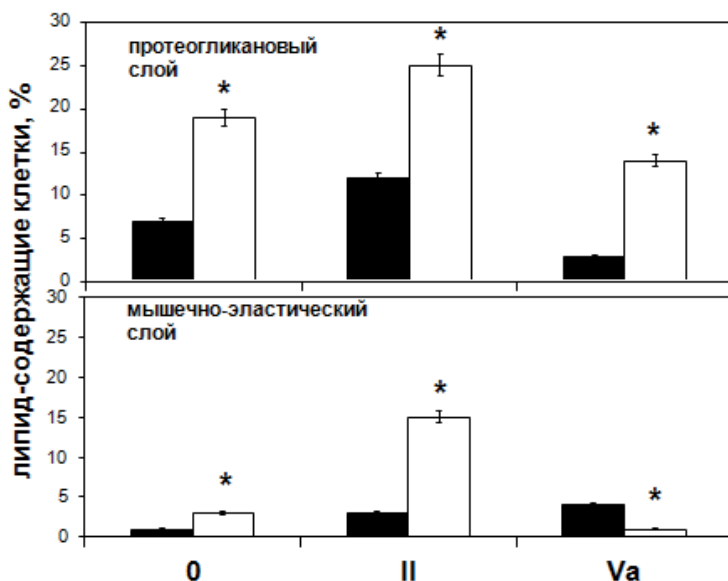


Рисунок 39. Доля клеток с липидными включениями среди клеток различной формы в интиме аорты человека

В суспензии клеток после спиртово-щелочной диссоциации фиксированной ткани интимы определяли долю клеток с липидными включениями среди клеток звездчатой и вытянутой формы

ПГ - протеогликановый слой интимы, МЭ - мышечно-эластический слой интимы.

Вытянутые клетки - незаштрихованные столбики, звездчатые клетки - заштрихованные столбики.

\* - достоверное отличие от доли липид-нагруженных вытянутых клеток.

Одной из причин внутриклеточного накопления липидов может быть нарушение их клеточного метаболизма. В клетках, культивируемых из атеросклеротических поражений, скорость синтеза основных классов липидов выше, чем в клетках, культивируемых из непораженной интимы аорты человека (Orekhov AN et al., 1985b; Тертов ВВ и др., 1982). Скорость синтеза липидов прямо и очень тесно коррелирует с содержанием липидов в клетках: чем выше внутриклеточное содержание избыточного жира, тем интенсивнее идет метаболизм липидов в атеросклеротических клетках (Orekhov AN et al., 1985b; Тертов ВВ и др., 1982). Однако эти наблюдения не дают ответ на вопрос: что вызывает изменение метаболизма липидов в артериальной стенке, ведущее в конечном итоге к накоплению избыточного жира в клетках.

В качестве наиболее вероятного источника липидов, перенасыщающих клетки атеросклеротического поражения, рассматриваются липопротеиды низкой плотности (ЛНП) - основной переносчик липидов в крови. Для доказательства прямого участия ЛНП в клеточном липоидозе при атеросклерозе были предприняты многочисленные попытки вызвать накопление липидов в культивируемых клетках путем добавления в культуру ЛНП. Эти попытки в основном оказались безуспешными - ЛНП не вызывают существенного накопления липидов, даже когда их добавляют в культуру в высоких концентрациях (Orekhov AN et al., 1987b; 1989a; Котелянский ВЭ и др., 1987). Причина тому - обратная регуляция метаболизма холестерина в клетке, благодаря которой при накоплении внутриклеточного холестерина уменьшается число специфических рецепторов к ЛНП на поверхности клетки, что препятствует дальнейшему поступлению в нее ЛНП рецепторным путем (Goldstein JL et al., 1985).



Накопление внутриклеточных липидов можно вызвать нерастворимыми комплексами, содержащими ЛНП (Basu SK et al., 1979; Falcone DJ et al., 1984; Orekhov AN et al., 1987b; 1989a; Salisbury BG et al., 1985; Vijayagopal P et al., 1985; Котелянский ВЭ и др., 1987). К таким комплексам относятся ассоциаты ЛНП с гликозаминогликанами, протеогликанами, фибронектином, коллагеном, эластином и другими компонентами, составляющими основу соединительнотканного матрикса артериальной стенки. Такой путь накопления липидов в клетках сосуда представляется весьма возможным, поскольку в сосудистой стенке для того есть все условия.

Кроме того, было установлено, что ассоциация ЛНП, объединяющая несколько частиц липопротеида - это необходимое и достаточное условие для накопления внутриклеточных липидов (Smirnov VN et al., 1990; Tertov VV et al., 1989a). По-видимому, ассоциаты ЛНП, как довольно крупные частицы, подобно нерастворимым ассоциатам, содержащим ЛНП, проникают в клетку путем неспецифического фагоцитоза, минуя рецепторный путь проникновения ЛНП в клетку. Обход регулируемого рецепторного пути может привести к нерегулируемому отложению липидов и перенасыщению клетки. Для нативных ЛНП ассоциация нехарактерна, в то же время химически модифицированные липопротеиды легко ассоциируют с образованием весьма крупных частиц.

Было показано, что все известные типы химической модификации ЛНП, включая имеющую место в крови множественную модификацию липопротеидов, стимулируют ассоциацию ЛНП (Tertov VV et al., 1992a,b). С другой стороны, было установлено, что без ассоциации даже модифицированные ЛНП не

вызывают накопления липидов в клетках (Tertov VV et al., 1992a,b).

В крови циркулирует подфракция атерогенных модифицированных ЛНП, способных вызывать накопление липидов при том, что нативные ЛНП, циркулирующие одновременно с модифицированными, не являются атерогенными и не вызывают накопление липидов в клетках (Тертов ВВ и др., 1990). Модификация ЛНП затрагивает белковую, липидную и углеводную структуру липопротеидной частицы, изменяет ее заряд, размер, плотность, иммуногенность и многие другие свойства ЛНП (Tertov VV et al., 1992c). Как указывалось выше, накопление липидов, вызываемое множественно модифицированными ЛНП, происходит только в том случае, если модифицированные ЛНП образуют ассоциаты. Показано, что неассоциированные модифицированные ЛНП, подобно нативным липопротеидам, не вызывают накопления внутриклеточных липидов (Tertov VV et al., 1992a,b). Была выявлена прямая и очень тесная корреляция между способностью вызывать накопление липидов и размерами ассоциата липопротеидных частиц (Tertov VV et al., 1992a,b).

Подфракция множественно модифицированных ЛНП имеется как в крови больных, так и здоровых лиц, однако в крови больных с документированным атеросклерозом любой локализации доля модифицированных ЛНП гораздо выше, чем в крови здоровых (Тертов ВВ и др., 1990). Имеется прямая связь между содержанием модифицированных ЛНП в крови и ее атерогенными свойствами, выражающимися в способности сыворотки крови вызывать накопление внутриклеточных липидов (Тертов ВВ и др., 1990).

## 4.2. Пролиферация

Подсчет числа интимальных клеток на срезах и определение количества клеток в суспензии после спиртово-щелочной диссоциации (Orekhov AN et al., 1984d; 1986a) выявляет в среднем двукратное локальное увеличение клеток в атеросклеротических поражениях (Orekhov AN et al., 1998; 2010), причем наибольшее число клеток выявляется в липофиброзных поражениях. В выраженных жировых поражениях (жировые полосы и липофиброзные бляшки), где имеет место наивысшее увеличение клеточности, увеличивается число как оседлых, так и гематогенных клеток. Основную часть клеток интимы (84-93%) составляют оседлые клетки, и именно изменение численности оседлых клеток определяет увеличение клеточности в атеросклеротических поражениях по сравнению с непораженной интимой (Orekhov AN et al., 1998; 2010). Следует заметить, что число клеток в фиброзной бляшке значительно ниже, чем в жировых атеросклеротических поражениях.

С помощью антител против циклина (PCNA) - одного из белков, экспрессируемых в ядре клетки во время S-фазы, в ткани можно выявить клетки, находящиеся в клеточном цикле, то есть пролиферирующие клетки (Рисунок 40).

Наибольшее количество пролиферирующих (содержащих циклин) клеток приходится на поражения с преобладанием липоидоза - жировые полосы и липофиброзные бляшки, где пролиферирующих клеток примерно в 10-20 раз больше, чем в непораженной интиме (Orekhov AN et al., 1998; 2010). Число пролиферирующих клеток в фиброзной бляшке ниже, чем в жировых поражениях, но достоверно превышает число этих клеток в непораженных участках (Рисунок 41).

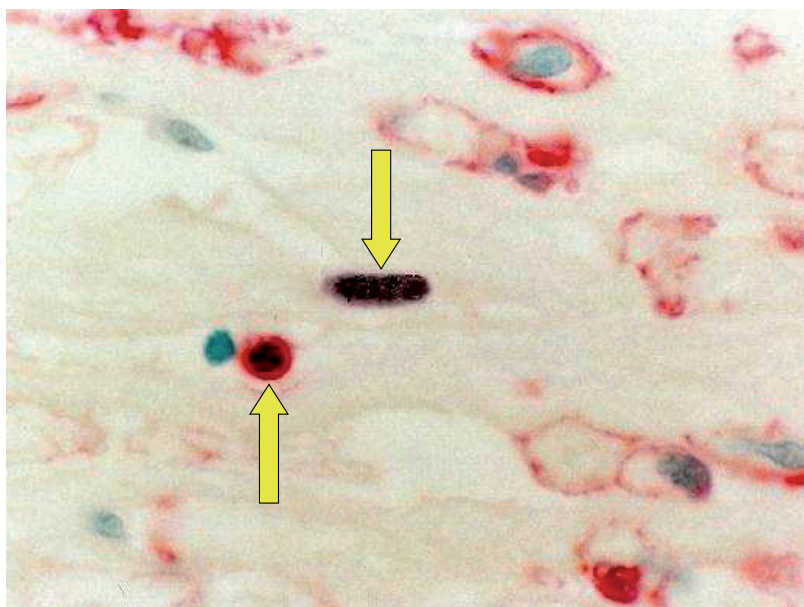


Рисунок 40. Иммуногистохимическое выявление PCNA в интима аорты человека

Стрелками указаны PCNA+ клетки.

Пролиферативный индекс (отношение числа пролиферирующих клеток к общему числу клеток) у оседлых клеток во всех атеросклеротических поражениях значимо выше, чем в непораженной интима (Orekhov AN et al., 1998; 2010). Наивысший пролиферативный индекс оседлых клеток выявлен в фиброзной бляшке, где он приблизительно в 8 раз выше, чем в непораженной интима (Рисунок 42). Пролиферативный индекс гематогенных клеток превосходит пролиферативный индекс оседлых кле-

ток, однако его значение в норме не отличается от значений в атеросклеротических поражениях и сходно с пролиферативным индексом лейкоцитов периферической крови.

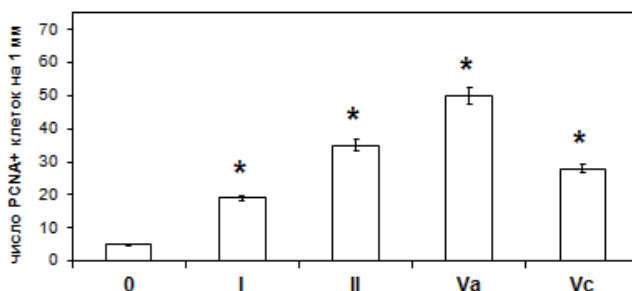


Рисунок 41. Количество клеток, экспрессирующих PCNA-антиген, в интиме аорты человека

На вертикальных срезах непораженных участков аорты и атеросклеротических поражений иммуноцитохимически выявляли пролиферирующие клетки, используя антитела против циклина - белка, экспрессированного в ядрах клеток, находящихся в S-фазе клеточного цикла. Затем определяли долю клеток, содержащих PCNA-антиген среди общего количества клеток в интиме.

0 - норма (4), I - начальные поражения (5), II - жировые полосы (4), Va - липофиброзные бляшки (5), Vc - фиброзные бляшки (6). В скобках указано количество проанализированных случаев.

\* - достоверное отличие от нормы,  $p < 0,05$ .

На основании этих данных можно предположить, что клеточность атеросклеротических поражений изменяется за счет пролиферации оседлых клеток и, возможно, миграции гематогенных клеток из кровотока. В жировых поражениях (жировые полосы и липофиброзные бляшки) происходит всплеск проли-

феративной активности оседлых клеток. В сосудистой стенке также имеет место пролиферация гематогенных клеток, но пролиферативный индекс гематогенных клеток не изменяется в атеросклеротических поражениях, по сравнению с непораженными участками. Проллиферативная активность гематогенных клеток является, по-видимому, фоновым процессом в атеросклеротических поражениях, отражающим изменение численности гематогенных клеток в результате их проникновения в суб-эндотелиальную интиму. В отличие от оседлых клеток, пролиферативная активность гематогенных клеточных элементов не стимулируется при атеросклерозе.

#### **4.3. Фиброз**

Накопление внеклеточного матрикса и образование соединительнотканной покрышки - самое важное из атеросклеротических проявлений с клинической точки зрения. Выше отмечалось, что содержание коллагена возрастает только в протеогликановом, но не мышечно-эластическом слое интимы. В непораженной интиме невозможно выявить клеток, синтезирующих проколлаген I типа - основной интерстициальный коллаген, накапливаемый в атеросклеротических бляшках. В атеросклеротических поражениях в протеогликановом слое интимы аорты такие клетки составляют от 6% (начальные поражения) до 18% (жировые полосы) всей клеточной популяции (Andreeva ER et al., 1997b). Эти результаты хорошо согласуются с данными иммуноцитохимического изучения локализации различных типов коллагена в атеросклеротических поражениях (Orekhov AN et al., 1987a). Показано, что именно в ближайшей к просвету части интимы происходит основное накопление коллагена.

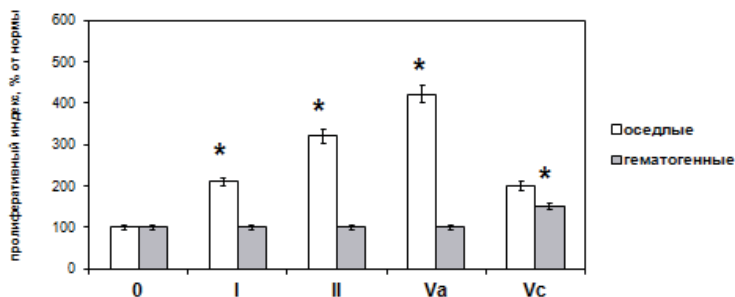


Рисунок 42. Пролиферативный индекс оседлых и гематогенных клеток в интиме аорты человека

На вертикальных срезах непораженных участков аорты и а атеросклеротических поражениях иммуноцитохимически выявляли пролиферирующие клетки, используя антитела против PCNA-антигена и типировали их с помощью двойного иммуноцитохимического окрашивания. Гематогенные клетки определяли с помощью коктейля антител (CD45+CD14). Оседлыми клетками считали все клетки, неокрашенные антителами гематогенного коктейля. Затем определяли пролиферативный индекс в каждой клеточной популяции.

0 - норма (4), I - начальные поражения (5), II - жировые полосы (4), Va - липофиброзные бляшки (5), Vc - фиброзные бляшки (6). В скобках указано количество проанализированных случаев.

Оседлые клетки - незаштрихованные столбики, гематогенные клетки - заштрихованные столбики.

\* - достоверное отличие от нормы,  $p < 0,05$

Формирование даже самых ранних атеросклеротических поражений, таких как начальные поражения, сопровождается появлением клеток, способных синтезировать основной интерстициальный коллаген соединительнотканной покрывки бляшки - коллаген I типа (Andreeva ER et al., 1997b). Формирование жи-

ровых полос, сопровождается значительным увеличением доли коллаген-синтезирующих клеток. Максимальное количество коллаген-синтезирующих клеток обнаруживается в липофиброзных бляшках, а в фиброзных бляшках их доля значительно ниже и сопоставима с долей в начальных поражениях. Таким образом, в ряду начальное поражение - жировая полоса - липофиброзная бляшка - фиброзная бляшка имеет место всплеск синтетической активности клеток в жировых поражениях - жировых полосах и липофиброзных бляшках (Andreeva ER et al., 1997b).

Гиперсекреция внеклеточного матрикса может являться как одной из причин, так и следствием нарушения целостности клеточной системы интимы в атеросклеротических поражениях. В начальных поражениях, где все клетки объединены в сеть, коллаген-синтезирующих клеток мало и все они интегрированы в сеть. В жировых полосах и в атеросклеротических бляшках клеточная сеть разрушается. Доля коллаген-синтезирующих клеток в таких областях выше, чем в начальных поражениях и большая часть их расположена именно в участках разрыва клеточной сети (Andreeva ER et al., 1997b). Это позволяет предположить, что синтетическая активность клеток значительно возрастает, когда они теряют контакты с соседями.

#### **4.4. Связь между липоидозом и другими атерогенными проявлениями**

Всплеск пролиферативной активности и синтеза коллагена в жировых поражениях наводит на мысль, что основные проявления атеросклероза: накопление липидов (липоидоз), пролиферация и секреция внеклеточного матрикса (фиброз) - взаи-



мосвязаны. Поскольку пролиферативная активность и фиброз оказались наивысшими в зонах липоидоза, представляется важным выяснить, какова связь между накоплением липидов в клетках (клеточным липоидозом) и их синтетической и пролиферативной активностью.

Сыворотка крови и ЛНП, выделенные из крови больных, способные вызывать накопление липидов в культивируемых клетках субэндотелиальной интимы аорты человека, обладают и другими атерогенными свойствами. Предварительная инкубация клеток с сывороткой или ЛНП, приводящая к внутриклеточному накоплению липидов, вызывает стимуляцию клеточной пролиферации, а также усиление синтеза коллагена, гликозаминогликанов и общего белка (Андреева ЕР и др., 1989; Orekhov A et al., 1989; 1990a; Tertov VV et al., 1988a; Орехов АН и Тертов ВВ, 1989). Таким образом, сыворотка крови и ЛНП больных с атеросклеротическими поражениями сосудов обладают широким спектром атерогенных свойств, вызывая все основные проявления атеросклероза на клеточном уровне - усиление пролиферации, липоидоз и фиброз. Для усиления пролиферации и стимуляции синтеза компонентов соединительнотканного матрикса не требуется непосредственный контакт клеток с модифицированными ЛНП. Если ЛНП, вызвавшие накопление липидов в клетках, убрать из культуры, повышенная пролиферативная активность и увеличенный синтез матрикса сохраняются в течение нескольких дней (Orekhov A et al., 1989; 1990). Этот факт позволяет предположить, что принципиальным моментом в реализации атерогенного потенциала на клеточном уровне является не столько взаимодействие ЛНП с клетками, сколько последствие этого взаимодействия, то есть накопление липидов, которое сопровождают другие атерогенные проявления, в

частности, усиление пролиферации клеток и стимуляция синтеза соединительнотканного матрикса.

Как указывалось выше, накопление липидов в клетках затрагивает целостность клеточной сети в интиме аорты человека. В жировых поражениях, где много клеток с липидными включениями и пенистых клеток, имеются разрывы клеточной сети, причем клетки, не имеющие контактов со своими соседями - это часто клетки, насыщенные липидными включениями (Rekhter MD et al., 1991).

Данные описанных выше экспериментов, выявивших снижение степени межклеточной контактной коммуникации в культуре под влиянием модифицированных ЛНП, вызывающих накопление липидов в клетках, можно было считать объяснением причины ослабления межклеточных контактов или даже полных их разрывов. Действительно, инкубация клеток субэндотелиальной интимы с модифицированными ЛНП приводит к накоплению внутриклеточных липидов, параллельно происходит уменьшение степени межклеточной контактной коммуникации (Andreeva ER et al., 1992).

Естественно предположить, что ослабление межклеточных связей - это результат накопления внутриклеточных липидов, однако такому выводу противоречат результаты экспериментов по стимуляции фагоцитоза в культуре клеток. Установлено, что инкубация клеток субэндотелиальной интимы с шариками латекса, имеющими размеры, сходные с размерами ассоциатов модифицированных липопротеидов, приводит к снижению степени межклеточной контактной коммуникации приблизительно в такой же степени, что и инкубация с модифицированными ЛНП (Рисунок 43). Следует заметить, что инкубация с шариками латекса приводит к их захвату клетками путем фагоци-

тоза, но при этом не наблюдается накопления внутриклеточных липидов (Рисунок 43). Таким образом, ослабление межклеточных связей, наблюдаемое при взаимодействии клеток с модифицированными ЛНП, не является следствием накопления липидов в клетках, но происходит, по-видимому, в результате стимуляции фагоцитарной активности, вызванной ассоциатами модифицированных липопротеидов.

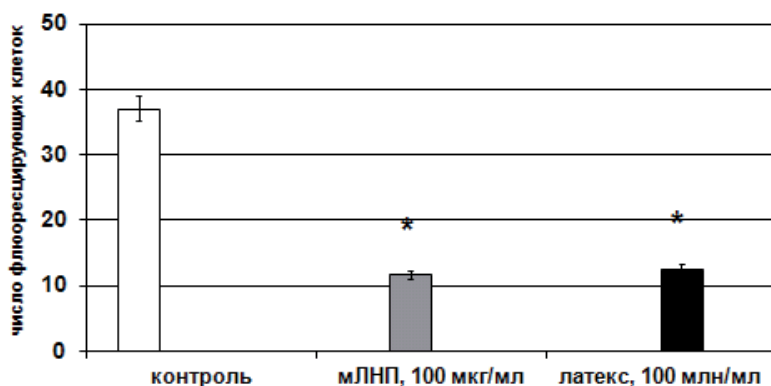


Рисунок 43. Влияние модифицированных липопротеидов и латекса на межклеточную коммуникацию в первичной культуре субэндотелиальных клеток аорты человека

Межклеточную коммуникацию в первичной культуре клеток интимы аорты человека оценивали с помощью метода микроионофореза флуоресцентного красителя кальцеина (Andreeva ER et al., 1995).

Флуоресцентный краситель инъецировали в клетки, после чего определяли количество клеток, флуоресцентно связанных с одной инъецированной клеткой.

\* - достоверное отличие от клеток без липидных включений,  $p < 0,05$ .

Важно добавить, что стимуляция фагоцитарной активности, вызванная шариками латекса, не приводит к стимуляции пролиферации, а также синтеза белка. Следовательно, такие

атерогенные проявления, как усиление пролиферативной активности и гиперсекреция внеклеточного матрикса - это результат накопления липидов в клетках, вызванного модифицированными ЛНП, но не следствие фагоцитоза ассоциатов липопротеидных частиц.

На основании приведенных данных можно представить следующую последовательность атерогенных проявлений на клеточном уровне. Модифицированные ЛНП, проникая в субэндотелиальное пространство интимы, образуют ассоциаты или ассоциируются с частицами внеклеточного матрикса. Эти ассоциаты или комплексы, содержащие ЛНП, проникают в клетку путем фагоцитоза (нерегулируемым путем), что приводит к накоплению внутриклеточных липидов, а это вызывает стимуляцию пролиферации, а также синтеза и секреции внеклеточного матрикса. Параллельно, стимуляция фагоцитарной активности вызывает ослабление межклеточных связей.

#### **4.5. Атерогенные проявления и циклические нуклеотиды**

Одновременные и однонаправленные атерогенные изменения, ведущие к накоплению внутриклеточных липидов, стимуляции пролиферации и гиперсекреции внеклеточного матрикса, наводят на мысль о существовании связи между всеми этими процессами. Такая связь вполне возможна на уровне клеточной регуляции, поскольку хорошо известно, что перечисленные процессы регулируются системой циклических нуклеотидов - универсальных внутриклеточных регуляторов. Известно, что циклический 3',5'-аденозинмонофосфат (цАМФ) подавляет пролиферацию клеток, синтез липидов и взаимодействие ЛНП с клеточными рецепторами, но стимулирует гидролиз липидов, а

также ингибирует синтез и секрецию белка, в частности, коллагена и гликозаминогликанов, с другой стороны, циклический 3',5'-гуанозинмонофосфат (цГМФ) оказывает обратное действие на эти процессы (Bentley JK & Beavo JA, 1992; Tertov VV et al., 1986b).

Установлено, что содержание цАМФ в атеросклеротических клетках (клетках, популирующих атеросклеротические поражения) в 2-8 раз ниже, чем в клетках непораженной интимы, в то время как содержание цГМФ в атеросклеротических клетках выше более чем в 2 раза, по сравнению с нормальными клетками (клетками непораженной интимы) (Tertov VV et al., 1986a; 1987a; Тертов ВВ и др., 1989). Эти изменения в содержании циклических нуклеотидов связаны с изменением активности ферментов их синтеза и деградации - циклазы и фосфодиэстеразы, соответственно. Так, активность аденилатциклазы - фермента, синтезирующего цАМФ, в жировой полосе ниже, чем в непораженной интимае и еще ниже в атеросклеротической бляшке, при этом фосфодиэстераза, гидролизующая цАМФ, не изменяется, что и объясняет падение цАМФ в клетках атеросклеротических поражений. С другой стороны, активность гуанилатциклазы, синтезирующей цГМФ, в жировой полосе выше, чем в норме при неизменной активности фосфодиэстеразы, деградирующей цГМФ (Tertov VV et al., 1987b). В атеросклеротической бляшке ситуация иная - активность гуанилатциклазы такая же, что и в непораженной интимае, а активность фосфодиэстеразы цГМФ значительно ниже (Tertov VV et al., 1987b). Эти изменения полностью объясняют увеличение содержания цГМФ в атеросклеротических поражениях.

На основании многочисленных данных можно утверждать, что обнаруженное снижение содержания цАМФ и повышение

уровня цГМФ в клетке должно приводить к активизации основных проявлений атеросклероза на клеточном уровне: пролиферации клеток, накопления липидов, синтеза внеклеточного матрикса (Tertov VV et al., 1987a).

Резонно задать вопрос: что же вызывает изменение циклических нуклеотидов в клетке в зонах атеросклеротических поражений? Показано, что при инкубации интимальных клеток аорты человека с модифицированными ЛНП параллельно с накоплением холестерина в клетках происходит существенное снижение уровня цАМФ и резкое повышение уровня цГМФ, то есть именно те изменения циклических нуклеотидов, которые были обнаружены в атеросклеротических клетках в сосудистой стенке (Таблица 7). Можно предположить, что накопление внутриклеточных липидов и является причиной изменений в системе циклических нуклеотидов.

Учитывая полученные данные по изменению циклических нуклеотидов, можно следующим образом уточнить схему развития атеросклеротических проявлений на уровне субэндотелиальных клеток интимы. В интима модифицированные ЛНП образуют ассоциаты или ЛНП-содержащие комплексы, которые активизируют фагоцитоз, что приводит к ослаблению межклеточных связей. Поскольку модифицированные ЛНП проникают в клетку, минуя регулируемый рецепторный путь захвата липопротеидов, в интимальных клетках накапливаются липиды, что вызывает падение уровня цАМФ и увеличение уровня цГМФ, а это приводит к дальнейшему накоплению внутриклеточных липидов, стимуляции пролиферации, а также синтеза и секреции внеклеточного матрикса. По-видимому, такое развитие событий характерно для начальных этапов атерогенеза. Если допустить, что дальнейшее развитие атеросклеротического поражения

идет в том же направлении, то можно было бы ожидать постоянного повышения содержания липидов в клетках, непрерывной стимуляции их пролиферативной активности и синтеза внеклеточного матрикса. Однако изложенные выше наши данные о снижении интенсивности атерогенных проявлений в выраженных атеросклеротических поражениях по сравнению с более ранними не позволяют принять предлагаемую схему для объяснения всего процесса формирования атеросклеротического поражения и заставляют искать причины колоколообразного изменения клеточного липоидоза, а также пролиферативной и синтетической активности, наблюдаемого при атеросклерозе.

#### **4.6. Степень межклеточной коммуникации и атерогенные процессы**

Атерогенез развивается поэтапно от мало выраженных изменений в интимае, которые можно выявить лишь под микроскопом или с помощью гистологических красителей (начальные поражения), к ярко выраженным поражениям, которые можно наблюдать невооруженным глазом и которые являются основой клинических проявлений заболеваний. Пользуясь современной классификацией (Stary HC et al., 1994), можно представить следующую последовательность этапов развития атеросклеротического поражения: непораженная интима - начальные поражения - жировая полоса - липофиброзная бляшка (атерома) - фиброзная бляшка. Нет данных, которые бы противоречили такому предположению. Не существуют также другие представления о развитии атеросклероза, которые принципиально расходились бы с этими.

На Рисунке 44 представлен график, по оси абсцисс которого расположены последовательные этапы атерогенеза от непораженной интимы до фиброзной бляшки. На график нанесены изменения функций клеток интимы, описанные выше, такие как: накопление внутриклеточных липидов (липоидоз), пролиферативная активность, синтез коллагена, межклеточная коммуникация. Можно видеть, что изменения липоидоза (числа клеток с липидными включениями), пролиферативной активности и синтеза коллагена имеют более или менее выраженный колоколообразный характер. Пролиферативная активность и синтез коллагена от низкого или даже нулевого уровня в непораженной интимае значительно возрастают, достигая максимума в жировых поражениях (жировая полоса и атерома), но существенно снижаются в фиброзной бляшке. Что касается числа клеток с липидными включениями, то оно медленно возрастает от непораженной интимы к липофиброзной бляшке, в затем резко падает в фиброзной бляшке, становясь даже ниже, чем во внешне непораженных участках интимы.

При этом обращает на себя внимание то обстоятельство, что степень контактной коммуникации между клетками монотонно падает практически до нуля от непораженной интимы, где почти все клетки связаны в единую клеточную сеть, до фиброзной бляшки, где клеточная сеть распадается, и клетки не связаны друг с другом. Можно предположить, что функции клеток, играющие ключевую роль в атерогенезе, зависят от степени контактной коммуникации между клетками и эта зависимость имеет колоколообразный характер.

Для проверки этого предположения была использована культура клеток непораженной интимы с различной степенью контактной коммуникации. Для получения таких культур клетки,



выделенные из интимы аорты человека, сажались с различной плотностью (Рисунок 45). В результате были получены очень редкие культуры, в которых почти все клетки располагались поодиночке. В таких культурах степень контактной коммуникации была близка к нулю. В плотных культурах основная часть клеток контактировала со своими соседями, и степень контактной коммуникации была наивысшей. Были получены также культуры промежуточной плотности с различной степенью контактной коммуникации (Рисунок 45).

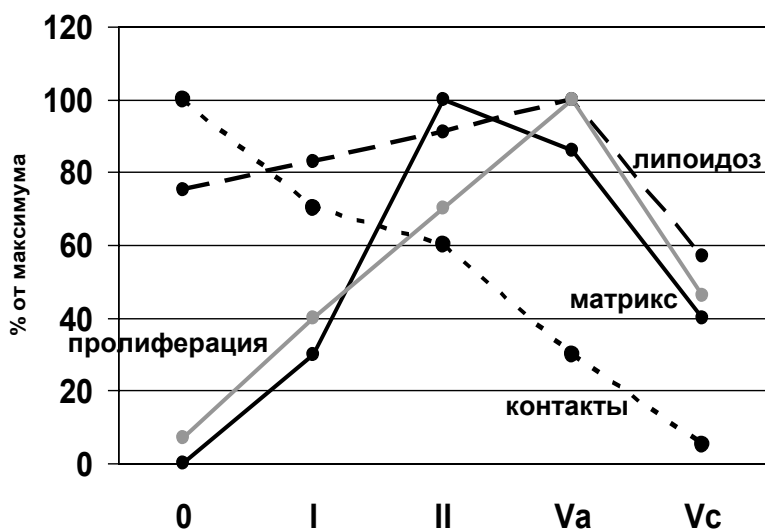


Рисунок 44. Атерогенные проявления в интиме аорты человека  
Изменения функций клеток при атеросклерозе, обнаруженные при изучении срезов аорты человека и интимальных клеток в культуре, выражены в процентах от максимальной величины, выявленной для данной функции  
0 - норма, I - начальные поражения, II - жировые полосы, Va - липофиброзные бляшки, Vc - фиброзные бляшки.

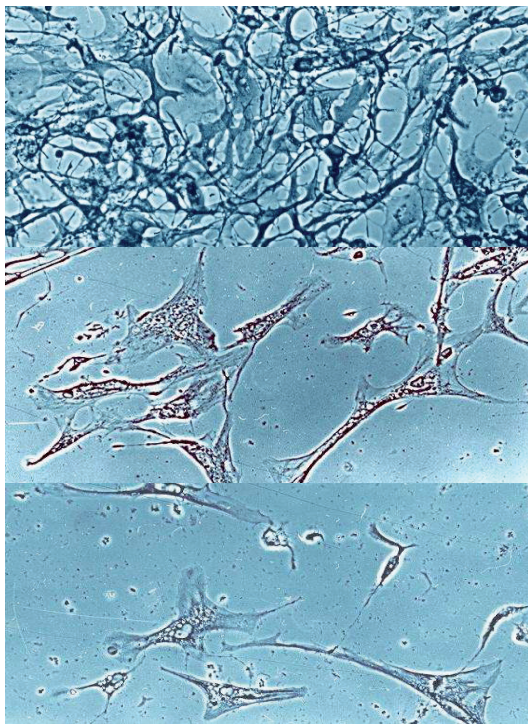


Рисунок 45. Культура клеток субэндотелиальной интимы аорты человека с различной плотностью

Высокая плотность – сверху, средняя плотность – посередине, низкая плотность – внизу.

Такие культуры, посаженные с разной плотностью, имитируют ситуацию в сосуде, где в норме имеется клеточная сеть, образованная отростками клеток, а в атеросклеротическом поражении клеточная сеть разрывается и, наконец, в бляшке происходит полная дезинтеграция клеточной сети и клетки располагаются отдельно друг от друга (Рисунок 46).

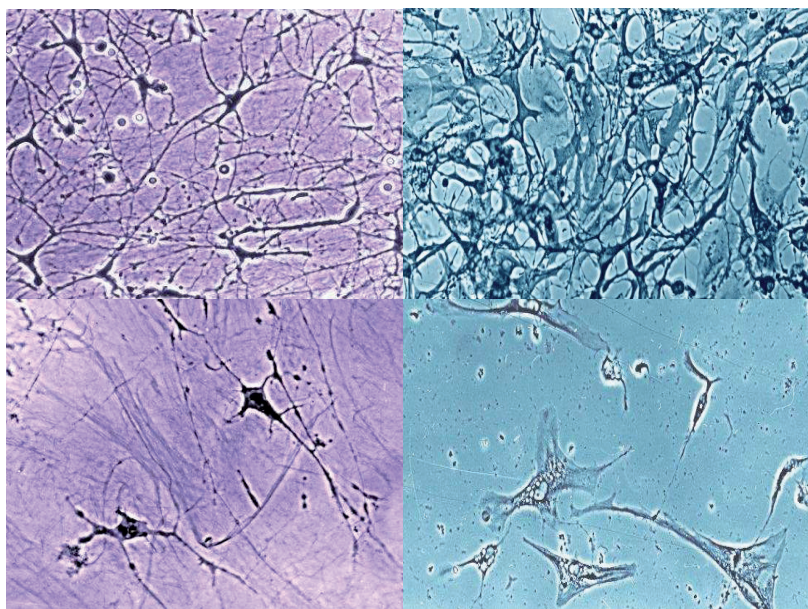


Рисунок 46. Различная плотность клеток в сосуде (слева) и в культуре (справа)

В очень редких культурах, где клетки практически не имели контактов друг с другом, пролиферативная активность и секреция белка были минимальными (Рисунок 47). С увеличением плотности и, соответственно, степени контактной коммуникации обе функции клеток резко возрастали (Рисунок 47). Максимум пролиферативной активности и секреции белка приходился на культуры, имеющие такую плотность, когда клетки начинают образовывать контакты между собой. В более плотных культурах пролиферативная активность и секреция белка снижались, а в наиболее плотных культурах уровень этих активностей был сходен с уровнем в очень редких культурах, в которых преобладали одиночные клетки (Рисунок 47).

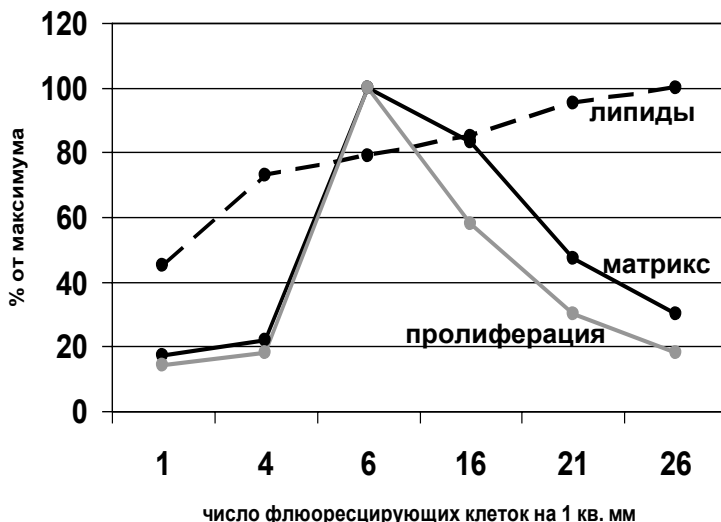


Рисунок 47. Зависимость атерогенных проявлений от степени контактной коммуникации в культуре клеток

Клетки, выделенные из непораженной интимы аорты человека, сажались в первичную культуру с разной плотностью. Полученные культуры различались по степени контактной коммуникации между клетками, определенной по перетеканию флуоресцентного красителя. На 6-й день культивирования определяли способность клеток накапливать холестерин под воздействием модифицированных ЛНП, их пролиферативную активность и синтез белка.

Накопление холестерина в культивируемых клетках не зависело существенно от степени контактной коммуникации в относительно плотных культурах, но резко падало в культурах, где практически полностью отсутствовали контакты между клетками (Рисунок 47). Таким образом, основные функции интимальных клеток, имеющее отношение к атеросклерозу, зависят от степени контактной коммуникации между ними. Эта зависи-

мость не прямая и для пролиферативной активности и синтеза белка имеет колоколообразный характер. Накопление внутриклеточных липидов не зависит от степени контактной коммуникации, но падает при полном разрыве межклеточных связей.

Колоколообразный характер зависимости клеточных функций от степени контактной коммуникации наводит на мысль о том, что изменения клеточных функций при атеросклерозе связаны с ослаблением и, в конечном счете, с разрывом межклеточных связей, поскольку с развитием атеросклероза в интиме по мере разрушения клеточной сети и обособления клеток клеточные функции также претерпевают колоколообразные изменения.

На Рисунке 48 представлены изменения клеточных функций в интиме при атеросклерозе (правый график) и в культуре интимальных клеток при изменении степени контактной коммуникации между клетками (левый график). Для удобства сравнения на левом графике по оси абсцисс отложены обратные значения степени межклеточной коммуникации с тем, чтобы степень коммуникации уменьшалась слева направо, то есть как на правом графике от непораженной интимы (максимальная степень контактной коммуникации, все клетки связаны в единую сеть) к фиброзной бляшке (минимальная межклеточная связь, отсутствие клеточной сети).

Характер изменения пролиферативной активности, синтеза внеклеточного матрикса и накопления внутриклеточных липидов на левом и на правом графике настолько сходен, что вывод о решающей роли нарушения межклеточных связей в изменении клеточных функций по мере развития атеросклероза представляется очевидным. То, что клеточный липоидоз не зависит существенно от степени межклеточных контактов до тех

пор, пока эти контакты не исчезают вовсе, подтверждает отсутствие прямой связи между накоплением липидов и ослаблением межклеточных контактов. С другой стороны это позволяет предположить, что стимуляция фагоцитоза, сопровождающая накопление модифицированных ЛНП в интимальных клетках является причиной ослабления и разрыва межклеточных связей, а не наоборот.

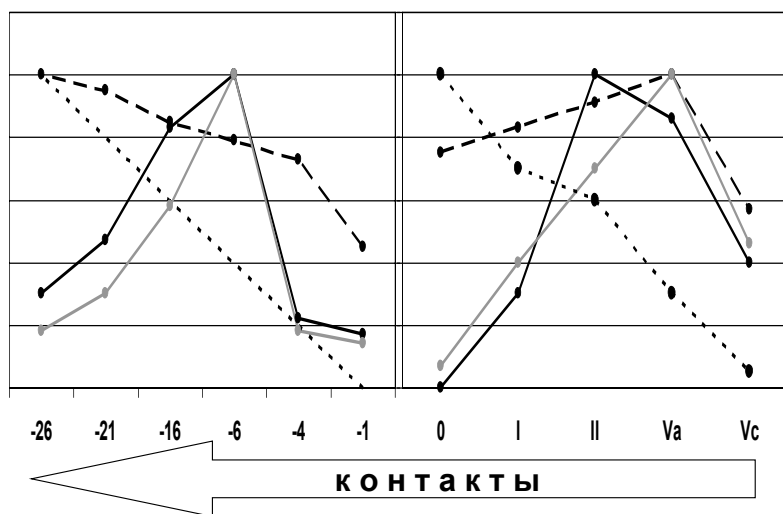


Рисунок 48. Межклеточная коммуникация и атерогенные проявления в интиме аорты человека

Тип линий соответствует обозначениям на Рисунке 44 и 47.

## 5. Клеточные механизмы атерогенеза

Суммируя изложенные данные, можно попытаться объяснить основные изменения, обнаруженные в интиме аорты человека при атеросклерозе. Схема последовательности событий при атеросклерозе представляется следующей (Рисунок 49).

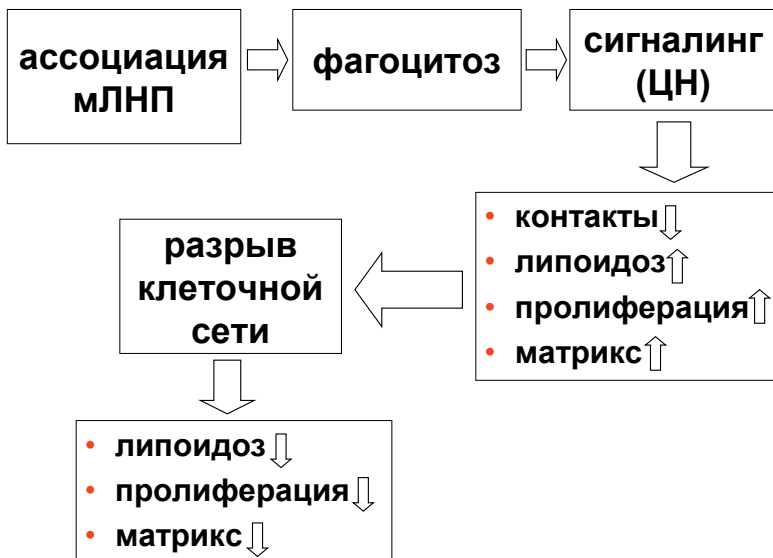


Рисунок 49. Последовательность событий при атеросклерозе

Модифицированные ЛНП или(и) их ассоциаты проникают из крови в субэндотелиальную интиму. В интиме за счет ассоциатов ЛНП или комплексов, содержащих ЛНП, активизируется фагоцитоз, в результате чего ослабляются межклеточные связи, а ЛНП проникают в клетку, минуя регулируемый рецепторный путь захвата липопротеидов, что вызывает накопление липидов в клетках. Это приводит к падению уровня цАМФ и увеличению уровня цГМФ, что в свою очередь ведет к дальнейше-

му накоплению внутриклеточных липидов, стимуляции пролиферации, а также синтеза и секреции внеклеточного матрикса. Такая ситуация характерна для ранних атеросклеротических изменений в интиме. Дальнейшее накопление липидов, проникающих в клетки путем фагоцитоза, усугубляет их обособление до полного разрыва связей между ними и разрушения единой клеточной сети, характерной для непораженной интимы. Образуются пенистые клетки, цитоплазма которых заполнена липидными включениями. По мере накопления липидов в интимальных клетках и разрушения клеточных связей происходит дальнейшая стимуляция пролиферативной активности, а также синтеза и секреции внеклеточного матрикса. Это свойственно выраженным жировым поражениям интимы (жировая полоса, липофиброзная бляшка). Секретируемый коллаген и другие компоненты матрикса, окружая клетку их синтезировавшую, еще в большей степени обособляют ее от соседей, что, в конечном счете, приводит к полной изоляции отдельных клеток и исчезновению клеточной сети. При этом активность основных атерогенных процессов резко падает: снижается накопление липидов в клетках, их пролиферативная активность, синтез внеклеточного матрикса. Такое наблюдается в фиброзной бляшке.

Изложенная схема изображена на Рисунке 50. Первичным и ключевым моментом атерогенеза надо считать накопление липидов в клетках, вызванное модифицированными ЛНП. Именно накопление липидов стимулирует основные атерогенные проявления на клеточном уровне, одновременно ассоциаты модифицированных ЛНП нарушают целостность клеточной сети в интиме вследствие стимуляции фагоцитоза. Развитие процессов в этом направлении приводит к возникновению выраженных жировых атеросклеротических поражений типа жировой полосы



или липофиброзной бляшки, где наблюдается наивысшая интенсивность атерогенных проявлений на клеточном уровне.

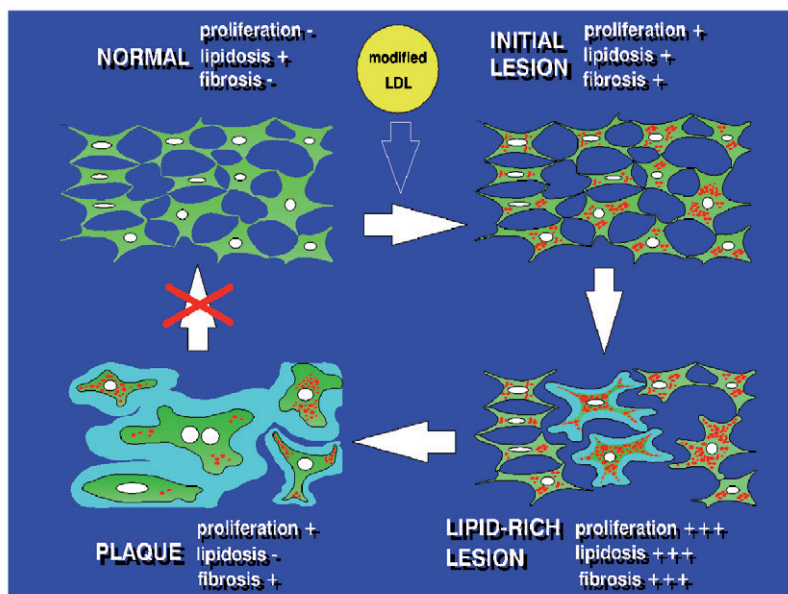


Рисунок 50. Схема клеточных механизмов атерогенеза

По интенсивности клеточных функций, активируемых при атеросклерозе, непораженная интима и фиброзная бляшка (конечный этап атерогенеза) весьма сходны. Однако состояние клеточной системы в этих двух зонах интимы различается принципиально. Возвращаясь в конечном итоге к функциональной активности, напоминающей функциональную активность клеток непораженных участков, клеточная система в фиброзной бляшке изменена настолько, что можно говорить о ее необратимом преобразовании. В связи с этим представляется практически невероятным обратный путь, либо какой-то другой пере-

ход от фиброзной бляшки к непораженной интиме. Маловероятно, что с клинической точки зрения фиброзная бляшка представляет опасность, поскольку это стабильное низкоактивное образование.

Совсем другая ситуация наблюдается в жировых поражениях, в частности в липофиброзной бляшке (атероме). Это нестабильное поражение, в котором все клеточные процессы активизированы максимально или почти максимально. Для клиники именно эти поражения, которые называют нестабильными бляшками, представляют наибольшую опасность, поскольку они быстро и активно развиваются. Их быстрый рост приводит к так называемому разрыву бляшки, который сопровождается критическими локальными изменениями гемостаза, ведущим к тромбозам, которая в свою очередь и является причиной сосудистых катастроф, таких как инфаркт миокарда, инсульт, внезапная смерть и пр. Однако, такие липофиброзные бляшки и тем более ранние поражения, по-видимому, могут подвергаться регрессу, поскольку клеточная система в них хоть и серьезно нарушена, но эти нарушения, вероятно, не носят необратимого характера.

Исходя из того, что ключевым моментом в возникновении и развитии атеросклеротического поражения является накопление внутриклеточных липидов, можно предположить, что наиболее эффективные подходы к предотвращению и обратному развитию атеросклеротических поражений, предшествующих стадии фиброзной бляшки, могут быть подходы, основанные на предотвращении накопления липидов в артериальных клетках и подходы, цель которых - выведение избыточного жира из клеток.

## **6. Роль модифицированных липопротеидов в клеточном липоидозе**

Поскольку отложение липидов в интима сосудов и образование наполненных липидными включениями пенистых клеток является не только одним из наиболее ранних проявлений атеросклероза, но инициирующим событием в возникновении атеросклеротического поражения (Alaupovic P, 1971; Fowler SM et al., 1979; Mahley RW et al., 1979; Smith EB, 1974), выяснение механизмов накопления внутриклеточных липидов имеет принципиальное значение в изучении патогенеза атеросклероза. В конце 70-х годов прошлого века было установлено, что источником липидов, накапливающихся в клетках сосудов, являются ЛНП, циркулирующие в крови человека (Chen RM & Fisher-Dzoga K, 1977; Goldstein JL et al., 1979a). Однако многочисленные попытки вызвать внутриклеточное накопление эфиров холестерина с помощью нативных ЛНП не увенчались успехом. С другой стороны, ЛНП, химически модифицированные в условиях *in vitro* (ацетилированные, обработанные малоновым диальдегидом, окисленные ионами металлов переменной валентности и т.д.), вызывали отложение липидов в клетках, то есть были атерогенны (Fogelman AM et al., 1980; Goldstein JL et al., 1979b; Haberland ME et al., 1984; Steinbrecher HP et al., 1984). В то же время, напряженный поиск в крови человека липопротеидов, сходных с ЛНП, модифицированными *in vitro*, не дал результата. К началу 80-х годов прошлого века накопились данные, создавшие ситуацию неопределенности. Было известно, что: 1) ЛНП являются источником липидов, накапливающихся в клетках сосудов; 2) нативные ЛНП не вызывают отложения внутриклеточного жира; 3) *in vitro* модифицированные ЛНП

накапливают липиды в клетках, то есть атерогенны, но их нет в крови. Сложившаяся ситуация предполагала поиск *in vivo* модифицированных ЛНП, способных вызывать внутриклеточное накопление липидов.

### **6.1. Циркулирующие модифицированные липопротеиды низкой плотности**

Было понятно, что модифицированные ЛНП, способные вызвать накопление липидов в клетках сосудистой стенки, следует искать, прежде всего, в крови больных, сосуды которых уже подверглись атеросклеротическому поражению. Для подтверждения этого предположения была выделена фракция суммарных липопротеидов низкой плотности из плазмы крови практически здоровых лиц и пациентов с ангиографически документированным атеросклерозом. Для оценки способности выделенных ЛНП вызывать внутриклеточное отложение липидов была использована первичная культура субэндотелиальных клеток интимы аорты человека, то есть именно тех клеток, которые накапливают жир при атеросклерозе (Orekhov AN et al., 1985a).

Семидневные первичные культуры субэндотелиальных клеток непораженной интимы аорты человека инкубировали 24 часа в среде 199, содержащей 10% липопротеид-дефицитной сыворотки здорового донора и ЛНП в концентрации 5-500 мкг аполипопротеина В (апоВ)/мл. Было обнаружено, что ЛНП крови здоровых лиц в большинстве случаев ни в одной из использованных концентраций не вызывали внутриклеточного отложения фосфолипидов, а также нейтральных липидов (Orekhov AN et al., 1988a; Tertov VV et al., 1989b). Напротив, большинство

препаратов ЛНП, выделенных из плазмы крови пациентов с коронарным атеросклерозом, в концентрации 20-100 мкг/мл вызвали 1,5-кратное увеличение содержания свободного холестерина и триглицеридов, а также 1,5-5-кратное накопление этерифицированного холестерина в культивируемых клетках. Дальнейшее увеличение концентрации ЛНП не приводило к увеличению внутриклеточного уровня липидов.

Таким образом, было обнаружено, что ЛНП большинства пациентов с коронарным атеросклерозом, но не здоровых лиц, способны вызывать накопление липидов в клетках сосудов человека. Это свойство ЛНП было названо атерогенностью.

При определении химического состава ЛНП здоровых лиц и пациентов не было обнаружено различий в содержании апо-белка, а также фосфолипидов, триглицеридов, свободного и этерифицированного холестерина. С другой стороны, было показано, что общее содержание сиаловой кислоты (N-ацетилнейраминовой кислоты) в ЛНП пациентов с коронарным атеросклерозом в 2-3 раза меньше, чем в ЛНП здоровых лиц. ЛНП с низким уровнем сиаловой кислоты были первоначально названы десиалированными липопротеидами (Orehov AN et al., 1989b; 1991a).

Сиаловая кислота является терминальным моносахаридом, входящим в состав аспарагин-связанных биантенных углеводных цепей апобелка ЛНП. Следующим за сиаловой кислотой моносахаридом в этих углеводных цепях является галактоза, которая становится терминальным сахаром в результате удаления сиаловой кислоты. Этот факт был использован для выделения десиалированных ЛНП (Tertov VV et al., 1990a). Для этого был применен лектин - аглютинин *Ricinus communis* (RCA<sub>120</sub>), обладающий высоким сродством к терминальной га-

лактозе. Суммарную фракцию ЛНП человека наносили на колонку с RCA<sub>120</sub>, иммобилизованным на CNBr-активированной агарозе. Было обнаружено, что часть липопротеидов проходит через такую колонку, не задерживаясь (сиалированные ЛНП). Другая часть связывается с лектином и элюируется с колонки 5-50 мМ галактозы (десиалированные ЛНП). Таким образом, было установлено, что не все ЛНП пациентов являются десиалированными, но лишь их определенная часть.

Определение сиаловой кислоты в выделенных с помощью лектин-хроматографии фракциях показало, что содержание этого сахара во фракции десиалированных ЛНП было в 2-3 раза ниже, чем во фракции сиалированных ЛНП (Tertov VV et al., 1990a). Следовательно, разработанный подход действительно позволяет разделять сиалированные и десиалированные ЛНП.

В дальнейшем с помощью колоночной лектин-хроматографии, а также твердофазного лектиноферментного анализа было показано, что доля десиалированных ЛНП в крови пациентов обычно варьирует в пределах 20-60% (Tertov VV et al., 1995a). Десиалированные ЛНП были обнаружены и в крови здоровых доноров, однако их доля обычно не превышала 5-10%.

Инкубация субэндотелиальных клеток интимы аорты человека с фракцией сиалированных ЛНП не влияла на внутриклеточное содержание фосфолипидов и нейтральных липидов (Tertov VV et al., 1990a; 1992a). Десиалированные ЛНП, элюируемые 50 мМ галактозой, вызывали в среднем 1,5-2-кратное накопление незатерифицированного холестерина и триглицеридов и 2-7-кратное накопление эфиров холестерина в культивируемых клетках. Следовательно, только десиалированная подфракция ЛНП человека является атерогенной. Сиалирован-

ные ЛНП атерогенными свойствами не обладают и могут рассматриваться как нативные немодифицированные ЛНП.

Таким образом, в крови человека удалось обнаружить и выделить подфракцию циркулирующих модифицированных ЛНП (цмЛНП), способную вызывать накопление липидов в клетках интимы аорты человека

## **6.2. Индукция атеросклеротических проявлений на клеточном уровне**

Поскольку помимо накопления липидов характерными проявлениями атеросклероза на клеточном уровне является повышенная пролиферация и усиленный синтез компонентов соединительнотканного матрикса клетками интимального слоя сосудов, было оценено влияние циркулирующие модифицированные ЛНП на пролиферативную активность, а также на синтез секретируемого белка, коллагена и гликозаминогликанов клетками, культивируемыми из непоражённой интимы аорты человека.

Инкубация субэндотелиальных клеток интимы аорты человека в течение 24 часов в среде 199, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, в присутствии 100 мкг/мл нативных ЛНП не оказывала влияния на включение тимидина. Напротив, цмЛНП в той же концентрации усиливали пролиферативную активность в 1,5-2 раза. Таким образом, цмЛНП стимулируют пролиферативную активность культивируемых клеток интимы аорты человека.

Нативные ЛНП не влияли на синтез секретируемого клетками белка, который оценивали по включению  $^{14}\text{C}$ -лейцина в кислотонерастворимую фракцию инкубационной среды. ЦмЛНП

стимулировали в 1,5-3 раза синтез секретируемого белка культивируемыми клетками. Более того, цмЛНП вызывали 2-кратное увеличение синтеза коллагена клетками, определяемого по включению  $^{14}\text{C}$ -пролина в высвобождаемую коллагеназой фракцию инкубационной среды. Было продемонстрировано также, что цмЛНП, но не нативные ЛНП, оказывали стимулирующее воздействие на включение  $^{14}\text{C}$ -глюкозамина в суммарную фракцию гликозаминогликанов субэндотелиальных клеток интимы аорты человека. Следовательно, в отличие от нативных ЛНП, цмЛНП способны ускорять синтез компонентов соединительнотканного матрикса.

В исследовании по выяснению механизмов усиления пролиферативной и синтетической активности клеток под действием цмЛНП были установлены следующие экспериментальные факты: 1) для стимуляции включения меченых тимидина и предшественников компонентов матрикса достаточно прединкубации клеток с модифицированными ЛНП, вызывающей отложение внутриклеточных липидов; 2) комплексы нативных ЛНП с природными (коллаген, эластин, фибронектин) и искусственными (частицы латекса, декстран сульфат) компонентами вызывают накопление липидов в клетках и возрастание пролиферативной и синтетической активности; 3) степень увеличения пролиферативной и синтетической активности коррелирует с количеством накопленных липидов (Tertov VV et al., 1988a; Orekhov AN et al., 1990a). Таким образом, опосредованное липопротеидами накопление внутриклеточных липидов является причиной усиления пролиферативной активности и синтеза компонентов соединительнотканного матрикса. Следовательно, цмЛНП способны вызывать все известные проявления атеросклероза на клеточном уровне.



### **6.3. Физико-химические особенности модифицированных липопротеидов**

#### **6.3.1. Химический состав**

В состав гликоконъюгатов апоВ ЛНП человека входят N-ацетил-глюкозамин, галактоза, манноза и сиаловая кислота в молярном соотношении, примерно, 2:1:2,5:1 (Tertov VV et al., 1993). Содержание N-ацетил-глюкозамина, галактозы и маннозы в белок-связанных гликоконъюгатах в нативных сиалированных и цмЛНП здоровых лиц было одинаковым. Уровень N-ацетил-глюкозамина в апоВ нативных ЛНП и цмЛНП пациентов с коронарным атеросклерозом был одинаков и не отличался от уровня этого моносахарида в подфракциях липопротеидов здоровых лиц. Содержание галактозы и маннозы в цмЛНП пациентов было достоверно ниже, чем в нативных ЛНП.

Уровень сиаловой кислоты в цмЛНП здоровых лиц был на 15-30% ниже, чем в нативных ЛНП (Tertov VV et al., 1993). Содержание сиаловой кислоты в апоВ нативных ЛНП пациентов было примерно таким же, что и в нативных липопротеидах здоровых лиц. Количество сиаловой кислоты в белок-связанных гликоконъюгатах цмЛНП был в 2-3 раза ниже, чем в нативных липопротеидах.

Углеводный состав липидной фракции ЛНП отличается от состава белок-связанных сахарных цепей отсутствием маннозы и наличием N-ацетил-галактозамина и глюкозы. В некоторых препаратах обнаруживались также следовые количества фукозы. Содержание липид-связанного N-ацетил-глюкозамина было в 5-9 раз ниже, а галактозы в 1,5-2 раза выше, чем в гликоконъ-

югатах апоВ. Количество липид-связанной сиаловой кислоты было в 3-5 раз ниже, чем в белок-связанных цепях.

Содержание всех нейтральных моносахаридов: N-ацетил-галактозамина, N-ацетил-глюкозамина, галактозы и глюкозы, в липид-связанных гликоконъюгатах цмЛНП здоровых лиц было в 1,5-2 раза ниже, чем в нативных липопротеидах (Tertov VV et al., 1993). Содержание липид-связанных N-ацетил-галактозамина и N-ацетил-глюкозамина в цмЛНП пациентов было ниже, чем в нативных липопротеидах здоровых лиц, тогда как уровень галактозы и глюкозы был сходен. Количество, как нейтральных сахаров, так и сиаловой кислоты в липидной фракции цмЛНП пациентов было в 1,5-2 раза ниже, чем в нативных липопротеидах.

Помимо углеводного состава было определено содержание основных классов нейтральных липидов в нативных сиалированных и десиалированных цмЛНП здоровых лиц и пациентов с коронарным атеросклерозом (Tertov VV et al., 1992c,d). Уровень свободного и этерифицированного холестерина и триглицеридов в цмЛНП здоровых лиц был на 30-40% ниже по сравнению с нативными ЛНП. Количество моноглицеридов и свободных жирных кислот в цмЛНП было в 1,5 раза выше, чем во фракции нативных ЛНП. Содержание свободного и этерифицированного холестерина, а также триглицеридов в цмЛНП пациентов было в 1,5 раза ниже, чем в нативных липопротеидах. Уровень моно- и диглицеридов, а также свободных жирных кислот в цмЛНП был в 3-4 раза выше, чем в нативных липопротеидах.

В цмЛНП здоровых лиц по сравнению с нативными ЛНП снижено содержание фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина и сфингомиелина, но увеличено содержание лизофос-

фатидилхолина (Tertov VV et al., 1992c,d). Уровень основных классов фосфолипидов в нативных ЛНП больных ИБС не отличался от нативных ЛНП здоровых лиц. Содержание фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина и сфингомиелина в цмЛНП пациентов было в 1,5-3 раза ниже, чем в нативных липопротеидах. Содержание лизофосфатидилхолина в цмЛНП было в два раза выше, чем его уровень в нативных ЛНП. Концентрация фосфатидилинозита и фосфатидилсерина в изученных фракциях здоровых лиц и пациентов достоверно не различалась.

Полученные данные свидетельствуют, что цмЛНП существенно отличаются от нативных липопротеидов по углеводному и липидному составу.

### **6.3.2. Физические параметры**

Определение размеров частиц нативных ЛНП и цмЛНП здоровых лиц и пациентов было проведено двумя методами: методом квазиэластичного рассеивания лазерного излучения в суспензии липопротеидов, а также с помощью электрофореза ЛНП в градиенте полиакриламидного геля с последующей сканирующей денситометрией (Tertov VV et al., 1992c). Полученные с помощью первого подхода моды распределения по размерам частиц нативных ЛНП здоровых лиц и пациентов составляли 26,5 и 26,8 нм, соответственно. Моды распределения для цмЛНП здоровых лиц и пациентов были равны 24,8 и 24,5 нм, соответственно. Сходные результаты для среднего диаметра частиц нативных (26,3 и 26,2 нм) и модифицированных (23,5 и 22,9 нм) ЛНП здоровых лиц и пациентов, соответственно, были получены с использованием электрофореза в полиакриламид-

ном геле (Tertov VV et al., 1992c). Таким образом, частицы цмЛНП имеют меньшие размеры, по сравнению с нативными липопротеидами.

Для сравнительного определения плотности нативных ЛНП и цмЛНП использовали ультрацентрифугирование липопротеидов в линейном градиенте плотности NaBr (Tertov VV et al., 1992c). Было показано, что распределение цмЛНП резко сдвинуто в сторону больших плотностей, по сравнению с нативными липопротеидами. Таким образом, цмЛНП более плотные, чем нативные ЛНП. Увеличение плотности частиц было связано с уменьшением в них фосфолипидов, а также свободного и этерифицированного холестерина и триглицеридов. При анализе подфракций было показано, что с увеличением плотности ЛНП уменьшается размер частиц, снижается содержание в них сиаловой кислоты и возрастает их атерогенный потенциал. То есть, наибольшую способность увеличивать содержание внутриклеточных липидов проявляли наиболее мелкие плотные десИАлированные цмЛНП.

С помощью электрофореза в агарозе было установлено, что цмЛНП здоровых лиц и особенно пациентов, обладают в 1,2-1,4 раза большей электрофоретической подвижностью по сравнению с нативными ЛНП (Tertov VV et al., 1992c). Это свидетельствует об увеличенном электроотрицательном заряде цмЛНП.

### **6.3.3. Анализ аполипопротеина В**

Для выявления возможной модификации апоБелка цмЛНП было определено содержание свободных аминок групп лизина в необработанных и делипидированных препаратах липопро-

идов (Tertov VV et al., 1992c). Содержание свободных аминок групп в ЛНП оценивали по их реакции с тринитробензолсульфоной кислотой. Содержание свободных аминок групп в интактных частицах нативных и десиалированных ЛНП здоровых лиц достоверно не различалось. Сходное количество свободных аминок групп было определено в делипидированных препаратах апоВ этих липопротеидов.

Количество аминок групп в интактных цмЛНП пациентов было в 2 раза ниже, чем в нативных ЛНП. Количество свободных аминок групп в делипидированных апоВ десиалированных ЛНП было выше, чем в интактных частицах, однако, ниже, чем в делипидированных апоВ, полученных из нативных ЛНП. Эти результаты указывают на то, что в цмЛНП пациентов часть аминок групп лизиновых остатков химически модифицирована, тогда как другая часть замаскирована из-за изменений третичной структуры апоВ.

#### **6.3.4. Степень окисленности и окисляемость липопротеидов**

В настоящее время широко распространены представления о том, что окисление ЛНП *in vivo* приводит к появлению у липопротеидов атерогенных свойств и инициирует развитие атеросклероза (Steinberg D et al., 1989.). В связи с этим, важно было ответить на следующие вопросы: 1) являются ли циркулирующие атерогенные десиалированные цмЛНП окисленными липопротеидами; 2) чем определяется окисленность и окисляемость липопротеидов; 3) достаточна ли степень *in vivo* окисленности ЛНП для проявления их атерогенных свойств.

Обычно о степени окисленности липопропротеидов судят по уровню гидроперекисей или реагирующих с тиобарбитуровой кислотой продуктов - соединений, образующихся в ходе перекисного окисления липидов. Однако химическая нестабильность и гидрофильность этих соединений предполагает их удаление из липопропротеидной частицы в ходе выделения и очистки ЛНП. Для оценки степени окисленности нативных и десалированных липопропротеидов был разработан принципиально новый подход (Tertov VV et al., 1995b). Этот подход основан на предположении, что образующиеся во время перекисного окисления химически активные производные липидов могут ковалентно связываться с апоВ-белком и являться, таким образом, маркером протекания окислительных процессов в липопропротеидной частице. С помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии и ядерного магнитного резонанса удалось продемонстрировать наличие ковалентно связанных с апоВ-стеролов (преимущественно, холестерина) и фосфатов в делипидированных ЛНП, окисленных с помощью ионов переменной валентности, азоинициаторов, гипохлорита натрия и культивируемых клеток. Свежевыделенные ЛНП здоровых лиц не содержали аддуктов липидов с апоВ-белком. Было показано, что в отличие от других показателей, применяемых для оценки интенсивности протекания перекисного окисления липидов в ЛНП, уровень ковалентно-связанного с апоВ-холестерина в окисляемых ЛНП является монотонной функцией (Tertov VV et al., 1992d). Таким образом, содержание апоВ-связанного холестерина в ЛНП является параметром, отражающим степень окисленности ЛНП.

Содержание апоВ-связанного холестерина в нативных ЛНП и цмЛНП здоровых лиц составляло  $0,25 \pm 0,08$  и  $0,28 \pm 0,05$  моль/моль апоВ, соответственно. Уровень апоВ-связанного хо-

лестерина в нативных ЛНП пациентов с коронарным атеросклерозом не отличался значимо от его уровня в нативных липопро-теидах здоровых лиц. Содержание апоВ-связанного холесте-рина в цмЛНП пациентов было в 7 раз выше, чем в нативных ЛНП. Таким образом, было обнаружено, что цмЛНП пациентов с ко-ронарным атеросклерозом являются окисленными липопро-теидами.

Подтверждением большей окисленности цмЛНП могут служить данные об увеличенном в 2-4 раза содержании в них, по сравнению с нативными липопро-теидами, суммарных окси-стеролов (Tertov VV et al., 1992c).

Помимо повышенной степени окисленности, было обна-ружено, что цмЛНП обладают большей предрасположенностью к окислению. Окисляемость ЛНП *in vitro* оценивали по длитель-ности периода индукции при  $\text{Cu}^{2+}$ -зависимом окислении липо-протеидов (Esterbauer H et al., 1989). Средняя длительность ин-дукционного периода окисления нативных ЛНП здоровых лиц и пациентов достоверно не различалась. Продолжительность ин-дукционного периода окисления цмЛНП здоровых лиц и паци-ентов была достоверно меньше по сравнению с нативными ЛНП в 3 и 6 раз, соответственно, что говорит об их большей пред-расположенности к окислению *in vitro*. Необходимо отметить, что окисляемость суммарных препаратов ЛНП здоровых лиц и пациентов прямо коррелировала с долей цмЛНП в них.

Для выяснения вопроса о причинах повышенной окисляе-мости и окисленности цмЛНП было исследовано содержание основных жирорастворимых антиоксидантов в липопро-теидных частицах и проведен корреляционный анализ между обнару-женным уровнем коэнзима Q, токоферолов и каротиноидов и уровнем апоВ-связанного холестерина, а также величиной пе-

риода индукции окисления ЛНП. Содержание всех исследованных антиоксидантов (коэнзима-Q,  $\alpha$ - и  $\gamma$ -токоферолов,  $\beta$ -каротина и ликопина) в цмЛНП было в 1,5-2 раза ниже, чем в нативных ЛНП. Уровень апоВ-связанного холестерина в цмЛНП, отражающего степень окисленности липопротеидов, прямо коррелировал с содержанием убихинона и был связан обратной корреляционной зависимостью с уровнем убихинола и  $\beta$ -каротина. С другой стороны, содержание аддуктов холестерина с апобелком в нативных ЛНП прямо коррелировало с уровнем убихинола. Длительность индукционного периода окисления цмЛНП была связана прямой корреляционной зависимостью с уровнем  $\alpha$ -токоферола и  $\beta$ -каротина и обратной с содержанием убихинона. Напротив, окисляемость нативных ЛНП прямо коррелировала с уровнем убихинона.

Анализ этих данных позволяет сделать ряд заключений: а) содержание липид-растворимых антиоксидантов в цмЛНП ниже, чем в нативных липопротеидах; б) этот факт определяет повышенную окисляемость цмЛНП; в) коэнзим-Q может играть про-оксидантную роль в подфракции нативных ЛНП; г) протекание *in vivo* процессов перекисного окисления липидов в цмЛНП подтверждается высоким удельным содержанием в них окисленной формы коэнзима-Q - убихинона; д) степень окисленности цмЛНП *in vivo* коррелирует с окислением убихинола и потерей каротиноидов.



#### **6.4. Взаимосвязь между степенью модифицированности ЛНП и атерогенностью липопротеидов**

Подфракция атерогенных ЛНП представляет собой мелкие, плотные, более отрицательно заряженные частицы, имеющие, по сравнению с нативными липопротеидами, изменения в липидной, белковой и углеводной составляющих. Все это позволяет определить эту подфракцию как МНОЖЕСТВЕННО-МОДИФИЦИРОВАННЫЕ липопротеиды низкой плотности. Важно ответить на вопрос, какие именно изменения из множественной модификации определяют атерогенный потенциал ЛНП. Был проведен корреляционный анализ между степенью изменения параметров ЛНП и способностью липопротеидов вызывать накопление липидов в субэндотелиальных клетках интимы аорты человека. Обнаружена достоверная обратная корреляция между атерогенностью ЛНП и содержанием в них сиаловой кислоты ( $r=-0,66$ ,  $p<0,05$ ). Другие исследованные параметры: размер и заряд частиц ЛНП, содержание нейтральных липидов и фосфолипидов, уровни жирорастворимых антиоксидантов, концентрации продуктов перекисного окисления липидов, количество свободных аминок групп лизина, степень окисленности и окисляемость ЛНП - с атерогенностью липопротеидов не коррелировали. Таким образом, десиамирование липопротеидов является наиболее важной модификацией, способствующей проявлению атерогенных свойств у ЛНП.

## 6.5. Множественная модификация липопротеидов

Параллельно с обнаружением множественно-модифицированных ЛНП, разными исследователями в крови человека были найдены также более электроотрицательные ЛНП (Avogaro P et al., 1988) и мелкие плотные ЛНП (Krauss RM & Burke DJ, 1982). Естественно возник вопрос, что общего и каковы различия между всеми обнаруженными модификациями ЛНП.

В совместной работе российских и итальянских исследователей было показано, что более электроотрицательные ЛНП, выделяемые ионообменной хроматографией, являются десалированными липопротеидами (Tertov VV et al., 1995c). С другой стороны, как указывалось выше, цмЛНП имеют увеличенный электроотрицательный заряд, то есть являются более электроотрицательными липопротеидами. Эти, а также, многие другие характеристики позволяют предполагать, что цмЛНП и более электроотрицательные ЛНП сходны, если не полностью идентичны.

Выше указывалось, что частицы десалированных цмЛНП имеют меньшие размеры и большую плотность, то есть являются мелкими плотными липопротеидами. С другой стороны, La-Belle и Krauss (La Belle M & Krauss RM, 1990) показали, что мелкие плотные ЛНП имеют сниженное содержание сиаловой кислоты, то есть десалированы. Эти данные свидетельствуют о сходстве двух типов модифицированных ЛНП.

Таблица 8. Сравнительные характеристики модифицированных ЛНП, обнаруженных в крови человека

| Параметр               | Множественно-модифицированные ЛНП                     | Электроотрицательные ЛНП           | Мелкие плотные ЛНП                                      |
|------------------------|-------------------------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| Атерогенность          | ↑ (Orekhov AN et al., 1989b; Tertov VV et al., 1990a) | ↑ (Avogaro P et al., 1988)         | ↑ (Tertov VV et al., 1992c; Jaakkola O et al., 1993)    |
| Размер                 | ↓ (Tertov VV et al., 1992c; 1995)                     | ↓ (Avogaro P et al., 1991)         | ↓ (Krauss RM & Burke DJ, 1982; Jaakkola O et al., 1993) |
| Плотность              | ↑ (Tertov VV et al., 1992c; 1995)                     | ?                                  | ↑ (Lindgren FT et al., 1969; Shen MMS et al., 1981)     |
| (-) Заряд              | ↑ (Tertov VV et al., 1992c)                           | ↑ (Avogaro P et al., 1988)         | ↑ (Jaakkola O et al., 1993)                             |
| Сиаловая кислота       | ↓ (Orekhov AN et al., 1989b; 1991)                    | ↓ (Tertov VV et al., 1995c; 1996a) | ↓ (La Belle M & Krauss RM et al., 1990)                 |
| Эфиры холестерина      | ↓ (Tertov VV et al., 1992c)                           | ↓ (Avogaro P et al., 1991)         | ↓ (Shen MMS et al., 1981; Teng B et al., 1983)          |
| Фосфолипиды            | ↓ (Orekhov AN et al., 1990a)                          | ↓ (Avogaro P et al., 1991)         | ↓ (Shen MMS et al., 1981; Teng B et al., 1983)          |
| Белок/липиды           | ↑ (Tertov VV et al., 1992c)                           | ↑ (Avogaro P et al., 1991)         | ↑ (Shen MMS et al., 1981; Teng B et al., 1983)          |
| Окисляемость           | ↑ (Tertov VV et al., 1992c; 1995)                     | ↑ (Cazzolato G et al., 1991)       | ↑ (Dejager S et al., 1993; Tribble DL et al., 1994)     |
| Антиоксиданты          | ↓ (Tertov VV et al., 1992c; 1995)                     | ↓ (Avogaro P et al., 1991)         | ↓ (Dejager S et al., 1993; Tribble DL et al., 1994)     |
| Модификация аминокрупп | ↑ (Tertov VV et al., 1992c)                           | ↑ (Cazzolato G et al., 1991)       | ?                                                       |
| Агрегация              | ↑ (Tertov VV et al., 1989a; 1992a)                    | ↑ (Avogaro P et al., 1988)         | ↑ (Jaakkola O et al., 1993)                             |

В Таблице 8 приведены данные о химическом составе и физических параметрах всех обнаруженных в крови человека типов модифицированных ЛНП. Можно видеть очевидное сходство характеристик модифицированных липопротеидов. В этой связи, можно предположить, что все описанные фракции модифицированных ЛНП, выделяемые различными методами, состоят из одних и тех же липопротеидных частиц, подвергшихся множественной модификации.

## **6.6. Множественная модификация ЛНП в крови**

Широкий спектр изменений частиц ЛНП и значение этих изменений для приобретения липопротеидами атерогенных свойств порождает вопрос, как осуществляется модификация липопротеидов в организме человека. Проверялось 2 предположения – 1) модификация ЛНП может происходить под действием клеток разных органов, 2) модификация ЛНП осуществляется в плазме крови.

Показано, что 24-часовая инкубация липопротеидов с интактными эндотелиоцитами, гепатоцитами, макрофагами и суб-эндотелиальными клетками или клеточными гомогенатами при 37°C не приводила к изменению физических свойств и химического состава нативных ЛНП. Для проверки второго предположения цельную кровь и полученную из нее плазму инкубировали в течение 24 часов при 37°C. Содержание сиаловой кислоты в ЛНП, выделенных из инкубированных препаратов плазмы и крови было в 2 раза меньше, чем в контрольных образцах, инкубируемых при 0°C. При этом наличие или отсутствие клеток крови не влияло на уровень сиаловой кислоты в ЛНП. Следовательно, модификация ЛНП происходит в плазме крови.

Таблица 9. Модификация ЛНП в сыворотке крови

| 0-1<br>час                               | 1-3<br>часов             | 3-6<br>часов                       | 6-12<br>часов                     | 12-24<br>часа           | 24-36<br>часов                      | 36-48<br>часов                                |
|------------------------------------------|--------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------------------|
| ↓Сиа-<br>ловая<br>кислота                | ↑Атеро-<br>ген-<br>ность | ↓Сво-<br>бодный<br>холе-<br>стерин | ↓Раз-<br>мер                      | ↓Триг-<br>лице-<br>риды | ↑Отри-<br>цатель-<br>ный за-<br>ряд | ↑АпоВ-<br>связан-<br>ный хо-<br>лесте-<br>рин |
| ↑% де-<br>сиали-<br>рован-<br>ных<br>ЛНП |                          |                                    | ↓Эфи-<br>ры хо-<br>лесте-<br>рина |                         |                                     | ↑окис-<br>ляе-<br>мость                       |
|                                          |                          |                                    | ↓Фос-<br>фоли-<br>пиды            |                         |                                     | ↑Ауто-<br>флуо-<br>рес-<br>ценция             |
|                                          |                          |                                    |                                   |                         |                                     | ↓Вита-<br>мин Е                               |

Для детального изучения процессов модификации ЛНП в плазме была разработана специальная схема эксперимента. Из плазмы крови с помощью ультрацентрифугирования и лектин-хроматографии выделяли фракцию нативных ЛНП и сыворотку, полученную после осаждения фибринового сгустка и липопротеид-дефицитной плазмы. ЛНП и сыворотку смешивали в тех же пропорциях, что и в исходной плазме, и инкубировали раз-

личные сроки при 37°C. После инкубации ЛНП вновь выделяли ультрацентрифугированием. Такой подход позволил исключить влияние на результаты эксперимента липопротеидов низкой плотности, образующихся в ходе инкубации из липопротеидов очень низкой и промежуточных плотностей. Было установлено, что уже через 1 час инкубации нативных ЛНП с аутологичной сывороткой наблюдается достоверное снижение уровня сиаловой кислоты в липопротеидах (Таблица 9).

При этом с помощью твердофазного лектиноферментного метода было обнаружено появление подфракции десиалированных ЛНП. На фоне продолжающегося снижения уровня сиаловой кислоты в ЛНП, спустя 3 часа инкубации препараты ЛНП становились способными вызывать накопление холестерина в культивируемых субэндотелиальных клетках, выделенных из непораженной интимы аорты человека. Начиная с шестого часа инкубации ЛНП с сывороткой, происходило монотонное снижение содержания нейтральных липидов и фосфолипидов в липопротеидах и связанное с этим уменьшение их размеров. После 36 часов инкубации обнаружено также возрастание электроотрицательности липопротеидных частиц. На длительных сроках инкубации (48-72 часа) ЛНП с сывороткой происходит потеря  $\alpha$ -токоферола, увеличение способности к окислению и накопление ковалентно связанного с аполипипротеином В холестерина, маркера перекисного окисления липидов липопротеидов (Таблица 9). В эти же сроки начинается деградация аполипипротеина В в ЛНП. Следовательно, десиалирование частиц ЛНП, являющееся одним из первых или первичным актом модификации, представляет собой, по-видимому, достаточное условие для появления у них атерогенных свойств. Последующие модификации лишь усиливают атерогенный потенциал ЛНП. Та-

ким образом, было продемонстрировано, что процессы модификации ЛНП, делающие липопротеиды атерогенными, могут протекать в плазме крови человека. Множественная модификация ЛНП - это каскад последовательных изменений в частице липопротеида: десиамирование, потеря липидов, уменьшение размера частицы, увеличение электроотрицательного заряда, перекисное окисление липидов ЛНП.

Важность десиамирования ЛНП как одного из первых или даже первичных актов атерогенной модификации липопротеидов заставила искать причины десиамирования ЛНП в плазме крови.

## **6.7. Природа десиамирующей активности в плазме**

Для выяснения природы десиамирующей активности, наблюдаемой в плазме крови, необходимо было выяснить: остается ли сиаловая кислота, отщепляемая от ЛНП в процессе инкубации, в свободном виде, или же переносится на акцепторы, находящиеся в плазме. Для получения ответа на этот вопрос использовали меченные [ $^3\text{H}$ ] по сиаловой кислоте ЛНП. На Рисунке 51 видно, что в процессе инкубации падение уровня радиоактивности в ЛНП сопровождалось его возрастанием в осадке, вызванных трихлоруксусной кислотой (ТХУ-нерастворимой фракции плазмы). В ТХУ-растворимой фракции, напротив, вплоть до 24 часов инкубации не было замечено даже следов радиоактивности. Эти факты говорят о том, что при десиамировании ЛНП в плазме сиаловая кислота переносится на плазменные гликоконъюгаты – акцепторы, а не остается в свободном виде. Таким образом, в плазме была обнаружена транс-сиалидазная активность.

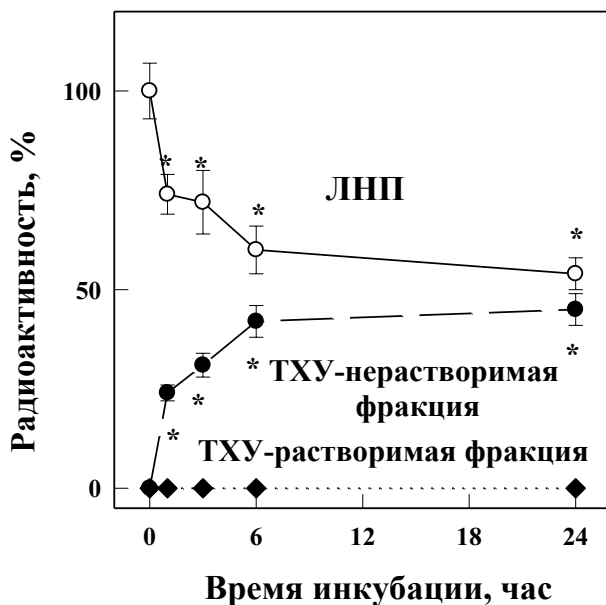


Рисунок 51. Временная зависимость изменений радиоактивности фракции ЛНП, ТХУ-растворимой и ТХУ-нерастворимой фракций сыворотки в ходе инкубации  $^3\text{H}$ -сиаловая кислота-меченых ЛНП с аутологичной сывороткой при 37°C

Двести мкг  $^3\text{H}$ -сиаловая кислота-меченых ЛНП инкубировали в течение указанного времени с 2 мл аутологичной сыворотки. Аликвоты по 200 мкл обрабатывали 10% ТХУ для определения белок-связанной радиоактивности. ЛНП и ЛНП-дефицитную сыворотку разделяли ультрацентрифугированием и преципитировали 10% ТХУ. Радиоактивность преципитатов измеряли на жидкостно-сцинтилляционном счетчике 1215-Rack-Beta, как описано в Материалах и Методах. Данные представлены в виде среднего трех определений  $\pm$  стандартное математическое отклонение. \* - достоверное отличие от контрольных ЛНП,  $p < 0,05$ .



Для выделения фермента (ферментов), осуществляющего перенос сиаловой кислоты в плазме крови, использовался метод аффинной хроматографии. В качестве сорбента использовали сефарозу с ковалентно-связанной с ней полисиаловой кислотой (Neu5Ac $\alpha$ 2-8Neu5Ac-Sepharose FF6). Молекулярный вес, а также степень чистоты и гомогенности препарата транссиалидазы, определяли с помощью электрофореза на полиакриламидном геле. На приведенной электрофореграмме видно, что полученный препарат являлся гомогенным и содержал белок с молекулярной массой около 65 кДа (Рисунок 52).

Содержание транссиалидазы в крови варьирует от 20 до 200 мкг/мл. Одним из возможных объяснений столь высокой концентрации может служить важная роль транс-сиалидазы в поддержании баланса сиалирования/десиалирования гликоконъюгатов различных компонентов крови.

Оценивали транс-сиалидазную активность при значениях pH от 2,5 до 8,0 с использованием в качестве субстрата меченого  $^3\text{H}$  по сиаловой кислоте фетуина. Из Рисунка 53 видно, что фермент имеет три pH-оптимума: pH 3,0 (наибольшая активность), pH 5,0 и pH 7,0. Таким образом, было продемонстрировано, что фермент обладает активностью при нормальном для плазмы нейтральном значении pH, то есть в физиологических условиях. Известно, что некоторые клетки, в частности макрофаги, способны закислять окружающую среду до pH 5,0. Вполне возможно, что транс-сиалидаза может функционировать и в очагах воспаления, где много макрофагов. Не известно, существуют ли в человеческом организме патологических условий, приводящие к сильному (pH 3,0) локальному закислению среды. Однако, в принципе, при захвате фермента клетками он в со-

ставе лизосом может участвовать в процессах транссиалирования гликоконъюгатов.

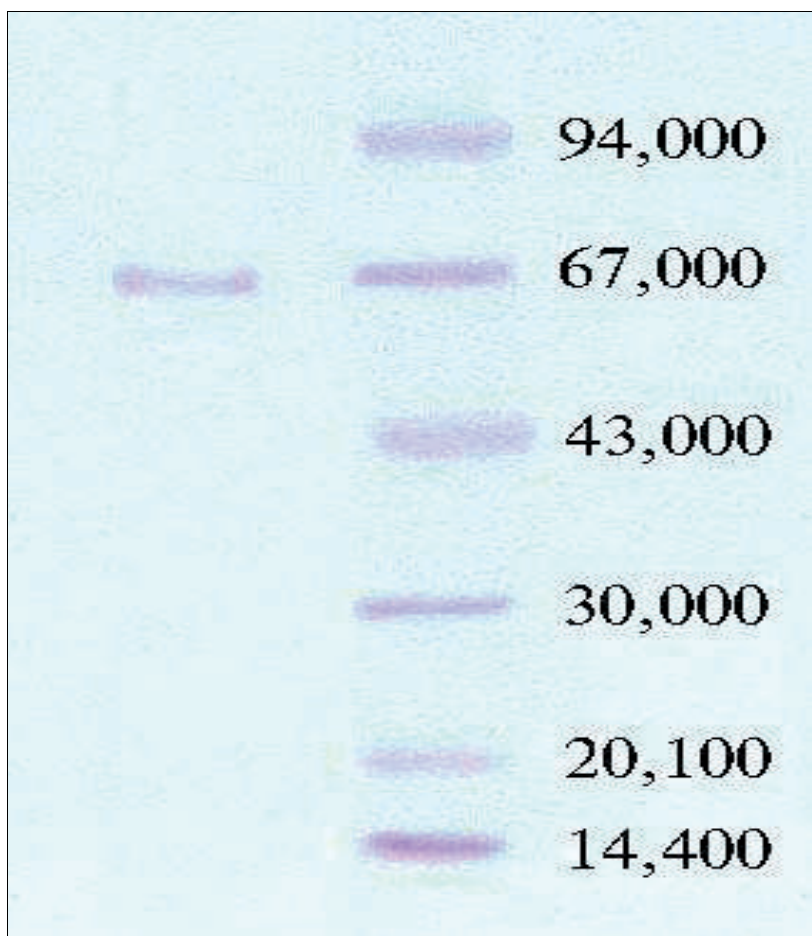


Рисунок 52. Электрофорез в полиакриламидном геле (6-23%) препарата сиалидазы, выделенного с помощью аффинной хроматографии из плазмы крови человека

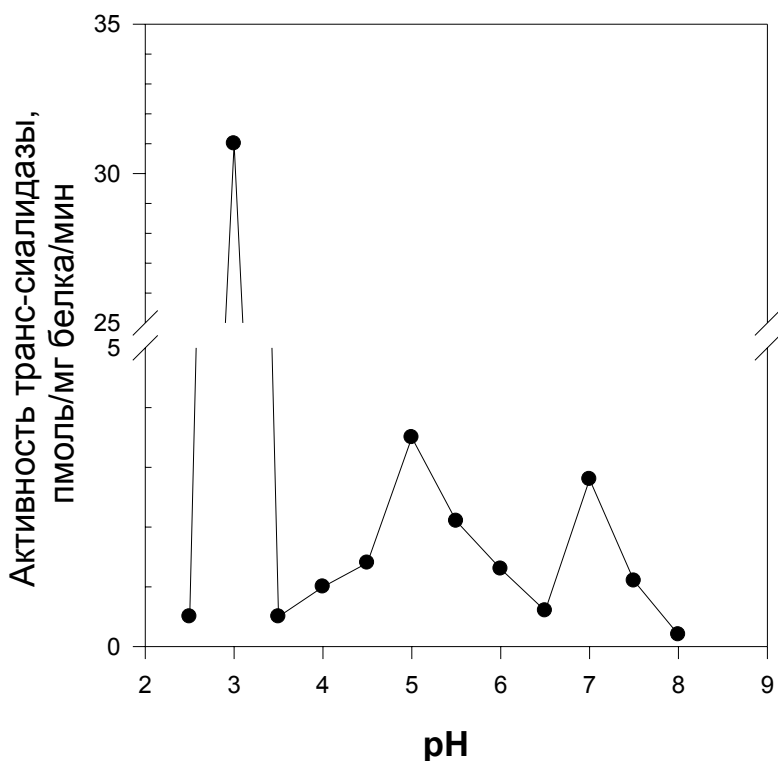


Рисунок 53. Зависимость от pH активности сиалидазы плазмы крови человека

В таблице 10 представлены данные о влиянии ионов некоторых металлов на активность фермента. Так, ионы  $Mn^{2+}$  и  $Zn^{2+}$  не влияли на активность транс-сиалидазы; ионы  $Cu^{2+}$  и  $Hg^{+}$  вызывали падение ферментативной активности в 6,3 и 6,7 раз соответственно, а ионы  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  в миллимолярной концентрации вызывали достоверное увеличение активности. Таким образом, ионы  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  могут являться активаторами транс-сиалидазы. Нормальная плазма крови человека содержит мил-

лимолярные концентрации этих ионов, по всей видимости, достаточные для проявления ферментативной активности.

Таблица 10 - Влияние катионов некоторых металлов на активность сиалидазы плазмы крови человека

| Катион           | Активность, % от контроля |
|------------------|---------------------------|
| Контроль         | 100±6                     |
| Ca <sup>2+</sup> | 251±13*                   |
| Mg <sup>2+</sup> | 129±4*                    |
| Zn <sup>2+</sup> | 110±7                     |
| Mn <sup>2+</sup> | 104±3                     |
| Cu <sup>2+</sup> | 16±1*                     |
| Hg <sup>+</sup>  | 17±2*                     |

Данные представлены в виде среднего трёх определений ±S.E.M.

\* - достоверное отличие от контроля,  $p < 0,05$ .

Для исследования субстратной специфичности фермента, в качестве доноров сиаловой кислоты были использованы меченые по сиаловой кислоте ЛНП, фетуин и трансферин. На Рисунке 54 представлена зависимость скорости переноса сиаловой кислоты транс-сиалидазой с глико- и липопротеидов на де-сиалированный фетуин от времени инкубации. Наиболее эффективно перенос сиаловой кислоты осуществлялся с ЛНП. Так, через 60 минут инкубации скорость переноса сиаловой кислоты с ЛНП была в 25 раз выше, чем с фетуина, и в 326 раз выше, чем с трансферина. Следовательно, липопротеиды являются более предпочтительным субстратом для транс-сиалидазы по сравнению с исследованными гликопротеидами

плазмы. Необходимо заметить, что активность фермента линейно зависела от концентрации транс-сиалидазы в реакционной пробе, в исследованном интервале от 0 до 100 мкг/мл (Рисунок 55).

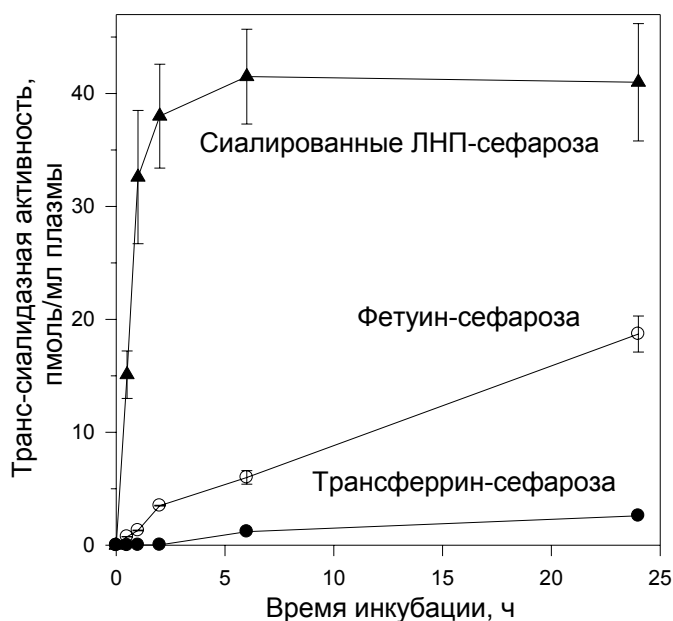


Рисунок 54. Временная зависимость скорости переноса сиалидазой сиаловой кислоты с иммобилизованных на сефарозе фетуина, трансферина и ЛНП на асиалофетуин

Инкубацию проводили при 37°C рН 7,0.

Данные представлены в виде трех определений  $\pm$  стандартное математическое отклонение.

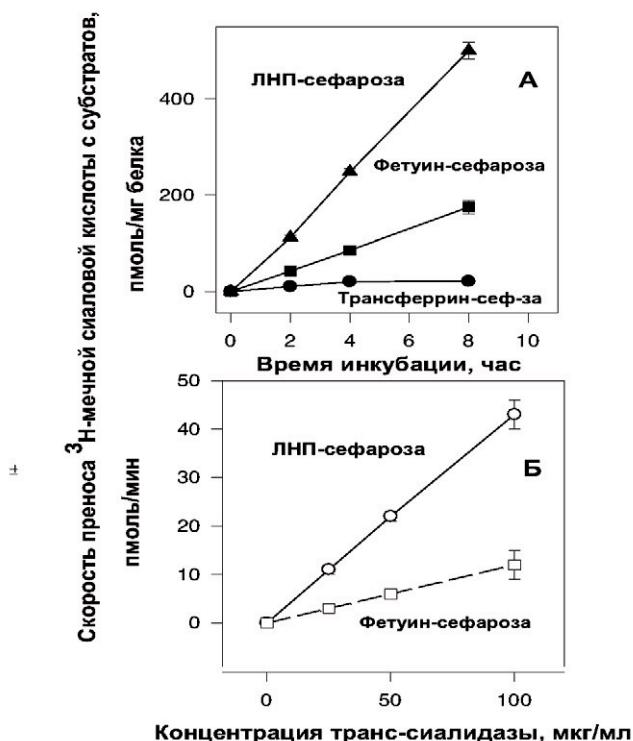


Рисунок 55 - Временная (А) концентрационная (Б) зависимость переноса сиаловой кислоты транс-сиалидазой с сиалированных доноров на асиалофетуин

Инкубацию проводили при 37°C рН 7,0.

Содержание сиаловой кислоты доноров в пробе - 4 нмоль.

Данные представлены в виде среднего трех определений  $\pm$  стандартное математическое отклонение.

В Таблице 10 приведены данные по скорости переноса сиаловой кислоты транс-сиалидазой с разных подфракций липопротеидов на десиалированный фетуин.

Таблица 10 - Скорость переноса сиаловой кислоты с нативных и циркулирующих модифицированных липопротеидов на асиалофетуин

| Донор сиаловой кислоты | Активность транс-сиалидазы, фмоль/мг белка/мин |
|------------------------|------------------------------------------------|
| Нативные ЛОНП          | 82±12                                          |
| ЦмЛОНП                 | < 2                                            |
| Нативные ЛПП           | 312±34                                         |
| ЦмЛПП                  | 21±4*                                          |
| Нативные ЛНП           | 4110±410                                       |
| ЦмЛНП                  | 24±6*                                          |
| Нативные ЛВП           | 9±1                                            |
| ЦмЛВП                  | < 2                                            |

Данные представлены в виде среднего трёх определений  $\pm$ S.E.M.

\* - достоверное отличие от сиалированных ЛНП,  $p < 0,05$ .

В качестве субстрата использовали меченые по сиаловой кислоте сиалированные (нативные) и десиалированные (циркулирующие модифицированные) липопротеиды. Все липопротеиды вносили в реакционную смесь в равных, по количеству сиаловой кислоты, количествах. Наибольшая скорость переноса сиаловой кислоты транс-сиалидазой наблюдалась при использовании в качестве субстрата сиалированных ЛНП. Так, перенос сиаловой кислоты с нативных ЛНП осуществлялся со скоростью, превышающей скорость переноса с множественно модифицированных ЛНП в 17 раз. Перенос сиаловой кислоты с нативных липопротеидов промежуточной плотности шел в 13



раз медленнее, чем с нативных ЛНП. Скорость переноса сиаловой кислоты в присутствии нативных липопротеидов очень низкой плотности и липопротеидов высокой плотности была значительно ниже, наблюдаемой для ЛНП и даже липопротеидов промежуточной плотности. Скорость переноса сиаловой кислоты с нативных липопротеидов очень низкой плотности была ниже в 50 раз, а с нативных липопротеидов высокой плотности – в 456 раз по сравнению со скоростью переноса с нативных ЛНП. Транс-сиалидаза в целом более эффективно переносила сиаловую кислоту с нативных липопротеидов, чем с циркулирующих модифицированных липопротеидов. Скорости переноса сиаловой кислоты с сиалированных по сравнению с циркулирующими модифицированными липопротеидами отличались в 41, 15, 17 и 4.5 раза для липопротеидов очень низкой, промежуточной, низкой и высокой плотности, соответственно.

В ЛНП сиаловая кислота входит в состав гликоконъюгатов как апобелка, так и некоторых гликолипидов. В связи с этим были изучены донорные свойства различных ганглиозидов (Рисунок 56). Скорости переноса сиаловой кислоты с GM3, GD3, GM1, GD1 $\alpha$  и GD1 $\beta$  были близкими по величине. При использовании в качестве субстрата GT1 $\beta$  и GQ1 $\beta$  (содержащих 3 и 4 молекулы сиаловой кислоты, соответственно) перенос сиаловой кислоты осуществлялся со скоростью, соответственно, в 17 и 11 раз более низкой, чем при использовании GD3.

Для изучения субстратной специфичности транс-сиалидазы были использованы меченые по сиаловой кислоте эритроциты. Было обнаружено, что транс-сиалидаза может осуществлять перенос сиаловой кислоты с гликоконъюгатов поверхности клеток крови. Скорость переноса сиаловой кислоты составила  $16,6 \pm 0,6$  пмоль/мг фермента/мин.



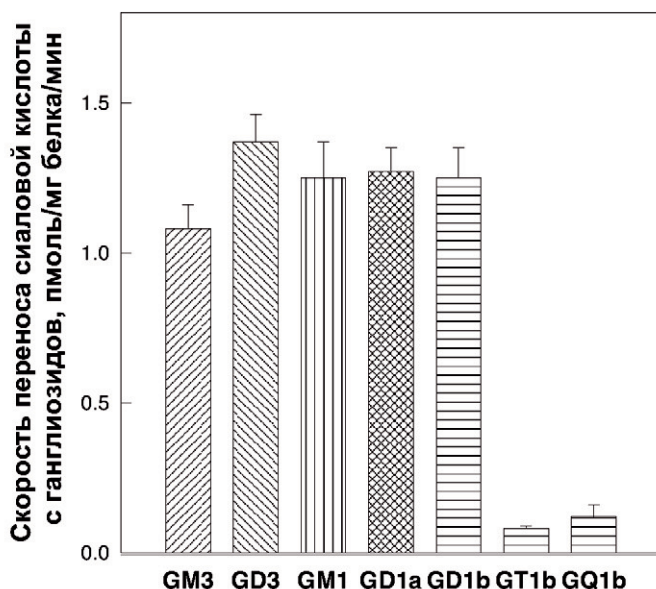


Рисунок 56. Скорость переноса сиаловой кислоты с ганглиозидов на асиалофетуин

Инкубацию проводили при 37°C рН в течение 18 часов.

Данные представлены в виде среднего трех определений  $\pm$  стандартное математическое отклонение.

Для установления типов углеводных цепей, с которых транс-сиалидаза может переносить сиаловую кислоту, использовали синтезированные гликоконъюгаты, иммобилизованные на полиакриламиде, содержащие меченую терминальную сиаловую кислоту в  $\alpha$ 2-3,  $\alpha$ 2-6 и  $\alpha$ 2-8 положении. Данные об активности фермента при использовании в качестве субстрата таких

гликоконъюгатов представлены в Таблице 11. Фермент с наибольшей скоростью удалял  $\alpha$ 2-6-связанную сиаловую кислоту, а также с большой эффективностью переносил  $\alpha$ 2-3-связанную сиаловую кислоту. При переносе с гликоконъюгатов сиаловой кислоты, связанной  $\alpha$ 2-6 гликозидной связью, активность фермента была в 1,2 раза выше, чем при использовании в качестве субстрата SiaЛьюис<sup>a</sup>-ПАА-сефароза ( $\alpha$ 2-3 связь), в 1,6 раза выше, чем с SiaЛьюис<sup>x</sup>-ПАА-сефароза ( $\alpha$ 2-3 связь) и в 3,4 раза выше, чем с Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Glc-ПАА-сефароза. Скорость переноса сиаловой кислоты транс-сиалидазой с гликоконъюгатов, содержащих  $\alpha$ 2-8-связанную сиаловую кислоту, была значительно (в 26 раз) меньше, чем при использовании гликоконъюгатов, содержащих  $\alpha$ 2-6-связанную сиаловую кислоту. Необходимо также заметить, что транс-сиалидаза оказалась неспособна использовать в качестве субстрата цитидин-5'-монофосфат-сиаловую кислоту (субстрат сиалилтрансфераз), а также сиалиллактозу.

Таким образом, транс-сиалидаза плазмы крови способна отщеплять и переносить с различной эффективностью сиаловую кислоту гликоконъюгатов, входящих в состав основных гликопротеидов, липопротеидов и ганглиозидов плазмы, а также клеток крови. Наибольшая эффективность переноса наблюдалась для  $\alpha$ 2-6 связей, наименьшая – для  $\alpha$ 2-8 связей.

Следующим этапом исследования являлось изучение акцепторной специфичности транс-сиалидазы плазмы крови человека. В качестве акцептора сиаловой кислоты в экспериментах использовали как нативный (сиалированный), так и искусственно десалированный фетуин. На нативный фетуин переноса сиаловой кислоты практически не было, в то время как при

использовании в качестве акцептора десиалированной формы фетуина наблюдался эффективный перенос сиаловой кислоты (Рисунок 57).

Скорость переноса сиаловой кислоты значительно возрастала с увеличением концентрации десиалированного фетуина и не менялась достоверно при использовании различных концентраций его нативной формы.

Таблица 11. Скорость переноса сиаловой кислоты с сиалированных гликоконъюгатов на асиалофетуин

| Донор сиаловой кислоты                             | Транс-сиалидазная<br>активность (рН 7,0),<br>пмоль сиаловой кислоты/мг<br>белка/мин |
|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4Glc-ПАА-сефароза | 42,2 $\pm$ 3,3                                                                      |
| Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Glc-ПАА-сефароза | 12,4 $\pm$ 1,0                                                                      |
| (Neu5Ac $\alpha$ 2-8) <sub>2</sub> -ПАА-сефароза   | 1,6 $\pm$ 0,4                                                                       |
| СиалилЛьюис <sup>а</sup> -ПАА-сефароза             | 36,7 $\pm$ 2,1                                                                      |
| СиалилЛьюис <sup>х</sup> -ПАА-сефароза             | 25,3 $\pm$ 2,2                                                                      |
| СиалилЛактоза                                      | <0,2                                                                                |
| Цитидин-5'-монофосфат-<br>сиаловая кислота         | <0,2                                                                                |

Данные представлены в виде среднего трёх определений  $\pm$ S.E.M.

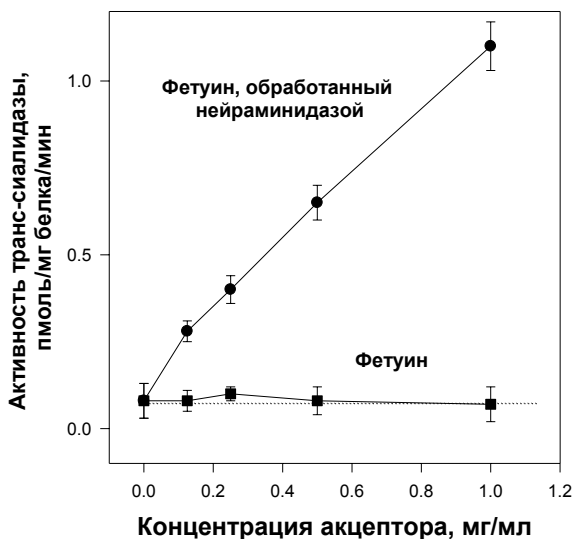


Рисунок 57. Скорость переноса сиаловой кислоты с ЛНП-сефарозы на нативный фетуин и асиалофетуин

Реакционную смесь, содержащую в финальном объеме 0,2 мл: 0,01 мл меченой по сиаловой кислоте ЛНП-сефарозы (10 мкг белка, 1050000 расп./мин), указанные концентрации нативного фетуина и асиалофетуина, 50 мМ трис-НСl (рН 7,0), 1 мМ ДТТ, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, 10 мкг/мл транс-сиалидазы, инкубировали 8 час при 37°C. После инкубации в пробы добавляли 0,3 мл охлажденной до 0°C воды и центрифугировали в течение 5 мин при 5000 g. 0,2 мл супернатанта использовали для измерения радиоактивности.

Данные представлены в виде среднего трех определений  $\pm$  стандартное математическое отклонение.

Были получены данные об акцепторных свойствах различных классов липопротеидов. В Таблице 12 представлены данные о скорости переноса меченой сиаловой кислоты с фе-

туина на разные классы сиалированных и десиалированных липопроотеидов. В целом, скорость переноса на десиалированные липопроотеиды была заметно выше, чем на нативные формы. Так, при добавлении в пробу сиалированных ЛНП скорость переноса сиаловой кислоты, по сравнению с контролем, возрастала в 3 раза, а десиалированных - в 6 раз. При использовании в качестве акцептора сиалированных липопроотеидов промежуточной плотности ферментативный перенос ускорялся в 2 раза, а десиалированных - в 4 раза. Скорости переноса транссиалидазой остатков сиаловой кислоты на липопроотеиды высокой и очень низкой плотности были достаточно близкими, и являлись наименьшими по сравнению с другими липопроотеидами.

Была изучена возможность переноса сиаловой кислоты на поверхностные гликоконъюгаты клеток крови - эритроцитов (нативных и частично десиалированных с помощью бактериальной нейраминидазы). В качестве донора сиаловой кислоты был использован меченый фетуин. Не было обнаружено переноса сиаловой кислоты на нативные эритроциты, однако был продемонстрирован перенос сиаловой кислоты на гликоконъюгаты частично десиалированных эритроцитов; скорость транссиалидазной реакции равнялась  $0,49 \pm 0,04$  пмоль/мг фермента/мин.

При изучении переноса сиаловой кислоты на лактозилцерамид и ганглиозиды были получены данные, представленные на Рисунке 58. В качестве донора сиаловой кислоты был использован [ $^3\text{H}$ ] меченый фетуин, ковалентно-связанный с сефарозой. С наибольшей скоростью перенос сиаловой кислоты осуществлялся на лактозилцерамид (10-кратное превышение над контролем). При использовании в качестве акцептора GM3, GD3, GM1, GD1a и GD1b были получены сопоставимые значе-

ния транс-сиалидазной активности (примерно 7-кратное превышение над контролем). Не было обнаружено достоверного увеличения по сравнению с контролем транс-сиалидазной активности в присутствии GQ1в.

Акцепторную специфичность фермента изучали, также, с использованием разных типов синтетических гликоконъюгатов. Донором сиаловой кислоты служил радиоактивно меченный фетуин, ковалентно связанный с сефарозой. Данные по скорости переноса сиаловой кислоты транс-сиалидазой на различные гликоконъюгаты представлены в Таблице 13. Наибольшая скорость переноса сиаловой кислоты наблюдалась при использовании в качестве акцептора гликоконъюгаты Льюис<sup>a</sup> и Льюис<sup>x</sup>. Был также показан перенос сиаловой кислоты на связанные с полиакриламидом лактозу, N-ацетиллактозамин (LacNAc) и N-ацетилгалактозамин ( $\alpha$ GalNAc). Транс-сиалидаза активно переносила сиаловую кислоту и на Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ -ПAA – аналог фрагмента углеводных О-цепей гликопротеидов. Из представленных в Таблице 13 данных следует, что сиаловая кислота может переноситься на (Neu5Ac $\alpha$ 2-8)<sub>2</sub>-ПAA, но не на свободную полисиаловую кислоту. Не было обнаружено переноса сиаловой кислоты на свободную лактозу и полиакриламид.

Таким образом, наилучшим акцептором сиаловой кислоты, среди исследованных гликофинголипидов, является лактозилцерамид, содержащий терминальную галактозу и не имеющий в своем составе сиаловой кислоты. Ганглиозиды, содержащие одну или две сиаловых кислоты, также являются хорошими акцепторами.

Таблица 12 - Скорость переноса сиаловой кислоты на сиалированные и десиалированные липопротеиды плазмы крови

| Липопротеиды | Подфракция      | Активность<br>транс-сиалидазы,<br>пмоль/мг<br>фермента/мин. |
|--------------|-----------------|-------------------------------------------------------------|
| Контроль     |                 | 0,39±0,04                                                   |
| ЛОНП         | Сиалированные   | 0,58±0,03*                                                  |
|              | Десиалированные | 0,77±0,09*                                                  |
| ЛПП          | Сиалированные   | 0,79±0,08*                                                  |
|              | Десиалированные | 1,36±0,05*                                                  |
| ЛНП          | Сиалированные   | 1,09±0,06*                                                  |
|              | Десиалированные | 2,48±0,14*                                                  |
| ЛВП          | Сиалированные   | 0,44±0,04                                                   |
|              | Десиалированные | 0,83±0,07*                                                  |

Данные представлены в виде среднего трёх определений ±S.E.M.

\* - достоверное отличие от контроля,  $p < 0,05$ .

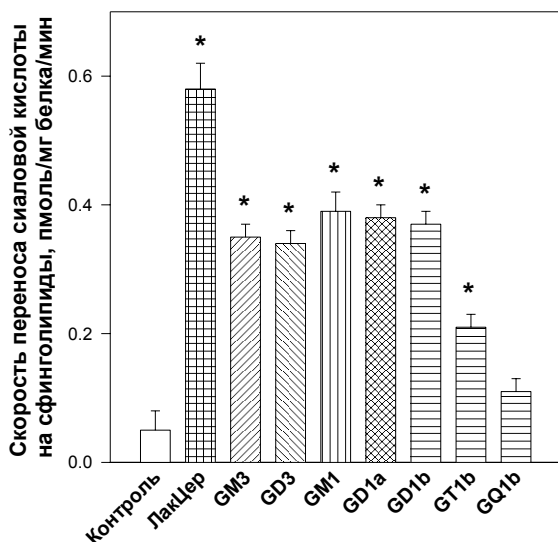


Рисунок 58. Скорость переноса сиаловой кислоты с фетуин-сефарозы на лактозилцерамид и ганглиозиды

Реакционную смесь, содержащую в финальном объеме 0,2 мл: 0,01 мл меченой по сиаловой кислоте фетуин-сефарозы (5 мкг белка, 145000 расп./мин), 100 нмоль лактозилцерамида или ганглиозида, 50 мМ трис-HCl (pH 7,0), 1 мМ ДТТ, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, 5 мкг/мл транс-сиалидазы, инкубировали 8 час при 37°C. После инкубации реакционную смесь экстрагировали, и ганглиозиды разделяли ТСХ. Позиции гликолипидов определяли сканирующей денситометрией и участки силикагеля, соответствующие ганглиозидам соскребали и измеряли радиоактивность.

ЛакЦер, лактозилцерамид.

Данные представлены в виде среднего трех определений  $\pm$  стандартное математическое отклонение.

\* - достоверное отличие от контроля,  $p < 0,05$



Таблица 13 - Скорость переноса радиоактивно меченной сиаловой кислоты с фетуина на различные гликоконъюгаты

| Акцептор сиаловой кислоты      | Транс-сиалидазная активность, % от контроля. |
|--------------------------------|----------------------------------------------|
| Контроль                       | 100±8                                        |
| Льюис <sup>x</sup> –ПАА        | 450±34*                                      |
| Льюис <sup>a</sup> -ПАА        | 581±46*                                      |
| Лас-ПАА                        | 426±30*                                      |
| LacNAc-PAА                     | 418±46*                                      |
| αGalNAc-PAА                    | 354±20*                                      |
| Galβ1-3GalNAcα-ПАА             | 394±32*                                      |
| (Neu5Acα2-8) <sub>2</sub> -ПАА | 224±30*                                      |
| (Neu5Acα2-8) <sub>3</sub>      | 95±10                                        |
| Лактоза                        | 98±8                                         |
| Полиакриламид (ПАА)            | 103±7                                        |

Данные представлены в виде среднего трёх определений ±S.E.M.

\* - достоверное отличие от контроля, p<0,5.

Для определения типа связи, образуемой сиаловой кислотой, при переносе на акцептор были использованы лектин EBL, преимущественно связывающийся с терминальной сиаловой кислотой, присоединенной к галактозе α2-6 связью, а также лектин MAL, специфичный к α2-3 гликозидной связи. В качестве субстрата использовали фетуин. На Рисунке 59 видно, что транс-сиалидаза образовывала как α2-6, так и α2-3 гликозидную связь.

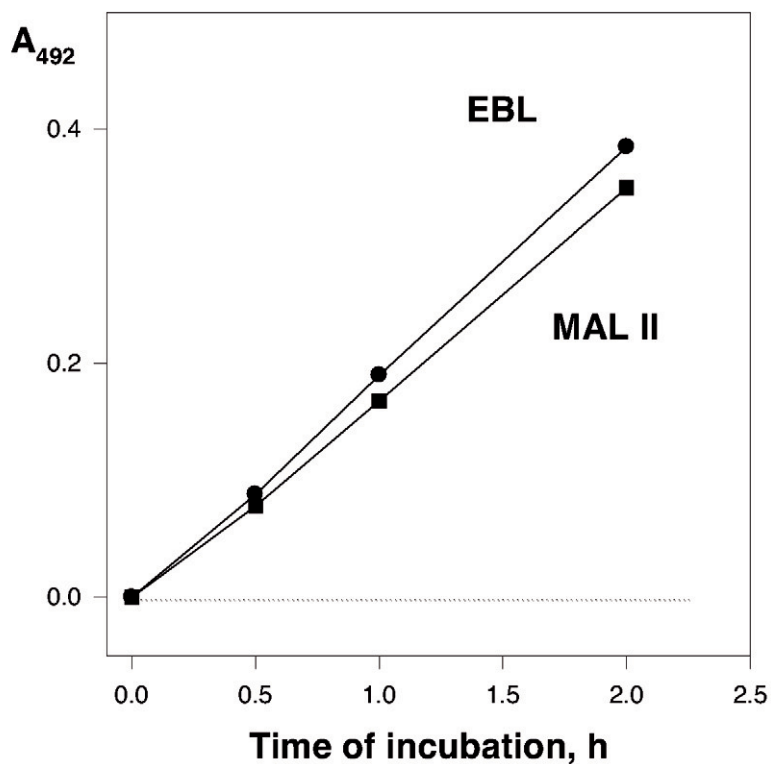


Рисунок 59 – Определения типа связи, образуемой сиаловой кислотой при переносе на акцептор

На Рисунке 60 приведены данные о влиянии нативных и обработанных транс-сиалидазой ЛНП на содержание суммарного холестерина в субэндотелиальных клетках, культивируемых из непораженной интимы аорты человека. Было показано, что нативные (сиалированные) липопротеиды низкой плотности не

вызывали достоверного накопления липидов клетками во всех исследованных концентрациях.

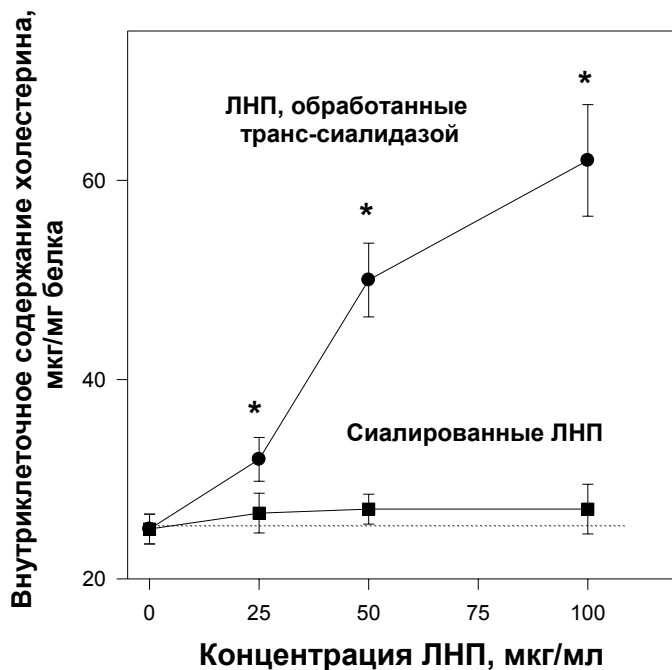


Рисунок 60 - Влияние сиалированных и обработанных транс-сиалидазой ЛНП на содержание суммарного холестерина в клетках, культивируемых из непораженной интимы аорты человека

Данные представлены в виде среднего трех определений  $\pm$  стандартное математическое отклонение.

\* - достоверное отличие от контроля,  $p < 0,05$ .

Инкубация ЛНП с транс-сиалидазой в присутствии десиалированного фетуина приводила к тому, что до 60% липопротеидных частиц становились десиалированными. Как следствие, обработанные ферментом ЛНП в концентрациях 25-100 мкг/мл вызывали 1,3-2,4 – кратное накопление холестерина субэндотелиальными клетками непораженной интимы. Можно заключить, что воздействие транс-сиалидазы плазмы крови человека на ЛНП приводит к появлению у них атерогенных свойств. Таким образом, в плазме крови человека открыт новый фермент – нативная транс-сиалидаза, способная вызывать атерогенную модификацию циркулирующих в кровотоке липопротеидов низкой плотности.

## **6.8. Клеточный метаболизм липопротеидов**

Для выяснения механизмов накопления внутриклеточных липидов, вызванного цмЛНП, были использованы два подхода: 1) изучение связывания, захвата и деградации  $^{125}\text{I}$ -меченного апоВ липопротеидов в субэндотелиальных клетках нормальной и атеросклеротической интимы аорты человека, и 2) изучение скоростей гидролиза и этерификации радиоактивно-меченых липидов, включенных в частицы ЛНП.

### **6.8.1. Связывание и захват $^{125}\text{I}$ -ЛНП клетками**

Скорости захвата нативных ЛНП и цмЛНП изучали на субэндотелиальных клетках, культивируемых из нормальной интимы аорты человека и атеросклеротических поражений, таких как жировые полосы и атеросклеротические бляшки. Захват йод-

меченых нативных ЛНП клетками, культивируемыми из атеросклеротической интимы, был таким же, как и захват липопропротеидов клетками непораженной интимы (Таблица 14). Захват цмЛНП клетками нормальной интимы превосходил захват нативных ЛНП в 3,5-4,5 раза. Захват цмЛНП клетками, полученными из жировых полос, в 6 раз превышал захват нативных ЛНП. Захват нативных и множественно-модифицированных ЛНП клетками, культивируемыми из атеросклеротических бляшек, был таким же, как и у клеток из жировых полос. Таким образом, захват цмЛНП в несколько раз превышает захват нативных липопропротеидов, что особенно наглядно проявляется при использовании клеток из областей атеросклеротических поражений.

Усиленный захват цмЛНП может быть обусловлен их повышенным связыванием с компонентами клеточной поверхности. Действительно, связывание цмЛНП клетками из непораженной и атеросклеротической интимы было в 2-4 раза выше, чем связывание нативных липопропротеидов (Таблица 14).

Анализ концентрационных зависимостей связывания липопропротеидов нормальными и атеросклеротическими клетками показал, что в отличие от нативных ЛНП, связывание цмЛНП не имеет насыщения, что указывает на наличие дополнительных мест связывания с низкой аффинностью. Тот факт, что связывание цм<sup>125</sup>I-ЛНП клетками лишь частично подавлялось 20-кратным избытком немеченых нативных ЛНП и антителами против рецептора к нативным ЛНП (C<sub>7</sub>), также свидетельствует о дополнительных местах связывания модифицированных липопропротеидов.

Таблица 14. Связывание, захват и деградация нативных и модифицированных ЛНП клетками, культивируемыми из непораженной и атеросклеротической интимы аорты человека

| ЛНП                        | Связывание<br>ЛНП | Захват ЛНП | Деградация<br>ЛНП |
|----------------------------|-------------------|------------|-------------------|
| нг/мг клеточного белка     |                   |            |                   |
| Непораженная интима        |                   |            |                   |
| Нативные ЛНП               | 95±4              | 1148±84    | 6248±345          |
| ЦмЛНП                      | 178±6*            | 2658±187*  | 3905±307*         |
| Липидная полоса            |                   |            |                   |
| Нативные ЛНП               | 98±6              | 1215±106   | 4148±189          |
| ЦмЛНП                      | 315±21*           | 6178±187*  | 1764±106*         |
| Атеросклеротическая бляшка |                   |            |                   |
| Нативные ЛНП               | 97±8              | 1108±109   | 4207±223          |
| ЦмЛНП                      | 307±20*           | 6095±194*  | 1605±93*          |

\* - достоверное отличие от нативных ЛНП,  $p < 0,05$ .

Наличие у десалирированных цмЛНП терминальной галактозы позволяло предположить, что модифицированные липопротеиды будут связываться с асиалогликопротеид-рецептором. Действительно было обнаружено, что 50 мМ галактоза, а также обработанный нейраминидазой, но не нативный, фетуин подавляли связывание цмЛНП культивируемыми клетками. Связывание нативных ЛНП клетками под действием этих агентов не изменялось. Эти результаты демонстрируют способность цмЛНП связываться с асиалогликопротеид-рецептором субэндотелиальных клеток.

Для проверки возможности связывания цмЛНП со скевенджер-рецептором субэндотелиальных клеток интимы аорты,  $^{125}\text{I}$ -ЛНП инкубировали с 20-кратным избытком немеченых ацетилированных ЛНП. Избыток ацетилированных ЛНП подавлял на 35% связывание меченых цмЛНП, но не влиял на связывание нативных ЛНП. В свою очередь, 20-кратный избыток цмЛНП ингибировал на 30% связывание ацетилированных  $^{125}\text{I}$ -ЛНП. Следовательно, цмЛНП способны конкурировать с ацетилированными ЛНП за связывание со скевенджер-рецептором (Haberland ME et al., 1984). С помощью метода иммуноблоттинга было обнаружено взаимодействие цмЛНП с димером и тримером скевенджер-рецептора, выделенного из линейных макрофагов человека THP-1. Таким образом, цмЛНП способны связываться со скевенджер-рецептором субэндотелиальных клеток и макрофагов.

Для выявления возможного связывания ЛНП с клеточными протеогликанами, клетки обрабатывали ферментами, гидролизующими их полисахаридные цепи: гиалуронидазой, смесью гепариназы и гепаритиназы, а также хондроитиназой. Обработка гиалуронидазой не влияла на связывание нативных ЛНП как нормальными, так и атеросклеротическими клетками. С другой стороны, связывание цмЛНП клетками, обработанными гиалуронидазой, было ниже, чем в случае интактных клеток. Обработка клеток смесью гепариназы и гепаритиназы или хондроитиназой ABC вызывала уменьшение связывания цмЛНП, но не нативных липопротеидов. При этом добавление в инкубационную среду липопротеидлипазы, образующей комплексы как с протеогликанами, так и с ЛНП, не изменяло связывания липопротеидов. Полученные данные свидетельствуют, что цмЛНП, в отличие от нативных липопротеидов, связываются с поверх-

ностными протеогликанами нормальных и атеросклеротических клеток, и это связывание не опосредовано липопротеидлипазой.

Таким образом, увеличенное связывание и захват цмЛНП клетками, могут объясняться их дополнительным связыванием со скевенджер-рецептором, асиалогликопротеид-рецептором, а также клеточными протеогликанами.

### **6.8.2. Внутриклеточная деградация аполипопротеина В**

Скорость деградации цмЛНП в нормальных клетках была в 1,5-2 раза ниже, чем скорость деградации нативных ЛНП (Таблица 14). В клетках, культивируемых из жировых полос и атеросклеротических бляшек, различие в скоростях гидролиза нативных ЛНП и цмЛНП было еще более выраженными - в 3-4 раза.

Для выяснения причин низкой скорости деградации цмЛНП были использованы гомогенаты субэндотелиальных клеток нормальной и атеросклеротической интимы аорты человека, что позволило изучать процессы протеолиза при различных рН среды и при добавлении агентов, плохо проникающих в интактные клетки, а также измерять активности протеолитических ферментов.

Прежде всего, было установлено, что и в клеточных гомогенатах деградация йод-меченого апобелка цмЛНП идет медленнее, чем деградация апобелка нативных ЛНП. Было обнаружено наличие двух рН-оптимумов для гидролиза апобелка - 4,0 и 5,5. При этом были продемонстрированы различия в скоростях деградации нативных ЛНП и цмЛНП при этих рН-оптимумах, что предполагает участие разных протеиназ в де-



градации апобелка нативных и модифицированных липопротеидов.

Для выяснения вопроса о том, какие протеиназы принимают участие в деградации белковой части нативных ЛНП и цмЛНП, были использованы ингибиторы основных лизосомальных протеиназ. Ингибиторы тиольных (йодоацетамид), сериновых (соевый ингибитор трипсина, фенилметансульфонилфторид) и металло-протеиназ (1,10-фенантролин), а также катепсина В и А (леупептин и антипаин) вызывали 20-80% ингибирование гидролиза апоВ нативных и модифицированных ЛНП. При этом катепсин А вовлечен в деградацию апобелка цмЛНП, но не нативных ЛНП. Пепстатин А, ингибитор карбокси-протеиназы - катепсина Д - полностью подавлял деградацию апоВ обоих типов липопротеидов. Кинетические исследования показали, что первоначальный гидролиз апоВ катепсином Д необходим для дальнейшей деградации апобелка другими протеиназами.

Измерение активностей протеолитических ферментов обнаружило достоверное 1,5-2-кратное снижение активностей катепсинов Д, В и А в гомогенатах атеросклеротических клеток, по сравнению с клетками, полученными из нормальной интимы.

Таким образом, как в нормальных, так и в атеросклеротических клетках скорость деградации захваченных цмЛНП ниже, чем скорость деградации нативных липопротеидов. Усиленный захват и низкая скорость внутриклеточной деградации приводят к тому, что цмЛНП накапливаются в субэндотелиальных клетках интимы аорты человека. Накопление липопротеидных частиц с недеградированным или частично деградированным апобелком ведет к появлению в клетке значительного пула липидов, и, в первую очередь, свободного и этерифицированного холестерина.

на, которые могут служить основой формирования липидных включений.

### **6.8.3. Метаболизм липидов липопротеидов**

Для изучения катаболизма эфиров холестерина липопро-  
теидов в состав нативных ЛНП и цмЛНП был введен  $^3\text{H}$ -  
холестерил линолеат. За время 24-часовой инкубации с мече-  
ными цмЛНП клетки нормальной интимы захватывали в 2 раза  
больше  $^3\text{H}$ -холестерил линолеата, чем при инкубации с натив-  
ными ЛНП. В случае атеросклеротических клеток эта разница  
достигала 3-5 раз. При этом доля гидролизованного эфира хо-  
лестерина нативных ЛНП составляла 80% как для нормальных,  
так и для атеросклеротических клеток. Доля гидролизованного  
 $^3\text{H}$ -холестерил линолеата цмЛНП составляла 40% для нор-  
мальных клеток и 25% для атеросклеротических клеток. Следо-  
вательно, скорость гидролиза эфиров холестерина цмЛНП в  
субэндотелиальных клетках нормальной и атеросклеротической  
интимы аорты человека существенно ниже, по сравнению с на-  
тивными липопротеидами.

Для измерения скорости этерификации холестерина инти-  
мальные клетки инкубировали в присутствии  $^{14}\text{C}$ -меченой олеи-  
новой кислоты. Было показано, что скорость этерификации хо-  
лестерина, как в нормальных, так и в атеросклеротических  
клетках, инкубируемых с цмЛНП в 2-3 раза выше, чем в случае  
нативных ЛНП. Таким образом, цмЛНП стимулируют внутрикле-  
точную этерификацию свободного холестерина. Это, а также  
тот факт, что эфиры холестерина, попавшие в клетку в составе  
цмЛНП, имеют сниженную скорость гидролиза объясняет внут-

риклеточное накопление эфиров холестерина в субэндотелиальных клетках интимы аорты человека.

## **6.9. Механизмы усиления атерогенного потенциала циркулирующих множественно-модифицированных ЛНП**

Теоретические расчеты, основанные на экспериментально измеренных скоростях захвата и деградации ЛНП, показывают что, в случае нативных ЛНП, время необходимое клетке нормальной интимы для накопления такого количества холестерина, чтобы стать пенистой, составляет около 130 лет. Этот расчет произведен при условии, что весь захваченный холестерин остается внутри клеток. В случае цмЛНП, время накопления холестерина должно составить около 15 лет. Данные ангиографических и ультразвуковых исследований свидетельствуют, что время образования атеросклеротической бляшки, закрывающей половину просвета сонной артерии, может составлять несколько недель или месяцев. Следовательно, есть основания предполагать, что скорость образования пенистых клеток, формирующих атеросклеротические поражения, должна быть много больше, чем следует из теоретических расчетов. Следует предположить, что для цмЛНП могут существовать дополнительные механизмы усиления их атерогенности. Обнаружено, по крайней мере, три таких механизма: образование ассоциатов липопротеидов, формирование ЛНП-содержащих иммунных комплексов и образование липопротеидами комплексов с компонентами соединительнотканного матрикса.

### 6.9.1. Ассоциация модифицированных ЛНП

Было обнаружено, что *in vivo* и *in vitro* модифицированные ЛНП спонтанно ассоциируют в условиях культуры клеток (Tertov VV et al., 1995d). Нативные ЛНП такой способностью не обладали. Показано, что атерогенные свойства препаратов модифицированных ЛНП прямо коррелируют со степенью ассоциации липопротеидов (Tertov VV et al., 1989a; 1992e). Выделенные с помощью гель-фильтрации ассоциаты липопротеидов вызывали драматическое накопление липидов в субэндотелиальных клетках интимы аорты человека. Удаление ассоциатов ЛНП из инкубационной среды с помощью фильтрации через фильтры с диаметром пор 0,1 мкм практически полностью препятствовало накоплению внутриклеточных липидов. Таким образом, ассоциация цмЛНП приводит к усилению их атерогенного потенциала.

Эксперименты с использованием йод-меченых ассоциатов липопротеидов, показали, что скорость захвата ассоциатов ЛНП в 5-20 раз превосходит захват неассоциированных липопротеидных частиц (Tertov VV et al., 1992f). При этом цитохалазин В - ингибитор клеточного фагоцитоза, а также шарики латекса - объект фагоцитоза подавляли захват ассоциатов клетками (Tertov VV et al., 1992b). Эти данные свидетельствуют о том, что захват ассоциатов липопротеидов клетками осуществляется путем фагоцитоза. Скорость деградации апоВ ассоциатов модифицированных ЛНП была в 2-5 раз ниже, чем скорость деградации апоВ индивидуальных частиц тех же липопротеидов. Таким образом, высокая атерогенность ассоциатов липопротеидов объясняется высокой скоростью их захвата путем фагоцитоза и низкой скоростью внутриклеточной деградации.

### 6.9.2. Образование циркулирующих иммунных комплексов

Множественная модификация липопротеидных частиц предполагает формирование антигенов, против которых могут быть образованы аутоантитела. Действительно, в крови большинства пациентов с коронарным атеросклерозом были обнаружены циркулирующие иммунные комплексы, состоящие из ЛНП и аутоантител к ним (Tertov VV et al., 1990b,c). Было показано, что количество ЛНП-содержащих циркулирующих иммунных комплексов прямо коррелирует со степенью развития коронарного атеросклероза и атеросклероза других локализаций (Kacharava AG et al., 1993; Orekhov AN et al., 1991b; 1995).

С помощью аффинной хроматографии на агарозе, с ковалентно-присоединенными козьими поликлональными антителами против ЛНП человека, из циркулирующих иммунных комплексов были выделены ЛНП для последующего изучения их свойств (Tertov VV et al., 1996b). ЛНП из циркулирующих иммунных комплексов представляют собой десилированные, мелкие, плотные частицы с повышенным электроотрицательным зарядом, низким содержанием нейтральных липидов и фосфолипидов, нейтральных сахаров, третичная структура апобелка которых нарушена. Таким образом, ЛНП из циркулирующих иммунных комплексов идентичны по своим свойствам липопротеидам подфракции цмЛНП.

С помощью аффинной хроматографии на агарозе, с ковалентно-присоединенными ЛНП, из плазмы крови пациентов с коронарным атеросклерозом были выделены аутоантитела против модифицированных ЛНП (Orekhov AN et al., 1991c). Аутоантитела представляли собой иммуноглобулины класса G с изоэлектрической точкой (pI) близкой к 8,5. Антитела взаимо-

действовали с белковой, но не с липидной, частью ЛНП. Аутоантитела были способны связываться с нативными, гликозилированными, ацетилированными, окисленными ЛНП, однако проявляли наибольшее сродство к ЛНП, обработанным малоновым диальдегидом, ЛНП пациентов с коронарным атеросклерозом и десиалированным липопротеидам.

Аутоантитела, взаимодействуя с нативными ЛНП, придавали им атерогенные свойства, а формируя комплексы с цмЛНП, существенно усиливали их атерогенный потенциал (Orekhov AN et al., 1991c). Связывание с образованным комплексом ЛНП-аутоантитело С1q-компонента комплемента и фибронектина приводило к еще более выраженному накоплению липидов в субэндотелиальных клетках непораженной интимы аорты человека.

### **6.9.3. Формирование комплексов ЛНП с компонентами соединительнотканного матрикса**

Было показано, что ЛНП способны образовывать комплексы с клеточным дебрисом, коллагеном, эластином и протеогликанами интимы аорты человека (Orekhov AN et al., 1987b; 1989a). Добавление таких комплексов к культивируемым клеткам вело к усиленному накоплению внутриклеточных липидов. В экспериментах с йод-мечеными ЛНП было установлено, что липопротеиды в составе комплексов захватываются быстрее (путем фагоцитоза), а деградируют медленнее, по сравнению с индивидуальными липопротеидными частицами.

Итак, образование цмЛНП крупных комплексов (ассоциатов, иммунных комплексов, комплексов с компонентами соединительнотканного матрикса) и их усиленный захват клетками

при низкой скорости деградации ведут к повышению атерогенного потенциала липопротеидов.

#### **6.10. Роль модифицированных липопротеидов в атерогенезе**

Итак, в крови людей была обнаружена подфракция липопротеидов низкой плотности, способная вызывать накопление липидов и, в первую очередь, эфиров холестерина в субэндотелиальных клетках непораженной интимы аорты человека. Таким образом, была преодолена парадоксальная ситуация: нативные ЛНП не вызывают отложения внутриклеточного жира, а *in vitro* модифицированные ЛНП не обнаружены в кровотоке.

Удалось показать, что атерогенные ЛНП характеризуются многочисленными изменениями в углеводной, белковой и липидной составляющих и могут быть названы множественно-модифицированными ЛНП. Множественная модификация происходит в плазме крови человека.

Продемонстрировано, что циркулирующие множественно-модифицированные ЛНП теряют сродство к В,Е-рецептору, однако, приобретают способность взаимодействовать с рядом других мембранных рецепторов и компонентов. Усиленный захват клетками модифицированных ЛНП, низкая скорость деградации липопротеидных частиц и гидролиза их эфиров холестерина, а также стимуляция этерификации свободного холестерина являются причинами внутриклеточного накопления эфиров холестерина, образующих липидные включения, характерные для атеросклеротических клеток. Этот процесс может быть усилен формированием множественно-модифицированными ЛНП крупных комплексов (ассоциатов, иммунных комплексов, ком-

плексов с компонентами матрикса и т.д.), захватываемых клетками путем фагоцитоза. Помимо накопления эфиров холестерина множественно-модифицированные ЛНП стимулируют точную пролиферацию и синтез компонентов соединительнотканного матрикса.

Таким образом, открыты и изучены модифицированные ЛНП, способные вызывать все проявления атеросклероза на клеточном уровне.

### **6.11. Особенности атерогенной модификации липопротеидов при сахарном диабете**

Поздние осложнения сахарного диабета включает разнообразные клинические синдромы, главным образом связанные с поражением сосудистой стенки крупных и мелких артерий, то есть макро- и микроангиопатии. Предполагают, что макроангиопатии являются поражениями атеросклеротического характера (Burchfiel CM et al., 1993), хотя при этом отмечаются некоторые патоморфологические изменения, специфические для сахарного диабета (Ledet T et al., 1990). Преждевременное развитие и ускоренное прогрессирование атеросклероза является характерной особенностью сахарного диабета, что было определено установлено в эпидемиологических исследованиях (Koskinen P et al., 1992; Valsania P et al., 1991). Кроме того, осложнения со стороны сердечнососудистой системы остаются ведущей причиной в структуре инвалидизации и смертности у больных инсулинзависимым и инсулиннезависимым сахарным диабетом (Kannel WB & Larson M, 1993; Krolewski AS et al., 1991). Тем не менее, механизмы ускоренного атерогенеза при сахарном диабете остаются неустановленными.



### 6.11.1. Атерогенность ЛНП при сахарном диабете

Было установлено, что сыворотка крови больных сахарным диабетом, как правило, обладает атерогенными свойствами (Slavina ES et al., 1987). Атерогенность сыворотки крови выявляется в 55% случаев при сахарном диабете 1 типа (инсулинзависимом) и в 90% случаев при сахарном диабете 2 типа (инсулиннезависимом). В среднем накопление холестерина, вызванное сывороткой крови больных сахарным диабетом, составляло 75% от исходного уровня внутриклеточного холестерина (Sobenin IA et al., 1993). Возник вопрос, насколько связаны атерогенные свойства сыворотки крови с ее липопротеидными компонентами. Для решения этого вопроса из исходно атерогенной сыворотки крови больных сахарным диабетом были выделены липопротеиды очень низкой (ЛОНП), низкой (ЛНП) и высокой (ЛВП) плотности. Липопротеид-дефицитная сыворотка (лишенная всех липидсодержащих частиц) полностью утрачивала свой атерогенный потенциал. Из всех классов липопротеидов, выделенных из сыворотки крови, только ЛНП обладали выраженным атерогенным эффектом. Оказалось также, что ЛНП, полученные из неатерогенных сывороток крови, не вызывали накопления внутриклеточных липидов. Напротив, ЛНП, выделенные из атерогенных сывороток крови, в 90% случаев были также атерогенны. Имелась достоверная положительная корреляция между атерогенными эффектами сывороток крови и соответствующих им ЛНП ( $r=0.89$ ,  $p<0.001$ ) (Sobenin IA et al., 1993). Таким образом, атерогенные свойства сыворотки крови больных сахарным диабетом обусловлены, прежде всего, липопротеидами низкой плотности. Эти данные явились также определенным указанием на существование модифицированных

ЛНП при сахарном диабете, поскольку нативные ЛНП здоровых лиц не вызывали накопления внутриклеточных липидов.

### **6.11.2. Неферментативное гликозилирование ЛНП при сахарном диабете**

Неферментативное гликозилирование белков - это комплекс последовательных химических реакций, приводящий к образованию стабильных ковалентных связей между молекулами глюкозы и свободными аминогруппами белка. При сахарном диабете гипергликемия приводит к нарастанию содержания продуктов неферментативного гликозилирования, что также проявляется в повышенном содержании фруктозиллизина в ЛНП больных диабетом (Kim HJ & Kurup IV, 1982). Было установлено, что при сахарном диабете происходит усиленное неферментативное гликозилирование всех классов апобелков липопротеидов, включая апо-В, основной белок ЛНП (Curtiss LK & Witztum JL, 1985). В результате гликозилирования *in vitro* ЛНП приобретают способность вызывать накопление эфиров холестерина в культивируемых моноцитах-макрофагах человека (Lopes-Virella MF et al., 1988). Такой же эффект гликозилированные *in vitro* ЛНП оказывают в культуре клеток интимы аорты человека (Tertov VV et al., 1989a). В процессе неферментативного гликозилирования *in vitro* содержание продуктов гликозилирования в ЛНП повышается в 2-2,5 раза, и это приводит к появлению атерогенных свойств у ЛНП, выражающихся в умеренном, но статистически достоверном накоплении холестерина в культивируемых клетках (Lopes-Virella MF et al., 1988). Гликозилирование ЛНП сопровождается эквимольным снижением содержания свободных аминогрупп, поскольку глюкоза реагирует пре-

имущественно с  $\epsilon$ -аминогруппами лизина, образуя шиффовы основания, а впоследствии - кетоамины, или продукты Амадори. Считают, что именно свободные лизиновые остатки играют существенную роль в определении третичной структуры аполипопротеина В, и снижение их количества может серьезно нарушать клеточный метаболизм гликозилированных ЛНП (Haberland ME et al., 1984). ЛНП, выделенные из крови больных сахарным диабетом 1 типа, были способны усиливать синтез эфиров холестерина в культивируемых человеческих моноцит-макрофагах, вызывая накопление внутриклеточного холестерина, и этот эффект коррелировал со степенью неферментативного гликозилирования липопротеидов (Lyons TJ et al., 1987). Действительно, ЛНП при сахарном диабете характеризуются повышением содержания продуктов неферментативного гликозилирования в среднем на 25% по сравнению с нормальным уровнем, наблюдаемым у здоровых лиц (Sobenin IA et al., 1993). Имеется статистически значимая положительная корреляция между содержанием фруктозиллизина в ЛНП больных диабетом и их атерогенным эффектом ( $r=0.57$ ,  $p<0.01$ ) (Sobenin IA et al., 1993). Таким образом, неферментативное гликозилирование, действительно, представляет собой атерогенную модификацию ЛНП, происходящую при сахарном диабете.

Следует отметить, что повышение уровня гликозилированного апо-В при сахарном диабете невелико, и атерогенный эффект гликозилированных ЛНП можно считать весьма умеренным. Поэтому процессам неферментативного гликозилирования при сахарном диабете вряд ли можно приписать ведущую роль в возникновении и прогрессировании атеросклеротических поражений. Были предприняты многочисленные исследования для установления роли гликозилированных ЛНП в атерогенезе.

Существует предположение, что в результате неферментативного гликозилирования нарушается метаболизм ЛНП, что проявляется в сниженном сродстве ЛНП к классическому ЛНП-рецептору (Witztum JL et al., 1982), замедленном клиренсе ЛНП в плазме крови (Wiklund O et al., 1987), повышенном захвате ЛНП макрофагами, усиленном ковалентном связывании ЛНП с компонентами соединительнотканного матрикса сосудистой стенки (Brownlee M et al., 1985), и генерации свободных радикалов, участвующих в окислительном повреждении липидной и белковой составляющих липопротеидной частицы (Bucala R et al., 1993). Тем не менее, реальная роль неферментативно гликозилированных ЛНП в развитии атеросклероза окончательно не выяснена.

### **6.11.3. Десиалированные ЛНП при сахарном диабете**

Оказалось, что сниженное содержание сиаловой кислоты в ЛНП наблюдается не только при атеросклерозе, о чем говорилось выше, но и в 90% случаев при сахарном диабете. В среднем уровень сиаловой кислоты в ЛНП больных диабетом на 30% ниже по сравнению с липопротеидами здоровых лиц (Sobenin IA et al., 1993). Была выявлена статистически достоверная отрицательная корреляция между содержанием сиаловой кислоты и атерогенным эффектом ЛНП больных сахарным диабетом ( $r=-0.51$ ,  $p<0.001$ ) (Sobenin IA et al., 1993). Эти данные позволили предположить, что десиалирование (а также любой процесс, приводящий к образованию ЛНП с низким содержанием сиаловой кислоты) является дополнительным, если не ведущим, в модификации ЛНП при сахарном диабете. Механизм десиалирования до настоящего времени не установлен. При

атеросклерозе, как и при сахарном диабете, не выявлено повышения нейраминидазной активности в плазме крови, хотя повышенное содержание свободной сиаловой кислоты в плазме наблюдается при ряде патологических состояний, в том числе при атеросклерозе (Lindberg G et al., 1993). С другой стороны, десиалированные ЛНП могут появляться в кровотоке в результате нарушенного посттрансляционного гликозилирования апо-В в гепатоцитах. Подобный механизм до настоящего времени не исследован, и возможность такого способа модификации остается чисто теоретической. Предварительные данные, полученные в результате исследования метаболизма ЛНП с помощью меченых предшественников, позволяют предположить, что десиалированные ЛНП являются стареющими липопротеидами (Orekhov AN et al., 1991d); в этом случае десиалирование может происходить в результате длительной циркуляции частиц или их секвестрирования в тканях.

#### **6.11.4. Гетерогенность ЛНП при сахарном диабете**

Установлено, что ЛНП больных сахарным диабетом можно разделить путем аффинной хроматографии на две фракции, а именно, сиалированные и десиалированные ЛНП, подобно тому, как разделяются ЛНП, выделенные из крови больных с подтвержденным атеросклерозом. В среднем содержание десиалированных ЛНП при сахарном диабете составляло 35% от общего пула ЛНП, что было в 3 раза выше по сравнению с показателями, наблюдаемыми у здоровых лиц (Sobenin IA et al., 1993;1994).

Сиалированные ЛНП, несвязывающиеся с аффинным сорбентом, были практически идентичны нативным ЛНП здоро-

вых лиц. Они характеризовались нормальным содержанием сиаловой кислоты, свободного и этерифицированного холестерина, продуктов неферментативного гликозилирования, имели нормальную электрофоретическую подвижность в агарозном геле, а также нормальные размер и плотность липопротеидных частиц. Такие ЛНП не вызывали накопления холестерина в культивируемых клетках интимы аорты человека, то есть были неатерогенны, хотя и были выделены из исходно атерогенного препарата ЛНП (Sobenin IA et al., 1993; 1994).

Существенные различия в физико-химических параметрах были выявлены для десиалированных ЛНП. Помимо сниженного на 25-60% содержания сиаловой кислоты, такие ЛНП имели низкое содержание нейтральных липидов (преимущественно эфиров холестерина) и повышенное содержание лизоформ фосфолипидов (Sobenin IA et al., 1993, 1994). Десиалированные ЛНП оказались также и неферментативно гликозилированными, так как содержали в 1,3-1,7 раз больше фруктозиллизина по сравнению с сиалированными ЛНП. Было установлено, что одновременная модификация нативных ЛНП двумя способами (например, десиалирование и неферментативное гликозилирование) приводит к появлению чрезвычайно высокого атерогенного потенциала липопротеидов (Sobenin IA et al., 1991). Иными словами, десиалирование и гликозилирование оказывают синергическое атерогенное действие. Можно предположить, что именно десиалированные ЛНП, являясь в тоже время гликозилированными липопротеидами, обеспечивают атерогенные свойства всего пула ЛНП у больного сахарным диабетом. Действительно, фракция десиалированных ЛНП вызвала 2,5-4,7-кратное повышение содержания внутриклеточного холестерина, в то время как исходные препараты ЛНП повышали уровень хо-

лестерина в клетках в 1,4-2,3 раза (Sobenin IA et al., 1993; 1994). Более низкий атерогенный потенциал исходного препарата ЛНП может быть объяснен присутствием в нем значительной доли немодифицированных (нативных) ЛНП.

Были получены дополнительные характеристики фракции модифицированных (десиалированных) ЛНП при сахарном диабете. С помощью нативного электрофореза в полиакриламидном градиентном геле было установлено, что средний размер частиц десиалированных ЛНП на 0,5-2,3 нм меньше, чем у салированных ЛНП (Sobenin IA et al., 1996). Десиалированные ЛНП также характеризовались повышенной гидратированной плотностью, что было установлено с помощью градиентного ультрацентрифугирования (Sobenin IA et al., 1996). Эти данные вполне объяснимы уменьшенным содержанием нейтральных липидов в десиалированных ЛНП. Способность десиалированных ЛНП вызывать накопление внутриклеточного холестерина возрастала в соответствии с повышением гидратированной плотности частиц. Выше указывалось, что присутствие мелких плотных ЛНП в крови человека определенно связано с развитием атеросклероза (Austin MA et al., 1988). Принимая во внимание высокий атерогенный потенциал десиалированных ЛНП, можно предположить, что малый размер и повышенная плотность липопротеидных частиц являются типичным признаком модифицированных ЛНП.

Десиалированные ЛНП больных диабетом также имели более отрицательный поверхностный заряд частиц, что было определено с помощью электрофореза в агарозном геле (Sobenin IA et al., 1996). Следует напомнить, что в крови больных атеросклерозом также имеется фракция электроотрицательных модифицированных атерогенных ЛНП (Avogaro P et al., 1988).

Важно отметить, что различные способы модификации ЛНП *in vitro* (например, ацетилирование, метилирование, окисление ионами переходных металлов, обработка малоновым альдегидом и пр.) приводят к образованию ЛНП с анионными свойствами, способных проявлять атерогенное действие в культуре клеток (Haberland ME et al., 1987). Возможно, что поверхностный заряд липопротеидных частиц играет существенную роль в процессах липопротеид-клеточного взаимодействия, причем изменение заряда может значительно изменять клеточный метаболизм ЛНП, приводя в конечном итоге к накоплению липидов.

Таким образом, в крови больных сахарным диабетом, наряду с нативными ЛНП, имеется фракция модифицированных липопротеидов. Эти липопротеиды являются множественно-модифицированными, поскольку характеризуются целым комплексом нарушений физико-химических свойств, включая низкое содержание сиаловой кислоты и высокий уровень продуктов неферментативного гликозилирования, малый размер и высокую плотность липопротеидных частиц, повышенный отрицательный поверхностный заряд.

Именно множественно-модифицированные ЛНП являются атерогенными, поскольку вызывают массивное накопление липидов в культивируемых клетках. Атерогенные свойства множественно-модифицированных ЛНП позволяют приписывать им существенную роль в раннем развитии атеросклероза при сахарном диабете.



## 7. Дефекты митохондриального генома и атеросклероз

Мы обнаружили тесную связь между дефектами митохондриального генома (митохондриальными мутациями) и атеросклерозом (Sazonova M et al., 2009.; Sobenin IA et al., 2012a,b; Chistiakov DA et al., 2012). Причем, с атеросклерозом коррелируют дефекты митохондриального генома как в клетках артериальной стенки (Sazonova M et al., 2009.; Sobenin IA et al., 2012b), так и в клетках, циркулирующих в крови (Sobenin IA et al., 2012a).

Митохондрии являются полуавтономными органеллами, находящимися в каждой клетке организма человека. В одной клетке может содержаться от 200 до 2000 митохондрий (Veltri KL et al., 1990). Митохондрии являются источником, по крайней мере, 90% энергии, вырабатываемой в клетке (Chance B et al., 1979). Митохондрии называют полуавтономными, потому что, в отличие от других органелл, они имеют свои собственную мтДНК. Митохондриальный геном человека сравнительно небольшой, состоящий только из 16569 пар оснований. Митохондриальный геном кодирует 13 белков, связанных с окислительным фосфорилированием, а также 22 тРНК и 2 рРНК, участвующих в синтезе этих митохондриальных комплексов. Каждая митохондрия содержит 2-10 копий круглой, суперспиральной, двухцепочечной ДНК (Shearman CW et al., 1977).

Наши электронно-микроскопические исследования атеросклеротических поражений у человека выявили существование глубоких структурных изменений митохондрий в клетках атеросклеротических поражений. Эти исследования показали различные степени структурных изменений крист, которые проявляются как в снижении числа крист, так и в изменениях их фор-

мы. Некоторые поврежденные митохондрий были обнаружены в непосредственном контакте с лизосомами, что предполагает формирование аутофагосом, удаляющих поврежденные органеллы из клетки (Рисунок 61). Однако подавляющее большинство измененных митохондрий не были подвержены процессу аутофагии (Рисунок 61). Аутофагия – это естественный механизм избавления клетки от дефектных или старых органелл. В случае митохондрий используется термин «митофагия».

Таблица 15. Мутации мтДНК, связанные с атеросклерозом

| Ген                              | Мутация | Гетероплазмия, %    |                               |
|----------------------------------|---------|---------------------|-------------------------------|
|                                  |         | Непораженная интима | Атеросклеротические поражения |
| ρPНК 12S                         | 652insG | 0                   | 9                             |
| ρPНК 12S                         | A1555G  | 26                  | 8                             |
| τPНК <sup>Leu(UUR)</sup>         | C3256T  | 11                  | 25                            |
| Субъединица 1 NADH дегидрогеназы | T3336C  | 2                   | 12                            |
| Субъединица 2 NADH дегидрогеназы | C5178A  | 17                  | 10                            |
| τPНК <sup>Leu(CUN)</sup>         | G12315A | 10                  | 35                            |
| Субъединица 5 NADH дегидрогеназы | G13513A | 29                  | 43                            |
| Субъединица 6 NADH дегидрогеназы | G14459A | 2                   | 7                             |
| Цитохром В                       | G14846A | 4                   | 10                            |
| Цитохром В                       | G15059A | 34                  | 53                            |

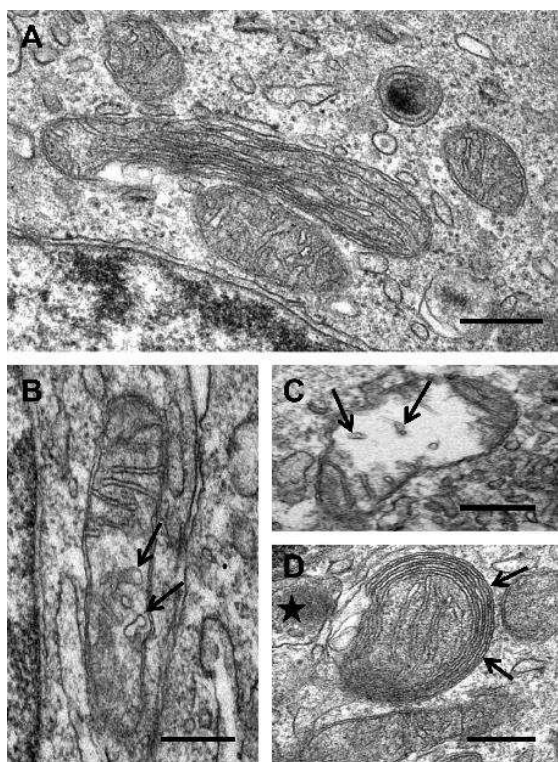


Рисунок 61. Ультраструктура митохондрий в атеросклеротических поражениях аорты человека

(А): неповрежденная митохондрия с четко очерченными кристами и хорошо сохранившимися окружающими мембранами. (В, С): Изменения крист и образование вакуолей (показано стрелками). (D): Аутофагосома, которая содержит митохондрии, окруженные концентрическими миелиноподобными мембранами (показаны стрелками), которые связаны с лизосомой (отмечены звездочкой). Электронная микроскопия; Масштаб = 150 нм (А-D).

Мы провели всесторонний анализ соматических мутаций мтДНК в атеросклеротических поражениях аорты человека. Из 40 проанализировали мутации, мы обнаружили десять, уровни гетероплазмии которых значительно отличались в атеросклеро-

тических поражениях по сравнению с непораженной аортой. В Таблице 15 приведен список этих мутаций.

Кроме того, мы оценили связь между уровнем гетероплазмии мтДНК мутаций С3256Т в клетках белой крови человека и степенью атеросклероза сонных артерий. Коэффициенты корреляций приведены в Таблице 16.

Митохондриальные мутации встречались тем чаще, чем более выраженными были атеросклеротические поражения (Рисунок 62).

По наличию или отсутствию мутаций были выявлены антиатеросклеротический и проатеросклеротический гаплотипы, которые можно применять для оценки генетической предрасположенности к атеросклерозу и его клиническим проявлениям (Таблица 17).

Таблица 16. Митохондриальные мутации, ассоциированные с атеросклерозом

| Ген    | Мутация | Коэффициент корреляции с ТИМ |
|--------|---------|------------------------------|
| MT-TL1 | C→T     | 0,363 **                     |
| MT-ND1 | T→C     | 0,152 *                      |
| MT-TL2 | G→A     | 0,308 **                     |
| MT-ND5 | G→A     | -0,357 **                    |
| MT-ND6 | G→A     | недостаточно                 |
| MT-CYB | G→A (1) | недостаточно                 |
| MT-CYB | G→A (2) | 0,317 **                     |

ТИМ – средняя толщина интима-медиального слоя общих сонных артерий.

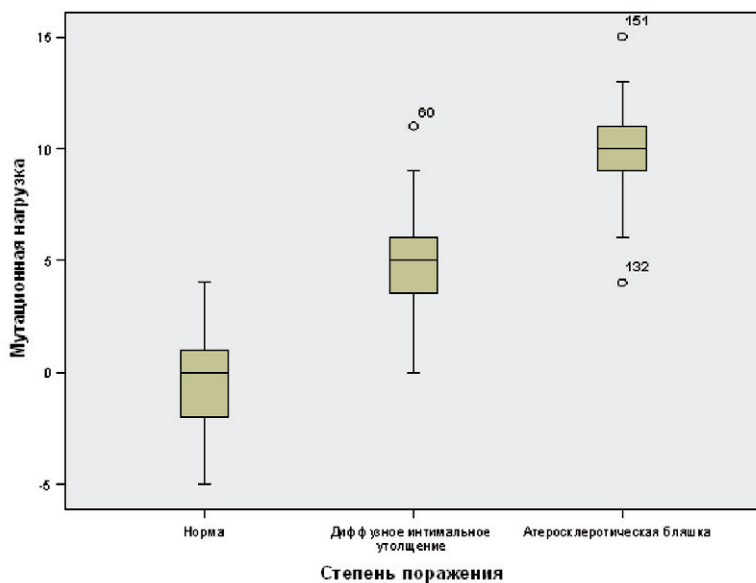


Рисунок 62. Суммарная мутационная нагрузка митохондриального генома лейкоцитов крови и каротидный атеросклероз

## 7.1. Возможные причины связи дефектов митохондриального генома с атеросклерозом

Молекулярно-клеточные механизмы связи атеросклероза с дефектами митохондриального генома не известны. Существуют объяснения такой связи, основанные на общих представлениях о важной роли энергетики и процессов окисления в норме и патологии вообще и при атеросклерозе в частности. Однако такие объяснения не представляют интереса, поскольку не приближают к выяснению истины.

Таблица 17. Гаплотипы мутаций мтДНК и характеристики атеросклероза

| Гаплотип                | Частота,<br>% | Размер<br>бляшки,<br>баллы | ТИМ,<br>мм  | Частота<br>ИБС,<br>% |
|-------------------------|---------------|----------------------------|-------------|----------------------|
| антиатеросклеротический |               |                            |             |                      |
| CTGAG<br>CTGGG<br>TTGGG | 23            | 0,55                       | 0,79        | 18                   |
| проатеросклеротический  |               |                            |             |                      |
| TAAAA<br>TTAGG<br>TCAAA | 40            | 1,18                       | 0,93        | 30                   |
|                         |               | $p < 0,001$                | $p < 0,001$ | $p = 0,14$           |

Мы обратили внимание на то, что в клетках атеросклеротического поражения большинство дефектных митохондрий не подвергается активной митофагии. Это может иметь важное последствие для клетки, содержащей дефектные митохондрии, но неспособной от них избавиться. Следует помнить, что миллиард лет назад бактерии проникли в более высокоразвитые клетки и прочно обосновались в них, полностью потеряв былую самостоятельность и превратившись в клеточные органеллы, которые мы называем теперь митохондриями. Дефектную митохондрию клетка может воспринимать не только как органеллу, от которой надо избавиться путем митофагии, но и ошибочно, как патоген бактериальной природы. Если это макрофаг, то он

начнет экспрессировать сигнальные молекулы, например, провоспалительные цитокины, которые привлекут к нему клетки врожденного иммунитета. Не будучи способной избавиться от «патогена», клетка будет инициировать реакцию врожденного иммунитета в режиме нон-стоп, пока не будет уничтожена другими иммунокомпетентными клетками.

Представим себе, что клетка артериальной интимы столкнулась с ассоциатом модифицированных ЛНП и восприняла его как патоген. Ассоциат будет фагоцитирован этой клеткой, а сама клетка немедленно начнет посылать сигнал опасности окружающим резидентным клеткам интимы и иммунокомпетентным клеткам, циркулирующим в крови. Пришедшие на помощь клетки начнут активно фагоцитировать ассоциаты модифицированных ЛНП. Реакция врожденного иммунитета будет активно развиваться вплоть до успешного завершения. Это благоприятное развитие событий. Проблемы же могут возникнуть, если среди рекрутированных клеток окажется клетка с дефективными митохондриями, которая не только не способна адекватно участвовать в реакции врожденного иммунитета, но не позволит ей завершиться, поскольку будет непрерывно посылать все новые сигналы, рекрутирующие в очаг реакции новые и новые клетки. Среди вновь рекрутируемых клеток могут оказаться такие, у которых также имеются митохондрии с генетическими дефектами. В этом случае реакция приобретет хронический характер, что свойственно начальным атеросклеротическим поражениям.

Таким образом, дефекты митохондриального генома могут играть важную роль в атерогенезе на стадии репарации, углубляя реакцию врожденного иммунитета и создавая условия для хронического патологического процесса. Разумеется, это

важно не только в случае атеросклероза, но для всех иммунных заболеваний.



## **8. Гипотезы, объясняющие развитие атеросклероза**

Для объяснения последовательности событий, конечным результатом которых является формирование атеросклеротической бляшки, было предложено множество гипотез. Среди них до сих пор не потеряли своей актуальности три основные концепции атерогенеза: тромбогенная, предложенная австрийским патологом Карлом Рокитанским еще в конце 50-х годов XVIII века, воспалительная, разработанная несколько позднее (1856) немецким патологом Рудольфом Вирховым, и инфильтративная, сформулированная отечественным патологом Н. Н. Аничковым в 1914 году. При этом только инфильтративная гипотеза нашла подтверждение в клинических исследованиях, направленных на регрессию атеросклероза с помощью холестеринснижающей терапии. Тем не менее, имеются факты, противоречащие каждой из предложенных концепций.

### **8.1. Тромбогенная теория атерогенеза**

Так, согласно тромбогенной теории атерогенеза, участниками формирования будущей атеросклеротической бляшки являются локальные отложения нитей фибрина на внутренней поверхности сосудистой стенки. Было показано, что в участках формирования атеросклеротической бляшки происходят локальные нарушения фибринолитического процесса и такие нарушения связывали с прогрессированием атеросклеротических поражений (Astrup T, 1956; Collen D & Juhan-Vague I, 1988). Эта концепция имеет многочисленных сторонников (Hoak JC, 1988). Новые горизонты дальнейшего развития тромбогенной теории атерогенеза открылись после того, как в участках би-

фуркации брюшной аорты была обнаружена повышенная активность активатора плазминогена (Wilcox JN et al., 1997). В этих же местах развиваются и выраженные атеросклеротические изменения.

В последние годы представления о значимости нарушений процессов тромбообразования как одного из факторов атерогенеза были конкретизированы результатами функционального и морфологического изучения кровяных пластинок. В общеизвестных схемах свертывания крови этим форменным элементам отводили незначительную роль. Кровяные пластинки часто рассматривали не как физиологически активные клетки, а как носителей так называемых тромбоцитарных (пластиночных) факторов, взаимодействие которых с аналогичными (или даже тождественными) факторами плазмы крови обуславливает формирование полноценного фибрина. Вместе с тем результаты, полученные уже в относительно ранних исследованиях, позволяли предполагать, что в основе возникновения артериального тромба лежит взаимодействие кровяных пластинок с поврежденной стенкой сосуда.

Опыт применения антикоагулянтов у больных показал, что они эффективны только при лечении тромбоза вен. Вместе с тем, антикоагулянты не оказывают лечебного действия при тромбозе артерий. Причиной этого может быть различие в структуре тромбов в артериях и венах. В венах образуются красные тромбы, состоящие из эритроцитов, лейкоцитов, фибрина и тромбоцитов, расположенных по периферии, в окружающей тромб зоне. В артериях же обнаруживают белые тромбы, состоящие, главным образом, из тромбоцитов и нитей фибрина. Преобладание тромбоцитов в белых тромбах фокусирует ос-

новное внимание на изучении роли этих форменных элементов в закупорке артерий.

Предположение о том, что в основе формирования белых артериальных тромбов лежит первоначальное взаимодействие тромбоцитов с сосудистой стенкой, долгое время не имело четких экспериментальных доказательств в связи с отсутствием адекватных методов изучения морфофизиологических изменений кровяных пластинок в динамике тромбообразования. В значительной степени это было обусловлено тем, что малые размеры тромбоцитов (2-4 мк) не позволяли производить детального изучения их структуры. Разработка методов изучения функциональных свойств тромбоцитов, а также - применение трансмиссионного и растрового электронных микроскопов для изучения динамики изменений тромбоцитов во время их физиологической активации позволили внести существенные коррективы в современные представления о механизмах тромбообразования и роли тромбоза в развитии атеросклероза.

Следует, однако, отметить, что, несмотря на многочисленные клинические наблюдения о взаимосвязи между формированием атеросклеротических изменений артерий и развитием повышенного свертывания крови, большинством современных исследователей аргументируется вывод о пристеночном тромбообразовании не как о причине, а как о следствии атеросклероза. Об этом, в частности, свидетельствуют убедительные данные о том, что тромбозу предшествует десквамация эндотелиальных клеток только в участках изъязвления атеросклеротической бляшки (Schwarz N, 1993). Изучение эндотелиальной выстилки в участках ранних атеросклеротических изменений не позволило получить каких-либо убедительных признаков нарушения ее целостности (Repin VS et al., 1984). По этой причине в

настоящее время тромботические состояния рассматривают как одно из осложнений атерогенеза, но не как его причину. Вместе с тем, роль пристеночного тромбообразования как одного из звеньев в цепи реакций, приводящих к прогрессии атеросклеротических изменений в ткани уже сформированной бляшки, подтверждена результатами патоморфологических (Stary HC et al., 1995) и клеточно-биологических (Arefieva TI et al., 2001; Bochkov VN et al., 1992) исследований.

Значительно более аргументированными являются представления о реактивных (воспалительных) изменениях сосудистой стенки как основном факторе, вызывающем развитие атеросклеротических изменений стенки артерий и о роли липидов в развитии атеросклероза. Эти, на первый взгляд, альтернативные друг другу гипотезы (концепция об атеросклерозе как реакции сосудистой стенки и инфильтративная теория атерогенеза) лежат в центре современных исследований по изучению морфогенеза атеросклеротической бляшки. В этой связи мы сочли целесообразным более подробно остановиться на изложении и анализе этих представлений.

## **8.2. Реакция сосудистой стенки на повреждение**

В конце 70-х годов для объяснения механизмов атерогенеза Р. Росс конкретизировал гипотезу Р. Вирхова и сформулировал новую концепцию, согласно которой ключевым звеном развития атеросклеротической бляшки является взаимодействие фактора роста, выделяемого тромбоцитами (PDGF), с гладкомышечными клетками сосудистой стенки. По мнению Росса, пусковым механизмом развития атеросклеротической бляшки является десквамация эндотелия. Предполагалось, что

в этих участках сосудистой стенки происходит прикрепление (адгезия) кровяных пластинок и выброс ими PDGF. Согласно концепции «реакция на повреждение», PDGF индуцирует серию изменений в гладкомышечных клетках, конечным результатом которых является формирование фиброзных изменений в отдельных участках сосуда (атеросклеротическая бляшка). Было постулировано, что под влиянием PDGF происходит: миграция сократительно активных гладкомышечных клеток из средней оболочки в интиму артерий; «дедифференцировка» гладкомышечных клеток и последующее их размножение; изменение фенотипа («модификация») гладкомышечных клеток с последующим их превращением в секреторно активные клетки.

Согласно гипотезе Росса описанные изменения лежат в основе избыточной продукции коллагена и других компонентов экстрацеллюлярного матрикса в экспериментально индуцированных участках повреждений сосудистой стенки.

К концу 70-х годов прошлого века накопилось большое количество данных, которые, как тогда казалось, подтверждали правомерность концепции «реакция сосудов на повреждение»: Из кровяных пластинок (тромбоцитов) был выделен фактор (PDGF), вызывающий пролиферацию гладкомышечных клеток в культуре.

В участках механического повреждения сосудистой стенки образуются тромбы, в состав которых входит большое количество тромбоцитов, прикрепленных к дезодотелизированной поверхности. Тромбоциты, адгезированные к поверхности сосуда, выбрасывают так называемые альфа-гранулы - осмиофильные вакуоли, являющиеся резервуаром для PDGF. В участках поврежденной интимы артерий накапливается большое количество гладкомышечных клеток с ультраструктурными признаками

высокой секреторной активности. В деэндоотелизированных участках артерий происходит резкое возрастание синтеза коллагена гладкомышечными клетками. В отдаленные сроки (через 1-2 недели) после механического повреждения аорты и других крупных артерий у кроликов, крыс, свиней и обезьян развиваются фиброзные изменения сосудистой стенки, обусловленные скоплением в этих участках синтетически активных гладкомышечных клеток.

Однако постепенно накапливались факты, противоречащие гипотезе «реакция на повреждение». Как в условиях экспериментальной гиперхолестеринемии, так и в артериях человека при развитии атеросклеротических бляшек эндотелиальная выстилка остается сохранной (Reidy MA, 1985; Repin VS et al., 1984). Таким образом, вопрос о десквамации эндотелия как пусковом механизме развития атеросклеротических изменений сосудистой стенки не получил экспериментального подтверждения.

Фактор, выделенный впервые из тромбоцитов (PDGF), как оказалось, секретируется многими другими клетками, в том числе – гладкомышечными клетками, эндотелием и макрофагами (Ross R, 1987). Было также установлено, что злокачественно измененные клетки, трансформированные ДНК-содержащими ретровирусами, а также спонтанно трансформированные клетки и клетки из опухолей человека (Palman C et al., 1992) синтезируют белки, гомологичные PDGF (одна из цепей - V-sis-онкогена). В дальнейшем оказалось, что большинство (если не все) типы клеток млекопитающих при определенных условиях могут синтезировать PDGF (Ross R, 1987). Таким образом, PDGF не мог и далее рассматриваться как единственный кандидат на роль биологически активных соединений, регулирую-

щих скорость морфогенетических процессов в стенке сосуда при атерогенезе.

Фиброзные изменения, индуцируемые механической травмой сосуда (Burns ER et al., 1978; Stemerman MB, 1981; Ross R et al., 1982), введением токсинов (Furchgott RF et al., 1984) и другими аналогичными экспериментальными процедурами даже отдаленно не напоминают по структуре атеросклеротическую бляшку человека (Stary HC, 1989).

Пролиферация клеток была выявлена в атеросклеротических поражениях, но она была наивысшей не в начальных поражениях, а в липофиброзных бляшках (Orekhov AN et al., 1998; 2010). Таким образом, пролиферация не является «реакцией на повреждение», но сопровождает процесс формирования атеросклеротического поражения.

В неизменной аорте человека содержится большое количество модифицированных так называемых «модифицированных» гладкомышечных клеток, не формирующих, однако, соединительнотканых структур, характерных для фиброзной атеросклеротической бляшки (Geer JC & Haust MD, 1972).

Таким образом, к концу 80-х - началу 90-х годов стала очевидной упрощенность концепции, согласно которой ключевым звеном развития атеросклеротических изменений сосудистой стенки является увеличение пролиферативной активности гладкомышечных клеток под влиянием PDGF. При этом наиболее убедительные факты, противоречащие этой концепции, были получены при изучении особенностей морфологического строения гладкомышечных клеток атеросклеротической бляшки артерий человека (Stary HC, 1989).

### 8.3. Инфильтративная теория атерогенеза

Согласно концепции, предложенной Н. Н. Аничковым еще в 1912 году, развитию зрелых фиброзных бляшек предшествует формирование липидных пятен. Последние представляют собой скопления так называемых пенистых клеток в отдельных участках интимы артерий (Stary HC, 1989; Woolf N, 1987). Предполагают, что увеличение концентрации холестерина и (или) транспортирующих это соединение частиц ЛНП в крови приводит к возрастанию скорости прохождения холестерина в интиму артерий, его поглощению клетками сосудистой стенки и, постепенно - к формированию атеросклеротической бляшки (Goldstein JL & Brown MS, 1992; Gotto AM Jr, 1993). Гипотеза о трансформации липидных пятен в зрелые атеросклеротические бляшки нашла подтверждение в экспериментах на лабораторных животных (Betz E, 1987; Stary HC & Malinow MR, 1982; Vesselinovitch D, 1988), частично - при изучении аутопсийного материала (Geer JC & Haust MD, 1972; Stary HC, 1989) и в популяционных исследованиях (D'Agostino RB Sr et al., 2001; Craven TE et al., 1990; Postiglione A et al., 1989; Thompson GR, 1990a;b).

Еще в начале прошлого века работами Игнатовского и Аничкова было установлено, что кормление кроликов пищей, богатой холестерином (сырыми куриными яйцами) приводит к развитию липидных пятен в артериях. Затем формируется так называемые промежуточные изменения стенки артерий, которые заканчиваются формированием зрелых бляшек. Эти опыты были неоднократно повторены, и в настоящее время гиперхолестериновая модель и ее модификации широко используется для исследования отдельных стадий атеросклеротического процесса, оценки эффективности гиполипидемических препара-



тов с различным механизмом действия, изучения роли различных факторов внешней среды на атерогенез (Kritchevsky D, 1993; Vesselinovitch D, 1988; Woolf N, 1987).

Взаимосвязь между липидными пятнами и фиброзной бляшкой аргументируется и результатами ряда эпидемиологических исследований (D'Agostino RB Sr et al., 2001; Postiglione A et al., 1989). Установлено, что у лиц с высоким уровнем холестерина крови риск развития ишемической болезни (Abbott RD et al., 1989), а также других заболеваний атеросклеротической этиологии (Marmot MG & Elliott P, 1989) значительно выше, чем у людей с низкими величинами этого показателя. В клинкоморфологических исследованиях показано, что атеросклеротические изменения коронарных артерий выражены тем в большей степени, чем выше были показатели уровня холестерина крови в последние годы жизни больного (Abbott RD et al., 1989). Результаты этих патоморфологических исследований подтверждены и с помощью ангиографии - метода прижизненной оценки атеросклеротического поражения артериального русла. Установлена взаимосвязь между показателями холестерина крови и степенью выраженности органических изменений, замедляющих скорость кровотока по коронарным (O'Malley JP & Illingworth DR, 1992.; Rabkin SW & Cheng KM, 1992), брахиоцефальным (Van Craeyveld E et al., 2011) и почечным (Vogel TR et al., 2003) артериям.

Дополнительные доказательства взаимосвязи между нарушениями липидного обмена и атеросклеротическими поражениями артериальной стенки получены у больных семейной гиперхолестеринемией (Goldstein JL & Brown MS, 1992; Keller C & Spengel FA, 1988; Tell GS et al., 1989; Vega GL et al., 1991). Эта наследственная аномалия характеризуется резким возрас-

танием уровня холестерина в крови и высокой предрасположенностью больных к развитию атеросклеротических изменений в магистральных артериях. Так, больные с гомозиготной формой семейной гиперхолестеринемией обычно умирают в молодом возрасте от инфаркта миокарда или острых нарушений проходимости сосудов головного мозга. У больных с гетерозиготной формой семейной гиперхолестеринемией выявляются резко выраженные атеросклеротические изменения аорты, коронарных, сонных и почечных артерий.

Brown и Goldstein (Goldstein JL & Brown MS, 1992) расшифровали механизм резкого повышения уровня холестерина у больных с этой наследственной аномалией. Ими были установлены также ключевые звенья процесса поглощения холестерина клеткой из экстрацеллюлярной среды и регуляции уровня холестерина внутри клетки. Эти данные принципиально изменили имевшиеся ранее представления о метаболизме холестерина и в 1985 году J. L. Goldstein и M. S. Brown были удостоены Нобелевской премии.

В серии работ, выполненных Brown и Goldstein, было показано, что в нормальных условиях постоянная концентрация холестерина внутри клетки поддерживается за счет взаимодействия трех основных процессов: рецепторного поглощения ЛНП; эндогенного синтеза холестерина; обратного транспорта холестерина в составе ЛВП.

Brown и Goldstein установили ключевой механизм, при помощи которого холестерина из внешней среды (крови) поступает внутрь клетки. Этот процесс осуществляется в результате специфического взаимодействия рецепторов клеточной мембраны с апобелком В, входящим в состав ЛНП (ЛНП-рецепторный механизм). При снижении внутриклеточной кон-

центрации холестерина возрастает скорость синтеза ЛНП-рецепторов, их число на поверхности клеточной мембраны увеличивается и происходит взаимодействие этих рецепторов с частицами ЛНП. Образующиеся комплексы (ЛНП - ЛНП-рецептор) с помощью эндоцитоза поступают в лизосомы (Goldstein JL & Brown MS, 1987.; Goldstein JL et al., 1982; Russell DW et al., 1986). В этих органеллах осуществляется гидролиз ЛНП-частиц с образованием свободного холестерина. Значительная часть холестерина используется клеткой для обновления мембран, а его избыток этерифицируется (Brown MS & Goldstein JL, 1986). При высоком уровне содержания холестерина в клетке синтез ЛНП-рецепторов снижается, они не встраиваются в клеточную мембрану и, тем самым, блокируется поступление новых порций холестерина (в составе ЛНП) из крови в клетку.

Установлено, что нарушения липидного обмена являются причиной быстрого развития атеросклеротических изменений в артериях больных семейной гиперхолестеринемией (Grundy SM & Vega GL, 1991; Seed M et al., 1990; Thompson GR, 1990 a;b; Vega GL et al., 1991; Walker JF & Tobert JA, 1987).

Следует отметить, что представленные выше результаты клинических исследований лишь подтверждают взаимосвязь между нарушениями липидного обмена и развитием атеросклеротических изменений артерий. Эти данные, однако, не позволяют судить о последовательности процессов, приводящих к трансформации липидных пятен в фиброзные бляшки. Взаимосвязь между появлением липидных пятен и развитием фиброзных бляшек не столь очевидна (Greenland P et al., 2002; McGill HC Jr et al., 2008; Oalman MC et al., 1997; Stary HC, 1989; Strong JP et al., 1973). Имеется, по крайней мере, несколько групп наблюдений, противоречащих предположению о трансформа-

ции всех липидных пятен в фиброзные бляшки. Среди них наиболее убедительные факты, противоречившие инсудативной теории Аничкова, были получены в ходе патологоанатомических исследований, посвященных сопоставлению зон распределения липидных пятен в артериях детей с географией расположения фиброзных бляшек в сосудах у лиц преклонного возраста.

Имеется ряд аргументированных предположений о том, что последовательность процессов, происходящих при формировании атеросклеротической бляшки у человека, отличается от таковой при развитии атеросклеротических изменений, экспериментально индуцируемых в сосудах лабораторных животных (Greenland P et al., 2002; Oalman MC et al., 1997; Sary HC, 1989; Strong JP et al., 1973). Так, у многих лабораторных животных кормление пищей, обогащенной липидами, приводит к образованию липидных пятен (Kritchevsky D, 1993; Wissler RW, 1991; Wissler RW & Group PD, 1996; Wissler RW & Strong JP, 1998; Vesselinovitch D, 1988). Последние представляют собой скопления так называемых пенистых клеток (макрофагов с большим количеством липидных вакуолей в цитоплазме) и внеклеточно расположенных липидов. Однако, дальнейшее содержание животных на диете, обогащенной холестерином, не позволяет добиться формирования структуры, даже отдаленно напоминающей зрелую атеросклеротическую бляшку у людей (Greenland P et al., 2002; McGill HC Jr et al., 2008; Oalman MC et al., 1997; Strong JP et al., 1973). Для индукции более выраженных атеросклеротических изменений в артериях кроликов и других экспериментальных животных прибегают к дополнительным экспериментальным воздействиям (Betz E, 1987). Однако ни механическое повреждение интимы, ни введение в кровоток ци-

тотоксинов или повреждающих отдельные типы клеток антител, ни другие экспериментальные процедуры не позволяют добиться полной имитации процессов атерогенеза.

Изучение патоморфологических изменений в артериях больных атеросклерозом также не позволило получить убедительных доказательств трансформации липидных пятен в зрелые атеросклеротические бляшки. При осмотре артерий со стороны их внутренней поверхности липидные пятна визуализируются в виде уплощенных участков желтого цвета различных размеров и формы. Для более отчетливой их идентификации используют тотальную окраску макропрепаратов Суданом красным, черным, масляным красным и другими реактивами на липиды (Freedman DS et al., 1988; Tanganelli P et al., 1993; Velican C et al., 1988). Это позволяет изучать локализацию липидных пятен и производить планиметрическую оценку занимаемой ими площади. Показатели распределения липидных пятен обычно соотносят с результатами изучения фиброзных бляшек в различных отделах артериального русла. На основании таких сопоставлений дают оценку патогенетической взаимосвязи фиброзных бляшек с липидными пятнами (Greenland P et al., 2002; McGill HC Jr et al., 2008; Oalmann MC et al., 1997; Strong JP et al., 1973; Svindland A., 1983).

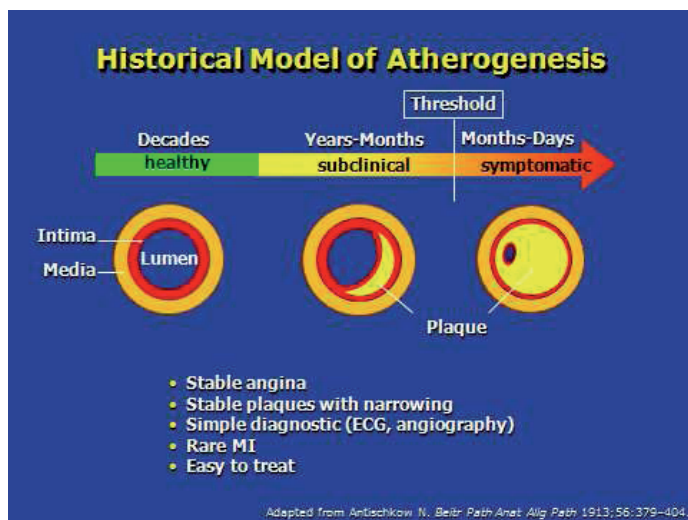
Планиметрическое изучение липидных пятен и фиброзных бляшек не позволило сформулировать окончательных выводов о патогенетической взаимосвязи этих структур друг с другом. Общепризнанным считают положение, согласно которому география липидных пятен в артериальном русле у детей не совпадает с локализацией фиброзных бляшек у взрослых. Так, липидные пятна в аорте детей располагаются преимущественно в восходящем отделе ее дуги и в грудном отделе. В то же время у

взрослых фиброзные бляшки локализуются в большинстве случаев в брюшном отделе аорты (Davies MJ et al., 1994). Такие данные находятся в противоречии с гипотезой о трансформации липидных пятен в зрелые бляшки. Дополнительные наблюдения, противоречащие гипотезе о превращении липидных пятен в фиброзные бляшки, были сделаны в конце 50х - начале 60х годов (Holman RL et al., 1958.; Strong JP& McGill HC Jr, 1963). Было установлено, что у негров обоего пола в возрасте от 10 до 25 лет площадь, занимаемая липидными пятнами в аорте больше, чем у белых лиц того же возраста и пола. В то же время число фиброзных бляшек и степень выраженности атеросклеротического процесса у взрослых белых лиц больше, чем у негров того же возраста (Strong JP& McGill HC Jr, 1963). Такие данные также противоречили предположению о превращении липидных пятен в фиброзные бляшки.

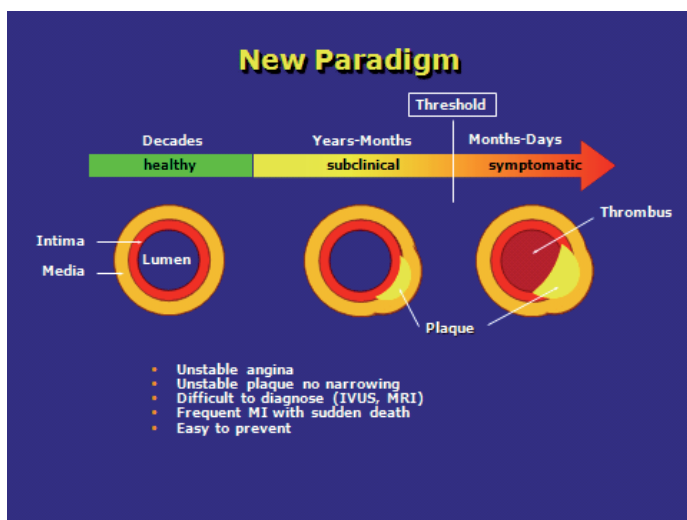
Исследования, выполненные позднее, позволили, по крайней мере, частично установить причины этих противоречий (Greenland P et al., 2002; Oalmann MC et al., 1997; Stary HC, 1989; Strong JP et al., 1973). Применение компьютерного анализа позволило установить, что фиброзные бляшки, по-видимому, развиваются в участках, где в детском и юношеском возрасте располагались липидные пятна. Однако в бляшку трансформируются лишь только часть липидных пятен, в то время как другие подвергаются обратному развитию (McGill HC Jr, 1984).

## 8.4. Современные представления о развитии атеросклероза

Наиболее распространенные современные представления о развитии атеросклероза описаны в обзорах (Koenig W, 2001; Libby P, 1995; Ross R, 1999). Основные идеи этих представлений можно проиллюстрировать презентацией, которая сопровождается текстом.



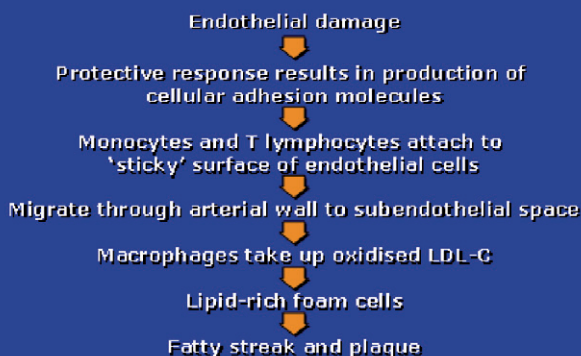
Изначально предполагалось, что атерогенез – это относительно простой процесс, который заключается в формировании атеросклеротических бляшек в интима. Рост бляшки может привести к закупорке артерии. Считалось, что постепенное увеличение размера бляшки ведет к выпячиванию ее в просвет артерии и, в конечном итоге, вызывает уменьшение просвета. Это приводит к сокращения притока крови, что вызывает стабильную стенокардию и реже инфаркт миокарда.



В настоящее время атерогенез следует рассматривать как сложный процесс, которому предшествует и который сопровождает воспаление. Эндотелий реагирует на повреждение, индуцируя защитный ответ, приводящий, в конечном счете, к образованию атеросклеротической бляшки. С течением времени бляшка может расти или уменьшаться в размерах, иногда выпячиваясь в просвет сосуда, а иногда нет. Клинический исход часто зависит от стабильности бляшки (Ross R, 1993a). Чем менее стабильна бляшка, тем более она предрасположена к эрозии или разрыву. Как эрозия, так и разрыв могут приводить к образованию тромба на месте бляшки и к окклюзии сосуда, которая ведет к нестабильной стенокардии или к инфаркту миокарда (Ross R, 1993a). Лекарственная терапия (гипохолестеринемические воздействия) в дополнение к диете и изменению образа жизни может привести к регрессии атеросклеротической бляшки.



## Pathogenesis of Atherosclerotic Plaques

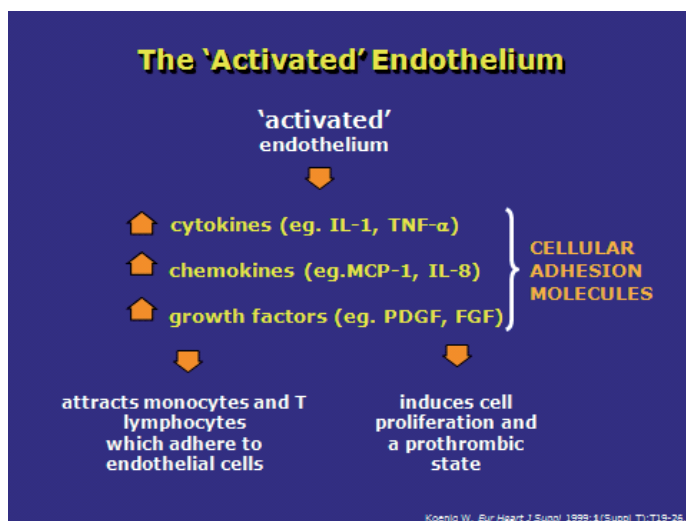


Предполагается, что первичные проявления атеросклероза связаны с повреждением эндотелия артериальной стенки, приводящим к эндотелиальной дисфункции. Это повреждение может быть вызвано разнообразными факторами: гемодинамическим напряжением (стресс сдвига, вызванный, например, гипертонией), разнообразными вазоактивными агентами, медиаторами из клеток крови (цитокинами), курением, атерогенной диетой, повышенным уровнем глюкозы и окисленными ЛНП (Koenig W, 2001).

Первоначально повреждение провоцирует эндотелиальные клетки экспрессировать молекулы клеточной адгезии, такие как цитокины (IL-1, TNF- $\alpha$ ), хемокины (MCP-1, IL-8) и факторы роста, таких как PDGF и bFGF (Koenig W, 2001). Образовавшаяся «липкая» поверхность заставляет воспалительные клетки, такие как моноциты и Т лимфоциты прикрепляться к эндотелию. Прикрепившись, они начинают мигрировать через интактный эндотелий в субэндотелиальную интиму. Многие моноциты дифференцируются в макрофаги и захватывают окисленные

ЛНП, которые более атерогенны, чем нативные ЛНП; эти макрофаги в последствие становятся пенистыми клетками (Koenig W, 2001).

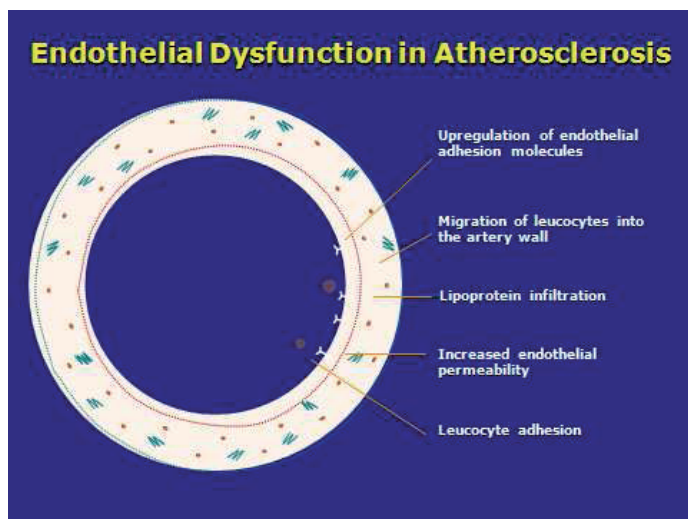
Окисленные ЛНП способствуют гибели эндотелиальных клеток и воспалительной реакции, приводящей к нарушению нормальных функций эндотелия. Кроме того, воспаление изменяет реакцию эндотелия на ангиотензин II, что приводит к нарушению вазодилатации, а также индуцирует протромбогенное состояние, воздействуя на тромбоциты и факторы свертывания крови. Таким образом, реакция эндотелия на повреждение, заключающаяся в индуцировании защитного ответа, должна, в конечном счете, привести к образованию атеросклеротической бляшки - фиброжирового или фиброзного поражения, которому предшествует и которое сопровождает воспаление (Ross R, 1993a).



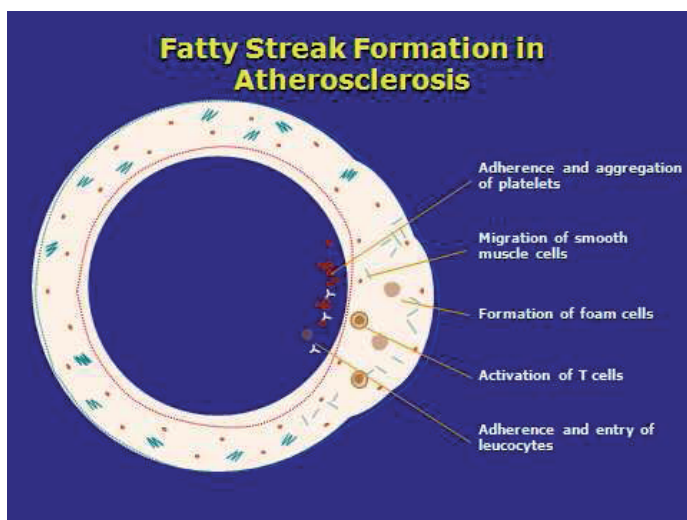
Повреждение эндотелия или воздействие на него атерогенных стимулов запускает воспалительную реакцию на уровне эндотелиальных клеток, которая приводит к подключению лей-

коцитов и высвобождению молекул клеточной адгезии, цитокинов, в том числе IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , хемокинов, включая MCP-1, IL-8, а также факторов роста: PDGF и FGF (Koenig W, 2001).

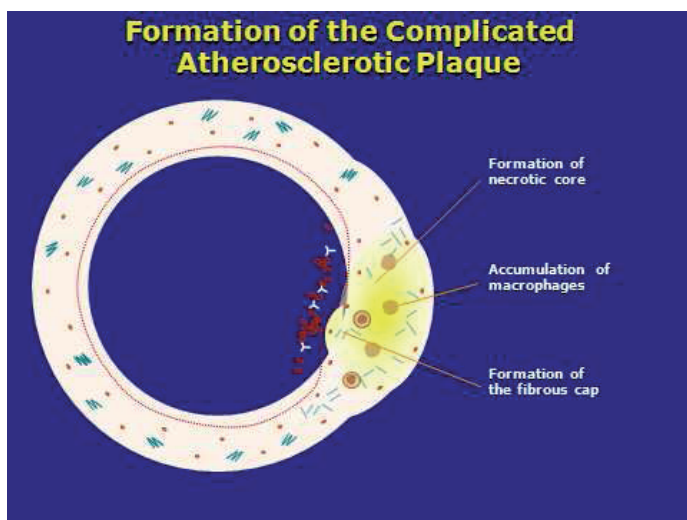
В дополнение к усилению иммунного ответа цитокины изменяют функции эндотелиальных клеток в протромботическом направлении, которое характеризуется повышением продукции PAI-1, TGF- $\beta$ , а также активацией системы коагуляции и высвобождением PDGF.



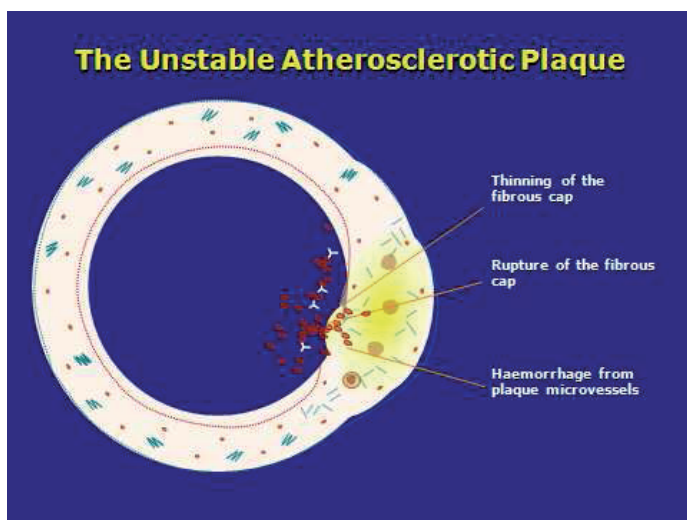
Эндотелиальная дисфункция при атеросклерозе характеризуется серией ранних изменений, которые предшествуют образованию поражения. Эти изменения включают повышенную проницаемость эндотелия, обратную регуляцию лейкоцитов и эндотелиальных молекул клеточной адгезии, а также миграцию лейкоцитов в артериальную стенку (Ross R, 1999).



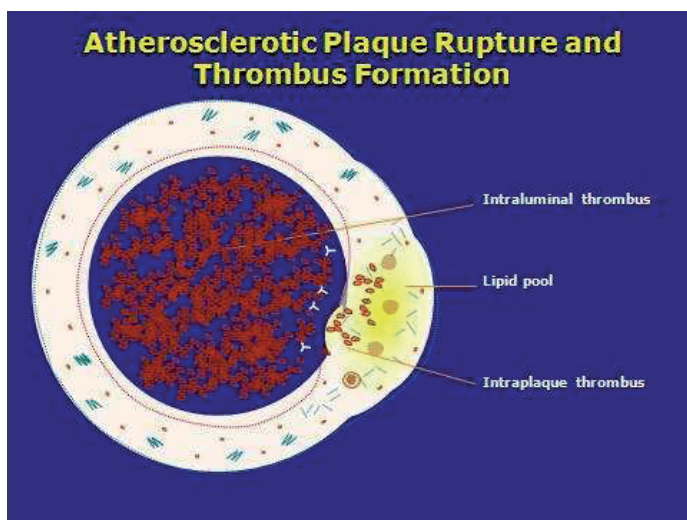
Жировая полоса – это самое раннее макроскопически различимое атеросклеротическое поражение, которое вызывается ассоциацией насыщенных липидами пенистых клеток, происходящих из макрофагов и Т лимфоцитов, которые накапливаются в интиме. Позднее к поражению подключаются гладкомышечные клетки. Имеет место сложная серия стадий, включающая миграцию гладкомышечных клеток, активацию Т клеток, образование пенистых клеток, а также прикрепление и ассоциацию тромбоцитов (Ross R, 1999). Жировые полосы в артерии – это обычное явление, они могут увеличиваться в размере, оставаться неизменными или даже исчезать (Ross R, 1999).



Развитая атеросклеротическая бляшка - это продвинутая стадия атеросклеротического процесса, которая является результатом гибели и разрушения в жировой полосе перегруженных липидами пенных клеток. Миграция сосудистых гладкомышечных клеток в интиму и покрытие ее волокнами коллагена приводит к образованию защитной фиброзной покрывки над липидным ядром. Фиброзная покрывка является принципиальным компонентом зрелой атеросклеротической бляшки, поскольку она отделяет высокотромбогенное жировое ядро от циркулирующих тромбоцитов и других факторов коагуляции. Стабильная атеросклеротическая бляшка характеризуется некротическим ядром, покрытым толстой фиброзной бляшкой содержащей много гладкомышечных клеток. Поражение расширяется путем роста в плечевых участках за счет продолжающейся адгезии лейкоцитов (Ross R, 1999).

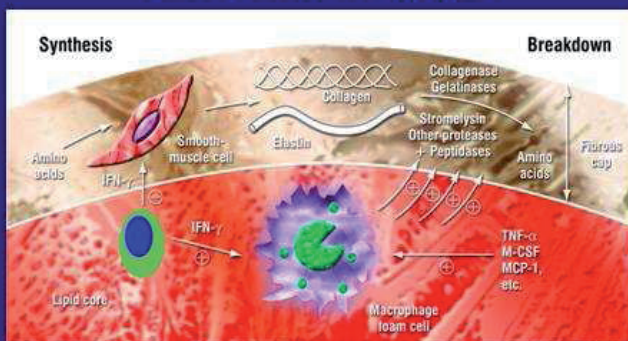


Большая атеросклеротическая бляшка может вызывать осложнения, уменьшая диаметр просвета сосуда и снижая поток крови, а также имея предрасположенность к разрыву или к эрозии. Эрозия бляшки или разрыв имеют место в бляшках, если они нестабильны. Факторам, которые могут влиять на нестабильность бляшки, являются гипертония, высокая турбулентность потока крови, повышенный уровень воспалительных клеток, липидное ядро и тонкая фиброзная покрывка с малым количеством гладкомышечных клеток или коллагеновых волокон. Как эрозия, так и разрыв могут привести к образованию тромба на месте бляшка и к окклюзии сосуда. Бляшка может вызывать уплотнение артерий, результатом чего является ослабление и утоньшение сосудистой стенки, что приводит к аневризме и, возможно, к геморагии (Ross R, 1999).



Исследования патологов показали, что разрыв атеросклеротической бляшки и последующее образование тромба в просвете сосуда лежат в основе этиологии острого ишемического коронарного синдрома, включая инфаркт миокарда и нестабильную стенокардию. Липидное ядро бляшки (особенно, плечевые участки поражения), избыток воспалительных клеток, тонкая фиброзная бляшка и дисфункция покрывающего ее эндотелия отличают морфологические особенности поражения, склонного к разрыву. Дисфункция эндотелия может вносить свой вклад в предрасположенность бляшки к разрыву благодаря ее провоспалительным, протромбогенным и вазоконстрикторным свойствам, которые модулируют характер поражения, реакцию на ростовые стимулы, сосудистый тонус и локальный стресс сдвига (Ross R, 1999).

## The Synthesis and Breakdown of Atheromatous Plaques

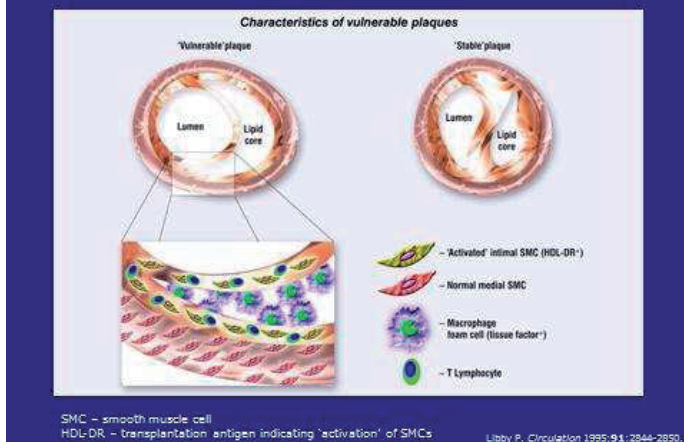


Libby P. *Circulation* 1995;91:2844-2850.

В состав атероматозной бляшки входит плотный фиброзный внеклеточный матрикс, за счет которого обеспечивается прочность покрышки. Метаболизм и формирование матрикса зависят от баланса продуктов синтеза и распада в фиброзной покрышке, особенно в плечевых участках. Сосудистые гладкомышечные клетки синтезируют белки матрикса – коллаген и эластин. В нестабильной фиброзной покрышке активированные Т лимфоциты обеспечивают сигналы через IFN- $\gamma$ , которые приводят, в конечном счете, к снижению образования коллагена. Активация макрофагов такими факторами как: IFN- $\gamma$ , IL-1, TNF- $\alpha$ , MCP-1 и M-CSF – приводит к повышению продуктивности коллагеназы, желатиназы, стромелизина и других протеаз и пептидаз, которые разрушают коллаген или ограничивают его образование в фиброзной покрышке (Libby P, 1995).



## The Vulnerable Atherosclerotic Plaque



Нестабильная бляшка характеризуется тонкой фиброзной покрывкой, липидным ядром и макрофагами, а также менее активной пролиферацией гладкомышечных клеток. В противоположность этому, стабильная бляшка имеет относительно толстую фиброзную покрывку, защищающую липидное ядро от контакта с кровью.

Нестабильная бляшка подвержена разрыву и изъязвлению с последующим быстрым развитием тромба. По-видимому, размер бляшки не определяет, предрасположена ли бляшка к разрыву. Реальность такова, что по данным ангиографии стабильные бляшки чаще суживают просвет, чем нестабильные бляшки.

Разрыв обычно происходит в месте утоньшения (в частности, в плечевых областях бляшки) и связан с участками, где относительно мало гладкомышечных клеток, но избыток макрофагов и Т клеток. Разрыв связан с большим наплывом макрофагов и активацией, что сопровождается секрецией металло-

протеиназ, которые вовлечены в разрушение коллагена (Libby P, 1995).

## **8.5. Слабые стороны современных представлений об атерогенезе**

Изложенные выше современные представления об атерогенезе пытаются связать две известные гипотезы развития атеросклероза – инфильтративную, отводящую ключевую роль в атерогенезе накоплению липидов в артериальной стенке (липидозу) и гипотезу «реакция на повреждение», придающую принципиальное значение повреждению эндотелия.

Любые гипотезы имеют право на существование до тех пор, пока не появились данные, способные их опровергнуть. Гипотезы, претендующие на широкое признание, кроме того, должны объяснять как можно больше известных фактов - чем больше фактов способна объяснить гипотеза, тем она лучше. Верный способ проверить правильность гипотезы – это испытать ее на практике, например, на основе гипотезы разработать подход к профилактике и лечению атеросклероза. К сожалению, изложенные выше современные представления о возникновении и развитии атеросклеротического поражения противоречат многим фактам или не учитывают их, часто очень неконкретны, а также не могут служить хорошей основой для разработки антиатеросклеротических подходов. Ниже перечислены наиболее существенные недостатки этих представлений.

Важность повреждения эндотелия как начального события атерогенеза не вызывает сомнения. Однако современные представления не указывают на конкретные способы локального повреждения эндотелиальной выстилки. Принципиальна именно

локальность, поскольку атеросклеротическое поражение возникает и развивается локально или даже фокально. Вообще говоря, для инициации атерогенеза не обязательно повреждение эндотелия, достаточно, чтобы у него изменилась проницаемость в сторону увеличения проницаемости для атерогенных факторов, например, для модифицированных ЛНП. Следует напомнить, что участки с поврежденным эндотелием не были обнаружены в артериях человека. С позиций общепринятых современных представлений о том, что всякое повреждение эндотелия приводит к возникновению атеросклеротического поражения, нельзя объяснить, почему атеросклероз не развивается у людей молодого возраста и у женщин до наступления менопаузы. Разве у них эндотелий не повреждается так же, как у мужчин? Понятно, что для развития атеросклероза необходимо не только, а, возможно, и не столько повреждение эндотелия, сколько совокупность нескольких факторов, которые одновременно встречаются в одном месте артериальной стенки, вызывая атерогенез.

Согласно рассматриваемой гипотезе эндотелиальная дисфункция при атеросклерозе характеризуется серией ранних изменений, которые включают повышенную проницаемость эндотелия. Возможно, так и есть, однако данные о ранних изменениях проницаемости эндотелия не приводятся, что делает важные заявления безосновательными.

Современные представления рассматривают повреждение эндотелия как триггер, запускающий целый каскад процессов, которые надо считать защитным ответом на повреждение. Что же это за защитный ответ, который ведет к поражению подлежащей ткани? Разве можно считать защитным ответом образование бляшки, которая перекрывает просвет сосуда? Нормаль-

ным защитным ответом на повреждение является репарация эндотелиальной выстилки, которая, скорее всего, и имеет место в артерии, поскольку участки дезэндотелизации не встречаются ни в нормальном сосуде, ни в зонах атеросклеротического поражения.

В качестве клеток, выполняющих защитный ответ на повреждение эндотелия, рассматривают моноциты и Т лимфоциты, которые прикрепляются к поврежденному эндотелию, а затем мигрируют в субэндотелиальную интиму. Возникает вопрос, если воспалительные клетки осуществляют защиту эндотелия от повреждения, зачем им нужно мигрировать в субэндотелиальную интиму. Что заставляет эти клетки мигрировать? Очевидно, что моноциты и лимфоциты мигрируют в сторону очага воспаления, который должен находиться в субэндотелиальной интиме. Современная гипотеза не дает ответа по вопросу, что вызывает воспаление в интиме. Представления о том, что все объясняется повреждением эндотелия, кажутся несостоятельными.

Относительно самого воспаления также возникает много вопросов. Стали обычными заявления о том, что атерогенез сопровождается воспалением. Серьезных оснований для таких утверждений нет. Предположения об участии воспаления в атерогенезе строятся на факте обнаружения в сосудистой стенке воспалительных клеток и молекул. Однако такие молекулы и клетки можно встретить в любой ткани организма. Выявление их в ткани – это условие необходимое, но отнюдь не достаточное для утверждения о наличии воспалительного процесса.

Рассуждая о роли моноцитов, которые проникают под поврежденный эндотелий с целью защитного ответа, утверждают, что они превращаются в макрофаги, чтобы захватывать окислен-

ные ЛНП. Странное утверждение! Неужели моноциты дифференцируются в макрофаги именно для захвата липопротеидов? Нет сомнений, что макрофаги захватывают модифицированные ЛНП, но трудно представить, что моноциты появляются в сосудистой стенке только для того, чтобы стимулировать липоидоз. Разумно искать ответа на вопрос, почему моноциты-макрофаги скапливаются в определенном месте артериальной стенки. Ответа на этот вопрос рассматриваемая гипотеза не дает. Кроме того, эта гипотеза полностью игнорирует способность оседлых мезенхимальных клеток (гладкомышечных и перитопоподобных клеток) захватывать модифицированные ЛНП, превращаясь в пенистые клетки. Это неправильно, поскольку оседлые клетки составляют основу субэндотелиальной популяции и представляют большинство среди пенистых клеток.

Из оседлых клеток рассматриваются только гладкомышечные клетки, которые согласно общепринятым представлениям мигрируют из меди и интимы, чтобы синтезировать фиброзную покрышку атеросклеротической бляшки. Миграция клеток из меди и интимы представляется излишней, поскольку в интиме артерии взрослого человека имеется немало гладкомышечных клеток, способных синтезировать соединительнотканый матрикс. Оседлые субэндотелиальные клетки интимы способны не только синтезировать коллаген, но обладают и другими важными функциями, имеющими отношение к атеросклерозу. Выше указывалось на то, что все основные проявления атеросклероза на клеточном уровне, а именно: повышенная пролиферация, липоидоз и фиброз – это результат функционирования оседлых клеток интимы.

Следует заметить, что причины накопления липидов в сосудистой стенке рассматриваемая гипотеза не объясняет. Это

очень серьезное упущение, поскольку липоидоз самое раннее и самое заметное проявление атеросклероза. Более того, единственная гипотеза атерогенеза, нашедшая подтверждение в клинических исследованиях – это инфильтративная гипотеза, которая базируется на представлениях, что без накопления липидов в сосудистой стенке атеросклероз не возникает. Нет сомнений, что источником накапливающихся липидов являются модифицированные ЛНП, однако общепринятые представления о характере атерогенной модификации липопротеидов не могут считаться верными. Согласно этим представлениям единственная атерогенная модификация – это окисление ЛНП. Выше подробно излагалось, что в крови имеет место множественная модификация липопротеидов, а окисленные ЛНП в крови не найдены. Нет нужды снова повторять изложенные выше аргументы.

Подобно тому, как наличие в интиме воспалительных молекул и клеток породило представление о воспалительной реакции, сопровождающей атерогенез, обнаружение в сосудах иммунокомпетентных клеток позволило авторам современной гипотезы развития атеросклероза утверждать о важной роли иммунного ответа в атерогенезе. Seriously обсуждается предположение о том, что атеросклероз – это аутоиммунное заболевание (Wick G, 2000). При этом считается, что иммунный ответ вместе с воспалением ускоряет развитие атеросклероза. Однако это утверждения общего характера. Конкретных механизмов участия иммунной системы в атерогенезе не приводится.

Самым слабым местом современных представлений об атеросклерозе является отсутствие логичного описания последовательности событий, приводящих к формированию различных типов атеросклеротических поражений. Все объяснения

направлены на то, что любое повреждение эндотелия обязательно приводит к развитию атеросклеротического поражения. Последующие события: появление гематогенных клеток в интиме, захват окисленных ЛНП, воспаление, иммунный ответ и т.д. вызываются друг другом и только стимулируют развитие поражения. Создается впечатление об атерогенезе как о каком-то порочном круге или самораскручивающемся процессе, у которого нет возможности остановиться, а тем более вернуться назад. Такие представления не могут объяснить, почему в одном случае атеросклеротическое поражение развивается, в другом стабильно, а в некоторых случаях претерпевает обратное развитие, то есть регрессию. Таким образом, рассматриваемая гипотеза не согласуется с реальным положением вещей.

Неудивительно, что оторванная от реальности гипотеза до сих пор не смогла предложить новых подходов к профилактике и лечению атеросклероза. Бесспорные успехи в антиатеросклеротической лекарственной терапии, достигнутые в последнее время, связаны, прежде всего, со снижением холестерина в крови. По-видимому, именно это заставило реанимировать интерес к старой инфильтративной гипотезе, основанной на решающей роли в атерогенезе накопления липидов в сосудистой стенке, и включить некоторые элементы липидной концепции в современные представления о развитии атеросклероза. Однако включения этих элементов оказалось слишком искусственным, и не сделало новую гипотезу лучше, поскольку не добавило ясности, но породило больше вопросов. Приходится констатировать, что в настоящий момент, к сожалению, не фундаментальная наука предложила практические подходы к воздействию на атеросклероз, а успехи клинической практики заставили модифицировать теоретические представления, причем не лучшим

образом. Учитывая то, что холестериновая концепция, являющаяся теоретической основой антиатеросклеротической терапии с применением гипохолестериновых лекарственных средств, разработана более ста лет назад, приходится признавать, что со времен Н. Н. Аничкова, разработавшего эту концепцию, фундаментальная наука практически ничего не смогла предложить клинической практике.

По-видимому, именно прорыв в антиатеросклеротической лекарственной терапии определил особый интерес фундаментальной науки к клиническим проявлениям атеросклероза. Увлечение клиническими проблемами не может способствовать изучению атерогенеза как самостоятельного процесса. В частности, так называемая нестабильная бляшка - это не особое поражение, которое надо изучать отдельно, а стадия развития атеросклероза, предшествующая фиброзной бляшке, которая, собственно, и является стабильным поражением. Нестабильная бляшка является клиническим понятием, которое объясняет клинические проявления, но не объясняет атеросклероз.

По-видимому, основные недостатки современных представлений о механизмах атерогенеза возникли из-за желания развивать гипотезу, не имеющую в качестве основы хорошего фактического материала. В последние годы очень мало проводится исследований феноменологического характера. Например, крайне слабо изучается морфология сосудистой стенки человека, в то время как старые добротные морфологические исследования практически забыты. В результате у современных исследователей возникают нелепые представления о нормальной интиме, в которой кроме эндотелия нет других клеток. Это порождает неверные представления о том, что повреждение



эндотелия всегда заканчивается формированием атеросклеротической бляшки.

## **8.6. Распространенные мифы и заблуждения**

Итак, современные представления о механизмах атерогенеза имеют много недостатков и противоречий. Это порождает разнообразные мифы и заблуждения, которые, к сожалению, широко распространены в научной среде. Мы хотели бы остановиться на 4 наиболее распространенных мифах и заблуждениях:

нестабильная бляшка - ключевой тип поражения;

макрофаги – ключевой клеточный элемент;

окисление – атерогенная модификация липопротеидов;

атеросклероз – хроническое воспаление.

### **8.6.1. Миф I – нестабильная бляшка является ключевым типом поражения**

Этот миф порожден данными патологов, которые говорят о том, что частота такого важнейшего клинического проявления атеросклероза как инфаркт миокарда не зависит от размера бляшки. Более того, инфаркт миокарда чаще всего возникает в месте гемодинамически незначимого стеноза коронарной артерии (Рисунок 63). Так, из-за атеросклеротических бляшек, перекрывающих просвет сосуда менее чем на 50%, инфаркт миокарда возникает в 68% случаев. В то же время, если бляшка крупнее и перекрывает просвет на 50-70%, она вызывает инфаркт миокарда только в 18% случаев. Еще реже (14% случаев) причиной инфаркта миокарда становятся самые крупные бляш-

ки, стенозирующие коронарную артерию более чем на 79%. Для объяснение этого парадокса стали использовать понятия «стабильная» и «нестабильная» бляшка.

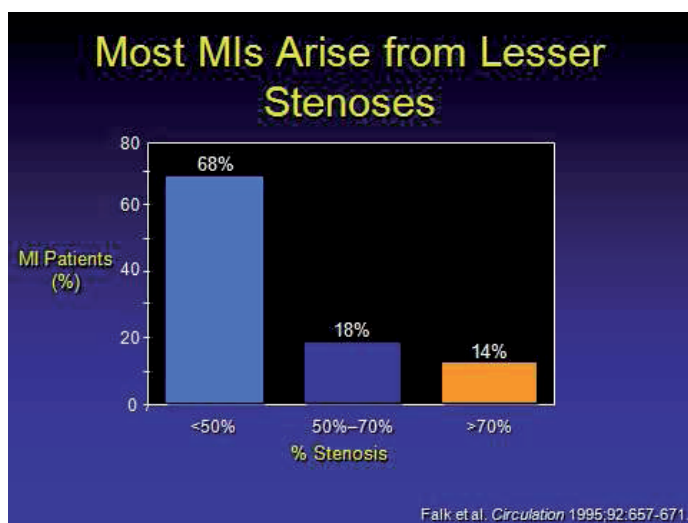


Рисунок 63. Связь частоты инфаркта миокарда со степень стеноза коронарной артерии

Стабильная бляшка характеризуется толстой фиброзной покрышкой (Рисунок 64) и развивается медленно, при этом не вызывает клинических проявлений даже существенно перекрывая просвет сосуда.

Другая ситуация имеет место в случае нестабильной бляшки. Липидное ядро такой бляшки отделено от просвета сосуда тонкой фиброзной покрышкой (Рисунок 65). Считается, что такие бляшки весьма предрасположены к разрыву, образованию тромба в месте разрыва и последующему инфаркту миокарда.



Рисунок 64. Стабильная бляшка в коронарной артерии  
Слева - поперечное сечение сосуда. Справа гистологический срез.



Рисунок 65. Нестабильная бляшка в коронарной артерии  
Поперечное сечение сосуда.

На Рисунке 66 показаны разорванные бляшки и тромбы, образующиеся в месте разрыва.

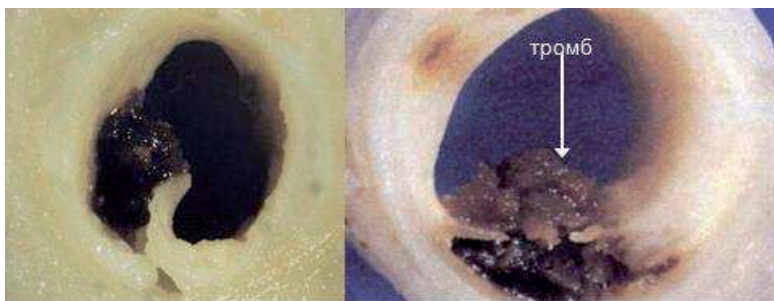


Рисунок 66. Разорванная нестабильная бляшка в коронарной артерии

Видны тромбы, образующиеся в месте разрыва. Поперечное сечение сосуда.

Следует ли считать нестабильную бляшку особым типом атеросклеротического поражения или, тем более, ключевым типом поражения? Для этого нет никаких оснований. На Рисунке 4 схематически представлены основные типы атеросклеротических поражений человека. Условно эти типы можно считать стадиями развития атеросклеротического поражения в следующей последовательности: непораженная интима - начальные поражения - жировые полосы - липофиброзные бляшки - фиброзные бляшки. Из жировой полосы всегда получится липофиброзная бляшка, а из нее фиброзная бляшка. Нет никаких оснований считать, что существует некая дихотомия и из жировой полосы может получиться либо стабильная бляшка, либо нестабильная. Нестабильная бляшка – это одна из стадий развития атеросклеротического поражения, соответствующая по современ-

ной классификации липофиброзной бляшке. За ней следует стадия стабильной фиброзной бляшки. Из сказанного можно сделать следующие выводы:

- стабильная и нестабильная бляшка не являются разными типами поражений, но различными стадиями атерогенеза;
- нестабильная бляшка – опасная стадия развития поражения;
- бороться надо не с нестабильными бляшками, а с атеросклерозом вообще.

Попытки определения нестабильной бляшки в качестве особого типа поражения уводят от необходимости выделения атеросклероза в самостоятельную научную дисциплину. В настоящее время проблемой атеросклероза занимаются кардиологи, невропатологи, ангиологи и другие специалисты, которые имеют дело не столько с атеросклерозом, сколько с его клиническими проявлениями. Естественно, что для таких специалистов наибольшую опасность с клинической точки зрения представляют нестабильные бляшки. Однако попытки борьбы именно с нестабильными бляшками не что иное, как латание дыр. Борьба с нестабильными бляшками, как и борьба с кардиологическими, неврологическими и другими проявлениями атеросклероза уводит от борьбы с самим атеросклерозом. Куда продуктивнее были бы разработки специфических подходов к профилактике и лечению атеросклероза. Такие подходы решали бы проблемы, как нестабильных бляшек, так и других типов атеросклеротического поражения.

### **8.6.2. Миф II - макрофаги являются ключевым клеточным элементом атерогенеза**

Этот миф – результат современных представлений о клеточных механизмах атерогенеза. Причем, проблему следует рассматривать шире, чем только макрофаги. Скорее всего, надо говорить о гематогенных клетках. Слабые стороны и ошибочность представлений о ключевой роли гематогенных клеток изложены выше. Кроме того, наши собственные исследования, результаты которых приведены в разделах, посвященных клеточным механизмам атерогенеза, свидетельствуют о том, что ключевым клеточным элементом атерогенеза являются не гематогенные, а оседлые клетки, в частности, перитцитоподобные клетки.

### **8.6.3. Миф III - окисление является важнейшей атерогенной модификацией ЛНП**

Этот миф имеет отношение к механизмам клеточного липоидоза и его роль в атерогенезе. В рамках современных представлений о механизмах атеросклероза окисление рассматривается как единственная модификация ЛНП, приводящая к неконтролируемому захвату липопротеидов макрофагами, ведущему к накоплению избыточного холестерина в макрофагах и формированию пенных клеток.

Важная роль накопления холестерина в клетках артериальной стенки не вызывает сомнения. Нет сомнений и относительно того, что модифицированные ЛНП, циркулирующие в крови, имеют высокую окисляемость и являются окисленными липопротеидами. Однако установлено, что окисление не явля-

ется единственной модификацией ЛНП. Циркулирующие модифицированные липопропротеиды являются множественно модифицированными частицами, у которых по сравнению с нативными ЛНП изменены многие физико-химические свойства таким образом, что модифицированные ЛНП становятся атерогенными, то есть у них появляется способность вызывать накопление липидов в клетках. Последовательность каскада атерогенных модификаций липопропротеидов такова, что окисление частиц является одной из последних стадий множественной модификации. Задолго до окисления липопропротеидная частица приобретает атерогенные свойства благодаря модификациям на уровне гликоконъюгатов, липидной и белковой составляющей. Таким образом, окисление не только не единственная атерогенная модификация ЛНП, но и не главная.

Одним из основных аргументов против окислительной модификации ЛНП как причина клеточного липоидоза в организме является тот факт, что окисленные ЛНП не были обнаружены в крови. Правда, в крови найдены аутоантитела против ЛНП, модифицированных малоновым диальдегидом (Palinski W et al., 1989). Несмотря на то, что ЛНП, конъюгированных с малоновым диальдегидом (МДА-ЛНП), как и окисленных ЛНП в крови обнаружено не было, наличие аутоантител против МДА-ЛНП рассматривалось как доказательство того, что окисленные ЛНП имеются *in vivo* (Palinski W et al., 1989). МДА-ЛНП – это искусственное образование, которое, в принципе, может возникнуть в организме. Предполагалось, что окисление ЛНП происходит не в крови, а в сосудистой стенке, где окисленные ЛНП немедленно захватываются макрофагами. Разумеется, эти сложные умозаключения, основанные на догадках и тенденциозности, не могут перевесить факт обнаружения в крови множественно моди-

фицированных атерогенных ЛНП, однако до сих пор миф об окисленных ЛНП как основной атерогенной модификации липопротеидов имеет широкое хождение среди исследователей.

Таблица 18. Константа сродства анти-ЛНП ( $\times 10^{-7} \text{ M}^{-1}$ )

|                           |      |
|---------------------------|------|
| ЛНП здоровых лиц          | 2,4  |
| гликозилированные ЛНП     | 2,6  |
| ацетилированные ЛНП       | 2,8  |
| ЛНП, окисленные медью     | 3,5  |
| ЛНП больных               | 11,3 |
| ЛНП, модифицированные МДА | 10,9 |
| десиалированные ЛНП       | 89,4 |

Обнаружение в крови аутоантител против МДА-ЛНП (Palinski W et al., 1989) остается самым важным аргументом в пользу окислительной модификации ЛНП *in vivo*. Выше указывалось, что мы также обнаружили в крови аутоантитела против модифицированных ЛНП (Orekhov AN et al., 1991c). Было оценено сродство этих антител к различным липопротеидам (Таблица 15). Липопротеиды, модифицированные гликозилированием, ацетилированием и окислением медью взаимодействовали с аутоантителами с таким же сродством, что и нативные ЛНП здоровых лиц. ЛНП, выделенные из крови больных с подтвержденным атеросклерозом, взаимодействовали с анти-ЛНП со сродством на порядок более высоким (Таблица 15). Было установлено, что с таким же высоким сродством взаимодействуют с анти-ЛНП и МДА-ЛНП, то есть мы также обнаружили, что ауто-



антитела имеют большее сродство к МДА-ЛНП по сравнению с нативными ЛНП. Однако самое высокое сродство аутоантитела имели к дезаилированным ЛНП. Константа сродства аутоантител к дезаилированным ЛНП была на порядок выше, чем к МДА-ЛНП и на 2 порядка выше, чем к нативным ЛНП (Таблица 18).

Важнейшим аргументом против гипотезы окислительной модификации ЛНП являются результаты клинических исследований, в которых применялись антиоксиданты для предотвращения окислительной модификации ЛНП в организме. Ни в одном исследовании не было показано, что применение антиоксидантом может замедлить развитие атеросклероза, а, тем более, вызвать его перрессию (Steinberg D, 1995; 1997; 2000; Witztum JL & Steinberg D, 2001). С момента опубликования результатов этих исследований интерес к изучению роли окислительной модификации ЛНП в атерогенезе резко упал. К сожалению, на смену гипотезе окислительной модификации ЛНП не пришли более разумные представления об атерогенной модификации липопротеидов. Консерватизм мышления в этой области оказался очень большим. Это не удивительно, учитывая то, что в течение более 15 лет тысячи исследователей тратили огромные ресурсы на доказательство принципиального значения для развития атеросклероза окислительной модификации ЛНП.

Учитывая широкое распространение ошибочных представление об окисленных ЛНП как основной атерогенной модификации липопротеидов, необходимо привести неоспоримые аргументы против этого мифа:

- окисленные ЛНП не были найдены в крови;

- признаки окисленности имеют множественно модифицированные ЛНП, причем только старые, долго циркулирующие в крови частицы;
- не обнаружено связи между окисленностью ЛНП и их атерогенностью;
- анти-ЛНП, обнаруженные в крови, не специфичны к окисленным ЛНП;
- в клинических исследованиях антиоксиданты не проявили антиатеросклеротического действия.

#### **8.6.4. Миф IV - атеросклероз является хроническим воспалением**

Представление об атеросклерозе, как о хроническом воспалении возникло на основании данных о наличии в атеросклеротическом поражении клеток и молекул, которые обычно сопровождают воспаление (Libby P, 2012; Libby P et al., 2009; 2010b; 2011).

С клинической точки зрения атеросклероз нельзя рассматривать как воспаление. В Таблице 19 приведены основные клинические симптомы воспаления в сопоставлении с проявлениями атеросклероза. Такой клиническим симптом как отек, по видимому, может локально проявляться в сосудистой стенке, о чем свидетельствует инфильтрация интимы различными элементами крови, однако наличие отека в интима требует документального подтверждения. Покраснение в очаге воспаления не может быть проявлением атеросклероза, поскольку интима, где развивается атеросклеротическое поражение, не имеет капилляров, следовательно, покраснения в зоне поражения быть не может. Повышение температуры – характерный симптом дл

очага воспаления, однако в случае сосудистой стенки нет данных о локальном повышении температуры. Боль, как симптом воспаления, не может иметь отношения к атеросклерозу, поскольку в интиме нет нервных окончаний и, следовательно, не может возникнуть боль. Такой симптом воспаления как дисфункция органа может иметь место в случае атеросклероза, если рассматривать проходимость крови через артерии как одну из важнейших функций сосуда. Однако дисфункция артерии как следствие атеросклеротического поражения может проявиться лишь на довольно поздних этапах развития поражения. Таким образом, и этот симптом не может иметь отношения к рассмотрению атеросклероза как хроническое воспаление, поскольку признаки воспаления появляются в сосудистой стенке еще до возникновения выраженных атеросклеротических поражений, которые могут привести к дисфункции органа.

С гистологической точки зрения фазы воспаления вполне соответствуют проявлениям атеросклероза. В Таблице 20 приведено сопоставление фаз воспаления и проявления атеросклероза. Инфильтративная фаза воспаления, безусловно, имеет место в интиме и заключается в инсудации компонентами крови, включая липопротеиды. Репаративной фазе воспаления соответствует активность интимальных клеток, связанная с пролиферацией и интенсивным синтезом компонентов внеклеточного матрикса. Наконец, терминальной фазе воспаления - формированию рубца соответствует в артериальной стенке формирование фиброзной бляшки, которая гистологически ничем от рубца не отличается.

Таблица 19. Симптомы воспаления и атеросклероз

|             | воспаление | атеросклероз |
|-------------|------------|--------------|
| отек        | +          | -/+          |
| покраснение | +          | -            |
| температура | +          | ?            |
| боль        | +          | -            |
| дисфункция  | +          | -/+          |

Таблица 20. Гистологические фазы воспаления и атеросклероз

| фаза         | воспаление | атеросклероз |
|--------------|------------|--------------|
| инфильтрация | +          | +            |
| репарация    | +          | +            |
| рубец        | +          | +            |

На Рисунке 67 приведена схема, сопоставляющая гистологические фазы воспаления и различные стадии атерогенеза. Инфильтративная фаза воспаления начинается еще до появления начальных поражений и продолжается с уменьшением интенсивности вплоть до образования фиброзной бляшки (рубца). Одновременно с инсудацией начинается репаративная фаза воспаления, которая набирает силу по мере того, как атеро-

склеротическое поражение становится все более выраженным (жировая полоса, бляшка). При переходе к фиброзной бляшке активная фаза воспаления в артериальной стенке заканчивается и формируется рубец.

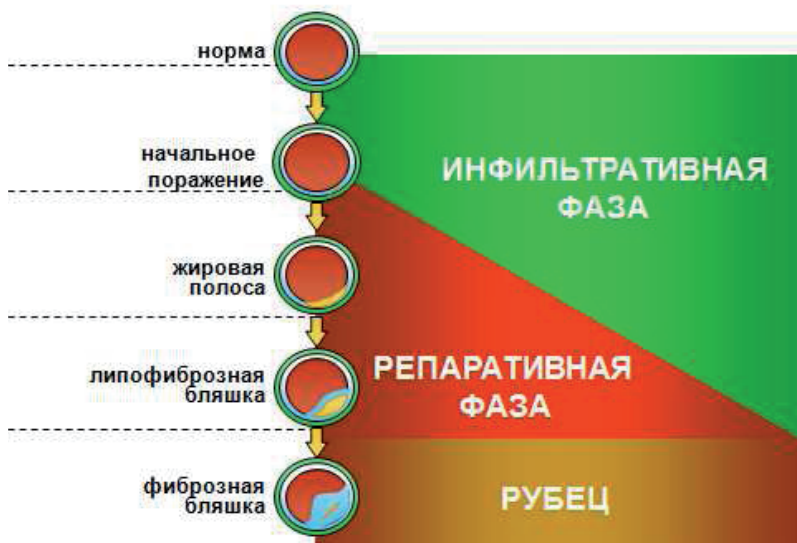


Рисунок 67. Гистологические фазы воспаления и стадии атеросклероза

Таким образом, в отличие от клинических представлений об атеросклерозе как о хроническом воспалении гистологические представления о воспалении вполне соответствуют процессу атерогенеза. Следовательно, о воспалении в сосудистой стенке как о процессе, сопровождающем атерогенез можно говорить только в гистологическом, но не в клиническом смысле. Вопрос о клинических и гистологических представлениях о роли воспаления в атерогенезе имеет вовсе не терминологическое

значение. Ошибочное представление о том, что атеросклероз является хроническим воспалением, подтолкнуло клиницистов к использованию обычной противовоспалительной терапии в качестве антиатеросклеротического воздействия. При этом были выбраны такие формы терапии как длительные курсы антибиотиков (Cannon CP et al., 2005; Danesh J, 2005; Epstein SE et al., 2009; Grayston JT et al., 2005; Jespersen CM et al., 2006; O'Connor CM et al., 2003; Rosenfeld ME & Campbell LA, 2011) и нестероидные противовоспалительные средства (Amer M et al., 2010; Chan FK et al., 2012; Cuccurullo C et al., 2007; Heeneman S et al., 2007; Rainsford KD, 2007; Ricciotti E & FitzGerald GA, 2011; Tabit CE et al., 2012). Такое лечение не вызывало благоприятных изменений. И это неудивительно, поскольку мишени для подобной терапии не имеют ничего общего с атеросклерозом. Выбор адекватных мишеней является необходимым условием для разработки эффективной антиатеросклеротической терапии. В частности, в клиническом исследовании CANTOS (Ridker PM et al., 2011; 2012) оценивается антиатеросклеротическая эффективность подавления провоспалительного цитокина интерлейкина-1 $\beta$  с помощью моноклональных антител. Такой подход имеет серьезное теоретическое обоснование, если рассматривать его как антиатеросклеротическую терапию, направленную на подавление воспаления.

## 9. Модель атерогенеза человека

Совокупность знаний и изложенных выше фактов, не вызывающих сомнений, а также понимание сильных и слабых сторон различных гипотез и распространенных представлений позволяет построить рабочую модель развития атеросклероза (Рисунок 68). Построение такой модели важно не только для того, чтобы объяснить накопленные факты и представить себе, как возникает и развивается атеросклеротическое поражение, но и для разработки на основе имеющихся знаний и представлений новых подходов к диагностике, профилактике и лечению атеросклероза и атеросклеротических заболеваний.

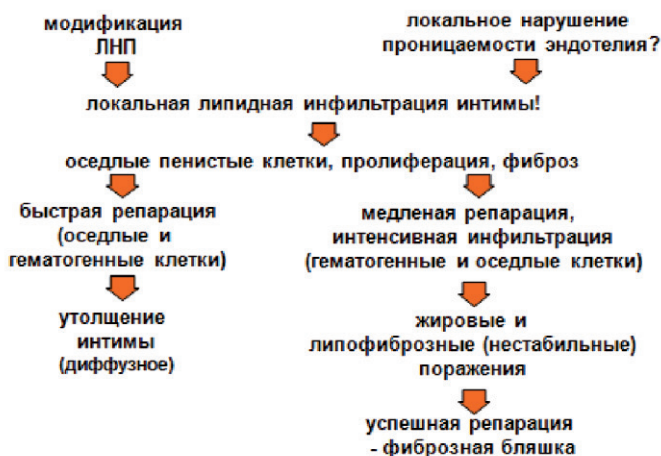


Рисунок 68. Модель возникновения и развития атеросклеротического поражения

Для возникновения локального поражения артериальной стенки должны произойти, как минимум два события - атерогенная модификация липопротеидов низкой плотности, циркулирующих в крови, а также локальное изменение проницаемости эндотелия.

Причиной модификации ЛНП являются процессы, происходящие как в крови, так и в сосудистой стенке, ведущие к множественным изменениям физико-химических характеристик липопротеидов и, как следствие, к нарушению их функций. Одним из самых ранних событий множественной модификации ЛНП является десалирирование гликоконъюгатов липопротеидной частицы, вызванное присутствующей в крови транс-салиридазой. Локальность изменения проницаемости эндотелия связана с гетерогенностью эндотелиальной выстилки, наличием кластеров гигантских многоядерных эндотелиальных клеток и мелких клеток, располагающихся мозаично. Эти морфологические типы эндотелия, без сомнения, различаются функционально. Повидимому, именно мозаичность расположения кластеров эндотелия определяет мозаичность атеросклеротических поражений в артериальной стенке.

Проникновение модифицированных ЛНП в субэндотелиальное пространство в месте повышенной проницаемости эндотелия ведет к локальной липидной инфильтрации интимы. Как в крови, так и в интиме модифицированные образуют ассоциаты друг с другом, с аутоантителами против модифицированных ЛНП (циркулирующие иммунные комплексы) и с компонентами внеклеточного матрикса. Ассоциаты ЛНП взаимодействуют с клетками, популирующими субэндотелиальную интиму. Это могут быть как оседлые клетки, так и клетки, пришедшие в интиму из крови (гематогенные клетки). Конформация модифицирован-



ных ЛНП в составе ассоциата принципиально отличается от конформации нативной липопротеидной частицы. Вследствие этого ассоциаты ЛНП не взаимодействуют с ЛНП-рецепторами на поверхности клетки, но проникают в клетку путем неспецифического фагоцитоза. Согласно Brown и Goldstein (Goldstein JL & Brown MS, 1987) нерецепторный захват липопротеидов приводит к накоплению внутриклеточных липидов и образованию пенистых клеток.

Фагоцитоз ассоциатов липопротеидов – это результат реакции врожденного иммунитета. Для клетки ассоциат не является липопротеидом, для захвата которого клетка имеет отлаженный механизм рецепторного взаимодействия, интернализации и деградации. Ассоциат, содержащий ЛНП, должен восприниматься клеткой как патоген, который подлежит уничтожению путем фагоцитоза. Фагоцит (макрофаг или оседлые перидитоподобные клетки), захватив воспринимаемый как патоген ассоциат, содержащий ЛНП, включают механизм реакции врожденного иммунитета, секретируя сигнальные молекулы, привлекающие соседние клетки артериальной стенки и иммунокомпетентные клетки крови в зону начинающегося воспаления. В ответ на этот сигнал оседлые и пришлые клетки также начинают захватывать ЛНП-ассоциаты, накапливая избыточные липиды и превращаясь в пенистые клетки.

Накопление липидов в клетках артериальной стенки не только формирует пенистые клетки, но также запускает процессы, характерные для репаративной фазы воспаления – пролиферацию и фиброз (синтез внеклеточного матрикса). Кроме того, интеграция трехмерной клеточной сети, характерной для непораженной субэндотелиальной интимы, нарушается. Межклеточные контакты в сети ослабевают.

При благоприятном развитии событий репарация заканчивается быстро. Оседлые и гематогенные иммунокомпетентные клетки справляются за несколько дней. В месте закончившейся реакции может сохраниться некоторое уплотнение как результат секреции компонентов внеклеточного матрикса, а также произойдет локальное увеличение числа клеток. Подобные события на протяжении жизни будут возникать то там, то здесь. С течением времени фиброзное уплотнение и увеличение клеточности субэндотелиальной интимы затронет все артериальное ложе и станет диффузным. Так, по-видимому, формируется диффузное интимальное утолщение, характерное для взрослого человека.

Однако не всегда реакция врожденного иммунитета (воспалительная реакция) заканчивается быстро и благополучно. Если по каким-то причинам локальная липидная инфильтрация интимы не прекращается, иммунокомпетентные клетки вынуждены будут участвовать в развивающейся воспалительной реакции с все возрастающей интенсивностью. Локальное скопление клеток будет возрастать, клеточная пролиферация и фиброз будут усиливаться. Ситуация может осложниться, если среди иммунокомпетентных клеток будут такие, у которых нарушен механизм митофагии и которые, как упоминалось выше, будут неспособны выполнять свои функции. Вместо того чтобы эффективно справляться с воспалением, такие клетки будут генерировать провоспалительные молекулы в режиме нон-стоп, привлекая в очаг воспаления все новые и новые клетки, включая клетки с амитофагией. Репарация будет протекать медленно и неэффективно, процесс станет хроническим.

Локальное хроническое воспаление будет сопровождаться усилением липоидоза, поскольку клетки не будут эффективно

справляться с усиливающейся липидной инфильтрацией интимы. Развитие клеточного липоидоза приведет к полной деструкции клеточной сети, усилению пролиферации и резкой интенсификации фиброза. Такая ситуация характерна для жировых атеросклеротических поражений, таких как жировая полоса и липофиброзная бляшка.

Неспособность клеток эффективно справиться с затянувшимся локальным воспалением в субэндотелиальной интиме вызовет тканевую реакцию, заключающуюся в формировании фиброзной покрышки, задача которой отграничить очаг воспаления и создать барьер для поступающих из кровотока липопротеидов и иммунокомпетентных клеток, которые в условиях хронической воспалительной реакции только способствуют развитию патологического процесса. Благоприятным исходом в такой ситуации будет полное обособление очага воспаления с подавлением воспаления и постепенным частичным восстановлением функций ткани с формированием фиброзной бляшки (рубца).

Неблагоприятным исходом с тяжелыми или даже фатальными последствиями для организма будет такое развитие липофиброзной бляшки, которое приведет к ее разрыву и образованию в месте разрыва тромба. Возвращаясь к Рисунку 67, следует отметить, что липофиброзная бляшка, как стадия развития атеросклеротического поражения – это стадия, которая сопровождается двумя разнонаправленными процессами - инфильтрацией и репарацией, имеющими приблизительно равные шансы пока между ними существует равновесие (Рисунок 69). Это равновесие неустойчивое. Если баланс сдвигается в сторону репарации, формируется фиброзная бляшка, что является благоприятным исходом. Если же репарация протекает неэф-

фективно и липидная инфильтрация перевешивает, может произойти разрыв бляшки. Такой исход уносит из жизни каждого второго.

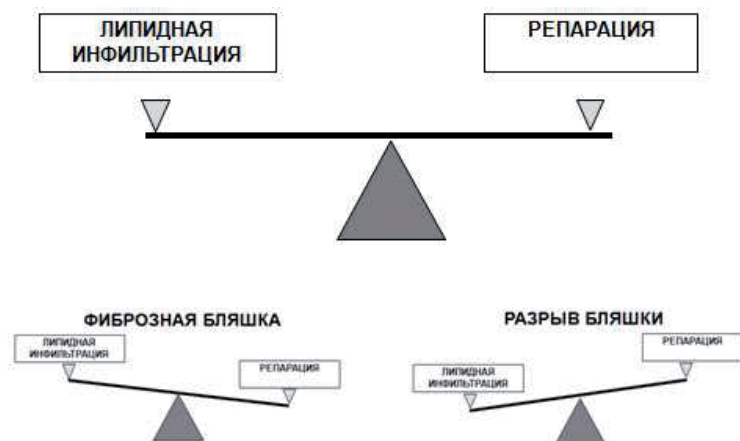


Рисунок 69. Неустойчивое равновесие между инфильтративной и репаративной фазой в жировом атеросклеротическом поражении

Таким образом, как на клеточном уровне, так и на тканевом решающим моментом для инициации и развития атеросклеротического поражения является липоидоз, то есть липидная инфильтрация интимы, накопление липидов в клетках и отложение их на структурах внеклеточного матрикса. Именно липоидоз является триггером атерогенеза, определяет развитие атеросклеротического поражения и является первопричиной клинических проявлений атеросклероза. Понимание этого не может не стимулировать поиск подходов к борьбе с атероскле-

розом. Разработка таких подходов имеет очевидную практическую значимость. Кроме того, оценивая эффективность подходов, разработанных на основе теоретических представлений о механизмах атерогенеза, можно установить, насколько истинными являются эти представления. Как известно, практика – это критерий истины.

В частности, наши представления о важной роли циркулирующих в крови множественно модифицированных ЛНП и иммунных комплексов, содержащих модифицированные липопротеиды, породили разработку метода оценки содержания ЛПН в циркулирующих иммунных комплексах. Определение этого параметра в клинических исследованиях позволило выявить его высокую диагностическую и прогностическую значимость в отношении атеросклероза (Sobenin IA et al., 2012c,d) Таким образом, на практике была доказана верность представлений об атерогенности множественной модификации ЛНП.

Другим примером подтверждения на практике справедливости гипотезы о том, что аутоантитела против ЛНП и циркулирующие иммунные комплексы, состоящие из анти-ЛНП и множественно модифицированных ЛНП, определяют атерогенный потенциал крови явились результаты пилотного испытания разработанной нами процедуры экстракорпорального удаления из крови анти-ЛНП (аферез анти-ЛНП). Такая процедура не влияет на содержание липидов в крови, но существенно снижает атерогенность (Chazov EI et al., 1988; Orekhov AN et al., 1991d). По данным повторной коронароангиографии это приводит к благоприятным изменениям течения атеросклероза (Orekhov AN et al., 1991d).

Наконец, наиболее убедительные доказательства правоты наших представлений о механизмах атерогенеза у человека

были получены в клинических исследованиях по регрессии атеросклероза у пациентов при применении антиатеросклеротических средств, которые мы разработали, опираясь на накопленные знания и используя клеточные модели, созданные нами на основе первичной культуры субэндотелиальной интимы аорты человека (Orekhov AN et al., 2013). Основным выводом из наших фундаментальных исследований указывает на то, что клеточный липоидоз – это ключевое событие атерогенеза. Мы разработали терапевтические средства, предотвращающие накопление липидов в клетках артерий. Применение этих средств приводит к регрессии атеросклероза и/или предотвращает его прогрессирование у пациентов. Таким образом, мы осуществили успешную трансляцию результатов наших фундаментальных исследований в клиническую практику. Данные, полученные при проведении клинических испытаний, подтвердили эффективность, как инновационного подхода, так и инновационных препаратов. Следовательно, можно утверждать, что наши теоретические представления полностью подтвердились на практике.

Ниже приводятся результаты оценки практической значимости наших разработок.

## 10. Диагностическая и прогностическая значимость при атеросклерозе циркулирующих иммунных комплексов, содержащих ЛНП

Для определения количества ЛНП, содержащихся в циркулирующих иммунных комплексах, был разработан специальный метод (Orekhov AN et al., 1995). Циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) выделяли из сыворотки крови путем преципитации полиэтиленгликолем 6000. Уровень ЛНП в ЦИК оценивали по содержанию ароВ или холестерина. Большее распространение получил второй способ, благодаря простоте определения и низкой стоимости анализа. Определенный этим способом параметр был назван «иммунный холестерин» или холестерин ЦИК (Х-ЦИК).

В проспективном 2-летнем исследовании участвовали 98 мужчин в возрасте 40-74 лет с ранним бессимптомным атеросклерозом сонных артерий. Ультразвуковое обследование проводилось трижды перед включением в исследование, 1 раз в 3 месяца в течение первого года наблюдения, 1 раз в 6 месяцев в течение второго года наблюдения, и трижды по окончании исследования.

В Таблице 21 представлены исходные клинические и биохимические характеристики участников исследования. Для установления диагностической и прогностической значимости уровня иммунного холестерина и других липидных показателей, их пороговые значения для данной выборки были определены методом наибольшего  $\chi^2$ . Пороговое значение для иммунного холестерина составило 16 мкг/мл. У пациентов с повышенным уровнем иммунного холестерина также отмечалось повышенное содержание общего холестерина и холестерина ЛНП.

Средняя и максимальная толщина интима-медиального слоя сонных артерий у пациентов с повышенным уровнем иммунного холестерина была достоверно выше, чем у пациентов с нормальным уровнем Х-ЦИК (Таблица 21).

Таблица 21. Исходные клинические и биохимические показатели

| Показатель                 | Все<br>больные<br>(n=98) | Х-ЦИК<br>$\leq 16.0$ мкг/мл<br>(n=55) | Х-ЦИК<br>$> 16.0$ мкг/мл<br>(n=43) |
|----------------------------|--------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|
| ТИМ, мм                    | 0,939 $\pm$ 0,015        | 0,920 $\pm$ 0,008                     | 0,963 $\pm$ 0,018 *                |
| Возраст, лет               | 60,6 $\pm$ 0,8           | 60,2 $\pm$ 0,5                        | 61,1 $\pm$ 0,8                     |
| Общий холестерин,<br>мг/дл | 231 $\pm$ 4              | 224 $\pm$ 2                           | 240 $\pm$ 3 *                      |
| Триглицериды,<br>мг/дл     | 196 $\pm$ 10             | 203 $\pm$ 6                           | 187 $\pm$ 9                        |
| Холестерин ЛВП,<br>мг/дл   | 42,6 $\pm$ 1,1           | 42,0 $\pm$ 0,6                        | 43,4 $\pm$ 1,0                     |
| Холестерин ЛНП,<br>мг/дл   | 149 $\pm$ 4              | 141 $\pm$ 2                           | 159 $\pm$ 3 *                      |
| Х-ЦИК, мкг/мл              | 14,9 $\pm$ 0,7           | 9,3 $\pm$ 0,6                         | 22,1 $\pm$ 2,8 *                   |

\* - достоверное различие между больными с нормальным и повышенным уровнем Х-ЦИК,  $p < 0,05$ .

Анализ сопряженности липидных показателей с исходной толщиной интима-медиального слоя сонных артерий выявил, что только уровни Х-ЦИК и холестерина ЛНП были достоверно сопряжены со степенью выраженности каротидного атероскле-



роза и при этом имели высокие значения относительного риска и отношения шансов (Таблица 22). Показатель Х-ЦИК имел наивысшую чувствительность и специфичность по сравнению с другими липидными параметрами, то есть обладал высокой диагностической ценностью. Следует отметить, что такие показатели, как общий холестерин, холестерин ЛНП и липопротеидов высокой плотности (ЛВП), характеризовались чувствительностью, сравнимой с Х-ЦИК, но их специфичность была низкой. Уровень триглицеридов сыворотки крови не имел достоверной диагностической значимости.

Таблица 22. Диагностическая значимость липидных показателей и Х-ЦИК

| Показатель       | $\chi^2$ | p     | Относительный риск | Отношение шансов | Чувствительность, % | Специфичность, %    |
|------------------|----------|-------|--------------------|------------------|---------------------|---------------------|
| Х-ЦИК            | 8,490    | 0,045 | 1,18               | 1,43             | 64,7<br>(62,1-67,1) | 60,1<br>(56,8-65,9) |
| Холестерин ЛНП   | 7,102    | 0,049 | 1,11               | 1,35             | 61,7<br>(56,5-66,8) | 42,9<br>(38,8-47,0) |
| Холестерин ЛВП   | 3,987    | 0,159 | 1,12               | 1,33             | 61,8<br>(58,2-65,4) | 45,3<br>(39,3-51,3) |
| Общий холестерин | 1,605    | 0,373 | 1,11               | 1,20             | 61,6<br>(58,3-65,0) | 45,7<br>(39,3-52,2) |
| Триглицериды     | 0,128    | 0,820 | 0,97               | 0,94             | 50,2<br>(39,9-61,0) | 38,1<br>(34,1-42,2) |

В скобках указан 95% доверительный интервал.

Увеличение толщины интима-медиаляного сонных артерий составило в среднем  $0,029 \pm 0,011$  мм за 2 года наблюдения при исходной средней толщине интима-медиаляного  $0,939 \pm 0,015$  мм ( $p=0.028$ ). Таким образом, динамика изменений

толщины интима-медиального может быть расценена как медленное, но статистически достоверное прогрессирование каротидного атеросклероза. Индивидуальные изменения толщины интима-медиального расценивались как прогрессирование, регрессия или стабильное состояние на основании статистически достоверных различий между средними величинами трех измерений при включении и по завершении исследования. Прогрессирование атеросклероза было отмечено у 52 больных (53,1%). Спонтанная регрессия была отмечена у 21 больного (21,4%). Соответственно, у 25 больных (25,5%) за 2 года наблюдения толщина интима-медиального достоверно не изменилась.

Таблица 23. Прогностическая значимость липидных показателей и Х-ЦИК

| Показатель       | $\chi^2$ | p     | Относительный риск | Отношение шансов | Значимость повышенных показателей, % | Значимость нормальных показателей, % |
|------------------|----------|-------|--------------------|------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Х-ЦИК            | 15,602   | 0,001 | 2,57               | 6,25             | 63,5<br>(53,6-71,5)                  | 78,3<br>(67,1-87,3)                  |
| Холестерин ЛНП   | 0,031    | 0,904 | 0,96               | 0,92             | 72,4<br>(67,7-77,6)                  | 58,1<br>(53,5-62,9)                  |
| Общий холестерин | 0,031    | 0,904 | 0,97               | 0,91             | 64,3<br>(56,0-72,8)                  | 39,0<br>(34,2-43,5)                  |
| Триглицериды     | 0,010    | 0,973 | 0,99               | 0,98             | 36,3<br>(31,0-41,3)                  | 34,8<br>(30,1-39,0)                  |
| Холестерин ЛВП   | 0,008    | 0,986 | 1,00               | 1,00             | 48,0<br>(42,4-53,7)                  | 43,4<br>(38,7-47,4)                  |

В скобках указан 95% доверительный интервал.

Анализ сопряженности липидных показателей с динамикой изменений толщины интима-медиа выявил, что только уровень Х-ЦИК был достоверно сопряжен с прогрессированием каротидного атеросклероза и имел высокие показатели относительного риска и отношения шансов (Таблица 23). Повышенный уровень Х-ЦИК, наряду с повышенным общим холестерином и повышенным холестерином ЛНП, имел достаточно высокую прогностическую значимость. Повышенный уровень триглицеридов сыворотки крови, как и сниженный уровень холестерина ЛВП, не имели прогностической значимости в отношении прогрессирования каротидного атеросклероза. Нормальный уровень Х-ЦИК (менее 16 мкг/мл) был единственным параметром, предвещающим отсутствие прогрессирования каротидного атеросклероза в течение 2 лет с прогностической значимостью 78,3% (Таблица 23). Нормальные уровни общего холестерина, холестерина ЛНП и ЛВП и триглицеридов не обладали достоверной прогностической ценностью.

Атерогенные свойства ЛНП-содержащих ЦИК позволяют предлагать использование Х-ЦИК в качестве биохимического маркера атеросклероза. Помимо диагностической значимости, повышенный уровень Х-ЦИК при раннем атеросклерозе имеет также и высокое прогностическое значение, сравнимое с повышенными уровнями общего холестерина и холестерина ЛНП. Следует отметить, что нормальный уровень Х-ЦИК оказался единственным высокозначимым биохимическим маркером, прогнозирующим отсутствие прогрессирования атеросклероза в течение 2 последующих лет.

## 11. Анти-ЛНП аферез

Было установлено, что сыворотки больных с исходно высокой атерогенностью после перфузии через колонку с иммобилизованными ЛНП в значительной степени теряют способность вызывать накопление холестерина в клетках, выделенных из субэндотелиальной интимы аорты человека. На основании этих данных было сделано предположение, что атерогенный фактор, присутствующий в сыворотке больных, сорбируется на агарозе с иммобилизованными ЛНП. Выяснилось, что этим фактором являются аутоантитела против ЛНП (Chazov EI et al., 1988; Orekhov AN et al., 1991d). В клинических условиях для устранения анти-ЛНП из плазмы крови больного целесообразно использовать сорбент на основе иммобилизованных аутологичных ЛНП, включенных в систему экстракорпорального кровообращения.

Мы провели исследование, посвященное обоснованию целесообразности применения этого метода у больных с атеросклерозом венечных артерий, чтобы дать оценку перспективности его применения в клинической практике.

После приготовления индивидуальной для данного больного колонки, сорбирующей фактор атерогенности и определения оптимального для данного больного интервала между процедурами афереза проводили последовательные процедуры удаления анти-ЛНП на протяжении 6 месяцев. Через каждые 2 месяца воздействия оценивали состояние больного с использованием общеклинических, инструментальных и биохимических методов. Таким образом, оценка влияния многократных процедур экстракорпоральной перфузии плазмы через колонку с иммобилизованными аутологичными ЛНП на клиническое течение ишемической болезни сердца у одного больного занимало 14-

17 месяцев (2 месяца подготовительного периода и 12- 15 месяцев воздействия).

Прежде всего, было необходимо установить, с какой частотой следует применять процедуры анти-ЛНП афереза у больных с ангиографически документированным атеросклерозом коронарных артерий. С этой целью сразу же после выполнения процедуры, а также начиная со следующего дня после проведения методики афереза, ежедневно изучали способность сывороток больных вызывать накопление холестерина в культивируемых клетках неизменной интимы аорты человека.

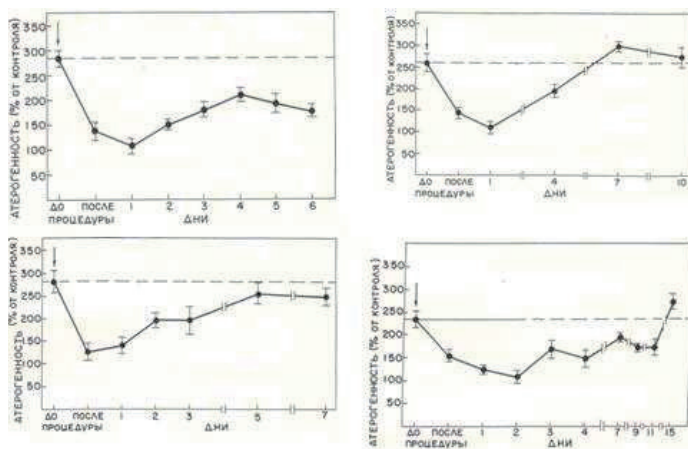


Рисунок 70. Влияние первой процедуры афереза анти-ЛНП на способность сыворотки различных больных вызывать накопление холестерина в культивируемых клетках неизменной интимы аорты человека

100% - показатели накопления холестерина в культивируемых клетках при добавлении 40% делипидированной сыворотки здорового человека (контроль).

На Рисунке 70 представлены данные о влиянии первой процедуры (перфузия через колонку с иммобилизованными на сефарозе аутологичными ЛПНП) на показатели атерогенности сывороток, выделенных из крови 4-х больных с ангиографически документированным атеросклерозом. Можно видеть, что у всех больных в результате двухчасовой экстракорпоральной перфузии плазмы крови через колонку с аутологичными ЛПНП атерогенность резко падает. Падение составляло 33,6% - 55,7% в сравнении с исходной (до процедуры) величиной. На следующий день после процедуры сыворотка, выделенная из крови этих больных, при добавлении ее в культуру не вызывала накопления холестерина в клетках интимы (атерогенность исчезает полностью). В последующие дни после процедуры показатели атерогенности сыворотки больных постепенно восстанавливались, и через 7-15 дней достигали исходного уровня.

Повторная процедура, проведенная через неделю после первой, также приводит к резкому снижению показателей атерогенности (Рисунок 71). Следует отметить, что вторая и третья процедура снижают атерогенность на более длительный срок и поэтому необходимости в еженедельном проведении процедуры нет, так как атерогенность не успевает за одну неделю возрасти существенно. Проводя процедуру один раз в две-три недели, можно добиться того, что атерогенность плазмы больного в течение длительного времени будет находиться на довольно низком уровне (Рисунок 71).

Важно было выяснить, отражается ли процедура афереза анти-ЛПНП на показателях липидного и липопротеидного состава крови у больных с ангиографически документированным атеросклерозом. Исследовалось содержание холестерина, триглицеридов и ЛВП в плазме крови до и непосредственно сразу же по-

сле экстракорпоральной перфузии через колонку с аутологичными ЛНП. Данные представлены в Таблице 24.

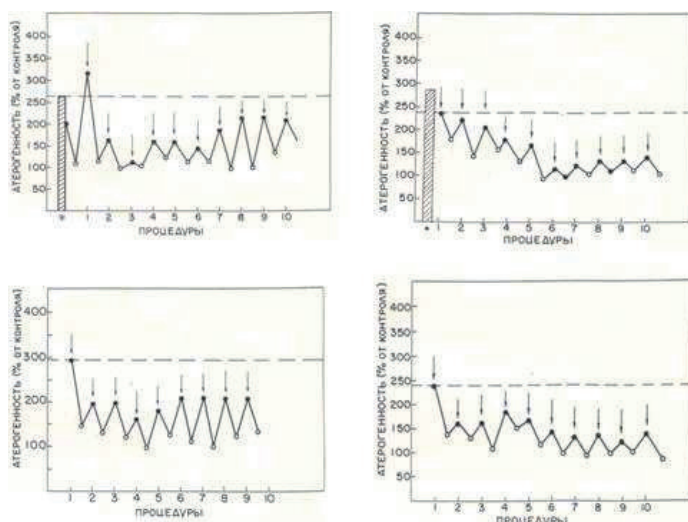


Рисунок 71. Влияние десяти процедур афереза анти-ЛНП (указаны стрелками) на способность сыворотки различных больных вызывать накопление холестерина в культивируемых клетках интимы аорты человека

100% - показатели накопления холестерина в культивируемых клетках при добавлении 40% делипидированной сыворотки здорового человека (контроль).

\* - показатели накопления холестерина в культивируемых клетках при добавлении 40% сыворотки крови больного до начала процедур.

Можно видеть, что проведение процедуры афереза анти-ЛНП не изменяют большинства изученных показателей. Так, у всех обследованных больных показатели содержания суммарного холестерина, ЛНП и ЛВП в плазме крови до и сразу же после проведения процедуры были сходными. После выполнения

процедуры отмечалось некоторое уменьшение содержания триглицеридов по сравнению с исходной (до процедуры) величиной. Однако к моменту выполнения следующей процедуры и эти показатели достигали исходного (до начала курса процедур афереза анти-ЛНП) уровня.

Следует отметить, что снижение содержания триглицеридов в плазме крови больных после проведения афереза анти-ЛНП и восстановления этих показателей до исходного уровня к моменту проведения следующей процедуры наблюдалось в течение всего курса лечения (Рисунок 72). Другие показатели липидного и липопротеидного профиля на протяжении всего курса применения процедур афереза анти-ЛНП не изменялись. Это показано на Рисунке 73, на котором отражены результаты изучения содержания холестерина, ЛВП в динамике проведенного лечения у больных с ангиографически документированным коронарным атеросклерозом.

Остается неясным, чем обусловлено снижение содержания триглицеридов сразу же после перфузии плазмы крови больных через колонку с аутологичными ЛНП. Для выяснения этого вопроса необходимы новые эксперименты. Однако отсутствие изменений в содержании холестерина и ЛВП, а также быстрое восстановление уровня триглицеридов позволяют заключить, что процедура афереза анти-ЛНП существенно не отражается на показателях липидного и липопротеидного состава сыворотки крови больных с ангиографически документированным атеросклерозом.



Таблица 24. Влияние процедур афереза анти-ЛНП на липидный и липопротеидный состав плазмы крови больных

| Больной | Показатели<br>(мг%) | Сроки исследования |       |              |       |               |       |
|---------|---------------------|--------------------|-------|--------------|-------|---------------|-------|
|         |                     | I процедура        |       | II процедура |       | III процедура |       |
|         |                     | до                 | после | до           | после | до            | после |
| I       | Холестерин          | 159                | 143   | 188          | 170   | 149           | 176   |
|         | Триглицериды        | 128                | 47    | 188          | 54    | 306           | 81    |
|         | ХС-ЛПВП             | 41                 | 36    | 39           | 35    | 41            | 35    |
|         | ХС-ЛПНП             | 93                 | 98    | 111          | 124   | 47            | 125   |
|         | ХС-ЛПОНП            | 25,6               | 9,4   | 37,6         | 10,8  | 61            | 16    |
| II      | Холестерин          | 225                | 206   | 213          | 166   | 197           | 178   |
|         | Триглицериды        | 93                 | 29    | 118          | 27    | 108           | 49    |
|         | ХС-ЛПВП             | 47                 | 40    | 47           | 35    | 40            | 37    |
|         | ХС-ЛПНП             | 159                | 160   | 142          | 126   | 135,4         | 131,2 |
|         | ХС-ЛПОНП            | 19                 | 6     | 24           | 5,0   | 21,6          | 9,8   |
| III     | Холестерин          | 188                | 178   | 175          | 150   | 193           | 187   |
|         | Триглицериды        | 94                 | 50    | 145          | 50    | 39            | 39    |
|         | ХС-ЛПВП             | 22                 | 33    | 38           | 36    | 39            | 33    |
|         | ХС-ЛПНП             | 147                | 135   | 108          | 108   | 146           | 146   |
|         | ХС-ЛПОНП            | 18,8               | 10    | 29           | 6     | 7,8           | 7,8   |
| IV      | Холестерин          | 237                | 232   | 189          | 177   | 276           | 218   |
|         | Триглицериды        | 42                 | 76    | 163          | 172   | 128           | 36    |
|         | ХС—ЛИНН             | 39                 | 36    | 37           | 36    | 45            | 38    |
|         | ХС-ЛПНП             | 190                | 181   | 119          | 107   | 205           | 173   |
|         | ХС-ЛПОНП            | 8,4                | 15,2  | 32,6         | 34,4  | 25,6          | 7,2   |

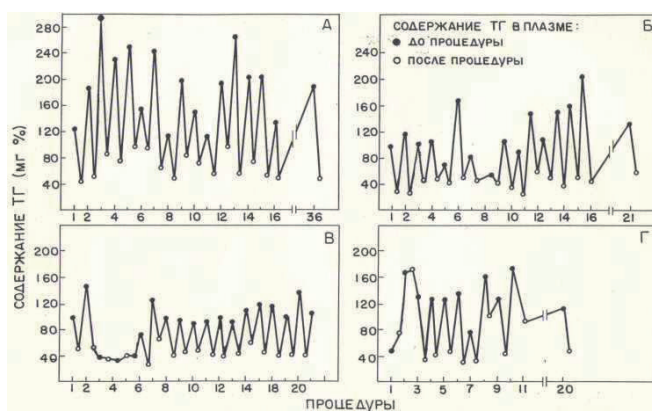


Рисунок 72. Динамика содержания триглицеридов у больных на протяжении курса процедур афереза анти-ЛНП

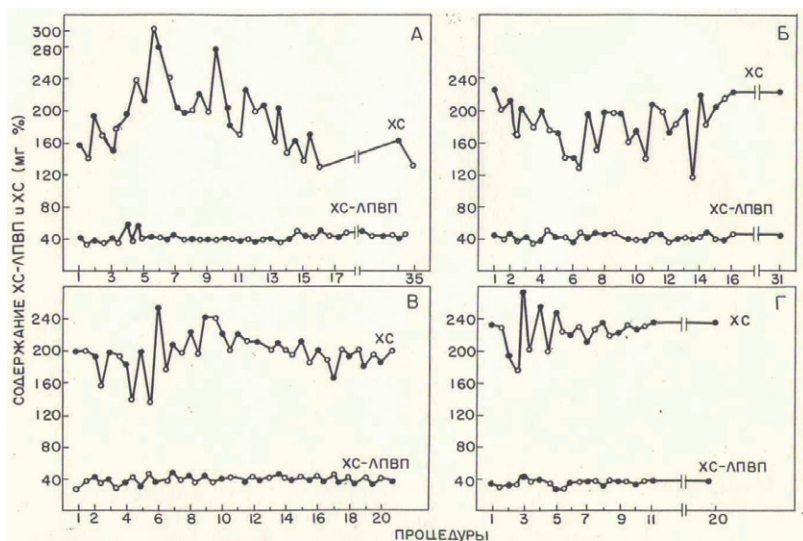


Рисунок 73. Динамика содержания холестерина и ЛПВП у больных на протяжении курса процедур афереза анти-ЛНП

В целом результаты, представленные выше, свидетельствуют о том, что многократные процедуры перфузии плазмы крови больных через колонки с аутологичными ЛНП, резко снижая показатели атерогенности сыворотки крови этих больных, не вызывают побочных эффектов в отношении показателей липидного и липопротеидного состава крови. Следует также отметить, что ни в одном из случаев мы не отмечали каких-либо нежелательных реакций во время проведения процедур проведения афереза анти-ЛНП.

Таблица 25. Влияние курса процедур перфузии плазмы крови через колонку с аутологичными ЛНП на показатели атерогенности сыворотки крови больных с ангиографически документированным атеросклерозом

| Больной | Сроки лечения | Количество процедур | Атерогенность (%) |                      | Р     |
|---------|---------------|---------------------|-------------------|----------------------|-------|
|         |               |                     | до лечения<br>(а) | после лечения<br>(б) |       |
| I       | 18 мес        | 31                  | 287±17            | 139±11*              | <0,05 |
| II      | 12 мес        | 40                  | 213±17            | 143±14*              | <0,05 |
| III     | 12 мес        | 20                  | 248±14            | 100±15*              | <0,05 |
| IV      | 12 мес        | 30                  | 242±21            | 115±12*              | <0,05 |

а - показатели атерогенности сыворотки больных с ангиографически документированным атеросклерозом до начала лечения;

б - показатели атерогенности сывороток этих же больных перед началом последней процедуры афереза;

\* -  $p < 0,05$ .

Данные, представленные в Таблице 25 и на Рисунке 74, свидетельствуют о том, что длительный курс процедур перфу-

зии плазмы крови через колонку с аутологичными ЛПНП позволяет добиться значительного снижения показателей атерогенности сывороток крови у этих больных. Так, если до начала курса лечения сыворотки, выделенные из крови обследованных больных, вызывали существенное увеличение содержания холестерина в культивируемых клетках интимы аорты человека (от  $213 \pm 17$  до  $287 \pm 17\%$ ), то к моменту повторного исследования этот показатель у 2-х больных практически не отличались от контроля (содержание холестерина в клетках при добавлении 40% сывороток этих больных составляли, соответственно,  $100 \pm 15\%$  и  $115 \pm 12\%$  по сравнению с контролем, взятым за 100%), а у двух других больных показатели холестерина в клетках не достигали даже 1,5 кратного накопления по сравнению с контролем.

Одновременно с изучением показателей атерогенности исследовалось также влияние длительного курса процедур афереза анти-ЛНП на клиническое состояние, показатели велоэргометрии и липидный состав сыворотки крови больных ИБС с ангиографически документированным атеросклерозом венечных артерий сердца. Соответствующие данные отражены в Таблице 26.

За время лечения самочувствие всех четырех больных значительно улучшилось. Это проявлялось в снижении частоты приступов стенокардии и уменьшении степени их выраженности. Если до лечения количество приступов стенокардии в сутки у обследуемых больных колебалось от 20 до 30 приступов в сутки, а для их купирования больные в среднем принимали 40-50 таблеток нитроглицерина, то к моменту повторного обследования (через 12-18 месяцев на фоне выполнения процедур афереза) частота загрудинных болей составляла в среднем 6-8

приступов в сутки, а число принимаемых таблеток нитроглицерина уменьшилось до 2-5 таблеток в сутки.

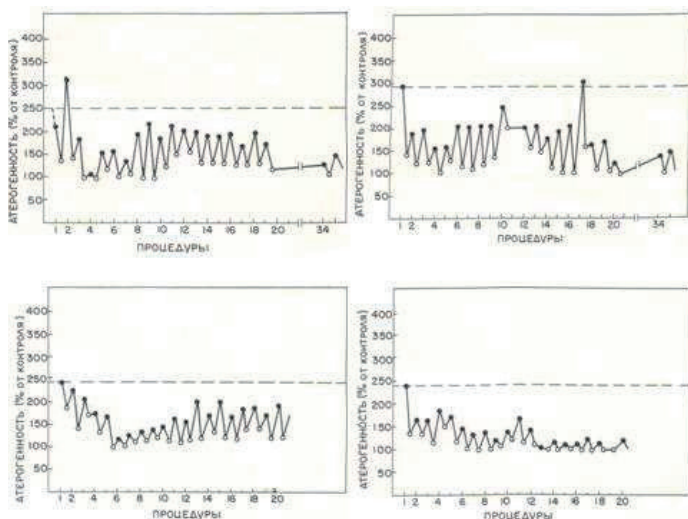


Рисунок 74. Динамика показателей атерогенности сыворотки различных больных

Это позволило двух больных, у которых до начала лечения была диагностирована стенокардия III функционального класса, перевести во II функциональный класс. Данные таблицы свидетельствуют также о том, что после проведенного курса процедур афереза анти-ЛНП у всех больных улучшилась переносимость физических нагрузок. Так, если до лечения больные проходили в среднем 400-450м, то после лечения длительность отрезка пути, который больные преодолевали без приступов стенокардии, составляла в среднем 650-700 м.

Длительный курс процедур афереза анти-ЛНП не отразился на показателях липидного и липопротеидного состава крови.

Данные Таблицы 23 свидетельствуют о том, что содержание холестерина, триглицеридов и ЛВП, а также концентрация ЛНП и ЛОНП, находившиеся в пределах возрастных нормативов в исходном (до начала лечения) периоде, остались практически на том же уровне к моменту повторного обследования.

Таблица 26. Влияние длительного курса процедур афереза анти-ЛНП на клиническое состояние больных ИБС с ангиографически документированным атеросклерозом

| Фамилии пациентов                      | I      |        | II          |             | III         |        | IV          |        |
|----------------------------------------|--------|--------|-------------|-------------|-------------|--------|-------------|--------|
|                                        | до     | после  | до          | после       | до          | после  | до          | после  |
| Стенокардия<br>(функциональный класс)  | III    | II     | II          | II          | III         | II     | III         | III    |
| Данные ВЭМ проба                       | полож  | полож  | полож       | полож       | полож       | полож  | полож       | полож  |
| Толерантность (кгм/мин)                | 600    | 600    | 450         | 450         | 600         | 750    | 450         | 450    |
| объем выполняемой<br>работы (кг/мин)   | 3300   | 3300   | 2700        | 2700        | 3300        | 6000   | 2700        | 2700   |
| Длительность ходьбы<br>без приступа(м) | 300    | 600    | 600-<br>800 | 600-<br>800 | 250-<br>300 | 1000   | 300-<br>400 | 400    |
| Липидный состав (мг%)                  | 255    | 201    | 220         | 224         | 225         | 220    | 227         | 254    |
| холестерин                             |        |        |             |             |             |        |             |        |
| триглицериды                           | 97     | 181    | 128         | 95          | 93          | 168    | 109         | 115    |
| ХС-ЛПВП                                | 47     | 44     | 32          | 41          | 47          | 40     | 22          | 34     |
| ХС-ЛПНП                                | 189    | 120    | 162         | 164         | 159         | 146    | 183         | 197    |
| ХС-ЛПОНП                               | 19     | 36,2   | 26          | 19          | 19          | 33,6   | 21,8        | 23     |
| Атерогенность (%)                      | 213±17 | 143±14 | 248±14      | 100±15      | 287±17      | 139±11 | 242±21      | 115±12 |

Наиболее интересными являются данные повторной коронароангиографии, представленные в Таблице 27. До начала

лечения больным была назначена коронароангиография, которая выявила гемодинамически значимые стенозы у двух больных в 3 основных коронарных артериях, а у двух других – в 2 коронарных артериях (Chazov EI et al., 1988). По окончании лечения была проведена повторная коронароангиография (Orkhov AN et al., 1991d).

Таблица 27. Повторная коронароангиография

| Больной              | I | II | III | IV | всего | %   |
|----------------------|---|----|-----|----|-------|-----|
| Общее число стенозов | 5 | 3  | 4   | 2  | 15    | 100 |
| Новые стенозы        | 0 | 0  | 0   | 0  | 0     | 0   |
| Прогрессирование     | 3 | 1  | 2   | 1  | 7     | 47  |
| Регрессия            | 1 | 1  | 0   | 2  | 4     | 27  |
| Стабильные           | 1 | 1  | 2   | 0  | 4     | 27  |

У больных не было выявлено ни одного нового гемодинамически значимого стеноза. В среднем около половины старых стенозов подверглись дальнейшему прогрессированию, регрессия наблюдалась у четверти старых стенозов. Также четверть стенозов не претерпели изменений. В целом эти данные следует рассматривать как благоприятное развитие коронарного атеросклероза. Таким образом, мы показали, что удаление из крови аутоантител против ЛНП препятствует развитию атеросклероза.

## **12. Перспективы антиатеросклеротической терапии**

Важнейшим доказательством правильности гипотез и теорий, объясняющих механизмы возникновения и развития атеросклеротического поражения, являются эффективные средства профилактики и лечения атеросклероза. Еще 25-30 лет назад эффективность антиатеросклеротической терапии практически невозможно было оценить. Проходили бурные дискуссии о том, возможна ли, в принципе, регрессия атеросклероза. Разработанные способы мониторинга артериальной стенки позволили в течение двух последних десятилетий не только доказать принципиальную возможность регрессии атеросклероза вследствие лекарственной терапии, но и создать такую область медицины как антиатеросклеротическая терапия.

### **12.1. Лекарственные средства**

Когда идет речь об антиатеросклеротической терапии, целесообразно разделить прямое и непрямое антиатеросклеротическое воздействие. Под прямым антиатеросклеротическим воздействием следует понимать такие способы лечения, которые непосредственно затрагивают сосудистую стенку и процессы, происходящие в ней. Непрямая антиатеросклеротическая терапия основана на воздействии на факторы риска атеросклероза, но не на артериальную стенку.

### **12.2. Снижение воздействия факторов риска: достоинства и недостатки**

В развитие атеросклероза вносят вклад различные нару-



шения липидного обмена, регуляции артериального давления, свертывающей системы крови, а также наличие других факторов риска. В настоящее время на основании результатов серьезных эпидемиологических исследований выявлена целая группа состояний и клинико-биохимических синдромов (факторов риска), способствующих развитию атеросклероза. Воздействие на факторы риска с целью их устранения является традиционной стратегией при первичной профилактике сердечнососудистых заболеваний, в основе которых лежит атеросклероз. В последнее время для оценки сердечнососудистого риска широко используются специальные алгоритмы, разработанные на основе многолетних проспективных эпидемиологических исследований и учитывающие комплексное воздействие различных факторов риска (Assmann G et al., 2002). Имеющиеся рекомендации по профилактике атеросклероза касаются главным образом воздействия на отдельные факторы риска. В то же время, полиэтиологический характер атеросклероза позволяет предполагать, что одновременное комплексное воздействие на целый ряд факторов риска явится наиболее обоснованным и клинически эффективным способом первичной профилактики.

С практической точки зрения для клиницистов важны факторы риска клинических проявлений атеросклероза, поэтому стратегия терапевтического воздействия на факторы риска разрабатывалась не в отношении самого атеросклероза, но заболеваний, которые им вызываются, в частности, в отношении сердечно сосудистых заболеваний.

Вероятность возникновения сердечнососудистых заболеваний, в основе которых лежит атеросклероз, определяется множественным воздействием различных факторов риска. Факторы риска в целом можно разделить на фиксированные (немо-

дифицируемые) - пол, возраст, семейный анамнез, наличие сахарного диабета, и модифицируемые - дислипидемия, артериальная гипертензия, курение, абдоминальное ожирение и др. Кроме того, выявлена связь других факторов риска с развитием ишемической болезни сердца (ИБС), таких, как повышенный уровень фибриногена, липопротеида (а) и гомоцистеина плазмы крови; при сахарном диабете или инсулинорезистентности приобретает значение наличие микроальбуминурии. Возможно, факторами риска являются также малоподвижный образ жизни, алкоголизм, гипергликемия, гиперинсулинемия, инсулинорезистентность, психоэмоциональные перегрузки, различные тромбогенные факторы и другое (Fuster V & Gotto AM Jr, 2000). Роль ряда факторов риска окончательно не установлена; выявление и диагностика многих из них не получили широкого распространения. Основой первичной профилактики сердечнососудистых заболеваний по праву считается воздействие на независимые (мажорные) факторы риска. Так, во Фрамингемском исследовании было показано, что снижение сердечнососудистой смертности на 44%, происшедшее в период с 1950 до 1989 года, по крайней мере, на треть обусловлено снижением воздействия факторов риска (Sytkowski PA et al., 1990). Снижение сердечнососудистой смертности в США за период с 1980 по 1990 годы на 50% было обусловлено борьбой с факторами риска и только на 43% - совершенствованием медикаментозных воздействий (Hunink MG et al., 1997). В Нидерландах снижение смертности от ИБС в период с 1978 по 1985 год было на 44% обусловлено мерами первичной профилактики (Bots ML & Grobbee DE, 1996). В Северной Карелии (Финляндия) снижение уровня холестерина крови и артериального давления в популяции, наряду с резким сокращением числа курильщиков, на 48% обусловило сни-

жение сердечнососудистой смертности за 20 лет наблюдения (Ginter E, 1997).

Стратегические подходы к снижению риска ИБС в течение многих лет традиционно подразделялись на меры первичной и вторичной профилактики. Первичная профилактика подразумевала вмешательства, проводимые в массовом масштабе и направленные на предупреждение возникновения сердечнососудистых заболеваний. Вторичная профилактика включала активные воздействия по предупреждению сердечнососудистых катастроф у больных ИБС. В последние годы это подразделение не стало выглядеть настолько явным. Проспективные эпидемиологические исследования показали, что у лиц с высоким сердечнососудистым риском, но без клинических признаков ИБС, вероятность острого инфаркта миокарда может быть даже выше, чем у больных ИБС (International Task Force for Prevention of Coronary Heart Disease, 2003; Voss R et al., 2002). Поэтому при планировании профилактических вмешательств стала преобладать концепция оценки абсолютного риска, выражающегося в актуальной вероятности наступления сердечнососудистой катастрофы. Кроме того, ключевые мероприятия, проводимые при первичной или вторичной профилактике атеросклеротических заболеваний, качественно не различаются и предусматривают, прежде всего, коррекцию липидного обмена, контроль артериального давления и отказ от курения. Естественно, что при наличии ИБС в значительной степени увеличивается объем проводимых нелекарственных и терапевтических вмешательств, и в настоящее время вторичная профилактика отличается от первичной главным образом количественно.

Основным методом профилактики сердечнососудистых заболеваний традиционно считались воздействия, направлен-

ные на снижение уровня холестерина в крови. Действительно, среди отдельных факторов риска наибольшей прогностической значимостью обладает повышенный уровень холестерина липопротеидов низкой плотности (ЛНП); этот показатель по своей чувствительности и специфичности превосходит все остальные изолированные факторы риска. Однако, алгоритмы определения сердечнососудистого риска, использующие оценку множественных факторов риска, дают лучшие результаты (Voss R et al., 2002). Дело в том, что при наличии нескольких факторов риска происходит их кластеризация и проявляется синергическое действие на вероятность сердечнососудистых заболеваний (Kannel WB et al., 1986; Stamler J et al., 1993). При наличии трех мажорных факторов риска вероятность сердечнососудистой катастрофы в течение последующих 20 лет возрастает в 3 раза, а общая смертность – почти в 2 раза; при наличии четырех-пяти факторов риска эти показатели возрастают, соответственно, в 5 и 3 раза (Yusuf HR et al., 1998). Поэтому ни один из известных факторов риска не должен рассматриваться в отдельности; напротив, если у больного выявлен какой-либо фактор риска, необходимо оценить наличие других факторов, и, что более важно, начать активное воздействие на все выявленные факторы риска (Fuster V & Gotto AM Jr, 2000). В настоящее время доступна мультивариантная оценка сердечнососудистого риска, основанная на результатах двух известных эпидемиологических исследований – Фрамингемского и Мюнстерского. Этот подход в значительной степени отражает мультифакторный патогенез атеросклеротических заболеваний, хотя и не включает оценку всех известных факторов риска. Естественно, что алгоритмы оценки риска, разработанные для одной популяции, могут неточно отражать эпидемиологическую ситуацию, суще-

ствующую в других странах (Empana JP et al., 2003; Hense HW et al., 2003). Идеальное решение этой проблемы заключается в проведении аналогичных проспективных исследований в различных странах и регионах, но более прагматичным подходом является калибровка существующих алгоритмов, основанная на данных перекрестных эпидемиологических наблюдений, которые более легко осуществимы. Так, на основе данных исследования ВОЗ разработаны поправочные коэффициенты для расчетных сердечнососудистых рисков (International Task Force for Prevention of Coronary Heart Disease, 2003.; Tunstall-Pedoe H et al., 1999).

За последние два десятилетия было проведено несколько клинических исследований, использовавших липидснижающую стратегию для предотвращения ИБС. Изначально стратегия была направлена на диетотерапию, но в ряде случаев воздействия оказались неэффективными, и относительно редко наблюдалось снижение холестерина более чем на 10% от исходного уровня (LaRosa JC et al., 1990; Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group, 1982). Затем последовали клинические исследования с использованием секвестрантов желчных кислот (смол), никотиновой кислоты и фибратов, в целом с благоприятными результатами, но возникали проблемы с переносимостью данных препаратов (Canner PL et al., 1986; The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial results, 1984a,b). Часто степень снижения холестерина и холестерина ЛНП была пропорциональна снижению частоты ИБС, наблюдаемому в ходе исследования.

Пришествие ингибиторов гидроксиметилглутарил – коэнзим А (ГМГ-КоА) редуктазы в конце 1980-х привело к лучшим возможностям снижения холестерина ЛНП. Было проведено гро-

мадное количество исследований по диетотерапии и липидснижающей терапии, и было выявлено благоприятное действие на коронарные и сонные артерии, на частоту возникновения ИБС, на частоту повторных проявлений ИБС и на частоту инсультов при самых разнообразных режимах воздействия (Blankenhorn DH et al., 1987; Brown BG et al., 2001; Frick MH et al., 1987; Heart Protection Study Collaborative Group, 2002; Kreger BE et al., 1987; Rubins HB et al., 1999; Scandinavian Simvastatin Survival Study Group, 1994; Sever PS et al., 2003; Shepherd J & Barter P, 2002; Shepherd J et al., 1995; 2002). В целом, в этих исследованиях большее снижение уровня холестерина приводило к большему снижению риска возникновения и рецидива ИБС. Но главным образом, предпосылкой эффективности холестеринснижающей терапии в этих исследованиях был сам факт лекарственного воздействия («intention-to-treat»), но отнюдь не степень снижения холестерина и не способность снизить общий холестерин или холестерин ЛНП до заранее намеченного уровня.

Было проведено большое количество клинических исследований по снижению артериального давления, в которых было показано, что риск ИБС снижается в тех случаях, когда с помощью диеты или различных лекарственных средств снижается систолическое или диастолическое артериальное давление; при этом спорным моментом оставалась безопасность проводимой терапии (Furberg CD et al., 1995; Pahor M et al., 2000; Sacks FM et al., 2001). Недавние исследования были ориентированы на лечение специальных групп пациентов, главным образом, пожилых лиц и больных с повышенным систолическим давлением. Эффективное снижение риска сердечнососудистых заболеваний было продемонстрировано в ряде подобных исследований: «Systolic Hypertension in the Elderly Program»

(SHEP), «Systolic Hypertension in Europe Trial» (Syst-Eur), «Systolic Hypertension in China Trial» (SYSt-China) (SHEP Cooperative Research Group, 1991; Staessen JA et al., 1997; Wang JG et al., 2000). В исследовании «Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial» (ALLHAT) у 40000 американцев изучали эффективность различных режимов лечения повышенного артериального давления у лиц старшего возраста. Было показано, что в качестве начальной терапии тиазидные диуретики эффективны в такой же степени, как и кальциевые антагонисты или ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) для снижения риска сердечнососудистых заболеваний (ALLHAT Officers and Coordinators for the ALLHAT Collaborative Research Group, 2002a). Дополнительное назначение статинов не улучшало благоприятный эффект, но следует отметить, что разница в уровнях холестерина между пациентами, получавшими активное лечение или плацебо, составляла около 10% в течение исследования (ALLHAT Collaborative Research Group, 2000; ALLHAT Officers and Coordinators for the ALLHAT Collaborative Research Group, 2002b). Другие результаты были получены в исследовании «Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial» (ASCOT) у пациентов, получавших, наряду с препаратами для снижения артериального давления, более мощную статиновую терапию, приведшую к различиям в уровнях холестерина свыше 40 мг/дл. В исследовании ASCOT более низкий риск сердечнососудистых заболеваний был связан как с воздействием на липиды, так и с воздействием на артериальное давление (Sever PS et al., 2003).

Различные компоненты диеты, влияющие на уровень липидов в крови, интенсивно изучались в течение второй половины прошлого века. Одним из наиболее ранних было долговремен-

ное исследование, проведенное у мужчин разных стран Европы, Северной Америки и Азии («Seven Countries Study») (Keys A et al., 1984a). В исследовании было показано, что потребление с пищей холестерина и насыщенных жиров связано с повышенным уровнем холестерина в популяции, и длительное последующее наблюдение за данной когортой подтверждает этот вывод (Keys A et al., 1984b; Verschuren WM et al., 1995). В Финляндии, стране с наивысшим средним уровнем холестерина в 1970-х, была проведена национальная программа по улучшению диеты, и распространенность уровня холестерина свыше 250 мг/дл в популяции снизилась с 16% до 3% в 1990-х (Jousilahti P et al., 1998).

Уровень холестерина у жителей США умеренно снизился за последние два десятилетия, и в среднем у взрослых лиц составляет около 204 мг/дл (Lichtenstein AH et al., 1998). Это изменение обусловлено, главным образом, снижением потребления жира и переходом с типичной американской диеты на режим питания, рекомендованный Американской ассоциацией по изучению болезней сердца (American Heart Association Step I diet). Содержание жиров в диете должно составлять менее 30% по калорийности, что должно привести к снижению уровня холестерина в крови на 15% от исходного уровня (Schaefer EJ et al., 1997). Руководства по диетической коррекции уровня холестерина, разработанные различными экспертными организациями (Krauss RM et al., 2000), рекомендуют потребление разнообразной пищи, включающей фрукты, овощи, продукты из цельных зерен; при этом важным аспектом является достижение и поддержание нормальной массы тела, желательного уровня холестерина и желательного артериального давления. У взрослых лиц целью является достижение уровня холестерина менее



200 мг/дл, но приблизительно половина населения не соответствует этому критерию. В качестве целевого значения при агрессивной липидснижающей терапии у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями установлен уровень холестерина ЛНП менее 100 мг/дл, но только 18% пациентов соответствуют этому критерию (Pearson TA et al., 2000).

Предполагают, что усиление окислительных процессов способствует развитию атеросклероза, поэтому наблюдается повышенный интерес к продуктам, обладающим антиоксидантными свойствами (Steinberg D et al., 1989). Наиболее изучены витамины С, В и Е. Результаты ряда обсервационных исследований говорят о том, что большее потребление этих витаминов с пищей или в качестве биологически активных добавок оказывает благоприятное влияние на сердечнососудистый риск (Rimm EB et al., 1993; Stampfer MJ et al., 1993). Однако, данные контролируемых клинических исследований, в том числе, проведенных в сравнении с другими антиатеросклеротическими воздействиями, в целом не подтвердили снижение риска (Brown BG et al., 2001; Heart Protection Study Collaborative Group, 2002; Yusuf S et al., 2000).

Повышенное потребление алкоголя постоянно связывают со сниженным риском ИБС, и принято считать, что ежедневный прием алкоголя в дозе 20 мл у мужчин и 10 мл у женщин способствует снижению этого риска (Kannel WB et al., 1996; Klatsky AL, 1996; Rimm EB et al., 1996; Rimm EB et al., 1998; Shaper AG, 1995). Считают, что в основе этого эффекта лежит изменение уровня холестерина ЛВП в крови, а также противовоспалительное и антиагрегационное действие. Потребление алкоголя в больших дозах небезопасно, поскольку повышает риск желудочно-кишечных кровотечений, геморрагических инсультов,

несчастных случаев, самоубийств и цирроза печени (Boffetta P 7 Garfinkel L, 1990; Ellison RC, 1990).

Борьба с курением как социально-направленная инициатива способствует существенному снижению риска ИБС. Так, в исследовании MRFIT было показано, что отказ от курения уже через 1-2 года приводит к достоверному снижению риска смерти от сердечнососудистых заболеваний (Kuller LH et al., 1991; Ockene JK et al., 1990). Возможно, снижение сердечнососудистой заболеваемости, наблюдающееся в США на протяжении последних десятилетий, связано с массовым отказом от курения. Распространенность курения в США неуклонно снижается с середины 1960-х годов. По данным исследования «National Health and Nutrition Examination Survey» (NHANES III) в 1988-1994 гг. распространенность курения была наименьшей у лиц, имеющих более чем 12-летнюю длительность получения образования, а хроническими курильщиками являются приблизительно 20% взрослых американцев. Более высокая распространенность курения характерная для менее образованных лиц, особенно при образовательном цензе менее 12 лет (Winkleby MA et al., 1999). Если в середине 1970-х годов в США курильщиками являлись около 75% мужчин и 35% женщин, то к середине 1990-х годов эти показатели снизились до 25% и 30%, соответственно.

Лица, придерживающиеся активного стиля жизни, в целом имеют сниженный риск сердечнососудистых заболеваний. В ранних исследованиях изучали риск сердечнососудистых заболеваний у спортсменов, но в последнее время внимание исследователей сосредоточено на повседневной физической активности. Ключевым выводом исследования «Harvard Alumni Study» было то, что повышенная физическая активность обрат-

но коррелирует с риском фатального и нефатального инфаркта миокарда в течение последующих 8 лет (Paffenbarger RS et al., 1986). Эти и другие данные говорят о том, насколько важна физическая активность для снижения риска сердечнососудистых заболеваний (Mittleman MA et al., 1993). Существует повышенный риск внезапной смерти при выполнении физических упражнений или непосредственно после нагрузки у лиц с недостаточной физической подготовкой, но такие побочные явления относительно редки (Mittleman MA et al., 1993; Mittleman MA & Siscovick DS, 1996). Современные рекомендации включают выполнение физических упражнений длительностью 30 минут в день, по крайней мере, пять раз в неделю (Thompson PD, 2003; Thompson PD & Lim V, 2003; Thompson PD et al., 2003). Улучшенная физическая подготовка, проявляющаяся повышенной толерантностью к физической нагрузке, связана со сниженным риском сердечнососудистых заболеваний, как у мужчин, так и у женщин (Blair SN et al., 1996). У лиц, находящихся в нижней квинтили по степени физической подготовки, отмечается наивысшая частота проявлений сердечнососудистых заболеваний. В то же время, даже умеренная степень физической подготовки связана с пониженным риском сердечнососудистых заболеваний у мужчин и женщин среднего возраста.

У больных сахарным диабетом 2 типа попытки снижения сердечнососудистого риска стали предприниматься лишь недавно. В настоящее время рекомендуется ориентироваться на более низкие пороговые значения холестерина ЛНП и артериального давления (Haffner SM, 1998; National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection E.a.T.o.H.B.C.i.A.A.T.P.I., 2002; Sowers JR et al., 2001). Основания для разработки этих агрессивных подходов были получены

при анализе данных рандомизированных клинических исследований эффектов гипотензивных и гиполипидемических препаратов в подгруппах больных сахарным диабетом 2 типа. Эффективность такого подхода была подтверждена в датском исследовании, где использовали агрессивную терапию гипергликемии, гипертонии, дислипидемии и микроальбуминурии у больных сахарным диабетом 2 типа (Gaede P et al., 2003; Pedersen O & Gaede P, 2003). Данные о необходимости поддержания допустимого уровня глюкозы в крови как части стратегии по профилактике сердечнососудистых заболеваний получили подтверждение в обсервационных исследованиях. В клинических исследованиях было показано, что уровни глюкозы крови и гликозилированного гемоглобина (HbA1c) важны для предупреждения микрососудистых осложнений глазного дна и почек, но при этом жесткий контроль глюкозы крови не дает каких-либо значимых преимуществ для снижения риска сердечнососудистых заболеваний (Kuusisto J et al., 1994; Singer DE et al., 1992; The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1993; Turner RC, 1998; Turner RC et al., 1999). Последнее наблюдение было получено в широкомасштабных исследованиях по мультифакторному воздействию у больных сахарным диабетом 2 типа (Turner RC et al., 1999).

Относительно новым и модным направлением в профилактике атеросклеротических заболеваний стало снижение уровня гомоцистеина в крови. В конце 1990-х годов в США было введено обогащение ряда зерновых продуктов фолиевой кислотой, что привело к снижению частоты случаев повышенного уровня гомоцистеина в свободноживущей популяции (Jacques PF et al., 1999). Считают, что дополнительный прием фолиевой кислоты с поливитаминными комплексами может снизить важность го-

моцистеина как фактора риска сердечнососудистых заболеваний. Возможно, гомоцистеин может оказывать влияние на риск сердечнососудистых заболеваний в ряде специфических ситуаций. Чрезвычайно высокое содержание гомоцистеина в крови, несмотря на дополнительный прием фолиевой кислоты, отмечается при нарушенной функции почек, что может оказывать влияние на ускоренное развитие атеросклероза у таких больных (Bostom AG et al., 1999). В настоящее время проводятся клинические исследования по влиянию приема препаратов фолиевой кислоты на снижение риска атеросклероза у больных с почечной недостаточностью (Bostom AG et al., 2001).

Современные подходы к профилактике и лечению атеросклероза, основанные на коррекции факторов риска, имеют свои достоинства и недостатки. К числу несомненных достоинств следует отнести высокую степень клинической эффективности воздействий, что проявляется в существенном снижении частоты клинических проявлений атеросклероза на популяционном уровне, таких как инфаркт миокарда (фатальный и нефатальный), инсульт и внезапная коронарная смерть.

К числу недостатков, свойственных данному подходу, следует отнести следующее. Благоприятные эффекты проявляются лишь на популяционном уровне, а при индивидуальном подходе к профилактике и терапии атеросклеротических заболеваний эти эффекты имеют гораздо более слабую степень выраженности (Kannel WB, 1998,2001; Kannel WB & Wilson PW, 1995; Kannel WB et al., 2004). В целом этот подход сводится к выполнению рекомендаций о ведении здорового образа жизни, в котором существенное место занимает регуляция питания и физической активности. При этом специфическая лекарственная терапия уместна лишь для относительно небольшой доли попу-

ляции, имеющей показания для назначения лекарственных средств. Наконец, критика этого подхода с позиции патофизиологии и современных клеточно-молекулярных концепций атерогенеза заключается в отсутствии элемента патогенетического воздействия. Действительно, учитывая изложенные выше данные о сложной и неоднозначной роли клеточных элементов артериальной стенки и модифицированных ЛНП в атерогенезе, представления о коррекции уровня холестерина в крови или регуляции артериального давления можно считать максимально упрощенными (если не сказать, вульгарными). Они крайне неточно соответствуют подходам к прямой антиатеросклеротической терапии, которая должна задействовать ключевые моменты атерогенеза на молекулярно-клеточном уровне.

### **12.3. Современное состояние прямой антиатеросклеротической терапии**

Для атеросклероза характерно сочетание множественных морфологических, гистологических и гемореологических изменений в артериях эластического или мышечно-эластического типа (Schwartz CJ et al., 1993). Понятие прямой антиатеросклеротической терапии должно подразумевать, по меньшей мере, предотвращение дальнейшего прогрессирования атеросклеротических поражений, уменьшение размеров липидно-некротического ядра и стабилизацию фиброзной покрышки атеросклеротической бляшки. Такой подход теоретически должен привести к регрессии имеющихся поражений. Несомненно, такой подход должен иметь и существенное патогенетическое обоснование – эффективность профилактики и терапии должна быть обусловлена воздействием на клеточно-молекулярные

механизмы атерогенеза.

Современное состояние прямой антиатеросклеротической терапии можно охарактеризовать как находящееся на начальном этапе своего развития. Существуют лишь два класса лекарственных средств, обладающих подтвержденной в клинических исследованиях антиатеросклеротической эффективностью. Речь идет об ингибиторах ГМГ-КоА редуктазы (статины) и антагонистах кальция. При этом достижения клинической науки значительно опережают фундаментальные изыскания.

Статины являются самыми эффективными гиполипидемическими препаратами, стабильно снижающими уровень холестерина в крови. В то же время, убедительно показано, что эти соединения оказывают также эффекты, не связанные непосредственно с влиянием на обмен холестерина. Данные преимущественно экспериментальных работ указывают на возможность прямого действия статинов на процессы, играющие роль в атерогенезе на клеточно-молекулярном уровне. Плейотропное (многонаправленное) действие статинов включает подавление образования молекул адгезии, торможение миграции моноцитов, снижение секреторной активности и пролиферации клеток в очагах атеросклеротического поражения, подавление внутриклеточного накопления липидов и другие процессы (Orekhov AN et al., 1986b; Шевченко ОП и Шевченко АО, 2003). Однако до конца неясно, насколько эти эффекты проявляются в клинических условиях.

Статины представляют собой гетерогенную группу. Одни из них (ловастатин, правастатин, симвастатин) являются полусинтетическими производными грибов, другие (флувастатин, аторвастатин, церивастатин, розувастатин) относятся к синтетическим соединениям. Несмотря на различия в химическом

строении, все статины оказывают сходное фармакологическое действие – обратимо ингибируют ГМГ-КоА редуктазу, что приводит к снижению скорости синтеза холестерина в гепатоцитах. Уменьшение образования внутриклеточного холестерина приводит к снижению уровня холестерина в крови, а также стимулирует синтез и экспрессию рецепторов к аполипопротеинам В и Е. Увеличивается захват апо-В- и апо-Е-содержащих липопротеидов из крови, возрастает их клиренс. Липидными эффектами статинов являются уменьшение количества частиц ЛНП и ЛОНП в кровотоке, снижение уровня холестерина ЛНП и триглицеридов, а также повышение количества частиц ЛВП; механизм последнего эффекта пока не установлен.

Крупные клинические исследования продемонстрировали, что статины достоверно снижают заболеваемость и смертность от сердечнососудистых заболеваний у больных с повышенным содержанием холестерина в крови. Положительное влияние статинов на отдаленный прогноз отмечалось при их использовании в целях как вторичной, так и первичной профилактики (Andrews TC et al., 2001; Downs JR et al., 1998; Scandinavian Simvastatin Survival Study Group, 1994; Shepherd J et al., 1995). Выраженное действие статинов на заболеваемость и смертность у лиц с широкой вариабельностью уровней холестерина в крови не может быть объяснено исключительно гипوليпидемическим действием. Это позволило предположить наличие дополнительных эффектов статинов, не связанных с их влиянием на содержание холестерина в крови (Chapman MJ et al., 2003; Grobbee DE & Bots ML, 2003; Le Goff W et al., 2004). В последние годы накопилось большое количество данных, свидетельствующих о нелипидных эффектах статинов. Многие из них являются следствием ингибирования синтеза изопреновых производ-



ных в цепи обмена мевалоната, в частности, фарнезилпирофосфата и геранилгеранилпирофосфата. Эти соединения участвуют в посттрансляционной модификации внутриклеточных сигнальных белков, в том числе, ГТФ-связывающих белков. Таким образом, изменяется регуляция клеточного роста и дифференцировки, экспрессии генов, поддержания цитоскелета, двигательных функций клеток, транспорта белков и липидов, защитных реакций (Laufs U & Liao JK, 2000; Takai Y et al., 2001). Другой путь реализации плейотропных эффектов статинов – подавление активности транспортного белка эфиров холестерина (Ahnadi CE et al., 1993; Bruce C & Tall AR, 1995; Cheung M et al., 1993). Наконец, статины способны связываться со специфическим сайтом антигена LFA-1, регулирующего функции адгезии и активации лимфоцитов (Weitz-Schmidt G et al., 2001), оказывая в результате противовоспалительное действие.

Наиболее широко известны клинические эффекты статинов. На протяжении последних десятилетий было проведено большое количество многоцентровых контролируемых клинических исследований по оценке влияния статинов на сердечно-сосудистый прогноз, в которых участвовали в общей сложности более 100000 человек. Во всех исследованиях была выявлена связь между снижением содержания холестерина ЛНП и улучшением прогноза как у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями, так и у условно здоровых лиц с выраженными факторами риска. Однако эта зависимость не носила прямолинейный характер, что еще раз подчеркивает важность нелипидных антиатеросклеротических механизмов действия статинов.

Первым крупным многоцентровым плацебо-контролируемым исследованием было исследование «Scandinavian Simvastatin Survival Study» (4S), в котором 4444 больных

ИБС наблюдалось более 5 лет. Прием симвастатина привел к снижению абсолютного риска на 30% и относительного риска на 4%. В ходе этого исследования было также выявлено, что прием статинов может замедлить прогрессирование атеросклеротических бляшек в коронарных артериях (Scandinavian Simvastatin Survival Study Group, 1994), что позволило говорить о прямом антиатеросклеротическом действии статинов.

В исследовании «Cholesterol and Recurrent Events» (CARE) участвовало 3583 мужчин и 576 женщин с нормохолестеринемией, перенесших инфаркт миокарда. Прием правастатина привел к снижению сердечнососудистой смертности на 20%, снижению риска инфаркта миокарда на 25, снижению риска инсульта на 31% (Sacks FM et al., 1994).

Исследование «Long-term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease» (LIPID) включало 9014 больных ИБС и продолжалось более 6 лет. Снижение общей смертности составило 22%, а риска смерти от сердечнососудистых заболеваний – 24% (The Long-term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group, 1998).

Исследование «West of Scotland Coronary Primary Prevention Study» (WOSCOPS) было нацелено на первичную профилактику ИБС у лиц с повышенным сердечнососудистым риском. Под наблюдением находилось 6596 мужчин на протяжении 5 лет. На фоне приема правастатина общая смертность снизилась на 22%, а сердечнососудистая смертность – на 33% (Shepherd J et al., 1995).

Исследование «Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study» (AFCAPS/TexCAPS) проводилось у 6605 добровольцев с низким риском ИБС на протяжении 5 лет. На фоне приема ловастатина вероятность развития нестабильной стено-

кардии снизилась на 32%, риск фатального или нефатального инфаркта миокарда – на 40% (Downs JR et al., 1998).

Самое крупное исследование клинической эффективности статинов – «Heart Protection Study» (HPS). В нем участвовало более 20000 добровольцев с повышенным риском ИБС и незначительно повышенным уровнем холестерина в крови. Наблюдение продолжалось более 5 лет. Прием симвастатина привел к снижению риска острого инфаркта миокарда и инсульта, по меньшей мере, на треть (Heart Protection Study Collaborative Group, 2002).

Исследования клинической эффективности статинов продолжаются. Их главной целью является внедрение идеи о назначении статинов в качестве антиатеросклеротических профилактических средств среди широкого круга лиц, у которых ранее считалось, что необходимости в приеме статинов нет. К ним, в частности, относятся женщины, лица старше 70 лет, а также лица с абсолютно нормальными показателями липидограммы крови (Шевченко ОП и Шевченко АО, 2003.). Результаты этих исследований вполне предсказуемы, поскольку уже описанные клинические эффекты статинов присущи, скорее всего, статинам как классу лекарственных средств, и положительный клинический эффект зависит не только и не столько от снижения уровня липидов в крови.

В аспекте клинической эффективности статинов особый интерес представляет их прямое антиатеросклеротическое действие, проявляющееся в остановке развития атеросклеротических поражений сосудов и индукции их регрессии, основанное на ингибировании молекулярно-клеточных механизмов атерогенеза. В этом отношении можно снова сказать, что клинические успехи значительно опережают фундаментальные иссле-

дования по изучению механизмов антиатеросклеротического действия статинов.

С целью мониторингирования атеросклероза в клинических исследованиях по индуцированной регрессии атеросклеротических поражений артерий широко используются ультразвуковые методы диагностики. Это объясняется их относительной простотой, доступностью, достаточной воспроизводимостью и неинвазивностью. Наиболее распространено ультразвуковое мониторирование состояния сонных артерий, а именно, измерение толщины интима-медиального слоя. Недавно опубликованный мета-анализ проведенных к настоящему времени исследований позволяет говорить о наличии прямого антиатеросклеротического действия у статинов как класса лекарственных препаратов (Kang S et al., 2004).

В ряде эпидемиологических исследований было установлено, что атеросклеротические поражения в абдоминальном отделе аорты, коронарных артериях и сонных артериях развиваются параллельно и четко связаны с возрастом (Berenson GS et al., 1992; Smith GD et al., 1990). Прогрессирование атеросклероза, оцениваемое как увеличение толщины интима-медиального слоя (ТИМ) сонных артерий, идет со скоростью 6,5-10,1 мкм в год (Chambless LE et al., 2002). Обсервационные исследования говорят о том, что прогрессирование каротидного атеросклероза является независимым фактором риска ИБС и инсульта (Bots ML et al., 1997; Burke GL et al., 1995; Chambless LE et al., 1997;2000).

Ультразвуковое исследование в В-режиме считается валидным и надежным методом исследования для выявления, количественной оценки и мониторингирования изменений артериальной стенки в периферических сосудах (сонных и бедренных

артериях) (Pignoli P et al., 1986). Кроме того, эти методы позволяют выявить атеросклероз на очень ранних бессимптомных стадиях (Bond MG et al., 1989; Riley WA et al., 1992). Увеличение ТИМ сонных артерий со скоростью более 30 мкм в год является клинически значимым, поскольку повышает риск сердечнососудистых катастроф (Aminbakhsh A & Mancini GB, 1999; Chambless LE et al., 1996).

В ряде исследований было показано, что агрессивная липидснижающая терапия с использованием статинов не только замедляет прогрессирование атеросклероза, но вызывает его обратное развитие (Kroon AA et al., 1996; Salonen R et al., 1995). Тем не менее, проведенные исследования по регрессии атеросклероза существенно различались между собой по дизайну, длительности терапии, способам медикаментозного воздействия и итоговой эффективности; многие из них имели недостаточный размер выборки. Поэтому именно мета-анализ сходных между собой исследований продемонстрировал эффективность антиатеросклеротической терапии с помощью статинов (Kang S et al., 2004).

Всего за период с 1980 по 2004 год было опубликовано 196 работ, так или иначе связанных с проведенными и завершенными исследованиями по регрессии атеросклероза. При проведении мета-анализа из этого списка было исключено 160 исследований, в которых не использовалось ультразвуковая диагностика, или не проводилось лечение статинами, или исследования были выполнены на животных моделях. Из оставшихся 39 публикаций были исключены: 12 обзоров литературы, одно исследование с использованием трехмерной ультразвуковой диагностики, 7 нерандомизированных исследований, а также 2 исследования по терапии статинами в сочетании с афере-

зом. Четыре исследования были проведены в одной и той же популяции, поэтому в анализ была включена лишь одна публикация. Два исследования были исключены по причине неполного представления данных. Таким образом, в конечном итоге осталось 10 полноценных рандомизированных контролируемых исследований (Kang S et al., 2004). Восемь исследований использовали плацебо-контроль (Byington RP et al., 1995; de Groot E et al., 1998; Hedblad B et al., 2001; Hodis HN et al., 1996; MacMahon S et al., 1998; Mercuri M et al., 1996; Probstfield JL et al., 1995; Salonen R et al., 1995); два исследования было проведено в сравнительном дизайне с активным контролем (Smilde TJ et al., 2001; Taylor AJ et al., 2002). В общей сложности в этих исследованиях наблюдались 3443 человека в возрасте от 30 до 70 лет. Длительность наблюдения составляла от 1 до 4 лет. В плацебо-контролируемых исследованиях было показано, что изменение

ТИМ при стандартной терапии статинами по сравнению с контрольной группой составила 22,4 мкм в год (95% доверительный интервал составил от 16,1 до 26,6 мкм в год). В исследованиях с активным контролем изменение ТИМ при агрессивной терапии статинами по сравнению с контрольной группой составило 63,3 мкм в год (95% доверительный интервал составил от 55,4 до 71,1 мкм в год). Таким образом, долговременная стандартная терапия статинами оказалась эффективной и безопасной в отношении замедления прогрессирования каротидного атеросклероза. Агрессивная терапия статинами оказалась чрезвычайно эффективной в отношении индукции регрессии каротидного атеросклероза (Kang S et al., 2004).

Информация об антиатеросклеротическом действии другой группы препаратов, а именно, антагонистов кальция, гораз-

до менее обширна. Известны всего 4 исследования по антиатеросклеротической эффективности этой группы препаратов, в которых использовали ультразвуковое мониторирование атеросклероза в сонных артериях. Одно из них было проведено в плацебо-контролируемом дизайне (Mancini GB et al., 2002; Mancini GB & Pitt B, 2002; Pitt B et al., 2000), остальные – с использованием активного контроля (Rosei EA et al., 1997; Zanchetti A, 1996a,b; Zanchetti A et al., 1992;1998). В исследовании «Prospective Randomized Evaluation of the Vascular Effects of Norvasc Trial» (PREVENT) изучали антиатеросклеротическое действие амлодипина. Было показано, что амлодипин вызывает уменьшение ТИМ сонных артерий со средней скоростью 15 мкм в год, в то время как в контрольной группе ТИМ увеличивается со скоростью 11 мкм в год (Pitt B et al., 2000). В сравнительных исследованиях «Multicenter Isradipine/Diuretic Atherosclerosis Study» (MIDAS), «European Lacidipine Study on Atherosclerosis» (ELSA) и «Verapamil in Hypertension and Atherosclerosis Study» (VHAS) также было продемонстрировано прямое антиатеросклеротическое действие антагонистов кальция, которое проявлялось в уменьшении ТИМ сонных артерий со скоростью 20-28 мкм в год.

Помимо статинов и антагонистов кальция в качестве потенциальных средств прямого антиатеросклеротического действия можно упомянуть гиполипидемическую комбинацию холестерина и ниацина, витамины-антиоксиданты, а также эстрогены. Однако количество исследований, подтверждающее антиатеросклеротическую эффективность данных препаратов крайне мало.

В плацебо-контролируемом исследовании «Cholesterol Lowering Atherosclerosis Regression Study» (CLAS) было показа-

но, что комбинация холестилола и ниацина вызывает регрессию каротидного атеросклероза со скоростью 20 мкм в год, а разница в динамике показателей между основной и контрольной группой составляет 30 мкм в год (Blankenhorn DH & Hodis HN, 1994; Blankenhorn DH et al., 1987a,b; 1993).

Плацебо-контролируемые исследования по влиянию заместительной гормональной терапии на ТИМ сонных артерий указывают на некоторое замедление прогрессирования атеросклероза у женщин в постменопаузе (de Kleijn MJ et al., 1999; Hodis HN et al., 2001). Однако эти данные затруднительно комментировать, поскольку в данных исследованиях женщины с выраженной гиперлипидемией получали статины наряду с эстрогенами. Обсервационные исследования также говорят о том, что у женщин, получающих заместительную гормональную терапию, ТИМ сонных артерий меньше, (Westendorp IC et al., 1999)

Скудные и неоднозначные данные имеются об антиатеросклеротическом действии витаминов-антиоксидантов (Salonen JT et al., 2000). В данном плацебо-контролируемом исследовании Salonen et al. среднее увеличение ТИМ в контрольной группе составило 20 мкм в год, при назначении витамина Е – 18 мкм в год, витамина С – 17 мкм в год, и только при назначении комбинации витаминов С и Е удалось добиться некоторого замедления атеросклеротического роста до 11 мкм в год.

Таким образом, в настоящее время можно говорить о достоверных антиатеросклеротических эффектах только двух групп лекарственных средств – статинов и антагонистов кальция. Фундаментальная проблема заключается в отсутствии представлений о механизмах антиатеросклеротического действия этих препаратов. В отношении статинов исследователи



уже достаточно давно ушли от примитивных объяснений антиатеросклеротического действия, основанных на торможении инфильтрации сосудистой стенки холестерином, и пытаются связать выявленные клинические эффекты с плеiotропными (нелипидными) механизмами действия. В отношении антагонистов кальция ситуация еще более далека от понимания. Современное объяснение, основанное на снижении стрессорного давления на стенку сосуда и создании благоприятных условий для восстановления эндотелиальной функции (Mancini GB et al., 2002; Pitt B et al., 2000) выглядит весьма наивным. В то же время, в наших работах с использованием первичной культуры клеток интимы аорты человека получены четкие указания на клеточно-молекулярные механизмы антиатеросклеротического действия этих препаратов. Несмотря на различие в химическом строении и фармакодинамических характеристиках, они обладают антиатеросклеротическими свойствами: препятствуют накоплению холестерина в клетках и способствуют удалению избыточных количеств уже накопившихся внутриклеточных липидов (Giessler C et al., 1987; Orekhov AN, 1990; Orekhov AN et al., 1988b; 1990b). Именно с их влиянием на процессы накопления внутриклеточного холестерина, инициирующего акта в атерогенезе, и следует связывать проявляющееся в клинических исследованиях прямое антиатеросклеротическое действие – замедление роста атеросклеротических поражений и их регрессию.

### **13. Разработка антиатеросклеротической терапии**

Исходно статины и антагонисты кальция не были использованы для прямого лечения или профилактики атеросклероза. Они рассматривались как гиполипидемические и гипотензивные средства, снижающие такие факторы риска как высокий уровень холестерина в крови и повышенное давление крови, соответственно. При применении этих препаратов успех лечения оценивается в достижении целевого уровня липидов и давления, а не в регрессии атеросклеротического поражения. Выявленную антиатеросклеротическую эффективность следует рассматривать как положительный эффект лечения, который основан на плейотропном механизме действия. Исходя из этого, необходимость разработки антиатеросклеротических средств прямого действия становится очевидной.

#### **13.1. Антиатерогенные и антиатеросклеротические препараты**

Совокупность наших знаний о возникновении и развитии атеросклеротического поражения в артериальной стенке человека, представления о триггерной роли накопления внутриклеточных липидов позволили нам определить возможные мишени антиатеросклеротической терапии (Рисунок 75).

Первый подход (мишень 1) – предотвращение атерогенной модификации (десалирирования) частиц ЛНП в крови вследствие активности транс-салидазы. Второй подход основан на селективном удалении модифицированных ЛНП из крови (мишень 2). Третий подход - это предотвращение накопления модифицированных ЛНП в клетках артериальной стенки (мишень 3). Кроме

того, есть другой подход, заключающийся в удалении избытка липидов из пенистые клетки (мишень 4). Рисунок 75 схематично демонстрирует все 4 цели. Мы использовали все четыре подхода в борьбе с атеросклеротическим поражением и считаем, что наиболее приемлемым подходом является третьей, а именно, предотвращение накоплению модифицированных ЛНП в артериальной стенке. Ниже мы описываем применение этого подхода для разработки антиатеросклеротической терапии.

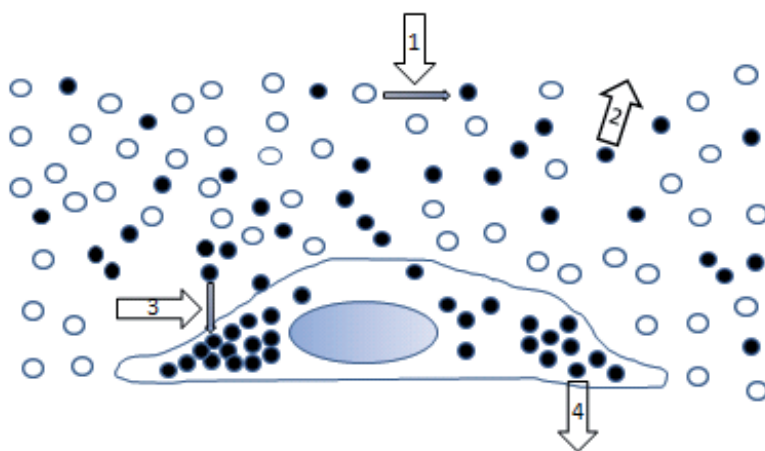


Рисунок 75. Мишени воздействия антиатеросклеротических и антиатерогенных препаратов

Черные кружочки – множественно модифицированные ЛНП; белые кружочки – нативные ЛНП.

Следует подчеркнуть, что агенты, способные предотвратить атерогенез, должны называться антиатерогенными препаратами, а агенты, которые способствуют регрессии атеросклеротических проявлений, являются антиатеросклеротическими препаратами. Предотвращение накопления внутриклеточного липидов, подавление клеточной пролиферации и синтеза вне-

клеточного матрикса следует считать антиатерогенным (профилактическим) действием. На уровне артериальной клетки любое действие лекарства, которое прямо не предотвращает превращение нормальной клетки в атеросклеротическую (пенистую клетку), надо рассматривать как не прямое антиатерогенное действие. Только тот препарат, который проявляет свою профилактическую деятельность на уровень артериального русла, является прямым антиатерогенным препаратом. На уровне артериальной клетки препарат с прямым антиатеросклеротическим действием должен вызывать регрессию основных клеточных проявлений атеросклероза, в том числе: снижение внутриклеточного содержания липидов, подавление пролиферации клеток и подавление синтеза внеклеточный матрикс.

Таким образом, препараты, которые влияют на атеросклероз, можно разделить на 3 группы: (1) антиатеросклеротические, (2) антиатерогенные прямого действия и (3) антиатерогенные непрямого действия.

### **13.2. Клеточная модель**

Мы разработали клеточную модель на основе первичной культуры клеток аорты человека для скрининга потенциальных лекарственных препаратов, изучение механизмов их действия, а также оптимизации антиатеросклеротическим лекарственной терапии. Клетки выделяются из субэндотелиальной части интимы аорты человека, то есть той части аорты, которая локализуется между эндотелиальной выстилкой и медией (Rekhter MD et al., 1991). С помощью коллагеназы и эластазы, клетки выделяются из субэндотелиального слоя интимы как нормальной, так и атеросклеротической части аорты (Orekhov AN et al.,

1984d; 1985a; 1986c). Используя формальные критерии, клетки, культивируемые из интимы, могут быть классифицированы как клетки гладкомышечного происхождения. Эти клетки окрашивали антителами к гладкомышечному миозину (Orekhov AN et al., 1984d; 1985a; 1986c). Для дальнейшей идентификации мы использовали антитела к гладкомышечному  $\alpha$ -актину (Yamada S et al., 2011). По нашим расчетам, в первичной культуре субэндотелиальных клеток аорты содержится около 90% гладкомышечных клеток, которые взаимодействуют с антителами к альфа-актину. Кроме того, клетки, культивированные из субэндотелиальной части интимы имеют ультраструктурные особенности, характерные для гладкомышечных клеток, а именно, базальную мембрану и пучки филаментов с плотными тельцами (Orekhov AN et al., 1984d; 1985a; 1986c). Культуры, на которых проводятся эксперименты, представлены смешанной популяцией типичных и модифицированных гладкомышечных клеток, которые были обнаружены и охарактеризованы в аорте человека (Rekhter MD et al., 1991).

Клетки субэндотелиального слоя интима, выделенные из атеросклеротических поражений, сохраняют при культивировании все основные характеристики атеросклеротических клеток. Культуры клеток из жировой полосы и зон жировой инфильтрации обладают повышенной пролиферативной активностью (Orekhov AN et al., 1983a), более высокой, чем у клеток, культивированных из непораженных участков интимы (Orekhov AN et al., 1983a; 1986b). Многие клетки, культивируемые из атеросклеротического поражения, являются пенистыми клетками, поскольку содержат многочисленные включения в виде липидных капель, которые полностью заполняют цитоплазму (Orekhov AN et al., 1985a). Основная часть избыточных липидов в пенистые

клетки представлена свободным холестерином и эфирами холестерина (Orekhov AN et al., 1985a). Следует отметить, что состав и содержание липидов в культуре клеток в течение первых 10-12 дней культивирования остаются неизменными и соответствуют показателям свежевыделенных клеток (Orekhov AN et al., 1985a; 1986b). Клетки, культивированные из субэндотелиального слоя интимы, способны синтезировать коллаген, протеогликаны и другие компоненты внеклеточного матрикса (Orekhov AN et al., 1990a).

Таким образом, клетки, выделенные из атеросклеротического поражения аорты человека, при культивировании сохраняет все основные свойства, характерные для атеросклеротических клеток. Они обладают повышенной пролиферативной активностью, содержат избыток холестерина в виде внутриклеточных включений и синтезируют внеклеточный матрикс. Эти характеристики позволяют рассматривать культуру атеросклеротических клеток как удобную модель для исследования влияния различных агентов на атеросклеротические проявления (Orekhov AN et al., 1986b). Исследования проводятся непосредственно именно на тех клетках, которые требуют терапевтического воздействия в естественных условиях.

Используя эту модель, мы изучили влияние различных препаратов и химических веществ. К настоящему времени протестировано множество веществ (Orekhov AN et al., 1986b). Эффекты различных агентов приведены в Таблице 28. Некоторые из веществ вызывали антиатеросклеротическое воздействие на культивируемые клетки, другие оказались неэффективными в этом отношении, а третьи стимулировали развитие атерогенных процессов.

Таблица 28. Вещества, тестированные на клеточной модели

| Вещество                         | Публикации                                                                                                       |
|----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Антиатеросклеротические          |                                                                                                                  |
| Циклический АМФ                  | Orekhov AN et al., 1986b; Tertov VV et al., 1982; 1986b;c; 1987b                                                 |
| Простациклин                     | Akopov SE et al., 1988; Baldenkov GN et al., 1988; Kudryashov SA et al., 1984; Orekhov AN et al., 1983b; 1986b;e |
| Простагландин E <sub>2</sub>     | Kudryashov SA et al., 1984; Orekhov AN et al., 1986b; Tertov VV et al., 1988b                                    |
| Искусственные ЛВП                | Orekhov AN et al., 1984e                                                                                         |
| Антиоксиданты                    | Orekhov AN et al., 1986b                                                                                         |
| Антагонисты кальция              | Baldenkov GN et al., 1988; Orekhov AN et al., 1986 b,d; 1987c; 1988b; 1990b                                      |
| Трапидил и производные трапидила | Giessler Ch et al., 1987; Heinroth-Hoffmann I et al., 1990                                                       |

(продолжение на следующей странице)

| Вещество                  | Публикации                                         |
|---------------------------|----------------------------------------------------|
| Липоксигеназы             | Tertov VV et al., 1988b                            |
| Липостабил                | Orekhov AN et al., 1986b                           |
| Экстракты грибов          | Li HR et al., 1989                                 |
| Проатерогенные            |                                                    |
| Бета-блокаторы            | Orekhov AN et al., 1988b,c                         |
| Тромбоксан A <sub>2</sub> | Baldenkov GN et al., 1988; Tertov VV et al., 1988b |
| Фенотиазин                | Orekhov AN et al., 1986b                           |
| Индиферентные             |                                                    |
| Нитраты                   | Orekhov AN et al., 1988b                           |
| Холестирамин              | Orekhov AN et al., 1986b                           |

#### 13.4. Эффекты сердечнососудистых препаратов на клеточной модели

На клеточных моделях были протестированы три класса сердечнососудистых препаратов: антагонисты кальция, бета-блокаторы и нитраты. Эти препараты широко используются в клинике при лечении различных заболеваний, основой которых является атеросклероз различной локализации. Мы попытались выяснить, как антагонисты кальция, бета-блокаторы и нитраты



вливают на атеросклеротические показатели артериальных клеток.

Было исследовано влияние антагонистов кальция на основные атеросклеротические показатели. Мы обнаружили, что антагонист кальция верапамил оказывает положительное влияние на все атеросклеротические клеточные показатели. В течение 48 часов верапамил, добавленный в культуру, снизил общий уровень внутриклеточного холестерина в 3 раза, резко снизил включение [ $^3\text{H}$ ]тимидина в ДНК клеток (то есть, подавлял пролиферативную активность клеток), а также ингибировал синтез коллагена в культуре клеток (Orekhov AN et al., 1986d; 1987c). Таким образом, этот препарат имеет прямое антиатеросклеротическое действие на уровне артериальной клетки.

Были также изучено несколько антагонистов кальция, в том числе нифедипин, дародипин, исрадипин, никардипин, нитрендипин, фелодипин, тиапамил, галлопомил, дилтиазем, папаверин и никардипин. Верапамил и нифедипин оказалось наиболее эффективным (Baldenkov GN et al., 1988; Orekhov AN et al., 1988b). В течение 24 часовой инкубации с культивируемыми клетками все антагонисты кальция существенно подавляли включение [ $^3\text{H}$ ]тимидина и снижали уровень внутриклеточного холестерина (Orekhov AN et al., 1987c; 1988b). Таким образом, антагонисты кальция оказывают прямое антиатеросклеротическое действие на клетки сосудов, нормализуя основные клеточные параметры.

В дополнение к антиатеросклеротическим эффектам, которые вызывают регрессию атеросклероза, в культуре были изучены антиатерогенные (профилактические) эффекты. Таблица 29 демонстрирует основные различия между этими двумя подходами. В случае антиатеросклеротического эффекта инду-

цируется регрессия атеросклероза, в то время как в случае антиатерогенного эффекта индуцируется его профилактика. В первом случае используются клетки, полученные из атеросклеротической бляшки, в то время как во втором типе экспериментов используются клетки, полученные из непораженной интимы. Когда рассматривается антиатеросклеротический эффект, клетки культивируются в присутствии стандартной эмбриональной телячьей сыворотки, в то время как в экспериментах по выявлению антиатерогенных эффектов используются атерогенные сыворотки, полученные от больных ишемической болезнью сердца. Эти сыворотки вызывают накопление холестерина и стимулируют другие атерогенные проявления в культуре клеток (Chazov EI et al., 1986; Orekhov AN et al., 1988a; Tertov VV et al., 1988a; 1989b). В случае антиатеросклеротического эффекта об эффективности препарата судят по ее способности снижать повышенное содержание холестерина в культивируемых атеросклеротических клетках. А в случае антиатерогенного эффекта об эффективности препарата судят по его способности предотвращать накопление внутриклеточного холестерина в нормальных клетках.

Четырехчасовая прединкубация культивируемых клеток с верапамилем приводила к полному предотвращению атерогенных эффектов сыворотки (Orekhov AN, 1990). Таким образом, верапамил обладает не только атеросклеротическим эффектом в культуре, в результате чего происходит регрессия атеросклеротических проявлений на клеточном уровне, но он также демонстрирует антиатерогенный, то есть профилактический эффект, устраняя атерогенных потенциал сыворотки.

Таблица 29. Антиатеросклеротические и антиатерогенные эффекты лекарств в культуре

|                                       |                                       |
|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Антиатеросклеротический эффект        | Антиатерогенный эффект                |
| Регрессия                             | Профилактика                          |
| Атеросклеротическое поражение         | Непораженная интима                   |
| Стандартная (неатерогенная) сыворотка | Атерогенная сыворотка пациентов       |
| Падение уровня холестерина            | Предотвращение накопления холестерина |

Был оценен эффект несколько антагонистов кальция на первичное накопление холестерина в культивируемых клетках, вызванное сыворотками пациентов. Верапамил и нифедипин полностью ингибировали накопление внутриклеточного холестерина, индуцированное сывороткой, в то время как другие антагонисты кальция, такие как дилтиазем, никардипин, исрадипин, и дародипин, существенно снижали накопление холестерина (Orekhov AN, 1990). Тестируемые антагонисты кальция, которые продемонстрировали антиатерогенный эффект в культуре клеток, подавляют развитие экспериментального атеросклероза у животных (Palatini P, 2005). Таким образом, наши данные, полученные с использованием клеточной модели *in vitro*, соответствуют наблюдениям *in vivo*. Можно заключить, что антагонисты кальция обладают не только антиатеросклеротическим, но и антиатерогенным (профилактическим) эффектом на уровне артериальной клетки.

Помимо антагонистов кальция были протестированы нитраты и бета-блокаторы, чтобы изучить их влияние на атеросклеротические клеточные показатели. Нитраты не влияли на пролиферативную активность клеток и лишь минимально воздействовали на уровень холестерина (Orekhov AN et al., 1988b). В противоположность этому все исследованные бета-блокаторы: пропранолол, алпренолол, метопролол, пиндолол, и тимолол увеличивали атеросклеротические проявления, то есть все эти препараты обладают проатерогенным эффектом в культуре клеток (Orekhov AN, 1990; Orekhov AN et al., 1988b). Если бета-блокаторы имеют такой же эффект *in vivo*, можно предположить, что эти препараты атерогенны и проявляют свой атерогенный эффект на уровень артериальной клетки. По-видимому, нитраты не обладают такими свойствами.

Было изучено также влияние сердечнососудистых препаратов на атеросклеротические показатели при совместном применении (Orekhov AN, 1990; Orekhov AN et al., 1988b). Исследование было сфокусировано на метопрололе, нифедипине и нитроглицерине - препаратах, которые широко используются в клинике. Метопролол вызывал повышение внутриклеточного холестерина, а нифедипин снижал уровень холестерина. Кроме того, нитроглицерин не оказывает влияние на этот показатель. Применение нифедипина на фоне метопролола не изменяло антиатеросклеротическое действие антагониста кальция. В этой комбинации, атерогенное действие метопролола выявлено не было. Применение метопролола в комбинации с нитроглицерином привело к устранению атерогенного эффекта бета-блокатора. Нифедипин, использованный вместе с метопрололом и нитроглицерином был столь же эффективным, как и в отсутствие этих препаратов. Таким образом, нифедипин проявля-

ет свои антиатеросклеротические эффекты как сам по себе, так и в сочетании с широко используются нитратами и бета-блокаторами. Эти данные указывают на очень важный вывод: атерогенное действие бета-блокаторов может быть ингибировано, если бета-блокаторы используются в комбинации с антагонистами кальция или нитратами. Эта находка позволяет надеяться, что есть возможность разработать бета-блокаторы, которые лишены атерогенных побочных эффектов.

Таким образом, три класса сердечнососудистых препаратов оказывает различное влияние на клеточные проявления атеросклероза. Антагонисты кальция обладают антиатеросклеротическим действием. Напротив, бета-блокаторы обладают атерогенным эффектом. Нитраты не оказывают эффекта на атеросклеротические проявления. Наши данные, полученные с использованием клеточной модели, согласуются с результатами клинических исследований. Loaldi и соавт. (Loaldi A et al., 1989) сообщили, что долгосрочный пероральный прием пропранолол усиливает развитие коронарного атеросклероза у пациентов со стенокардией по сравнению с антагонистом кальция нифедипином и изосорбит динитратом. Нифедипин, имел положительное влияние на коронарный атеросклероз, подавляя развитие существующих атеросклеротических поражений и предотвращая появления новых. Изосорбита динитрата был менее эффективным в этом отношении, в то время как ситуация с пропранололом была наихудшей. Эти клинические наблюдения находятся в полном соответствии с нашими данными, полученными на клеточных моделях.

### 13.5. Модель *ex vivo*

Все приведенные выше выводы и гипотезы основаны на данных, полученных в экспериментах *in vitro*. Естественно, возникает вопрос, будут ли эффекты бета-блокаторов, антагонистов кальция и других агентов проявляться *in vivo* и какова оптимальная антиатеросклеротическая терапия, основанная на антагонистах кальция и других лекарственных средствах?

Для оптимизации антиатеросклеротической и антиатерогенной терапии была разработана модель *ex vivo*. В этой модели вместо лекарств в культуру клеток добавляется сыворотка, выделенная из крови пациентов после приема ими исследуемого препарата.

Антагонисты кальция, такие как верапамил и нифедипин, а также бета-блокаторы, пропранол и пиндолол, были исследованы на модели *ex vivo* (Orekhov AN et al., 1988b; 1990b). В течение 2-4 часов после приема нифедипина и верапамила сыворотка, выделенная из крови пациентов, обладала антиатеросклеротическими свойствами, то есть присутствие сыворотки снижало содержание внутриклеточного холестерина и замедляло пролиферацию атеросклеротических клеток. Напротив, сыворотка, полученная от пациентов, которые принимали пропранол и пиндолол, была проатерогенной. Проатерогенные свойства проявлялись на уровне артериальной стенки в увеличении уровня внутриклеточного холестерина и в стимуляции пролиферации клеток. Эти данные позволили сделать предположение, что не только *in vitro*, но и *in vivo*, антагонисты кальция и бета-блокаторы, проявляют антиатеросклеротические и проатерогенные свойства, соответственно.

Был исследован эффект пролонгированного курса приема

нифедипина на свойства сыворотки (Orekhov AN, 1990). Пациент принимал 20 мг нифедипина 3 раза в день с интервалом 8 часов в течение 7 дней. Через 28 дней регулярного приема нифедипина исходный уровень атерогенности сыворотки был значительно ниже, чем в начале терапии. Уже непосредственно после первого приема нифедипина, атерогенность сыворотки была нивелирована. В противоположность этому, длительная терапия бета-блокатором пропранололом приводила к проявлению у сыворотки устойчивой атерогенности. В начале курса сыворотка пациента была неатерогенной, тем не менее, 28 дней регулярного приема пропранолола приводило к появлению атерогенности, которая отсутствовала до приема лекарственного средства. Таким образом, однократный прием бета-блокаторов вызывает временную атерогенность сыворотки крови, а пролонгированная терапия бета-блокаторами приводит к появлению стабильных атерогенных свойств сыворотки.

### **13.6. Непрямой антиатерогенный эффект ловастатина**

Описанные выше наблюдения иллюстрируют использование культуры клеток, выделенных из аорты человека, в модели *in vitro* для массового скрининга потенциальных лекарственных средств и изучения механизма их действия. Клеточная культура может быть применена в модели *ex vivo* для изучения непрямого антиатерогенного действия лекарств и оптимизации антиатеросклеротического (антиатерогенного) эффекта лекарственной терапии. Используя модели *in vivo* и *ex vivo*, мы исследовали связанные с атеросклерозом эффекты ловастатина.

В таблице 30 приведены данные, согласно которым липид-снижающий агент ловастатин не влияет ни на один из па-

раметров, характеризующих атеросклероз, в культуре клеток человека, выделенных атеросклеротического поражения, что свидетельствует о том, что лекарство не обладает прямым антиатеросклеротическим действием.

Таблица 30. Влияние терапии ловастатином на уровень холестерина, липопротеидов низкой плотности, ЛНП-содержащих циркулирующих иммунных комплексов и атерогенный потенциал сыворотки крови пациентов

| № сыворотки | До терапии |        |        |           | После терапии |        |        |           |
|-------------|------------|--------|--------|-----------|---------------|--------|--------|-----------|
|             | Общ Хл     | Хл ЛНП | Хл ЦИК | Хл Клеток | Общ Хл        | Хл ЛНП | Хл ЦИК | Хл Клеток |
| 1           | 319        | 253    | 44,9   | 57±16     | 234           | 159    | 15,9   | 27±4      |
| 2           | 377        | 296    | 33,6   | 49±4      | 262           | 168    | 13,6   | 28±6      |
| 3           | 365        | 272    | 42,5   | 47±3      | 259           | 177    | 14,7   | 32±4      |
| 4           | 274        | 202    | 49,1   | 56±5      | 214           | 122    | 16,1   | 30±5      |
| 5           | 322        | 256    | 40,3   | 41±1      | 239           | 154    | 11,7   | 26±1      |
| 6           | 274        | 210    | 46,3   | 47±5      | 195           | 121    | 16,2   | 32±6      |
| 7           | 283        | 217    | 42,1   | 49±5      | 208           | 126    | 14,1   | 35±4      |
| 8           | 342        | 261    | 43,2   | 53±5      | 241           | 163    | 13,7   | 27±2      |

Пациенты принимали ловастатин (40мг/день) в течение 180 дней. Данные представлены в виде среднего 4 определений (±СМО). Все различия «до терапии» и «после терапии» статистически значимы ( $p<0.05$ ). ОбщХл - общий холестерин в сыворотке крови (мг/дл), ХлЛНП – холестерин липопротеидов низкой плотности (мг/дл), ХлЦИК – холестерин в циркулирующих иммунных комплексах (мкг/мл), ХлКлеток – общий холестерин нормальных клеток аорты, культивируемых в течение 24 часов с сывороткой крови пациентов (мкг/мг клеточного белка). Содержание холестерина в клетках контроля, культивируемых в присутствии фетальной телячьей сыворотки, составило 22±3 мкг/мг клеточного белка.



Через 6 месяцев приема ловастатина (40 мг в день), уровень общего холестерина и холестерина ЛНП снизился на 25 и 34%, соответственно. Это сопровождалось снижением уровня холестерина в циркулирующих иммунных комплексах (Таблица 30), который определяют атерогенный потенциал сыворотки пациентов. Сыворотка, полученная из крови пациентов после лечения ловастатином, ингибировала накопление внутриклеточного холестерина по сравнению с сывороткой, выделенной из крови тех же пациентов до лечения (Таблица 30). В некоторых случаях ловастатин полностью нивелировал атерогенные свойства сыворотки.

Таким образом, ловастатин не производит прямого антиатеросклеротического действия на клетки артериальной стенки, тем не менее, он проявляет непрямую антиатерогенную активность. Этот эффект реализуется в снижении уровня холестерина в крови, который провоцирует уменьшение содержания ЛНП в циркулирующих иммунных комплексах. Иммунные комплексы с низким содержанием ЛНП индуцируют меньшее накопление холестерина в стенке артерий, что, как мы предполагаем, и вызывает не прямое антиатерогенное действие ловастатина.

### **13.7. Модель in vivo**

Модели in vivo необходимы для подтверждения результатов, которые были получены на моделях in vitro и ex vivo, а также для поиска новых подходов к лечению атеросклероза. Мы предполагаем, что некоторые результаты, полученные нами на клеточных моделях, применимы в клинической практике. Для подтверждения этих данных мы применяли модель in vivo, в которой использовали кроликов с локальными поражениями аор-

ты, созданными хирургически с помощью баллонного катетера. Это широко распространенный и простой метод имитации фиброзного атеросклеротического поражения (Fei W et al., 2011).

Используя данную модель, мы попытались подтвердить атерогенность бета-блокаторов и изучить возможность снижения атерогенности путем комбинирования бета-блокаторов с антагонистами кальция. Во-первых, мы показали, что применение бета-блокаторов вызывает появление атерогенности сыворотки крови кроликов точно так же, как и в случае сыворотки человека.

После перорального приема пропранолола, метопролола, атенолола, пиндолола или тимолола, у кролика брали кровь, и сыворотку крови кролика добавляли в культуру мышинных перитонеальных макрофагов. Все образцы сыворотки, полученные после приема кроликами бета-блокаторов, стимулировали внутриклеточное накопление холестерина, что свидетельствует о том, что все эти бета-блокаторы обладают атерогенным потенциалом в отношении крови кроликов (Таблица 31). Для детального исследования атерогенных свойств бета-блокаторов был выбран пропранолол в силу того, что он демонстрирует наибольшее внутриклеточное накопление холестерина (Таблица 31).

После приема пропранолола атерогенность сыворотки появлялась в течение 1 часа, достигала максимума в течение 2 часов, и полностью элиминировалась через четыре часа. Пропранолол давали 3 раза в день с интервалом 4 часа. Вторая и третья доза вызывала некоторое увеличение атерогенности крови, которая появлялась после приема первой дозы. Через 24 часа после приема первой дозы и двух доз после нее, атерогенность не исчезала и оставалась на существенно более высо-

ком уровне; новые дозы увеличивали атерогенность незначительно.

Таблица 31. Влияние терапии бета-блокаторами на накопление холестерина мышинными перитонеальными макрофагами при добавлении сыворотки крови кроликов

| Бета-блокатор | Доза, мг | Накопление холестерина, % от контроля |
|---------------|----------|---------------------------------------|
| Контроль      | -        | 100                                   |
| Пропранолол   | 20       | 195±5*                                |
| Метопролол    | 50       | 126±9*                                |
| Атенолол      | 100      | 161±10*                               |
| Пиндолол      | 5        | 129±8*                                |
| Тимолол       | 2,5      | 194±19*                               |

Данные представлены в виде среднего от трех определений ± СМО.

\* - статистически значимое отклонение от контроля ( $p < 0,05$ ).

Кровь брали через 2 часа после перорального приема лекарства, сыворотку крови добавляли к культуре мышинных перитонеальных макрофагов. Уровень холестерина определяли через 4 часа после добавления сыворотки.

В нашем исследовании кролики получали пропранолол три раза в день в течение 21 дня. Это имитировало трехнедельный курс терапии бета-блокаторами. Сыворотка крови становилась атерогенной после приема первой дозы. Кроме того, атерогенность оставалась высокой в течение всего 21-дневного периода, но значительно не повышалась при приеме последующих доз. В конце эксперимента животные были забиты, и аорта была вырезана.

Таблица 32. Влияние папаверина на атерогенность пропранолола (% от контроля)

| Параметр                           | Пропранолол,<br>20 г/день | Папаверин,<br>20мг/день | Пропранолол<br>+ Папаверин |
|------------------------------------|---------------------------|-------------------------|----------------------------|
| Соотношение<br>интима : ме-<br>диа | 177±4*                    | 96±8                    | 94±8                       |
| Количество<br>клеток               | 305±9*                    | 116±4                   | 127±8                      |
| Эфиры<br>холестерина               | 573±135*                  | 107±11                  | 94±16                      |
| Свободный<br>холестерин            | 244±32*                   | 124±13                  | 95±10                      |
| Триглицериды                       | 355±31*                   | 161±38                  | 158±26                     |
| Коллаген                           | 172±20*                   | 104±8                   | 99±10                      |

\* - статистически значимое отклонение от контроля ( $p < 0,05$ ).

В-среднем, неоинтимальное утолщение у кроликов, принимающих пропранолол, было в 2 раза выше, чем в контрольной группе (Таблица 32). Таким образом, пероральный прием пропранолола вызывал появление атерогенности сыворотки крови кроликов. Также как и в случае пациентов с атеросклерозом, длительная терапия этим препаратом вызывала появление стабильной атерогенности. В случае кроликов появление атеро-

генности сопровождалась стимуляцией роста неоинтимального утолщения поврежденной аорты. Таким образом, выявление атерогенности *in vitro*, вызванной пропранололом в клеточной культуре, и данные, полученные *ex vivo* на клеточной модели, были подтверждены на животной модели *in vivo*.

Для подтверждения другого очень важного результата, полученного на наших моделях, а именно способности антагонистов кальция элиминировать атерогенный потенциал бета-блокаторов, мы использовали комбинацию пропранолол-папаверин. Папаверин был выбран, поскольку он обладает умеренной антиатеросклеротической активностью (Baldenkov GN et al., 1988). Данный препарат можно рассматривать как нейтральную или слабую добавку к бета-блокатору.

Одновременный прием пропранолола и папаверина устранял атерогенность, вызванную бета-блокатором. В отличие от сыворотки крови кроликов, которые получали только пропранолол, сыворотка крови кроликов, получавших комбинацию пропранолол-папаверин, не вызывала накопления внутриклеточного холестерина.

На протяжении 21-дневной терапии комбинацией пропранолол-папаверин, сыворотка кров кроликов не проявляла атерогенных свойств, в то время как сыворотка крови кроликов, принимавших пропранолол, демонстрировала значительный атерогенный потенциал. Папаверин полностью устранял стимулирующий эффект пропранолола на рост неоинтимального утолщения (Таблица 32). Также было исследовано влияние пропранолола и комбинации пропранолола с папаверином на другие виды показателей атеросклероза в аорте кролика. Пропранолол способствовал увеличению числа клеток в интиме и стимулировал накопление триглицеридов, холестерина и его

эфиров, а также продукцию коллагена в зоне поражения. Прием папаверина не влиял на эти параметры. В комбинации с папаверином пропранолол утрачивал атерогенный потенциал в отношении всех параметров (Таблица 32). Этот феномен не является результатом простого сложения атерогенного действия пропранолола и антиатерогенного эффекта папаверина, так как папаверин сам по себе не предотвращал развитие атеросклероза в поврежденной аорте кролика.

Таким образом, мы показали, что папаверин устраняет атерогенный эффект пропранолола. Эти результаты подтверждают наши данные, полученные на моделях *in vitro* и *ex vivo*. Мы надеемся, что комбинация бета-блокатора и агента, который устраняет его атерогенный потенциал, будет полезной в разработке новых лекарств без атерогенных побочных эффектов.

## 14. Оптимизация диеты

Клеточная модель может быть использована для тестирования не только лекарств, но и пищевых продуктов. Мы исследовали антиатеросклеротическое и антиатерогенное действие некоторых видов грибов и морепродуктов.

Было показано, что водные и спиртовые экстракты 20 видов корейских грибов демонстрируют антиатеросклеротический и антиатерогенный эффект (Li HR et al., 1989). Тринадцать из 20 исследованных экстрактов грибов обладали антиатерогенным действием на клеточной культуре, то есть их добавление в культуру приводило к уменьшению клеточного холестерина и/или замедляло пролиферацию атеросклеротических клеток. Десять из двадцати экстрактов грибов продемонстрировали антиатерогенную активность в дополнение к антиатеросклеротическому эффекту. Четыре вида грибов были выбраны для исследования их свойств на модели *ex vivo*. Культивирование в течение 24 часов атеросклеротических клеток в присутствии сыворотки крови здоровых субъектов, которые употребляли в пищу грибы, привело к снижению уровня внутриклеточного холестерина на 21-30%, что, безусловно, является антиатеросклеротическим эффектом (Li HR et al., 1989). Таким образом, исследованные грибы обладают антиатеросклеротическим и антиатерогенным эффектом на модели *ex vivo*.

В качестве морепродуктов были выбраны моллюски и мясо криля. В частности, пациенты употребляли мясо моллюсков, принадлежащие к роду *Vuccinum*. Через 2 часа после приема моллюсков, у пациентов брали кровь и в сыворотке определяли антиатеросклеротические свойства (Таблица 33). Добавление сыворотки к культуре атеросклеротических клеток приводило к

падению уровня внутриклеточного холестерина. Через четыре часа после приема антиатеросклеротические свойства сыворотки стали еще более заметными (Таблица 33).

Таблица 33. Влияние морепродуктов на связанные с атеросклерозом параметры плазмы пациентов

| Продукт  | Внутриклеточный холестерин,<br>мкг/мг клеточного белка |         |        |         |
|----------|--------------------------------------------------------|---------|--------|---------|
|          | Контроль                                               | 0 часов | 2 часа | 4 часа  |
| Buccinum | 196+17                                                 | 204+16  | 181+19 | 150+16* |
| Криль    | 37+5                                                   | 86+4    | 71+7   | 49+4*   |

\* - статистически значимое отклонение от 0 часов ( $p < 0,05$ ).

Сыворотка крови пациентов из другой группы была атерогенной, она приводила к более чем двукратному увеличению холестерина в клетках, выделенных из непораженной интимы. Эти пациенты получали одну дозу мяса антарктического криля, через 2 часа атерогенность сыворотки крови данных пациентов снижалась, а через четыре часа практически исчезала (Таблица 33). Таким образом, мясо криля обладает профилактическим антиатерогенным действием на уровне артериальных клеток.

Полученные результаты дают возможность предполагать, что применение мяса криля в диете способствует предотвращению атеросклероза. Для разработки диетической терапии, в основе которой лежит мясо криля, нужно было определить эффективную дозу и надлежащий режим приема. Для этого пациентам, сыворотка крови которых обладала атерогенным потенциалом, давали мясо криля и брали у них кровь до приема и че-



рез 2 и 4 часа. Сыворотку крови пациентов инкубировали с культурой субэндотелиальных клеток, выделенных из непораженной интимы аорты человека, после чего в каждом случае определяли содержание внутриклеточного холестерина. Дозозависимый эффект был выявлен путем сравнения эффективности двух доз. Эффективность каждой дозы была оценена путем анализа, по крайней мере, 6 сывороток, полученных от разных пациентов. Было установлено, что мясо криля обладает антиатерогенным эффектом в дозе 10-20 г, половина максимального эффекта достигалась при дозе 30 г, а максимальный эффект достигается при дозе 50 г мяса криля.

Мы полагаем, что данный подход может быть полезен при разработке и оптимизации антиатеросклеротической и антиатерогенной терапевтической диеты.

#### **14.1. Натуральные продукты в антиатеросклеротической терапии**

Антиатерогенный эффект пищевых продуктов стал стимулом для разработки антиатеросклеротической терапии, основанной на натуральных продуктах. Развитие атеросклероза происходит в течение многих лет, поэтому антиатеросклеротическая терапия должна быть длительной, если не пожизненной. При таком длительном лечении обычная медицина не будет работать, поэтому натуральные продукты могут стать хорошей альтернативой.

Мы протестировали множество экстрактов натуральных продуктов, чтобы выявить их влияние на атерогенность сыворотки крови или их способность предотвращать внутриклеточное накопление холестерина, вызванное атерогенной сыворот-

кой крови пациентов. В Таблице 34 представлены только наиболее эффективные натуральные продукты. Естественно, в список испытанных продуктов вошли антиатерогенные, проатерогенные и нейтральные продукты. Среди антиатерогенных натуральных продуктов, наиболее эффективным оказался чеснок.

Таблица 34. Антиатерогенный эффект натуральных продуктов

|                            | Снижение атерогенности, % |
|----------------------------|---------------------------|
| <i>Spirulina platensis</i> | 51                        |
| <i>Allium cepa</i>         | 21                        |
| <i>Beta vulgaris</i>       | 31                        |
| <i>Triticum vulgaris</i>   | 70                        |
| <i>Glycyrrhiza glabra</i>  | 55                        |
| <i>Salsola collina</i>     | 11                        |
| <b>Allium sativum</b>      | <b>77</b>                 |
| <i>Pinus sylvestris</i>    | 52                        |

#### 14.2. Механизм антиатеросклеротического действия чеснока

Мы исследование антиатерогенный эффект экстракта чеснока на накопление липидов в культуре клеток аорты человека. Было показано, что накопление липидов сопровождается стимуляцией других проявлений атеросклероза на клеточном

уровне, а именно синтезом внеклеточного матрикса и пролиферацией (Orekhov AN et al., 1988a; 1990a). Таким образом, исследование эффекта экстракта чеснока на содержание внутриклеточных липидов тесно связано с изучением механизмов антиатеросклеротических эффектов чеснока.

Клетки, выделенные из практически нормальной аорты и атеросклеротической бляшки, сильно различаются по своему липидному составу. Уровень фосфолипидов, свободного и этерифицированного холестерина в атеросклеротических клетках значительно выше по сравнению с клетками, выделенными из нормальной интимы (Таблица 35). Добавление сыворотки крови пациентов в культуру нормальных клеток вызывало внутриклеточное накопление всех классов липидов, кроме фосфолипидов (Таблица 35). После 24 часов инкубации нормальных клеток с атерогенной сывороткой уровень холестерина возрос в 3,2 раза, триглицеридов и свободного холестерина в 1,7 раза и составил 60-80% от уровня липидов в культивируемых клетках из атеросклеротических поражений (Таблица 35). Добавление экстракта чеснока предотвращало накопление свободного холестерина и триглицеридов и уменьшало накопление эфиров холестерина в 2,8 раза (Таблица 35).

В клетках, выделенных из бляшки, чеснок способствовал уменьшению уровня триглицеридов, свободного и этерифицированного холестерина на 21, 31 и 35%, соответственно (Таблица 35). Чеснок не оказывал существенного эффекта на уровень фосфолипидов в клетках, культивируемых из нормальной и пораженной аорты человека (Таблица 35). Следует добавить, что он также не влиял на содержание в клетках нормальной и пораженной аорты сфингомиелина, фосфатидилхолина, фосфатидилинозитола, фосфатидилсерина и фосфатидилэтанола-

мина.

Таблица 35. Влияние экстракта порошка чеснока на липидный состав гладкомышечных клеток, выделенных из интимы аорты человека

|                            | Содержание липидов, мкг/мг клеточного белка |                       |                       |                              |
|----------------------------|---------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------------|
|                            | Фосфолипиды                                 | Триглицериды          | Свободный холестерин  | Этерифицированный холестерин |
| Нормальные клетки          |                                             |                       |                       |                              |
| Контроль                   | 85,8±3,9                                    | 10,5±0,5              | 7,8±0,7               | 10,4±0,3                     |
| Атеро-генная сыворотка     | 92,3±6,4                                    | 17,5±0,7 <sup>a</sup> | 12,9±0,7 <sup>a</sup> | 33,1±1,2 <sup>a</sup>        |
| + ЭПЧ, 1 мг/мл             | 84,4±3,0                                    | 12,8±0,4 <sup>b</sup> | 8,3±0,3 <sup>b</sup>  | 18,4±0,7 <sup>ab</sup>       |
| Атеросклеротические клетки |                                             |                       |                       |                              |
| Контроль                   | 136,1±8,3                                   | 24,6±1,2              | 16,0±0,6              | 56,0±3,3                     |
| ЭПЧ, 1мг/мл                | 131,8±8,0                                   | 17,0±1,0 <sup>a</sup> | 12,7±0,7 <sup>a</sup> | 34,2±1,5 <sup>a</sup>        |

Данные представлены в виде среднего трех определений ± СМО трех отдельных экспериментов. Нормальные клетки были получены из непораженной интимы аорты человека, атеросклеротические клетки были выделены из атеросклеротического поражения. Параметры клеток, культивированных в стандартных условиях, были приняты за контроль. Для того чтобы вызвать внутриклеточное накопление липидов, в культуру нормальных клеток добавляли пулированную атерогенную сыворотку крови пациентов с атеросклерозом сонных артерий. Клетки с добавками инкубировали в течение 24 часов.

ЭПЧ – экстракт порошка чеснока,

a - статистически значимое отличие от контроля,  $p < 0,05$ .

b - статистически значимое отличие от атерогенной сыворотки,  $p < 0,05$ .

Основным источником холестерина, накапливающимся в артериальных клетках, являются липопротеиды низкой плотности (ЛНП). Клетки артерий могут связывать, интернализировать и метаболизировать ЛНП. Внутриклеточный метаболизм холестерина ЛНП может быть изучен с использованием липидной метки [ $^3\text{H}$ ]-холестериллинолеата. Большая часть эфиров холестерина, поступивших в клетки с липопротеидами низкой плотности, распалась до свободного холестерина и попала в культуральную среду (Таблица 36).

В отличие от ЛНП, циркулирующих в крови здоровых доноров, липопротеиды больных модифицированы и вызывают внутриклеточное накопление эфиров холестерина. Захват и деградация таких липопротеидов значительно выше по сравнению с ЛНП здоровых доноров (Таблица 36). Чеснок снижает интернализацию эфиров холестерина нативных и модифицированных ЛНП на 32 и 56 процентов, соответственно (Таблица 36). В результате внутриклеточное содержание эфиров холестерина при инкубации с нативными и модифицированными ЛНП становится в 2 и 4 раза ниже, соответственно (Таблица 36). Таким образом, чеснок подавляет захват и внутриклеточную деградацию эфиров холестерина ЛНП, и это приводит к снижению внутриклеточного накопления свободного и этерифицированного холестерина в клетках артерий.

Было исследовано влияние экстракта чесночного порошка на ферменты, ответственные за внутриклеточный метаболизм эфиров холестерина — ацил-коэнзимА:холестерин О-ацилтрансферазу (АХАТ), способствующую образованию эфиров холестерина в артериальных клетках, и холестеринэстеразу (гидролазу эфиров холестерина) (ХЭ), осуществляющую гидролиз эфиров холестерина. Активность ферментов определяли в

лизатах нормальных и атеросклеротических клеток.

Таблица 36. Влияние экстракта порошка чеснока на метаболизм ЛНП в субэндотелиальных клетках аорты

|                            | dpm/мкг клеточного белка |                      |                      |
|----------------------------|--------------------------|----------------------|----------------------|
|                            | Внутри клетки            |                      | Вне клетки           |
|                            | Эфиры холестерина        | Свободный холестерин | Свободный холестерин |
| Нативные ЛНП               | 92+4                     | 62+3                 | 4872+119             |
| Нативные ЛНП + ЭПЧ         | 49+3*                    | 47+2*                | 3344+203*            |
| Модифицированные ЛНП       | 194+14                   | 83+5                 | 7400+503             |
| Модифицированные ЛНП + ЭПЧ | 55+6*                    | 60+4*                | 3295+289*            |

Клетки, выделенные из непораженной интимы, культивировали в течение 24 часов с нативными и модифицированными (десалированными) ЛНП (100мкг/мл), мечеными [<sup>3</sup>H]холестериллинолеатом.

ЭПЧ – экстракт порошка чеснока

\* - статистически значимый эффект ЭПЧ, p<0,05. Другие детали как в Таблице 35.

Активность АХАТ в атеросклеротических клетках была в 3 раза выше, чем в клетках непораженной интимы. Экстракт чесночного порошка в концентрации 100 мкг/мл и выше значимо снижал активность АХАТ (Рисунок 76).

Активность холестеринэстеразы в клетках бляшки почти в 2 раза превосходила активность фермента в клетках из непо-  
раженной интимы. Экстракт чесночного порошка в диапазоне  
концентраций 10-1000 мкг/мл значимо увеличивал активность  
фермента, полученного как из атеросклеротических, так и из  
нормальных клеток (Рисунок 77). Концентрационная зависи-  
мость эффекта имела колоколообразный характер. При концен-  
трации экстракта чесночного порошка 100 мкг/мл имел место  
максимальный эффект, а в концентрациях выше и ниже опти-  
мальной экстракт чесночного порошка был менее эффектив-  
ным.

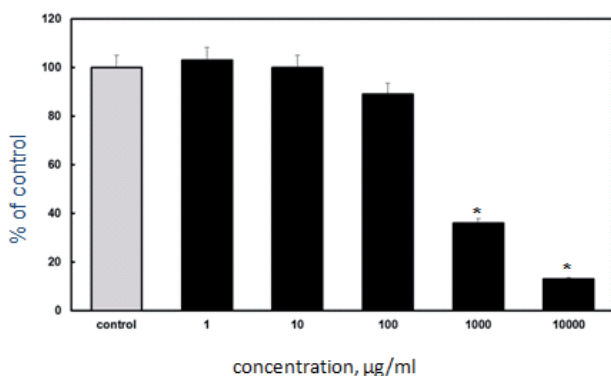


Рисунок 76. Влияние экстракта порошка чеснока на активность ацил-КоА:холестерин-ацилтрансферазы (АХАТ) в гладкомышечных клетках, культивированных из атеросклеротического поражения

Каждое значение представлено в виде среднего трех определений  $\pm$  СМО, статистически значимое ( $p < 0,05$ ) отличие от контроля (0 мкг/мл экстракта порошка чеснока) помечены звездочкой.

Таким образом, экстракт чесночного порошка способен ингибировать АХАТ (фермент внутриклеточного синтеза эфиров холестерина) и стимулировать ХЭ (фермент внутриклеточной деградации эфиров холестерина). Эти данные полностью объясняют механизмы снижения накопления внутриклеточного холестерина под воздействием чеснока.

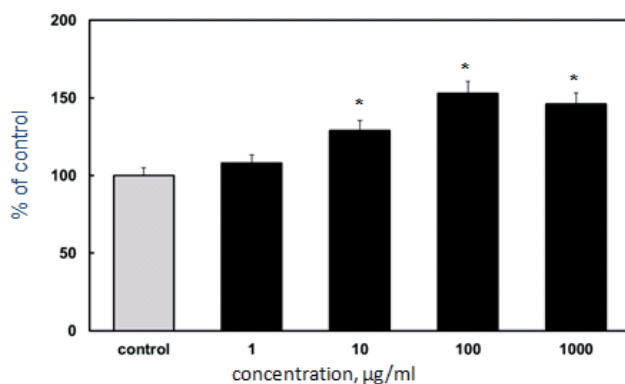


Рисунок 77. Влияние экстракта порошка чеснока на активность холестеринэстеразы в гладкомышечных клетках, культивированных из атеросклеротического поражения

Каждое значение представлено в виде среднего трех определений  $\pm$  СМО, статистически значимое ( $p < 0,05$ ) отличие от контроля (0 мкг/мл экстракта порошка чеснока) помечены звездочкой

В дальнейшем было изучено антиатеросклеротическое действие чеснока на животной модели и на модели *ex vivo*. В обоих случаях исследования подтвердили эффекты, полученные на модели *in vitro* (Orekhov AN, Grünwald J, 1997).



## **15. Разработка природных антиатеросклеротическое препаратов предотвращающих накопление внутриклеточного холестерина**

Мы считаем, что чеснок и другие натуральные продукты имеют хорошие перспективы стать основой для создания антиатеросклеротическим препаратов. С одной стороны, атеросклероз развивается в течение многих лет, поэтому антиатеросклеротическое терапия должна быть долгосрочной или даже всю жизнь. С другой стороны, токсичность и высокая стоимость обычных препаратов создают проблемы в применении таких лекарств в течение длительного времени. Таким образом, препараты на основе натуральных продуктов могут стать хорошей альтернативой.

Успех клинических исследований по изучению регрессии атеросклероза, вызванной статинами и другими препаратами, стал для нас стимулом в разработке антиатеросклеротическим препаратов на основе натуральных продуктов и проведении клинических испытаний по оценке эффективности натуральных препаратов при атеросклерозе.

Атеросклероз может оставаться бессимптомным в течение длительного времени. Получить быстрый результат при оценке степени атеросклероза трудно, а оценить эффективность антиатеросклеротической терапии невозможно без метода выявления ранних, субклинических изменений. Визуализация является единственным эффективным методом оценки в разработке антиатеросклеротической терапии.

## 15.1. Визуализация атеросклероза

Существует несколько методов визуализации, используемых для оценки атеросклероза (Tardif JC et al., 2011). В течение долгого времени основным методом была ангиография, которая использовалась для оценки прогрессирования или регрессии атеросклероза. При коронароангиографии можно выявить поперечное сечение коронарной артерии, представляющие собой плоский силуэт сосуда, заполненный контрастным препаратом. Этот подход является крайне актуальными в клинических условиях, но не предоставляет информацию о ранних стадиях утолщения стенки пораженной атеросклеротическим процессом. Ультразвуковое исследование является неинвазивным методом визуализации, который позволяет оценить как стенку, так и просвет артерии, что в свою очередь позволяет оценить истинную регрессию. Основным параметром является толщина интима-медиа (ТИМ), которая может быть измерена неинвазивно. Этот метод хорошо верифицирован гистологическими и эпидемиологическими исследованиями (Verhamme P et al., 2010). Магнитно-резонансная томография сонных артерий также позволяет провести неинвазивную визуализацию артериальной стенки и просвета, не подвергая пациента излучению, хотя и с более низким разрешением по сравнению с ультразвуковым исследованием. Важно, что магнитно-резонансная томография может также предоставить информацию о составе бляшки. Позитронно-эмиссионная томографии с компьютерной томографией может выявить метаболическую активность клеток и, возможно, воспаление в стенке артерии (Arsenault BJ et al., 2012).

## 15.2. Толщина интима-медиа (ТИМ)

Атеросклеротическое поражение достаточно хорошо визуализируется с использованием ультразвукового исследования. Этот метод был использован как суррогатный показатель атеросклероза в многочисленных исследованиях. Внутрисосудистые поражения могут быть быстро и надежно оценены в сонных, бедренных артериях и в брюшной аорте. Степень внутрисосудистого атеросклеротического поражения хорошо коррелирует с большинством стандартных факторов риска сердечнососудистых заболеваний (Simon A et al., 1995). Наибольшая связь степени атеросклеротического поражения выявлена в сопоставлении с ишемической болезнью сердца (Mitchell JR & Schwartz CJ, 1962; Craven TE et al., 1990; Geroulakos G et al., 1994; Geroulakos G et al., 1994). Изучение периферических артерий ультразвуковым исследованием рассматривается как чувствительный метод обнаружения атеросклеротического поражения, а также является полезным при оценке ответа на проведенную терапию. Утолщение комплекса интима-медиа в артериальной стенке является самым ранним признаком анатомических изменений, приводящих к развитию и прогрессированию атеросклероза. Высокое разрешение (В-режим) ультразвукового исследования широко используется для неинвазивной количественной оценки ТИМ сонных артерий в качестве способа определения субклинического атеросклероза (Crouse JR 3rd et al., 1995). ТИМ считается маркером атеросклероза, а также является предиктором сердечнососудистых заболеваний (Blankenhorn DH & Hodis HN, 1994; Bots ML et al., 1997; Chambless LE et al., 1997; Craven TE et al., 1990; Geroulakos G et al., 1994; Hodis HN et al., 1998; O'Leary DH et al., 1999; Salonen

JT & Salonen R, 1993). Таким образом, ультразвуковое исследование толщины интима-медиального комплекса сонной артерии является приемлемым методом для мониторинга атеросклероза при длительной терапии.

Прежде, чем оценить антиатеросклеротическую эффективность наших собственных разработок мы проанализировали опубликованные результаты различных клинических исследований, чтобы выяснить, насколько применимы методы ультразвукового измерения ТИМ для оценки антиатеросклеротической эффективности различных препаратов. Для сравнения эффектов различной антиатеросклеротической терапии, мы выбрали те исследования, в которых дизайн и ультразвуковые протоколы измерения ТИМ были аналогичны. Результаты этих исследований описаны ниже.

### **15.3. Препараты, влияющие на метаболизм липидов**

Большинство исследований, определяющих развитие атеросклероза, были проведены с препаратами, влияющими на липидный обмен. Это объясняет, тот факт, что единственной гипотезой, которая получила подтверждение в клинике, является холестериновая гипотеза. Холестериновая гипотеза была предложена более 100 лет назад Н. Н. Аничковым. Первоначально, гипотеза Аничкова связывала атеросклероз с высоким уровнем общего холестерина в крови. Современные теории изменили лишь некоторые аспекты этой гипотезы, в частности, отмечается, что атеросклероз связан не только с общим уровнем холестерина, но и с атерогенностью липопротеидов низкой плотности и антиатерогенностью липопротеидов высокой плотности. Кроме того, обсуждается роль различных молекул,

участвующих в метаболизме липопротеидов.

### 15.3.1. Статины

Статины были введены в клиническую практику как препараты, подавляющие синтез холестерина и снижающие уровень ЛНП. Следует подчеркнуть, что статины назначались в качестве гиполипидемических препаратов, а не как антиатеросклеротические средства.

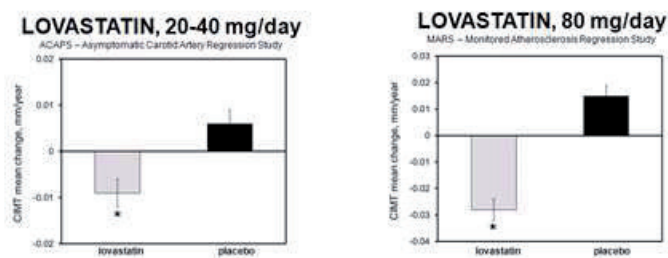


Рисунок 78. Антиатеросклеротические эффекты ловастатина

В первых клинических исследованиях статины были использованы в качестве гиполипидемических агентов, чтобы проверить гипотезу о том, что снижение уровня холестерина может привести к регрессии атеросклероза. Хотя прямой корреляции между снижением уровня холестерина и регрессией атеросклероза выявлено не было, эти исследования показали антиатеросклеротический эффект статинов. Позже для объяснения нелипидного антиатеросклеротического эффекта статинов стали обсуждать плейотропное действие статинов (Bellosta S et al., 1998; Comparato C et al., 2001; Davignon J, 1998; Farmer JA, 2000; Gotto Jr AM Jr & Farmer JA, 2001; McFarlane SI et al., 2002;

Takemoto M et al., 2001; Werner N et al., 2002).

Первым статином, который продемонстрировал антиатеросклеротическое эффект, был ловастатин (Probstfield JL et al., 1995). На Рисунке 78 показаны антиатеросклеротические эффекты ловастатина, полученные в двух исследованиях ACAP и MARS с различными дозами ловастатина (Probstfield JL et al., 1995; Mack WJ et al., 1996). Более высокая доза вызывала больший эффект (Рисунок 78).

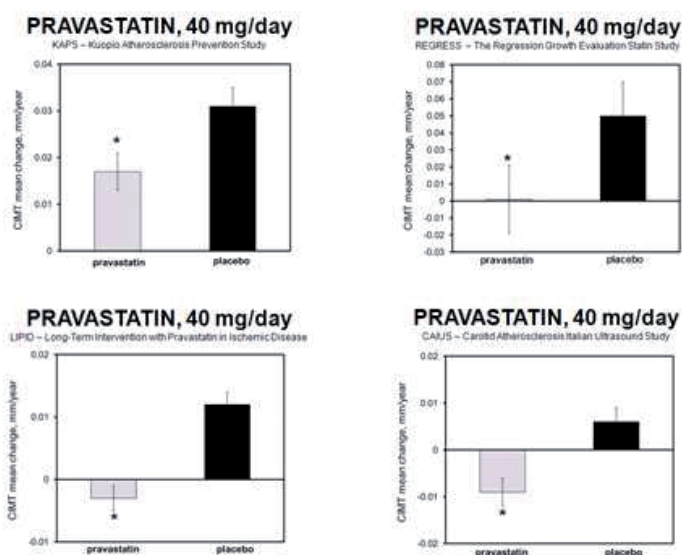


Рисунок 79. Антиатеросклеротические эффекты правастатина

Другой статин правастатин широко изучался в клинических исследованиях по регрессии атеросклероза. Гипохолестеринемический эффект правастатина был аналогичен эффекту ловастатина (McTavish D & Sorkin EM, 1991). Однако антиатеросклеротические эффекты либо отсутствовали при дозах 20-40 мг/сут как в исследовании PLAC II (Byington RP et al., 1995), ли-

бо были умеренными как в исследованиях KAPS, REGRESS, LIPID, CAIUS (Baldassarre D et al., 2000; De Groot E et al., 1998; Salonen R et al., 1995; The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group, 1998).

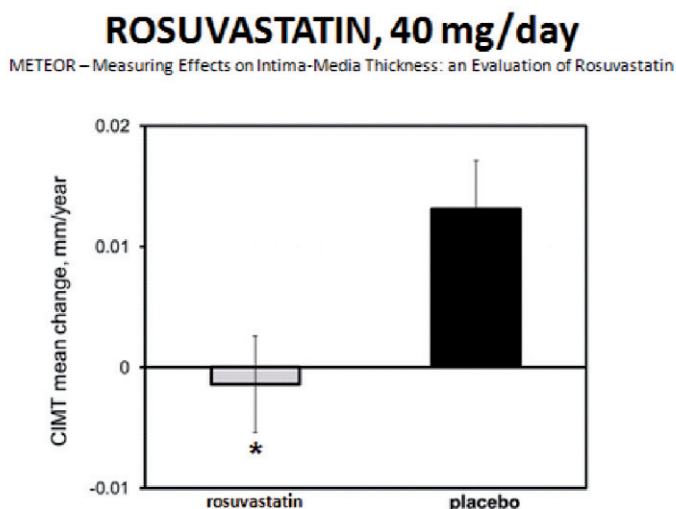


Рисунок 80. Антиатерогенный эффект розувастатина

На Рисунке 79 видно, что в двух исследованиях (KAPS, REGRESS), правастатин только замедлил развитие атеросклероза, но не вызвал регрессию, а в двух других исследованиях (LIPID, CAIUS), правастатин способствовал умеренной регрессии атеросклероза.

Было выявлено антиатерогенное действие одного из последних статинов розувастатина (Crouse JR 3rd et al., 2007). Было показано, что розувастатин предотвращает прогрессирование атеросклероза (Рисунок 80).

Были проведены сравнительные исследования антиатеросклеротической эффективности различных статинов. Влияние аторвастатина сравнивали с эффектами симvastатина и правастатина (Smilde TJ et al., 2001; Taylor AJ et al., 2002). На Рисунке 81 видно, что аторвастатин был более эффективным.

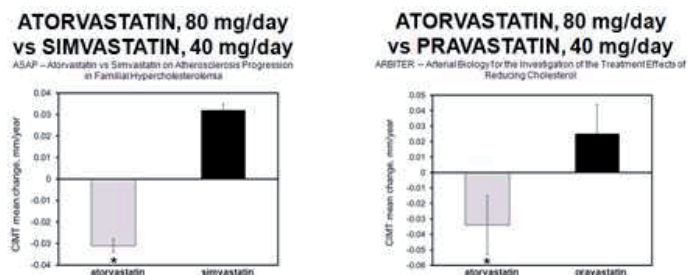


Рисунок 81. Антиатеросклеротические эффекты статинов

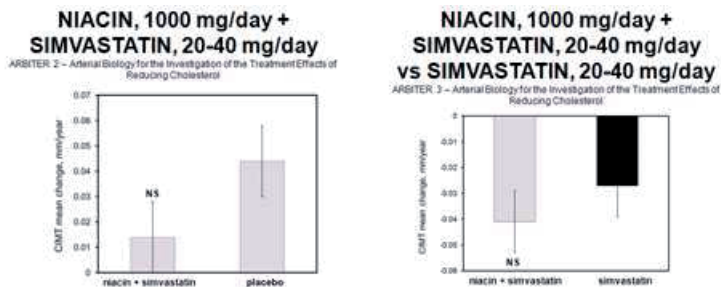


Рисунок 82. Антиатеросклеротические эффекты симvastатина в комбинации с ниацином



Статины были также использованы в комбинации с ЛВП-повышающим агентом никотиновой кислотой (Taylor AJ et al., 2004; 2006; 2009). Комбинация симвастатина с ниацином не вызывала регрессию атеросклероз и не имела статистически значимых антиатеросклеротических эффектов по сравнению с плацебо (Рисунок 82). В отношении регрессии атеросклероза эта комбинация не была значимо более эффективной, чем симвастатин отдельно (Рисунок 82).

Другое исследование показало, что использование ниацина в сочетании со статинами (симвастатин или аторвастатин) вызвало значительное уменьшение толщины интима-медиа сонной артерии; кроме того, никотиновая кислота превосходила по эффективности эзетимиб (Рисунок 83).

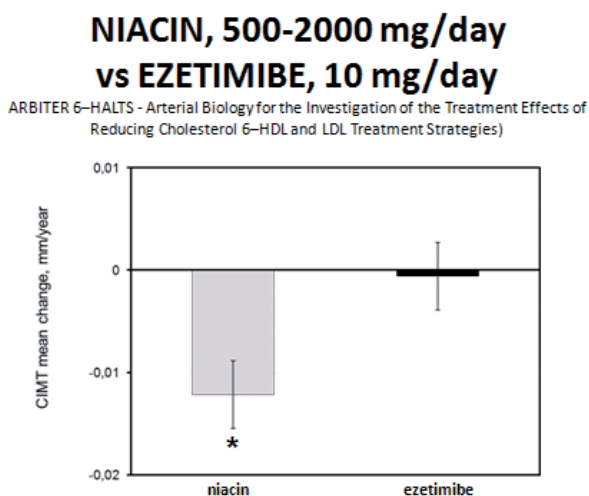


Рисунок 83. Антиатеросклеротический эффект ниацина

### 15.3.2 ЛВП-терапия

В настоящее время имеют широкое распространение представления, что разработка лекарств для увеличения содержания в крови липопротеидов высокой плотности (ЛВП), вероятно, перспективна для лечения атеросклероза. Эта гипотеза базируется на выводах исследования Framingham Heart Study, в котором ЛВП обратно коррелируют с сердечнососудистыми заболеваниями, независимо от уровня ЛНП (Gordon T et al., 1977). Повышение уровня циркулирующих ЛВП является привлекательной терапевтической мишенью.

Лечение путем повышения уровня ЛВП может включать в себя инъекции ЛВП, ЛВП-подобных частиц или апоА-1 миметического белка, а также ингибиторы белка переноса эфиров холестерина (СЕТР). Однако, клинические испытания с апоА-1 Милано/фосфолипид комплексом (ETC-216) (Nissen SE et al., 2003), комплексом нативных апоА-1 с фосфатидилхолином (CSL-111) (Tardif JC et al., 2007) и делипидированными ЛВП (Waksman R et al., 2010) не дали статистически значимого антиатеросклеротического эффекта по сравнению с плацебо.

Другой подход для повышения уровня холестерина ЛВП заключается в ингибировании СЕТР. СЕТР переносит эфиры холестерина от ЛВП к апоВ-содержащим ЛНП или ЛОНП. Известно, что холестерин ЛВП не вызывает атеросклероза. ЛНП, напротив, переносят холестерин ко всем тканям, включая сосудистую стенку, и повышенный уровень холестерина ЛНП является одним из причинных факторов атеросклероза. К сожалению, все попытки продемонстрировать антиатеросклеротическую эффективность ингибирования СЕТР оказались безуспешными ввиду того, что все клинические исследования, связанные

ингибированием СЕТР были остановлены по тем или иным причинам.

## 15.4. Нелипидная антиатеросклеротическая терапия

### 15.4.1. Антагонисты кальция

Стимулом для изучения влияния антагонистов кальция на атеросклероз было наличие данных об антиатеросклеротической эффективности антагонистов кальция на животных моделях (Catapano AL, 1997; Weinstein DB & Heider JG, 1989). Тем не менее, первые исследования на больных с применением антагонистов кальция не увенчались успехом (Borhani NO et al., 1996; Zanchetti A et al., 1998). У больных гипертонической болезнью ни исрадипин, ни верапамил не вызывали регрессию атеросклероза, и ни один из них существенно не отличался по эффективности от диуретиков, используемых в качестве контроля (Рисунок 84).

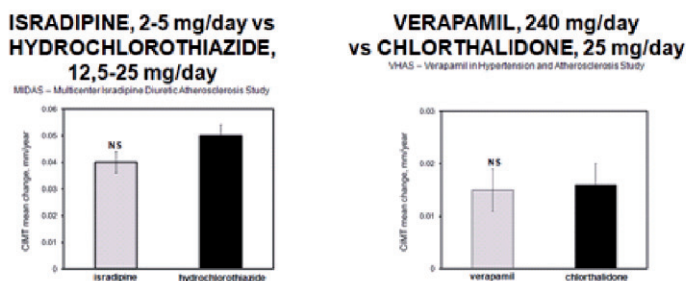


Рисунок 84. Антиатеросклеротические эффекты кальциевых антагонистов

## NIFEDIPINE, 30 mg/day

INSIGHT – International Nifedipine GITS Study: Intervention as a Goal in Hypertension Treatment

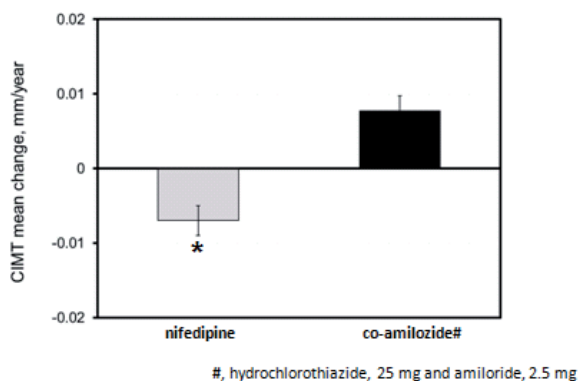


Рисунок 85. Антиатеросклеротический эффект нифедипина

## RAMIPRIL, 10 mg/day

SECURE – The Study to Evaluate Carotid Ultrasound changes in patients treated with Ramipril and vitamin E

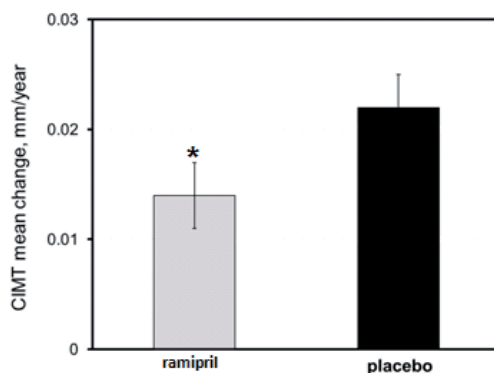


Рисунок 86. Антиатеросклеротический эффект рамиприла

Единственное успешное исследование было проведено с нифедипином (Simon A et al., 2001). Была продемонстрирована регрессия атеросклероза у больных артериальной гипертонией. В этом исследовании была выявлена значительная разница между курсами лечения нифедипином и мочегонными средствами, которые были использованы в качестве контрольных препаратов (Рисунок 85).

#### **15.4.2. Ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента**

Экспериментальные и эпидемиологические данные свидетельствуют о том, что активация ренин-ангиотензин-альдостероновой системы играет важную роль в процессах атерогенеза, а длительное торможение ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) может быть полезным (Lonn EM et al., 1994). Действительно, длительное лечение ингибитором АПФ рамиприлом оказывало положительное влияние на прогрессирование атеросклероза (Lonn E et al., 2001). Рамиприл, значительно замедлял прогрессирование атеросклероза по сравнению с плацебо (Рисунок 86).

#### **15.5. Прямая антиатеросклеротическая терапия на основе натуральных продуктов**

Используя клеточные модели, описанные выше, опираясь на результаты, полученные на этих моделях, мы разработали ряд препаратов на основе натуральных продуктов, обладающих антиатеросклеротическим терапевтическим потенциалом, выявленным на клеточных моделях. Разработка натуральных антиатеросклеротических препаратов была осуществлена на основе

результатов наших фундаментальных исследований, в частности, знания механизмов клеточного липоидоза у человека при атеросклерозе.

Анализ опубликованных данных об эффективности антиатеросклеротической терапии позволил нам выбрать метод визуализации атеросклероза и его оценки, основанной на измерении ТИМ сонных артерий. Применяя этот метод и широко используемый протокол клинических исследований, мы оценили антиатеросклеротическую эффективность наших разработок.

#### **15.5.1. Алликор (чеснок)**

Как показано выше, чеснок оказывает прямое антиатерогенное действие, предотвращая накопление холестерина в стенках артерий. Мы разработали и зарегистрировали таблетки на основе порошка чеснока, которые в настоящее время производит ООО «ИНАТ-Фарма» (Россия).

Нами было проведено рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование, которое получило название «Мониторирование атеросклероза при снижении атерогенности» (MACA) (ClinicalTrials.gov Identifier, NCT01734707), поскольку главной его задачей была оценка влияния снижения атерогенности сыворотки крови под действием Алликора на динамику изменений диффузного утолщения интима-медиального слоя сонных артерий (Orekhov AN et al., 2012).

Мы убедились, что длительный прием Алликора приводит к существенному и значимому снижению атерогенности. Низкий уровень атерогенности поддерживался на протяжении всего периода исследования (Рисунок 87).

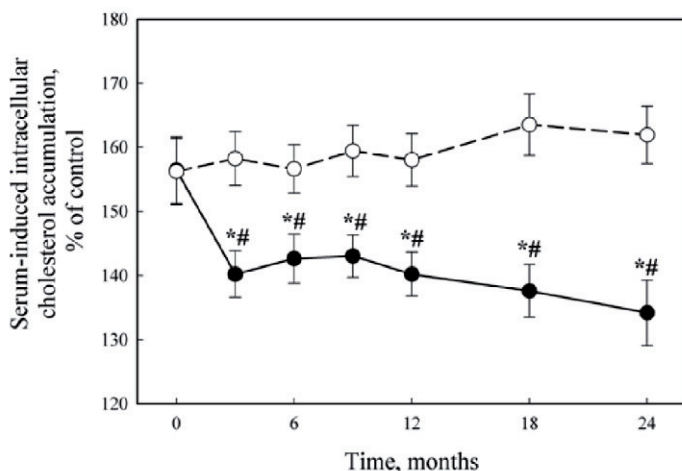


Рисунок 87. Динамика изменения атерогенности сыворотки крови

Черные кружочки – пациенты, получавшие Алликор; белые кружочки – пациенты, получавшие плацебо.

\* - статистически значимое отличие от исходного уровня,  $P < 0,05$ ;

# - статистически значимое отличие от группы плацебо,  $P < 0,05$ .

Алликор способствовал достоверному уменьшению ТИМ в сравнении с контрольной группой, получавшей плацебо (Рисунок 88). Различия в направленности изменений ТИМ сонных артерий между основной группой и группой плацебо были статистически достоверными ( $\chi^2=9,788$ ,  $p=0,020$ ). Случаи прогрессирования атеросклероза преобладали в группе плацебо, в то время как применение Алликора оказывало благоприятное действие, заключающееся в существенном увеличении числа случаев регрессии поражений и снижении частоты случаев прогрессирования атеросклероза.

Тенденция к уменьшению ТИМ в основной группе была отмечена уже после первых 3 месяцев исследования, но статистически значимое отличие, как от исходного значения, так и от показателей в группе плацебо было зарегистрировано только после 12 месяцев лечения (Orekhov AN et al., 2012). В конце двухлетнего исследования различие между группами пациентов, принимавших алликор и плацебо, возросло и было статистически значимым. Динамика абсолютных изменений ТИМ сонных артерий представлена на Рисунке 89. Если в группе плацебо отмечалось умеренное увеличение ТИМ сонных артерий со средней скоростью  $0,015 \pm 0,008$  мм в год при средней исходной ТИМ  $0,931 \pm 0,009$  мм, то в основной группе изменения в ТИМ составили  $-0,022 \pm 0,007$  мм в год, что существенно отличалось от показателей в группе плацебо ( $p=0,002$ ). При этом средняя скорость изменений ТИМ была одинаковой в течение двух лет исследования, а в основной группе положительный эффект лечения был более выражен в течение первого года приема Алликора ( $-0,028 \pm 0,008$  мм в первый год и  $-0,016 \pm 0,007$  мм – во второй).

Результаты, полученные в данном исследовании, в основном совпадают с данными, полученными в двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании, проведенном Koscielny и соавт. (Koscielny J et al., 1999). В нем было продемонстрировано, что лечение в течение 4-х лет препаратом на основе чеснока Kwaі замедляет рост атеросклеротических бляшек в сонных и бедренных артериях на 5-18%. Анализ зависимости размера атеросклеротической бляшки от возраста показал ее увеличение между 50 и 80 годами, а при лечении чесноком ее размер уменьшился на 6-13% за 4 года. Тем не менее, несмотря на терапию чесночным препаратом, размер бляшки оставался



примерно постоянным в возрасте 50-80 лет (Koscielny J et al., 1999).

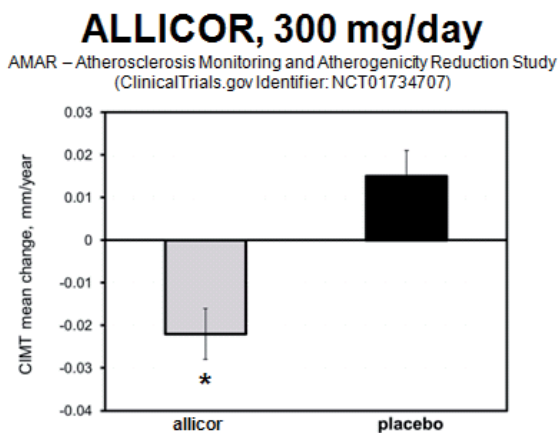


Рисунок 88. Антиатеросклеротическое действие алликора

Звездочкой помечены статистически значимые отличия от группы плацебо.

Уменьшение ТИМ, которое было продемонстрировано в исследовании МАСА, сравнимо с наиболее успешными клиническими испытаниями других соединений (Blankenhorn DH et al., 1993a,b; Crouse JR 3rd et al., 1995; Hodis HN, 1995; Pitt B et al., 2000; Salonen R et al., 1995; Smilde TJ et al., 2001; Zanchetti A et al., 1998). При этом в этих исследованиях использовались мощные липидснижающие агенты или антагонисты кальция, механизм действия которых связан со снижением уровня холестерина ЛНП, основным фактором риска для развития атеросклероза, а также гемодинамическим стрессом сосудистой стенки (Таблица 37).

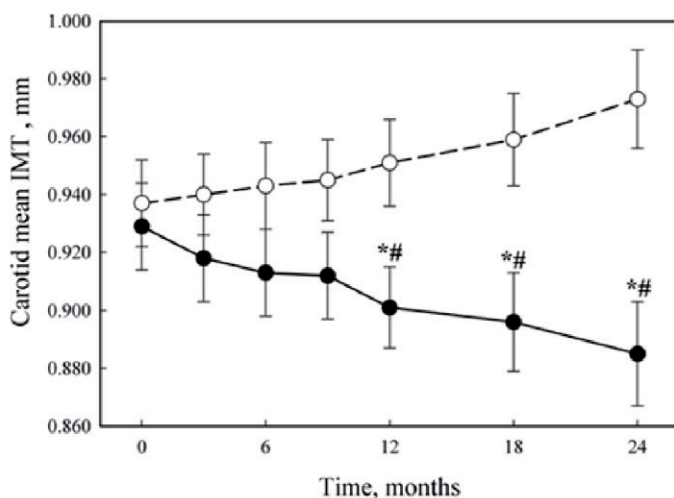


Рисунок 89. Динамика изменений ТИМ

Детали те же, что на Рисунке 87.

Прямое влияние чеснока на атеросклероз обсуждалось в нескольких работах (El-Sayyad HI et al., 2010; Lavu M et al., 2011; Lei YP et al., 2010; Prasad K, 2010; Reinhart KM et al., 2009). Антиатеросклеротическое действие чеснока может быть связано с его способностью снижать уровень холестерина в крови (Chen ZY et al., 2008; Reinhart KM et al., 2009). Этот эффект достигается за счет ингибирования гидроксиметилглутарил-коэнзим-А-редуктазы (ГМК-КоА-редуктазы) (Vidyashankar S et al., 2010). В противоположность этим исследованиям, рассматривающим гиполипидемическое действие чеснока, мы изучили прямое антиатеросклеротическое и антиатерогенное действие алликаора, а именно, способность чеснока напрямую влиять на процессы, происходящие в артериальной стенке. Для изучения механизмов терапевтического эффекта чеснока мы использовали культуру клеток, выделенную из атеросклеротического поражения

аорты человека. Для изучения антиатерогенного (профилактического) эффекта мы инициировали клеточные проявления атеросклероза в первичной культуре клеток, выделенных из пораженной интимы аорты человека добавлением в нее атерогенной сыворотки больных с ангиографически подтвержденным атеросклерозом. Чеснок способствовал снижению уровня триглицеридов, свободного и этерифицированного холестерина в клетках, выделенных из пораженной интимы, и предупреждал вызванное атерогенной сывороткой накопление липидов в клетках, выделенных из здоровой интимы. Другими словами, чеснок обладает прямым антиатеросклеротическим (терапевтическим) и антиатерогенным (профилактическим) действием. Чеснок ингибирует АХАТ и стимулирует холестеринэстеразу, которые напрямую влияют на синтез и деградацию эфиров холестерина в клетке. Это может объяснить прямое антиатеросклеротическое действие чеснока.

В целом, результаты нашего исследования показали, что длительное лечение алликором (препаратом на основе чеснока) обеспечивает прямое антиатеросклеротическое воздействие на атеросклероз сонных артерий. Поскольку алликор - средство природного происхождения, он безопасен в отношении побочных эффектов и может быть показан к пожизненному приему, который может быть необходимым для профилактики и лечения субклинического атеросклероза.

Полученные результаты способствовали проведению клинических испытаний двух других препаратов на основе натуральных продуктов: Инфламината, который обладает антицитокиновой активностью, и обогащенного фитоэстрогенами препарата Каринат, который предназначен для женщин в постменопаузе.

Таблица 37. Сравнение данных, полученных в клинических исследованиях регрессии атеросклероза сонной артерии

| Исследование | Препарат              | Значение изменения<br>ТИМ, мм |         | Источник                                     |
|--------------|-----------------------|-------------------------------|---------|----------------------------------------------|
|              |                       | плацебо                       | лечение |                                              |
| PLAC II      | Правастатин           | 0,068                         | 0,059   | Crouse JR et al., 1995                       |
| KAPS         | Правастатин           | 0,029                         | 0,010   | Salonen R et al., 1995                       |
| ASAP         | Симвастатин           | -                             | -0,009  | Smilde TJ et al., 2001                       |
| PREVENT      | Амлодипин             | 0,011                         | -0,015  | Pitt B et al., 2000                          |
| ASAP         | Аторвастатин          | -                             | -0,020  | Smilde TJ et al., 2001                       |
| CLAS         | Холестипол,<br>ниацин | 0,010                         | -0,020  | Blankenhorn DH et al., 1993a; Hodis HN, 1995 |
| MARS         | Ловастатин            | 0,015                         | -0,028  | Blankenhorn DH et al., 1993b; Hodis HN, 1995 |
| VHAS         | Верапамил             | -                             | -0,028  | Zanchetti A et al., 1998                     |
| MACA         | Алликор               | 0,015                         | -0,022  | Orekhov et al., 2012                         |

### 15.5.2. Инфламинат (календула, бузина, фиалка)

Атеросклероз это патологический процесс, который обладает некоторыми элементами асептического воспаления, а воспалительные цитокины играют не последнюю роль в развитии атеросклероза (Aidinian G et al., 2006; Daugherty A et al., 2005; Libby P, 2006). С этой точки зрения, лекарства, обладающие системным противовоспалительным действием, могут использоваться для профилактики атеросклероза. Использование натуральных препаратов вместо обычных лекарств более правильно для ранней профилактики атеросклероза ввиду того, что они не обладают побочными эффектами и подходят для долгосрочной или пожизненной терапии. Мы исследовали антиатеросклеротический эффект натурального препарата инфламинат, который состоит из фиалки, бузины и календулы. Эти растения широко распространены и используются в народной медицине в качестве противовоспалительных агентов. В пилотном клиническом исследовании (ClinicalTrials.gov Identifier, NCT01743404) инфламинат был изучен по тому же протоколу, который применялся в описанном выше исследовании МАСА. При сравнении группы, которая принимала инфламинат, а также контрольной группы, которая принимала плацебо, было показано, что инфламинат способствует регрессии атеросклероза и имеет статистически значимые отличия от контроля и группы плацебо (Orekhov AN et al., 2012). На рисунке 90 представлена регрессия атеросклероза на фоне прием инфламината у мужчин с бессимптомным атеросклерозом.

## INFLAMINAT, 1500 mg/day

Study of Anti-atherosclerotic Activity of Inflaminat in Asymptomatic Participants  
with Subclinical Atherosclerosis  
(ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01743404)

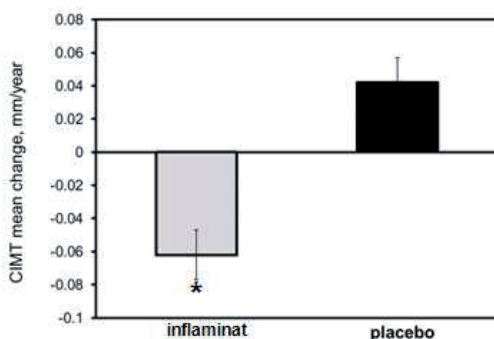


Рисунок 90. Антиатеросклеротическое действие инфламината

### 15.5.3. Каринат (продукт, богатый фитоэстрогенами)

Профилактика атеросклероза у женщин после менопаузы – проблема, решение которой в современной медицине еще не найдено. Заместительная гормональная терапия была отвергнута как инструмент для лечения атеросклероза ввиду негативных результатов, которые были получены в ряде исследований WHI, PEPI и HERS (Burger HG et al., 2012; de Villiers TJ & Stevenson JC, 2012; Ellis MJ et al., 2011; Masood DE et al., 2010; Pellegrini CN et al., 2009; Smith NL et al., 2008). Необходима разработка новых подходов. Фитоэстрогены часто рассматриваются как возможная альтернатива заместительной гормональной терапии, но практически ничего не известно об их действии на атеросклероз. Мы провели скрининг многих натуральных про-

дуктов, обогащенных фитоэстрогенами, в поиске обладающих наибольшим антиатерогенным потенциалом. Наиболее обещающими оказались чеснок, экстракт виноградных косточек, листья зеленого чая и шишки хмеля. Взяв за основу данные продукты, мы составили биологически активную добавку к пище «Каринат». Этот препарат продемонстрировал антиатерогенный эффект на клеточных моделях, кроме того, он характеризуется высоким содержанием биологически активных полифенолов, включая резвератрол, генистеин и дайдзеин. Каринат также содержит бета-каротин, альфа-токоферол и аскорбиновую кислоту в таких количествах, чтобы удовлетворять суточную потребность в данных антиоксидантах.

Для того чтобы охарактеризовать положительные и отрицательные стороны лечения атеросклероза Каринатом было проведено двойное слепое плацебо-контролируемое исследование с участием женщин в пери- и пост-менопаузальном периоде (ClinicalTrials.gov Identifiers, NCT01741974 и NCT01742000). Основным параметром была скорость изменений ТИМ за год, а вторичным параметром была динамика протекания климактерического синдрома, это параметр учитывался только у перименопаузальных женщин.

Данные, полученные в исследовании, представлены на Рисунке 91. Видно, что в группе плацебо ТИМ возросла в среднем на 100 мкм за год наблюдений. Оказалось, что скорость развития атеросклероза у женщин в постменопаузальный период крайне высока: увеличение ИМТ составило 13% в год, а рост бляшек составил 40% в год. В группе, принимающей каринат, мы наблюдали совсем другую картину. Средняя ТИМ не изменилась (статистически незначимое увеличение на 6 мкм в год, то есть менее 1%). Тем не менее, было зафиксировано тормо-

жение роста бляшек (27% за год).

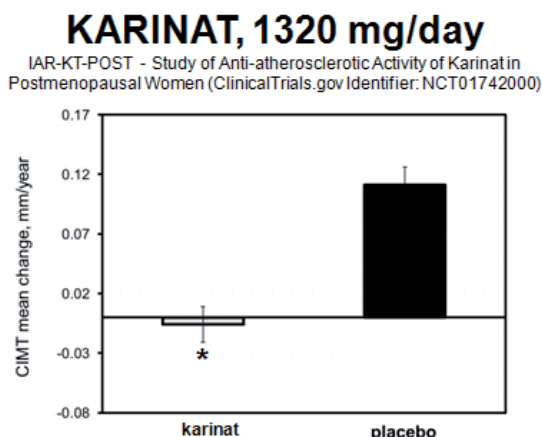


Рисунок 91. Антиатеросклеротическое действие карината

Результат количественного определения степени развития атеросклероза в динамике показал, что использование фитоэстрогенного комплекса женщинами в период менопаузы полностью подавляет образование новых атеросклеротических поражений и в 1,5 раза замедляет развитие уже существующих бляшек (Orekhov AN et al., 2012).

#### 15.5.4. Гранатовый сок

Наши данные об антиатеросклеротической эффективности натуральных продуктов в некоторой степени согласуются с результатами клинических исследований других разработчиков, использующих натуральные продукты для антиатеросклеротической терапии.



Израильскими исследователями для исследования влияния употребления гранатового сока субъектами с умеренным риском ишемической болезни сердца было проведено двойное слепое параллельное исследование (Davidson MH et al., 2009). Были изучены некоторые параметры, характеризующие ТИМ сонной артерии. Только один параметр среди них продемонстрировал статистически значимый антиатеросклеротический эффект по сравнению с группой плацебо (Рисунок 92). В целом, в исследовании не было показано, что гранатовый сок оказывает значительное влияние на развитие атеросклероза в сонных артериях. Тем не менее, специальный анализ позволил установить, что скорость увеличения ТИМ сонной артерии ниже в группе пациентов, у которых был повышенный уровень триглицерид-содержащих ЛНП, низкий уровень холестерина ЛВП и более высокий окислительный стресс (Davidson MH et al., 2009).

### **POMEGRANATE JUICE, 240 ml/day**

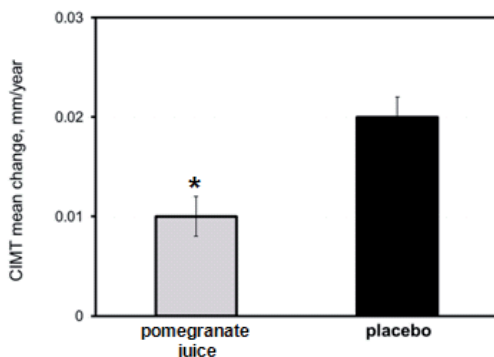


Рисунок 92. Антиатеросклеротическое действие гранатового сока

Таким образом, натуральные продукты можно считать перспективными препаратами для антиатеросклеротической терапии. Двухлетний прием алликаора (порошок чеснока) вызывал антиатеросклеротический эффект на сонной артерии мужчин с бессимптомным атеросклерозом. Инфламинат (фиалка, бузина, календула), который обладает антицитокиновой активностью, приводил к регрессии атеросклероза в сонной артерии после одного года приема. Обогащенный фитоэстрогенами препарат каринат (порошок чеснока, экстракт виноградной косточки, лист зеленого чая, шишки хмеля, бета-каротин, альфа-токоферол, аскорбиновая кислота) предотвращал развитие атеросклероза у женщин в период менопаузы.

Наши фундаментальные исследования показали, что клеточный липоидоз – это ключевое событие при образовании атеросклеротических поражений. Используя клеточные модели и натуральные продукты, мы разработали подход для предупреждения накопления липидов в клетках артерий. Этот подход приводит к регрессии атеросклероза и/или предупреждению его прогрессирования у пациентов. Таким образом, результаты наших фундаментальных исследований были успешно переведены в клиническую практику. Благодаря этому был разработан новый подход к борьбе с атеросклерозом. Опираясь на наши знания, мы разработали препараты, которые обладают прямым антиатеросклеротическим действием. Наши клинические испытания подтвердили эффективность, как новаторского подхода, так и новых препаратов.

К сожалению, практикующие врачи не предписывают натуральные продукты, которые обладают терапевтическим потенциалом в отношении атеросклероза, в качестве антиатеросклеротического средства. Однако потенциал этих веществ поз-

воляет рассматривать их в качестве основного или дополнительного препарата для подобных предписаний (Slevin M et al., 2012).

## **16. Перспективы молекулярной и клеточной терапии**

Достижения науки из различных областей знаний стимулируют новые молекулярные и клеточные подходы для лечения атеросклероза. Эти подходы не всегда имеют прямое отношение к атеросклерозу и скорее связаны с заболеваниями, в основе которых лежит атеросклероз (атеросклеротические заболевания). Однако такое положение дел является, по-видимому, результатом отсутствия адекватной теории, объясняющей развитие атеросклероза, о чем говорилось выше. Клиническая практика не желает мириться с нехваткой теоретических основ и поэтому вынуждена опережать фундаментальную науку. Так появляются самые современные способы лечения атеросклероза молекулярного и клеточного уровня. Такие подходы как: использование методов переноса генов, техники антисмысловых олигонуклеотидов и трансплантации клеток из костного мозга или методов иммуномодуляции для лечения атеросклероза – претендуют на то, чтобы стать альтернативой традиционной терапии. Многие из этих подходов еще далеки от клинического применения и пока апробируются лишь на экспериментальных моделях.

### **16.1. Пересадка гена**

Перенос соматических генов как терапевтический подход к лечению атеросклероза представляет собой внедрение нормальных генов в соматические клетки пациентов, чтобы компенсировать наследственные или приобретенные нарушения, характеризующиеся пониженным уровнем продуктов специфич-

ческих генов *in vivo*. Для этого используются следующие подходы: замещение гена, коррекция гена или усиление гена. Для терапии атеросклеротических заболеваний недавние разработки сфокусировались на применении генного усиления для стимуляции ангиогенеза, как подхода реваскуляризации при симптоматической ишемии. Успех переноса генов зависит частично от выбора соответствующего гена, эффективной упаковки вектора (от чего зависит эффективность трансфекции ткани), и от способа доставки гена. К настоящему времени большинство экспериментальных и клинических данных, касающихся переноса генов или доставки рекомбинантного белка, имеют отношение к фактору роста эндотелия сосудов (VEGF) и фактору роста фибробластов (FGF). Естественно, с развитием сосудистой биологии в будущем, исследователи получают альтернативные гены-мишени для гиперэкспрессии. Методики упаковки вектора должны позволять достигать большой эффективности при минимальной токсичности. Методы, используемые для увеличения экспрессии гена, включают аденовирусный вектор первого и второго поколений, аденоассоциированного вируса (AAV), ретровирусы, гемагглютинирующий японский вирус Sandai (HVJ), перенос генов посредством катионных липосом или перенос «голой» плазмидной ДНК. Кроме того, используются разные способы доставки генов, включая прямую инъекцию в ишемизированную ткань, или введение в системный или локальный кровоток. Неудивительно, что при наличии такого числа вариаций в методах переноса генов, что полученные данные различаются.

### 16.1.1. Заболевание периферических сосудов

Много исследований было посвящено использованию добавления генов для лечения недостатка кровотока периферических сосудов (Рисунок 93). Критическая ишемия конечности встречается у 500-1000 человек на миллион в год и, несмотря на широкий спектр периферических и хирургических вмешательств, встречаются больные, у которых нет альтернативы ампутации из-за недостаточной коллатеральной циркуляции. Был исследован терапевтический ангиогенез посредством добавления гена VRGF и получены многообещающие для многих из этих пациентов результаты. В экспериментальных исследованиях и клинических испытаниях была оценена клиническая эффективность двух сплайс-форм VEGF: VEDF<sub>165</sub> и VEGF<sub>121</sub>. VEDF<sub>165</sub> отличается от VEGF<sub>121</sub> тем, что содержит домен связывания с гепарином, который облегчает связывание с рецептором и увеличивает активность.

В одном из первых исследований, продемонстрировавших клиническую эффективность VEGF, вводили «голую» плазмиду VEGF<sub>165</sub> через покрытый гидрогелем катетер для ангиопластики и осуществляли баллонное растягивание в дистальной части подколенной артерии пациента с периферической ишемией. Через 4 недели, наблюдалось формирование коллатерального кровообращения, а, кроме того, доплеровское исследование обнаружило улучшение остаточного и максимального кровотока; однако, лечение с использованием VEGF вызывало значительный отек нижних конечностей (Isner JM et al., 1996). Инъектировали также «голую» плазмиду VEGF<sub>165</sub> в мышцы пациентов с незаживающими язвами ног или с ишемией покоя. У этих пациентов наблюдалось значительное улучшение значений ло-

дыечно-плечевого индекса, а также с помощью ангиографии или магнитно-резонансного исследования было показано увеличение формирования коллатерального кровообращения. Пациенты отмечали симптоматическое улучшение и заживление язв, но во всех случаях наблюдался значительный периферический отек конечностей, в которые вводили VEGF (Baumgartner I et al., 1998).

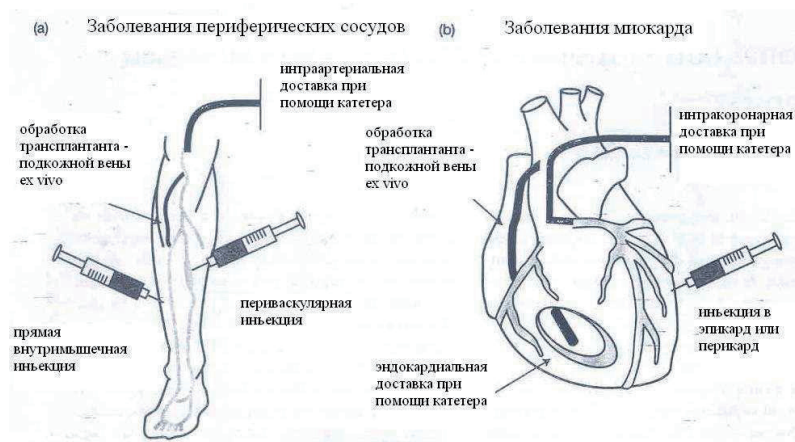


Рисунок 93. Современные методы доставки гена

В настоящее время существует несколько методов доставки факторов роста или генов для лечения заболеваний периферических сосудов (а). Это такие подходы как: прямая внутримышечная инъекция в несколько сайтов, прямая инъекция в периваскулярные сайты, интраартериальное вливание при помощи катетера, обработка венозного трансплантата ex vivo. Похожие методы используются для доставки факторов роста или генов в ишемизированный миокард (b). Это такие методы как: инъекция в эпикард в несколько сайтов, прямая перикардальная инъекция, интракоронарное вливание при помощи катетера, инъекция в эндокард при помощи катетера в несколько сайтов, обработка ex vivo трансплантата - подкожной вены (Yla-Huerttuala S & Alitalo K, 2003).

Эффективность переноса гена VEGF путем интраартериального введения при помощи катетера была показана на больных с симптоматической хронической ишемией нижних конечностей в случае чрезкожной транслуминальной ангиопластики. В этом исследовании, перенос гена VEGF был осуществлен с использованием аденовирусного вектора или плазмидной ДНК инкапсулированной в липосомы. У пациентов, которых лечили VEGF, с помощью дигитальной субтракционной ангиографии было показано увеличение неоваскуляризации через 3 месяца после переноса генов, при этом наблюдалось улучшение показателей лодыжечно-плечевого индекса (Makinen K et al., 2002).

Другие исследователи показали, что перенос генов VEGF<sub>121</sub> улучшает функции, как эндотелия, так и резерва кровотока в нижних конечностях больных с заболеваниями периферических сосудов. У пациентов, включенных в фазу 1 клинического исследования переноса гена VEGF<sub>121</sub> при помощи аденовируса, резерв кровотока измерялся при помощи термодилуции. Через тридцать дней после переноса генов оказалось, что базальный уровень кровотока был неизменным по сравнению с показателями до лечения; однако, у пациентов после переноса генов наблюдалось значительное увеличение как кровотока, так и резерва кровотока в ответ на ацетилхолин; эффект был связан с увеличением продолжительности ходьбы (Rajagopalan S et al., 2001).

В противоположность этим наблюдениям, недавно опубликованные данные исследования фазы II, проведенного для оценки эффективности однократной внутримышечной инъекции аденовируса, кодирующего VEGF<sub>121</sub>, пациентам с заболеваниями периферических сосудов были разочаровывающими. Двой-



ное слепое плацебо-контролируемое исследование «The Regional Angiogenesis with Vascular Endothelial growth factor trial» (RAVE) было проведено на 105 пациентах с односторонними заболеваниями периферических сосудов. Исследование представляло собой серию из 20 внутримышечных инъекций вирусных векторов или плацебо в соответствующую конечность за один раз. Через 12 недель не была выявлена разница между группами в длительности ходьбы. Кроме того, через 12 или 26 недель не было существенной разницы в значении лодыжечно-плечевого индекса, пройденном расстоянии до наступления хромоты, качестве жизни. Таким образом, эти данные не подтверждают эффективности однократных серий внутримышечных инъекций при аденовирусном переносе генов VEGF<sub>121</sub> при лечении заболеваний периферических сосудов (Rajagopalan S et al., 2003).

Как показали доклинические и ограниченные клинические исследования, перенос гена фактора роста гепатоцитов (HGF) способствует увеличению неоваскуляризации при ишемии периферических сосудов. HGF, как фактор роста для активации ангиогенеза, является многообещающим объектом исследований, так как он стимулирует пролиферацию эндотелиальных клеток, без стимуляции пролиферации гладкомышечных клеток, а также является фактором выживания эндотелиальных клеток. В начальных исследованиях, введением в артерию рекомбинантного HGF удалось индуцировать ангиогенез в модели ишемии задней конечности кроликов. В дальнейших исследованиях на модели ишемии задней конечности крыс, трансфекция «голой» плазмидой несущей человеческий ген HGF путем внутримышечной инъекции приводила к значительному улучшению кровообращения и увеличению плотности капилляров. Инте-

ресно, что через 5 недель после переноса генов, ангиогенез, индуцированный трансфекцией плазмидой HGF был значительно интенсивнее, чем после однократной инъекции рекомбинантного HGF. Эти данные были подтверждены в исследованиях на модели ишемии задних конечностей кроликов, на которых при однократном внутримышечном введении «голой» плазмиды HGF было показано значительное увеличение длины коллатеральных сосудов. Серийные ангиограммы показали прогрессивное удлинение коллатеральных артерий по направлению к дистальной точке восстановленного родительского сосуда у животных трансфицированных HGF. Это позволяет предположить, что HGF эффективно модулирует ангиогенез (Taniyama Y et al., 2001).

Эффективность использования HGF для стимуляции неоваскуляризации была оценена также в ограниченном клиническом исследовании, в котором принимали участие шесть пациентов с тяжелыми ограничивающими активностью симптомами, которые не поддавались традиционной терапии. Эти пациенты получили две внутримышечные инъекции голой плазмиды, несущей человеческий ген HGF. После переноса генов пять из шести пациентов отметили симптоматическое улучшение, что коррелировало с улучшением показателей лодыжечно-плечевого индекса. При такой терапии не было отмечено негативных эффектов, и, что интересно, трансфекция не приводила к периферическому отеку, наблюдавшемуся у пациентов, которым трансфицировали ген VEGF (Morishita R, 2002). Однако эффективность и потенциальные возможности использования гена HGF не сравнивали напрямую с VEGF.

В противоположность описанным выше исследованиям, терапевтический ангиогенный эффект, индуцированный основ-

ным фактором роста фибробластов (bFGF), вызывался инъекцией рекомбинантного белка, и это не требовало использования вируса для достижения эффекта гиперэкспрессии при лечении заболеваний периферических сосудов. На моделях ишемии задних конечностей у кроликов и крыс bFGF увеличивал формирование коллатеральных сосудов и улучшал периферическое кровообращение. Клинические исследования фазы I, в которых оценивалась эффективность использования bFGF для лечения симптоматического заболевания периферических артерий, были проведены на пациентах с перемежающейся хромотой (Cooke JP et al., 1999). В двойном слепом плацебо-контролируемом дозо-ранжирующем исследовании, проведенном на симптоматических пациентах с лодыжечно-плечевым индексом меньше 0,8, белок bFGF был инъецирован в бедренную артерию ишемизированной конечности. Через месяц кровообращение в задней части голени было улучшено на 66%, а через 6 месяцев - на 153%. У контрольных пациентов не было значительного улучшения кровообращения (Lazarous DF et al., 2000). Может ли перенос гена bFGF быть более эффективным, еще предстоит выяснить.

Введение рекомбинантного фактора роста фибробластов-2 (rFGF-2), как было показано, повышает способность переносить физическую нагрузку у пациентов с ограничивающими активность симптомами перемежающейся хромоты. В исследовании «Therapeutic Angiogenesis with Recombinant Fibroblast Growth Factor-2 for Intermittent Claudication» (TRAFFIC) пациенты подвергались билатеральному интраартериальному введению rFGF-2 или плацебо в первый и на 30-ый день. Через 90 дней у пациентов, которых лечили rFGF-2, было показано увеличение продолжительности ходьбы по сравнению с пациентами, полу-

чавшими плацебо (Lederman RJ et al., 2002).

### **16.1.2. Ишемия миокарда**

Влияние повышенного уровня или гиперэкспрессии факторов роста на инициацию ангиогенеза было оценено как возможный подход для лечения симптоматического заболевания эпикардиальных коронарных артерий (Таблица 38). Чтобы избежать необходимости доставки гена при помощи вируса для повышения уровня VEGF, в исследовании «Vascular Endothelial Growth Factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis» (VIVA) был использован рекомбинантный человеческий VEGF (rhVEGF). В это двойное слепое плацебо-контролируемое исследование были включены 178 пациентов со стабильной стенокардией напряжения, которым не была рекомендована чрезкожная или хирургическая реваскуляризация. Пациенты случайным образом получали плацебо или rhVEGF. Через два месяца после лечения не было значительного различия между группами в тесте на беговой дорожке, в классе стенокардии или качестве жизни. Интересно, что через четыре месяца после лечения, у пациентов, получавших низкие дозы rhVEGF наблюдалось улучшения в течении стенокардии по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, несмотря на то, что не было значительных изменений в тесте на беговой дорожке. Хотя VEGF, введенный в виде рекомбинантного белка, хорошо переносился, не было отмечено долговременных объективных показателей клинического улучшения (Henry TD et al., 2003).

Таблица 38. Клинические испытания, проведенные с целью изучения возможности использования генной терапии для лечения симптоматического атеросклероза

| Испытание                          | Агент                                                                   | Способ доставки                                    | Исследуемая популяция                                                                                                   | Первичная цель                                            | Результаты                 |
|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|----------------------------|
| Заболевания периферических сосудов |                                                                         |                                                    |                                                                                                                         |                                                           |                            |
| Makinen K et al., 2002             | Аденовирус-VEGF <sub>165</sub>                                          | Интраартериальное вливание                         | Хроническая ишемия нижних конечностей<br>Инфраингуинальный стеноз, подлежащий чрезкожной транслюминальной ангиопластике | Формирование коллатерального кровообращения через 90 дней | Положительные              |
| RAVE (Rajagopalan S et al., 2003)  | Аденовирус-VEGF <sub>121</sub>                                          | Внутримышечная инъекция                            | Ограничивающая активность хромота (Escercise - limiting claudication )                                                  | Время ходьбы (peak walking time) через 90 дней            | Отрицательные              |
| Rajagopalan S et al., 2001         | Аденовирус-VEGF <sub>121</sub>                                          | Внутримышечная инъекция                            | Инвалидизирующая хромота. Боль в состоянии покоя                                                                        | Реактивность сосудов (vascular reactivity) через 1 месяц  | Положительные              |
| Lazarous DF et al., 2000           | Белок R-bFGF                                                            | Интраартериальное вливание                         | Переменяющаяся хромота<br>ABI < 0.8                                                                                     | Кровообращение в задней части голени через 1 месяц        | Положительные              |
| TRAFFIC (Lederman RJ et al., 2002) | R-FGF-2 белок                                                           | Интраартериальное вливание                         | Переменяющаяся хромота                                                                                                  | ЕТТ через 3 месяца                                        | Положительные              |
| Morishita R, 2002                  | Плазмида HGF                                                            | Внутримышечная инъекция                            | Переменяющаяся хромота                                                                                                  | Симптоматическое облегчение                               | Положительные              |
| Ишемия миокарда                    |                                                                         |                                                    |                                                                                                                         |                                                           |                            |
| VIVA (Henry TD et al., 2003)       | R-VEGF белок                                                            | Интракоронарное вливание + внутримышечное вливание | Стабильная стенокардия.<br>Пациентам не рекомендована реваскуляризация (poor revascularisation candidates)              | ЕТТ через 2 месяца                                        | Отрицательные              |
| KAT (Hedman M et al., 2003)        | Аденовирус-VEGF <sub>165</sub><br>Плазмида/липосома VEGF <sub>165</sub> | Интракоронарное вливание                           | Стенокардия класса 2-3 согласно CCS; >60% стеноз коронарных артерий                                                     | Перфузия (кровообращение) миокарда через 6 месяцев        | Положительные (аденовирус) |
| Fortuin FD et al., 2003            | Плазмида VEGF2                                                          | Прямая инъекция в миокард                          | Стенокардия класса 3-4 согласно CCS                                                                                     | ЕТТ через 1 месяц                                         | Положительные              |

(продолжение на следующей странице)

| Испытание                       | Агент            | Способ доставки                               | Исследуемая популяция                                                                                                       | Первичная цель                               | Результаты    |
|---------------------------------|------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|---------------|
| Losordo DW et al., 2002         | Плазмида VEGF2   | Прямая инъекция в миокард при помощи катетера | Хроническая ишемия; пациентам не рекомендована реваскуляризация (poor revascularisation candidates)                         | Класс стенокардии через 3 месяца             | Положительные |
| FIRST (Simons M et al., 2002)   | R-FGF-2 белок    | Интракоронарное вливание                      | Индукцибельная ишемия inducible ischemia<br>Пациентам не рекомендована реваскуляризация (poor revascularisation candidates) | ЕЕТ через 3 месяца                           | Отрицательные |
| AGENT (Grines C et al., 2003)   | Аденовирус FGF-4 | Интракоронарное вливание                      | Стенокардия класса 2-3 согласно CCS                                                                                         | ЕЕТ через 1 месяца                           | Положительные |
| AGENT-2 (Grines C et al., 2003) | Аденовирус FGF-4 | Интракоронарное вливание                      | Стабильная стенокардия<br>Обратимая ишемия (reversible)                                                                     | Уменьшение размера дефекта перфузии миокарда | Положительные |

VEGF, фактор роста эндотелия сосудов; R-bFGF, рекомбинантный основной фактор роста фибробластов; ABI, лодыжечно-плечевой индекс (ankle-brachial index); R-FGF-2, рекомбинантный фактор роста фибробластов -2; EET, exercise tolerance test; HGF, фактор роста гепатоцитов; CCS, Canadian Cardiovascular Society; FGF-4, фактор роста фибробластов-4.

Первоначально гиперэкспрессия VEGF достигалась путем прямой инъекции «голой» плазмиды VEGF<sub>165</sub> в ишемизированный миокард пациентов. Ранние исследования показали, что перенос гена благоприятно влияет на течение стенокардии, улучшая фракцию выброса левого желудочка и уменьшая объективные показатели ишемии (Losordo DW et al., 1998; Vale PR et al., 2000). Эти наблюдения были подтверждены в исследовании, в которое были включены 30 пациентов со стенокардией III или IV класса, которых трансфецировали введением непосредственно в миокард «голой» ДНК, кодирующей VEGF. В этом ис-

следовании у 29 из 30 пациентов наблюдалось облегчение симптомов стенокардии и снижение потребления нитроглицерина (Lathi KG et al., 2001). Перенос гена VEGF приводил также к долговременному симптоматическому и клиническому улучшению у безнадежных пациентов, которых подвергали прямой инъекции VEGF. Через год после переноса гена, пациенты отмечали уменьшение симптомов стенокардии и снижение приема нитроглицерина, а также продемонстрировали значительное улучшение в тесте на беговой дорожке по сравнению с результатами перед лечением (Fortuin FD et al. 2003).

Когда аналогичные исследования были проведены с использованием аденовируса с делецией E1-E3, который вводился пациентам с клинически значимым заболеванием коронарных артерий, результаты не были столь значительны. Перенос гена VEGF<sub>121</sub> производился путем прямой инъекции в ишемизированный миокард в качестве дополнения к аортокоронарному шунтированию или как единственная терапия. Через 30 дней после хирургического вмешательства в обеих группах коронарная ангиография и оценка подвижности стенки дали основание предполагать улучшение в области введения вектора; в то же время, все пациенты отмечали облегчение симптомов стенокардии. В тех случаях, когда перенос генов был единственной терапией, через 6 месяцев лишь незначительно улучшились показания пробы на беговой дорожке (Rosengart TK et al., 1999; Rosengart TK et al., 1999).

Для того чтобы повысить эффективность введения вирусного вектора была разработана система доставки его при помощи катетера. Катетеры снабжены иглой на дистальном конце и вводятся чрезкожно в эндокардиальную поверхность левого желудочка под управлением электромеханического картирова-

ния. С использованием этой системы доставки, осуществили трансфекцию голой плазмидой, кодирующей VEGF<sub>2</sub> (phVEGF) неоперабельным пациентам со стенокардией класса III или IV. Процедура хорошо переносилась, и через 12 недель у пациентов наблюдали снижение класса стенокардии по сравнению с пациентами получавшими плацебо (Losordo DW et al., 2002). Хотя, из результатов этого исследования не ясно, является ли использование катетера столь же эффективным для стимуляции ангиогенеза, как и прямая инъекция в миокард, заболеваемость и смертность при этой процедуре значительно ниже, чем при торакотомии.

В исследовании «Kuopio Angiogenesis Trial» (KAT) была изучена безопасность и эффективность переноса гена VEGF при помощи катетера при интракоронарном введении во время процедуры чрескожной коронарной реваскуляризации. В этом исследовании принимали участие 103 пациента, которые были подвергнуты чрескожной коронарной ангиопластике или имплантации коронарного стента. Случайно выбранным пациентам были введены гены VEGF при помощи аденовирусного вектора или заключенной в липосому плазмиды. В последующие 6 месяцев уровень клинического рестеноза и минимальный диаметр просвета существенно не различались между группами; однако, перфузионное сканирование миокарда показало значительное улучшение у пациентов, которые подверглись трансфекции введением аденовирусного вектора (Hedman M et al., 2003.).

Описанные выше исследования показали, что доставка рекомбинантного фактора роста или перенос гена хорошо переносятся пациентами, обеспечивают симптоматическое облегчение и при этом наблюдается улучшение показателей пери-



ферической или миокардиальной ишемии. Дальнейшие исследования были направлены на поиск новых комбинаций генной терапии и клеточного переноса, переноса нескольких генов и методик управления экспрессией генов. Например, в экспериментах проведенных на крысах с инфарктом миокарда и рубцами, вызванными криоповреждением, осуществили перенос *in vitro* гена VEGF в миобласты H9c-2с, после чего в миокардиальный рубец инъецировали как трансдуцированные клетки, так и «голую» плазмиду, кодирующую VEGF. Область рубца значительно уменьшилась по сравнению с контролем в обоих случаях, и это коррелировало с увеличением плотности капиллярной сети, что было показано гистологически. Хотя не было отмечено значительной разницы в плотности капилляров при введении «голой» плазмиды, кодирующей VEGF и трансдуцированных миобластов, это исследование подтвердило, что миобласты выживают *in vivo* и оказывают эффект сравнимый с эффектом гиперэкспрессии при введении VEGF (Sugimoto T et al., 2003).

В другом исследовании на моделях экспериментального инфаркта миокарда перенос гена VEGF комбинировали с геном ангиопоэтина-1 для стимуляции ангиогенеза и артериогенеза. В этом исследовании мышам однократно инъецировали аденовирус, кодирующий VEGF, ангиопоэтин-1 или комбинацию векторов. Увеличение экспрессии одного VEGF или одного ангиопоэтина-1 в пограничных зонах приводило к увеличению плотности капилляров на 36%; при совместном введении наблюдалось 7,5 кратное увеличение неоваскуляризации, что позволяет говорить, что комбинационная терапия оказывает синергический эффект (Siddiqui AJ et al., 2003).

Чтобы ограничить риск патологического ангиогенеза, исследователи экспериментировали с экспрессией VEGF, инду-

цируемой гипоксией, с использованием эритропоэтинового энхансера, расположенного выше промотора SV 40, кроме того, использовался водорастворимый липополимерный комплекс в качестве способа доставки. По этой методике экспрессия VEGF *in vitro* индуцировалась только в гипоксических эндотелиальных клетках и стимулировала их пролиферацию. Инъекция комплекса *in vivo* показала, что экспрессия VEGF ограничивалась только клетками ишемизированного миокарда; таким образом, была продемонстрирована возможность локализовать индукцию экспрессии VEGF (Lee M et al., 2003a,b).

Начальные исследования способности FGF вызывать ангиогенез в ишемизированном миокарде проводились с использованием прямой инъекции или имплантации в комплексе гепарин-алгинат пролонгированного действия, применяемого для доставки рекомбинантного белка. Прямая инъекция FGF в дополнение к хирургической реваскуляризации инициировала формирование *de novo* коллатерального кровообращения, что было показано ангиографически через 3 месяца. Эти коллатеральные сосуды оставались проходимыми и через 3 года (Pecher P & Schumacher BA, 2000; Schumacher B et al., 1998.; Sellke FW et al., 1998). Эти данные были подтверждены другим исследованием, которое показало, что у пациентов, которых лечили FGF, через 32 месяца было меньше обратимых или необратимых перфузионных дефектов, по сравнению с контролем (Ruel M et al., 2002).

Рекомбинантный FGF, вводимый однократно интракоронарно в виде болюса, уменьшает проявление симптомов и улучшает функции миокарда, что было показано в фазе I открытого клинического исследования. Позднее было проведено исследование «Initiating Revascularization Trial» (FIRST), в котором

определяли эффективность и безопасность рекомбинантного FGF2 (rFGF-2). В отличие от данных исследования фазы I, через 90 дней не была выявлена значительная разница между введением rFGF-2 или плацебо в способности переносить физическую нагрузку, хотя пациенты, получавшие rFGF-2, субъективно отмечали облегчение симптомов стенокардии. Таким образом, это исследование не показало терапевтической эффективности однократного интракоронарного введения rFGF-2 (Simons M et al., 2002).

Для того чтобы преодолеть ограничения при использовании рекомбинантного белка, в исследовании «Angiogenic GENE Therapy» (AGENT) для стимуляции ангиогенеза у пациентов со стенокардией осуществили перенос гена FGF при помощи аденовируса. В этом исследовании понимали участие 79 пациентов со стенокардией класса II или III, из которых были случайным образом выбраны пациенты, которым вводили ген FGF или плацебо. Через четыре недели продолжительность физической нагрузки по сравнению с контролем увеличивалось (Grines CL et al., 2002). Позднее проводилось исследование AGENT-2, в котором изучалась эффективность переноса гена FGF у 52 пациентов со стабильной стенокардией и симптомами обратимой ишемии. Через 8 недель, было отмечено значительное уменьшение размера ишемизированного участка, в то время как у пациентов, получивших плацебо, не было улучшения (Grines CL et al., 2003a,b).

Так как клинические исследования с использованием VEGF и FGF дают противоречивые результаты, изучается возможность гиперэкспрессии других генов и перспективы их использования для трансфекции. Гиперэкспрессия других факторов роста, таких как HGF, была изучена в экспериментальных

моделях ишемии миокарда и, как было показано, он ограничивает ремоделирование левого желудочка после инфаркта и сердечную недостаточность у животных. В модели инфаркта миокарда мышам инъецировали в мышцы задней конечности аденовирус кодирующий человеческий HGF. У этих животных наблюдалось повышение уровня человеческого HGF в плазме, а через 4 недели после инфаркта улучшение показателей ремоделирования левого желудочка по сравнению с контролем. У трансфецированных мышей наблюдалась увеличение неоваскуляризации и уменьшения фиброза по сравнению с контролем. Эти данные позволяют предположить, что генная терапия, направленная на повышение экспрессии HGF, может быть хорошей альтернативой использованию других факторов роста (Li Y et al., 2003).

В экспериментальных исследованиях было показано, что ишемическое preconditionирование обуславливается индуцибельной изоформой NO синтазы (iNOS). Было предположено, что гиперэкспрессия iNOS будет ограничивать повреждение миокарда, вызываемое ишемией-реперфузией. В экспериментах на мышах, гиперэкспрессия iNOS значительно уменьшала размер инфаркта и этот эффект был ассоциирован с увеличением экспрессии циклооксигеназы-2 и уровня простаноидов. Результаты позволяют предположить, что генная терапия с iNOS устраняет необходимость постоянного внутривенного вливания доноров NO (Li Q et al., 2003). Эти наблюдения наводят на мысль, что один из механизмов, благодаря которому ингибиторы циклооксигеназы-2 способствуют развитию сердечно-сосудистых заболеваний - это ингибирование защитного действия, которое оказывается iNOS при ишемии-реперфузии.

Гиперэкспрессия iNOS при аортокоронарном шунтирова-

нии также ограничивает рестеноз. В модели аортокоронарного шунтирования у свиней, местное введение аденовируса, кодирующего iNOS, приводило к значительному уменьшению формирования неointимы, что показал морфометрический анализ через 1 месяц после процедуры (Wang K et al., 2003). Перенос гена iNOS был осуществлен с использованием липосомного комплекса. Липосомные комплексы вводили в бедренную или коронарные артерии мини-свиней с использованием методики локальной доставки лекарств. Внутрисосудистое ультразвуковое исследование показало, что локальный перенос iNOS приводил к значительному уменьшению области бляшки в стентах бедренной и коронарной артерий (Muhs A et al., 2003).

Для уменьшения негативных последствий, связанных с инфарктом миокарда, другой интересной альтернативой является гиперэкспрессия фактора ингибирования лейкемии (LIF). LIF является членом семейства цитокинов интерлейкина-6 (IL-6) и регулирует рост и развитие кардиомиоцитов. Исследования показали, что плазмидная ДНК, кодирующая LIF, инъецируемая в бедренную мышцу мыши сразу после экспериментального инфаркта миокарда, смягчает ремоделирование левого желудочка и фиброз миокарда. Гистохимический анализ показал, что инъекция кДНК LIF предотвращает смерть кардиомиоцитов в ишемизированной области и индуцирует неоваскуляризацию. Более того, инъекция кДНК LIF облегчает мобилизацию и хоуминг клеток из костного мозга в сердце и их дифференцировку в кардиомиоциты, что может быть вторым механизмом, благодаря которому гиперэкспрессия LIF сохраняет функции сердца после инфаркта миокарда (Zou Y et al., 2003).

Так как апоптоз кардиомиоцитов связан с ремоделированием желудочков, использовался аденовирусный вектор, коди-

рующий антиапоптотический ген Bcl-xL, чтобы предотвратить смерть кардиомиоцитов при ишемии-реперфузии. В этом исследовании гиперэкспрессия Bcl-xL за четыре дня до повреждения при ишемии-реперфузии, приводила к значительному уменьшению размера инфаркта и уровня креатинкиназы в сыворотке. Кроме того, функция сердца при гиперэкспрессии Bcl-xL была сохранена, а уровень апоптоза уменьшен (Huang J et al., 2003).

Генную терапию применили для подавления синтеза моноцитарного хемотаксического белка-1, экспрессия которого регулируется по принципу обратной связи в ткани сердца после экспериментального и клинического инфаркта, что способствует развитию воспалительной реакции. Перенос мутантного человеческого гена моноцитарного хемотаксического белка-1 (MPC-1) с делецией терминальной аминокислоты за 3 суток до и через 14 суток после инфаркта миокарда, уменьшал расширение полости левого желудочка и сократительную дисфункцию, уменьшал интерстициальный фиброз, рекрутирование макрофагов и экспрессию в тканях миокарда гена фактора некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) и трансформирующего фактора роста- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Hayashidani S et al., 2003).

## **16.2. Антисмысловая (антисенс) технология**

Альтернативным подходом терапии атеросклероза, является уменьшение экспрессии белков, связанных с формированием атеросклеротической бляшки, воздействуя на транскрипцию и трансляцию. Изучалось применение нескольких методов с разной степенью эффективности.

### 16.2.1. Антисмысловые (антисенс) олигонуклеотиды

Одним из подходов является использование антисмысловых олигонуклеотидов (ODN), которые комплементарны мРНК-мишеням и связываются с ними стехиометрически. В другом случае, используются рибозимы, уникальный класс РНК, которые каталитически расщепляют определенный специфический вид РНК, что приводит к ее деградации. Трансфекция двухцепочечными олигонуклеотидными ловушками (decoy ODN), направленными на *cis*-активаторные регуляторные элементы, уменьшает *cis-trans* взаимодействие. *Trans* факторы не могут взаимодействовать с эндогенными *cis*-активаторными регуляторными элементами, и таким образом, модулируется экспрессия гена (Morishita R et al., 2003). Кроме того, для воздействия на экспрессию генов используют каталитические ДНК или ДНКзимы (Рисунок 94).

Антисмысловые ODN, которые подавляют экспрессию генов на уровне РНК, обычно имеют длину в 15-20 нуклеотидов, которые образуют последовательность, комплементарную мРНК-мишени. Эти соединения формируют гетеродуплекс с РНК-мишенью и блокируют трансляцию как путем пространственного ингибирования движения рибосомы вдоль мРНК, так и ее разрушением вследствие активирования РНКазы. Несмотря на то, что антисмысловые ODN уменьшают экспрессию белков-мишеней, их использование как терапевтических агентов ограничено, из-за неспецифических биологических эффектов. Олигомеры формируют структуры, которые могут взаимодействовать независимо от последовательности с факторами роста, сигнальными молекулами, белками и компонентами межклеточного матрикса (Khachigian LM, 2000).

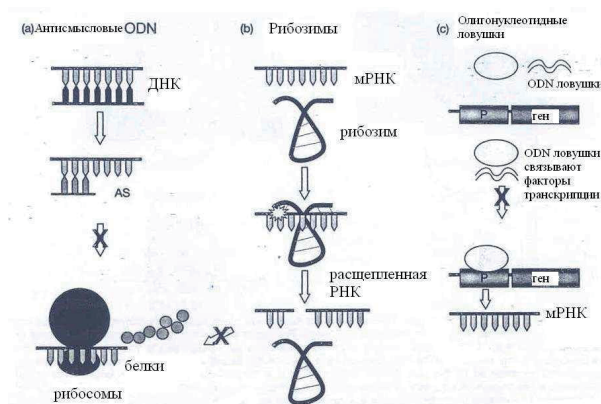


Рисунок 94. Механизм действия антисмысловых олигонуклеотидов (ODN), рибозимов и олигонуклеотидных ловушек

(а) Антисмысловые (AS) олигонуклеотиды (ODN) образованы 15-20 нуклеотидами, которые связываются с комплементарным сайтом-мишенью на мРНК. Антисмысловые ODN блокируют трансляцию белка пространственно ингибируя передвижение рибосом вдоль мРНК и иницируя расщепление РНКазой мРНК. (б) Рибозимы обладают каталитической активностью и действуют на специфические последовательности, расщепляя РНК, которая является субстратом для рибозимов, и таким образом блокируют трансляцию белка (Р). (с) Олигонуклеотидные ловушки представляют собой короткие ODN, которые содержат последовательность, связывающую специфический фактор транскрипции (TF). Фактор транскрипции узнает и связывается с этими ODN, что препятствует взаимодействию с соответствующими сайтами связывания факторов транскрипции на ДНК (промотеры генов-мишеней) (Doherry EA & Doudna JA, 2000; Dzau VJ et al., 2001; Khachigian LM, 2000; Puerta-Fernandez E et al., 2003).

Антисмысловые ODN против регуляторов клеточного роста, включающих с-Муб, с-Мус, NFκB, p65, cdk2 и cdc2 киназу/ядерный антиген пролиферирующих клеток, были использованы, чтобы уменьшить формирование неоинтимы при экспе-



риментальном повреждении сосудов и в моделях атеросклероза (Khachigian LM, 2000). В других исследованиях использовали антисмысловые ODN, чтобы изменить состав атеросклеротических бляшек (Sugano M & Makino N, 1996). Например, кроликам инъецировали антисмысловые ODN против холинэстеразы, фермента, который облегчает перенос эфира холестерина с липопротеидов высокой плотности к аполипопротеинам. Кролики содержались на диете с высоким содержанием холестерина в течение 16 недель. У кроликов, которым вводили смысловые ODN, понизился общий холестерин и повысилась концентрация липопротеидов высокой плотности по сравнению с контролем. Более того, у кроликов, которым инъецировали антисмысловые ODN, наблюдалось значительное уменьшение атеросклеротического поражения артерий и было меньше липидных бляшек по сравнению с контрольными животными (Sugano M et al., 1998).

Антисмысловые ODN также использовали для обработки сосудистых шунтов для снижения риска рестеноза. В ранних исследованиях использовали регуляторный белок клеточного цикла cdc2 киназу/ядерный антиген пролиферирующих клеток, чтобы ограничить пролиферацию гладкомышечных клеток. Это позволило уменьшить гиперплазию неоинтимы и увеличить гипертрофию меди в яремной вене кролика, которая была имплантирована в сонную артерию, что говорит о возможности переориентации венозных трансплантатов в направлении нормальных артериальных каналов (Mann MJ et al., 1995). Аналогично, трансфекция обходного сосудистого шунта антисмысловыми ODN против cdc2 киназы или антиапоптотического белка Bcl-xL ограничивает формирование неоинтимы и рестеноза

протеза, в модели гетеротопного аллогraftа сердца у мышей (Suzuki J et al., 1997; 2000).

Несмотря на большое количество экспериментальных данных, которые показывают, что трансфекция антисмысловыми ODN против регуляторов клеточного цикла уменьшает формирование неоинтимы, клинические исследования не подтвердили эти результаты. В рандомизированном исследовании, в котором принимали участие 85 пациентов с заболеванием эпикардальных коронарных артерий, подлежащие процедуре чрескожной реваскуляризации, после имплантации стента вводили антисмысловые ODN против с-Мус или, в качестве контроля, физиологический раствор. Через 6 месяцев, ангиография показала сходный диаметр просвета у контрольной группы и группы наблюдения, также и ультразвуковое исследование сосудов не показало никаких значительных различий между группами в размере рестеноза стента. Исследователи предположили, что разочаровывающие результаты были получены из-за неадекватной локальной концентрации антисмысловых ODN, недостаточной концентрации, полученной при однократном введении, или из-за воспалительной реакции, возникшей в ответ на чрескожный интралюминальный способ доставки, которая стимулировала развитие атеросклероза (Kutryk MJ et al., 2002).

### **16.3. Рибозимы**

Использование каталитических РНК, или рибозимов, рассматривалось как альтернатива применения антисмысловых ODN для уменьшения формирования неоинтимы. Но в настоящий момент их использование ограничено из-за чувствительно-

сти к гидролазам (Рисунок 94). Известно 5 основных вариантов каталитического расщепления РНК: головка молотка, шпилька, интроны группы I, рибонуклеаза Р и рибозимы вируса гепатита  $\delta$  (Рисунок 95) (Doherry EA & Doudna JA, 2000; Khachigian LM, 2000; Puerta-Fernandez E et al., 2003).

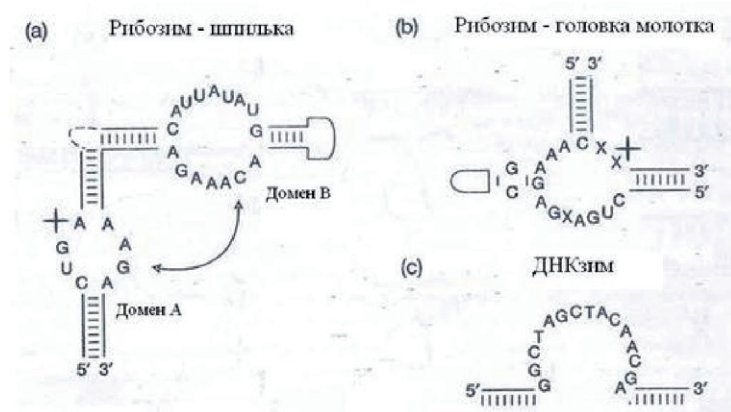


Рисунок 95. Структурные варианты рибозимов и ДНКзимов

(а) рибозим «шпилька» образован консервативной последовательностью нуклеотидов, которая фланкируется нуклеотидами, образующими различные последовательности разной длины. Складывание доменов А и В приводит к такому пространственному расположению этих доменов, что они находятся бок о бок и эта структура стабилизируется, за счет образования третичных связей между нуклеотидами во внутренних петлях. Расщепляющий сайт помечен звездочкой. (б) Рибозим «головка молотка» образован петлей из консервативных последовательностей нуклеотидов. Расщепляющий сайт помечен звездочкой. (в) ДНКзим представляет собой открытую петлю, образованную консервативной последовательностью нуклеотидов, которая является каталитическим доменом, плечи образованы различными нуклеотидами и служат для связывания с субстратом (Ahn JD et al., 2002; Doherry EA & Doudna JA, 2000; Puerta-Fernandez E et al., 2003).

А, аденин; G, гуанин, С, цитозин; Т, тимидин; U, урацил; X, аденин, цитозин или урацил.

Исследований *in vivo*, в которых показана эффективность применения рибозимов для приостановки развития атеросклероза, мало. Использование рибозима ODN к TGF- $\beta$  было изучено при повреждении сонной артерии на модели у крыс. В этом эксперименте, после доставки рибозима ODN, наблюдалось уменьшение синтеза коллагена, клеточной пролиферации и формирования неоинтимы (Yamamoto K et al., 2000). Рибозимы также использовали, чтобы воздействовать на адгезию воспалительных клеток к стенкам пораженного атеросклерозом сосуда. В эксперименте с мышами гиперэкспрессия 12/15 липоксигеназы приводила к спонтанному образованию жировых полос в аорте, что способствовало адгезии моноцитов к активированным клеткам сосудистого эндотелия. Использование рибозима ODN против 12/15 липоксигеназы позволило полностью предотвратить адгезию моноцитов к сосудистой стенке и уменьшить локальное воспаление и формирование атеросклеротических бляшек (Reilly KB et al., 2004).

#### **16.4. Олигонуклеотидные ловушки**

Чтобы преодолеть ограничения связанные с введением антисмысловых ODN и рибозимов, были разработаны олигонуклеотидные ловушки, объектом воздействия которых являются специфические факторы транскрипции. Олигонуклеотидные ловушки представляют собой двухцепочечные молекулы, которые имитируют хромосомные сайты связывания факторов транскрипции и действуют как конкурентные ингибиторы, уменьшая доступность факторов транскрипции, необходимых для активации и супрессии генов-мишеней как показано на Рисунке 94 (Dzau VJ et al., 2001). Олигонуклеотидные ловушки

против FAP-1 и NFκB уменьшают пролиферацию гладкомышечных клеток сосудов, экспрессию внутриклеточной молекулы адгезии-1 (ICAM-1) и молекулы адгезии сосудистых клеток-1 (VCAM-1), уменьшая тем самым миграцию макрофагов и Т-лимфоцитов в сосудистую стенку и формирование неоинтимы (Ahn JD et al., 2002; Buchwald AB et al., 2002; Yoshimura S et al., 2001).

Применение олигонуклеотидных ловушек в качестве антиатеросклеротического воздействия является перспективным терапевтическим подходом для долговременной стабилизации венозного трансплантата. Были проведены доклинические исследования, в которых изучалась возможность использования олигонуклеотидных ловушек против фактора транскрипции E2F при развитии трансплантационного атеросклероза в модели интерпозиционного венозного трансплантата при пересадке яремной вены в сонную артерию. Кроликов с гиперхолестеринемией трансфецировали олигонуклеотидными ловушками против E2F. При содержании кроликов в течение 6 месяцев на диете с высоким уровнем холестерина в результате такой терапии уменьшалась пролиферация гладкомышечных клеток и формирование неоинтимы в сосудах. В другом эксперименте кроликов содержали в течение 6 месяцев до операции на диете с нормальным уровнем холестерина, а затем на диете с высоким уровнем холестерина в течение еще 6 недель. При однократном введении олигонуклеотидных ловушек против E2F у этих животных наблюдалась устойчивость к атеросклерозу по сравнению с животными, которым вводили ODN со случайной последовательностью или физраствор (Ehsan A et al., 2001).

Эффективность использования олигонуклеотидных ловушек против E2F для предотвращения развития трансплантаци-

онного атеросклероза была подтверждена в клинических исследованиях. В них изучали эффективность использования таких олигонуклеотидных ловушек в предотвращении рестеноза обходного сосудистого шунта. В исследовании «Project in Ex-Vivo Vein Graft Engineering Via Transfection» (PREVENT 1) был изучен эффект ингибирования E2F, достигнутый с использованием олигонуклеотидных ловушек. В этом исследовании приняли участие 41 пациент, которым случайным образом в качестве обходного шунта имплантировали инфраингуинальный участок вены трансфецированный олигонуклеотидными ловушками против E2F, ODN со случайной последовательностью или не-трансфецированный. Обработка вены осуществлялась интраоперационно путем трансфекции *ex vivo* с эффективностью трансфекции 89%. Через 12 месяцев после операции отмечались меньшая степень окклюзии протеза, частота повторных операций или критического стеноза (Dzau VJ, 2005; Mann MJ et al., 1999).

С целью уменьшить экспрессию генов и тем самым ограничить развитие атеросклероза использовались каталитические ДНК или ДНКзимы. ДНКзимы обладают каталитической активностью и расщепляют одноцепочечные РНК по специфическим сайтам (Рисунок 95). Они менее чувствительны к химической или ферментативной деградации по сравнению с РНКзимами, и проявляют большую субстратную гибкость. У модели ДНКзима «10-23» каталитический домен образован высококонсервативной последовательностью из 12 дезоксирибонуклеотидов, которая фланкирована двумя субстратузнающими доменами. ДНКзим «10-23» может эффективно расщеплять последовательность мРНК транскрипта по неспаренному пурину или пиримидину и, таким образом, можно синтезировать ДНКзимы, ко-

торые узнают нуклеотиды AU стартового кодона (Zhang L et al., 2002).

В настоящее время имеется немного данных клинических исследований об эффективности использования каталитических ДНК для предотвращения развития атеросклероза, однако есть несколько доклинических исследований, в которых показана их эффективность. Главным образом, исследования сфокусированы на воздействии на ген преддранной экспрессии и фактор транскрипции Egr-1, который устроен по принципу цинкового пальца. В сонной артерии крыс в течение 3 часов острого перекрытия кровотока, наблюдается апрегуляция экспрессии Egr-1, и через 18 суток формируется неоинтима. Локальное введение каталитической ДНК во время наложения лигатуры уменьшает экспрессию Egr-1 и, как следствие, формирование неоинтимы (Lowe HC et al., 2002).

## **16.5. Трансплантация костного мозга**

Все большее признание получают представления об атеросклерозе как патологическом процессе, характеризующимся ухудшенной мобилизацией или недостаточным количеством стволовых клеток и ранних предшественников, необходимых для репарации сосуда. Было отмечено, что трансплантация костного мозга или клеток предшественников оказывает терапевтический эффект при лечении гематологических и солидных злокачественных опухолей. Подобные наблюдения вместе с развитием методик выделения этих клеточных линий привели к идее использования такого рода терапии для лечения атеросклероза. Показано, что для эффективного лечения сосудистых нарушений путем трансплантации костного мозга должен быть

достигнут минимальный уровень химеризма. Чтобы определить этот уровень, смешали разные пропорции гомогената из костного мозга, полученного от мышей C57BL/6, с костным мозгом от нокаутных по apoE мышей, и имплантировали эти клетки мышам нокаутным по apoE, получившим летальную дозу радиации. В результате, по сравнению с контрольными мышами, у мышей с химеризмом >60% отмечалась нормализация уровня холестерина в плазме крови через 6 недель после трансплантации, у мышей с химеризмом <40% наблюдалось уменьшение уровня холестерина к 42 неделе. У мышей с 10%-ным химеризмом, уровень холестерина в плазме значительно не снижался, но атеросклеротическое поражение сосудов уменьшилось. Эти данные дают основание предполагать, что в подобной модели достаточно 10% химеризма, чтобы значительно уменьшить проявления атеросклероза (Sakai Y et al., 2002).

Ранние попытки трансплантации костного мозга с целью уменьшения формирования атеросклеротических бляшек показали эффективность этого подхода для уменьшения уровня холестерина в плазме у нокаутных по apoE мышей с гиперхолестеринемией. При трансплантации костного мозга использовались как сингенные клетки, полученные от apoE-дефицитных мышей, так и клетки экспрессирующие apoE, полученные от мышей дикого типа. В результате, отмечалось четырехкратное уменьшение уровня холестерина через 4 недели после трансплантации по сравнению с мышами, которые получали сингенный трансплантат. Эти изменения были связаны также со значительным уменьшением степени атеросклеротического поражения через 4 месяца. Таким образом, трансплантация костного мозга дикого типа восстанавливает фенотип дикого типа у мышей нокаутных по apoE. Позднее использовали такую же мето-



дику, чтобы показать, что элиминация макрофагов apoE типа объясняет уменьшение формирования атеросклеротической бляшки (Boisvert WA & Curtiss LK, 1999).

Таким же образом при трансплантации костного мозга было показано, что макрофагальный белок, связывающий жирные кислоты (aP2), который участвует в метаболизме жирных кислот и клеточном транспорте липидов, принимает участие в формировании атеросклеротической бляшки. У мышей, нокаутных по двум генам apoE и aP2, атеросклеротические поражения были значительно меньше, чем у мышей нокаутных по apoE, и в этих поражениях обнаруживается значительно меньше макрофагов. Это явление связали с уменьшением экспрессии хемоаттрактантов для макрофагов и воспалительных цитокинов у мышей нокаутных по двум генам (Layne MD et al., 2001).

Несмотря на то, что проведенные исследования показали эффективность трансплантации костного мозга для уменьшения формирования атеросклеротических бляшек в экспериментальных моделях на животных, клиническому применению этой процедуры препятствует, связанный с ней высокий уровень заболеваемости и смертности. Исследования последнего времени сфокусированы на выделении и введении отдельных популяций клеток из костного мозга для преодоления этих ограничений.

## **16.6. Имплантация клеток**

Осложнения, вызванные трансплантацией клеток из костного мозга, частично связаны с гетерогенным составом костного мозга. Из-за присутствия гематopoэтических стволовых клеток и других ранних клеток предшественников эффективность часто зависит от способа сортировки клеток перед трансплантацией.

В одних исследованиях трансплантировали несортированные клетки костного мозга, в других – изолированные популяции клеток, таких как плюрипотентные мезинхимальные стволовые клетки или моноклеарная фракция. Более того, в зависимости от способа выделения (например, простое выделение или рост и дифференцировка в культуре), полученные фракции клеток могут значительно различаться по составу и фенотипу. Из-за этого иногда трудно сравнить результаты разных исследований, и до сих пор неясно, какая клеточная линия производит больший терапевтический эффект. Однако интересные результаты, полученные в предварительных исследованиях с трансплантацией клеток из костного мозга и возможность их трансфектировать антисмысловым ODN или вирусными векторами, чтобы изменить экспрессию генов, позволяют рассматривать трансплантацию клеток как один из новых подходов в лечении атеросклероза.

Предварительные исследования, проведенные на модели мелких животных, показали, что прямая инъекция несортированных клеток костного мозга после культивирования *in vitro* способствует восстановлению левого желудочка в модели инфаркта миокарда. Полученные данные объяснялись способностью этих клеток дифференцироваться в кардиомиогенные клетки *in vivo*, что способствует регенерации миокарда после инфаркта (Jain M et al., 2001).

В одном исследовании на модели инфаркта миокарда у мышей клетки из костного мозга обработали 5-азациитидином перед имплантацией, чтобы индуцировать кардиомиогенную дифференцировку, и после этого ввели в венечное кровообращение. Через 8 недель клетки костного мозга идентифицировали в миокардиальном рубце и околорубцовых тканях, эти клетки

экспрессировали специфический белок кардиомиоцитов – тропонин-1. Кроме того, клетки из костного мозга формировали щелевые контакты с соседними кардиомиоцитами реципиента. Инкорпорация клеток донора приводило к значительному увеличению фракции выброса и уменьшению конечного систолического диаметра левого желудочка. Таким образом, как следует из результатов, для доставки клеток можно использовать чрезкожное введение, после чего клетки костного мозга способны к направленной миграции и дифференцировке, что позволяет улучшить сердечную функцию (Saito T et al., 2003).

Интересно отметить, что в этом исследовании инъецировался болюс из  $1 \times 10^6$  клеток, хотя сразу после введения было идентифицировано только 34% клеток, которые попали в коронарные микрососуды инфарктного и неповрежденного миокарда. После того как эти клетки перемещаются в интерстициум миокарда, морфология клеток из костного мозга в центре миокардиального рубца значительно отличается от тех же клеток в периферической зоне. Последние окружены жизнеспособными кардиомиоцитами и имеют хорошо организованные сократительные белки, формируют щелевые контакты с кардиомиоцитами реципиента, в то время как в рубце введенные клетки менее дифференцированы. Эти данные показали влияние микроокружения на кардиомиогенную дифференцировку (Saito T et al., 2003).

Результаты исследований, проведенных на крупных животных, отличаются от описанных. В модели хронического инфаркта миокарда овец, прямая инъекция в область инфаркта несортированных аутологичных клеток из костного мозга не улучшала функции левого желудочка. Гистологическое исследование сердца не показало приживления клеток из костного

мозга или их дифференцировку в эндотелиальные клетки. Несмотря на то, что проведенные исследования отличаются выбором животной модели и способом введения клеток, исследования на овцах дают основания предполагать, что несортированная фракция клеток из костного мозга не была обогащена клеточной популяцией, которая способствует улучшению сократительной функции постинфарктной рубцовой ткани (Bel A et al., 2003).

Данных о клиническом применении несортированных аутологичных клеток из костного мозга мало. Этот метод был применен при лечении 8 пациентов с хроническим заболеванием периферических сосудов, которые не поддавались традиционной терапии. После инъекции клеток у семи из восьми пациентов наблюдалось симптоматическое улучшение, а у двух полностью зажили язвы на пальце стопы (Esato K et al., 2002). В другом небольшом исследовании пяти пациентам вводились аутологичные клетки из костного мозга во время операции аортокоронарного шунтирования. Клетки имплантировали в неподлежащие трансплантации области. Постоперационная сцинтиграфия показала улучшение перфузии у трех из пяти пациентов (Hamano K et al., 2001).

## **16.7. Предшественники эндотелиальных клеток**

Несмотря на то, что в описанных исследованиях имплантация несортированных клеток из костного мозга улучшает перфузию ткани и уменьшает ишемию, недавно было сформировано еще одно направление исследований – использование предшественников эндотелиальных клеток из костного мозга

для эффективной неоваскуляризации сосудов с атеросклеротическим поражением. Было показано, что предшественники эндотелиальных клеток из костного мозга участвуют в неоваскуляризации после повреждения стенки сосуда. Таким образом, модулирование функций этих клеток может быть еще одним терапевтическим подходом.

Предшественники эндотелиальных клеток, циркулирующие в периферической крови, а также из костного мозга экспрессируют ряд эндотелиальных маркеров, таких как рецептор фактора роста эндотелия-2 (VEGFR-2), Tie-2, VE-кадгерин, CD34, CD146, E-селектин. Эти маркеры используются для выделения предшественников эндотелиальных клеток из костного мозга и периферической крови. Предшественники эндотелиальных клеток экспрессируют также маркер стволовых клеток CD133, а фракцию клеток CD133+VEGFR-2+, можно индуцировать к дифференцировке в зрелые CD133-VEGF-2- эндотелиальные клетки, которые принимают участие в неоваскуляризации. Эти клетки составляют только 0,01% от общего количества циркулирующих в крови клеток. Однако после повреждения сосуда их количество может возрасти до 12% (Rafii S & Lyden D, 2003; Szmitko PE et al., 2003).

Получены клинические и экспериментальные данные, демонстрирующие способность предшественников эндотелиальных клеток к хоумингу в сайты эндотелиальной дисфункции. В экспериментах на животных в сайтах ишемии конечности, были обнаружены генетически маркированные предшественники эндотелиальных клеток. После эксплантации аппарата вспомогательного кровообращения у пациентов с последней стадией сердечной недостаточности, были обнаружены прикрепленные CD34+VEGFR-2+ клетки, что свидетельствует об участии пред-

шественников эндотелиальных клеток в ранней стадии рекрутинга при формировании нетромбогенной поверхности (Rafii S & Lyden D, 2003; Szmitko PE et al., 2003).

Были проведены многочисленные исследования, в которых изучался вклад циркулирующих предшественников эндотелиальных клеток в развитие атеросклеротического поражения сосудов и восстановление клеточной стенки с целью определить терапевтическое значение трансплантации предшественников эндотелиальных клеток. Особенный интерес к предшественникам эндотелиальных клеток, объясняется также тем, что повышенный риск сердечнососудистых заболеваний, как было показано, ассоциирован с дефицитом циркулирующих предшественников эндотелиальных клеток (Hill JM et al., 2003). Более того, у пациентов с заболеваниями сердца факторы риска заболевания коронарных артерий влияют на количество и функции предшественников эндотелиальных клеток. У этих пациентов, курение табака является одним из главных независимых показателей уменьшения количества предшественников эндотелиальных клеток, в то время как на ухудшение способности клеток предшественников к миграции влияет гипертензия (Vasa M et al., 2001). Имеются предположения, что старение предшественников эндотелиальных клеток может быть одной из причин повышения риска развития атеросклероза с возрастом (Goldschmidt-Clermont PJ, 2003).

Для изучения эффективности введения предшественников эндотелиальных клеток *in vivo* выделяют моноклеарную фракцию или получают более чистую популяцию. После выделения клетки инъецируют сразу или после выращивания в культуре. Так как существуют разные способы выделения клеток и протоколы исследований, не удивительно, что в разных иссле-

дованиях получены противоречивые результаты. Например, в модели периферической ишемии конечности у крыс, инъекцировали моноклеарную фракцию клеток в мышцы или в артерию ишемизированной конечности проксимально относительно экспериментальной окклюзии. Через четыре недели после трансплантации ангиография показала интенсификацию развития коллатеральных сосудов, что было подтверждено иммуногистохимическим исследованием мышечной ткани; интраартериальное введение клеток имело такой же терапевтический эффект (Yoshida M et al., 2003). Трансплантация предшественников эндотелиальных клеток в ишемизированную заднюю конечность мышей и крыс с диабетом также улучшает кровообращение, что свидетельствует о потенциальной эффективности такой терапии для лечения пациентов при наличии фактора риска. В противоположность этим данным при введении моноклеарной фракции клеток из костного мозга животных дикого типа нокаутным по *apoE* мышам с периферической ишемией тканевой неоваскуляризации сопутствовало увеличение формирования атеросклеротических бляшек в аорте. Так как из бляшек в аорте выделили очень небольшое число трансплантированных клеток, предположили, что негативное действие оказал синтез проангиогенных и провоспалительных медиаторов, что, вероятно, может ограничить применение такой терапии в клинике (Silvestre JS et al., 2003).

В исследованиях *in vitro* была показана способность предшественников эндотелиальных клеток дифференцироваться в миогенные клетки, а в модели экспериментального инфаркта миокарда предшественники эндотелиальных клеток мигрировали в зону инфаркта и участвовали в сохранении функции левого желудочка. В экспериментах, в которых крысам во время

инфаркта миокарда вводились CD34+ клетки, мобилизованные гранулоцит-колоние-стимулирующим фактором (G-CSF), трансплантация клеток улучшала функции миокарда, ограничивала апоптоз кардиомиоцитов и негативный ремоделинг левого желудочка. При этом человеческие эндотелиальные клетки большей частью были локализованы в инфарктной области, тогда как крысиные эндотелиальные клетки принимали участие в формировании сосудов на границах инфарктной области (Szmitko PE et al., 2003). Доказательства участия предшественников эндотелиальных клеток в репарации сосудов были получены также при изучении трансплантационного атеросклероза у мышей, когда восстановленный эндотелий трансплантата был образован клетками, дифференцировавшимися из циркулирующих предшественников эндотелиальных клеток (Xu Q et al., 2003).

Трансплантация предшественников эндотелиальных клеток была применена в клинике для уменьшения ишемии, возникшей вследствие атеросклеротического поражения сосудов. Пяти пациентам с периферической ишемией инъецировали в 50 различных участков ишемизированной конечности аутологичные CD34+ клетки предшественники, мобилизованные G-CSF. Через 3 дня после проведения процедуры было отмечено симптоматическое облегчение и увеличение пройденного расстояния без проявления симптомов (Inaba S et al., 2002). Эти наблюдения были продолжены в исследовании «Therapeutic Angiogenesis using Cell Transplantation» (TACT). В нем приняли участие 22 пациента с билатеральной ишемией ног. В одну конечность пациентам инъецировали моноклеарную фракцию клеток, выделенных из периферической крови, а в другую моноклеарную фракцию, полученную из костного мозга. Через 4



недели значительно улучшились показатели лодыжечно-плечевого индекса и чрезкожное парциальное давление кислорода, уменьшилась боль, возникающая в состоянии покоя и увеличилось время передвижения без боли, причем этот эффект поддерживался в течение 24 недель. Таким образом, предварительные клинические исследования показывают, что моноклеарная фракция клеток из костного мозга может оказывать терапевтический эффект и при этом наблюдаются минимальные побочные эффекты (Tateishi-Yuyama E et al., 2002).

Клинические исследования также показали возможность применения предшественников эндотелиальных клеток в качестве дополнительной терапии при остром инфаркте миокарда для ограничения ремоделинга после инфаркта. В исследовании «Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction» (TOPCARE-AMI) была изучена безопасность и эффективность инъекции предшественников эндотелиальных клеток. В исследовании приняли участие 20 пациентов с острым инфарктом миокарда и реперфузией связанных с инфарктом артерий. Этим пациентам вводили в артерию, катастрофические изменения в которой вызвали инфаркт, предшественников эндотелиальных клеток, полученные из костного мозга и периферической крови. Через четыре месяца отмечали улучшение функции левого желудочка, что характеризовалось увеличением фракции выброса и уменьшением объема левого желудочка в конце систолы. Не было отмечено значительной разницы в эффективности действия периферических предшественников эндотелиальных клеток и выделенных из костного мозга, а также не наблюдались злокачественные аритмии и воспалительные реакции. Во втором исследовании десяти пациентами, которым была назначена традиционная при

остром инфаркте миокарда терапия, инъектировали аутологичных предшественников эндотелиальных клеток во время процедуры баллонной ангиопластики. Через 3 месяца у пациентов, которым вводили предшественников эндотелиальных клеток, был меньший размер инфаркта и систолический индекс, меньше объем левого желудочка в конце систолы, сократительная способность, а также кровоснабжение миокарда в области инфаркта было значительно лучше по сравнению с пациентами, которым была назначена только традиционная терапия (Assmus B et al., 2002).

Предшественники эндотелиальных клеток можно генетически модифицировать. В частности, эти клетки трансдуцировали *ex vivo* аденовирусом, кодирующим человеческий VEGF<sub>165</sub> и ввели их мышам с ишемией задней конечности. Было показано двукратное увеличение пролиферации у трансдуцированных *ex vivo* предшественников эндотелиальных клеток. Можно предположить, что таким образом они приобретали проангиогенный фенотип. Когда эти клетки вводили мыши, уровень человеческого VEGF был значительно выше, чем у контрольных мышей и повышенный уровень отмечался до 28 дней после инъекции, что проявлялось в увеличении неоваскуляризации и кровообращения в ишемизированной конечности и уменьшении аутоампутации на 64%. Интересно отметить, что необходимая для полученная такого эффекта доза трансдуцированных клеток была в 30 раз меньше, чем доза нетрансдуцированных предшественников эндотелиальных клеток (Iwaguro H et al., 2002). Несмотря на то, что в этом исследовании было показано, что трансдуцированные предшественники эндотелиальных клеток были более эффективными, чем нетрансдуцированные, эффект трансдуцированных предшественников эндотелиальных клеток

не сравнивают с переносом генов. Однако получены важные наблюдения, что биологически модифицированные предшественники эндотелиальных клеток более эффективны, чем немодифицированные или нетрансдуцированные клетки.

Перенос генов в предшественников эндотелиальных клеток применяли также, чтобы увеличить эффективность доставки антикоагулянтов на модели экспериментальной ангиопластики. Предшественники эндотелиальных клеток были инфицированы в условиях *ex vivo* с эффективностью более 90% ретровирусом, кодирующим антитромботические агенты (тканевой активатор плазминогена и гирудин). Клетки были инъецированы в артерию, поврежденную при баллонной ангиопластике. Через 7 дней около 73% поверхности поврежденных сосудов было покрыто трансдуцированными предшественниками эндотелиальных клеток, при этом в эксплантированных артериях поддерживалась секреция белков. По сравнению с контролем трансдуцированные предшественники эндотелиальных клеток предотвращали положительный ремоделинг сегментов и при их использовании толщина меди была меньше. Формирование неointимы не замедлялось, что объясняется выбором генов в этом эксперименте (Griese DP et al., 2003).

В другом исследовании гематопоетические стволовые клетки мышей трансдуцировали с использованием самоинактивирующегося ретровирусного вектора, который встраивает элементы, регулирующие работу генов из макрофагального человеческого гена CD68. В этих экспериментах, стволовые клетки, дефицитные по *aroE*, трансдуцировали вирусом, кодирующим *aroE* и вводили дефицитным по *aroE* мышам. В результате макрофаги этих мышей экспрессировали уровень *aroE* сравнимый с макрофагами мышей дикого типа. В этой модели у мак-

рофагов экспрессия apoE, обеспечиваемая вектором, была достаточной, чтобы уменьшать гиперхолестеринемию и обратить развитие атеросклеротических бляшек (Gough PJ & Raines EW, 2003).

## **16.8. Иммуномодуляция**

В последнее время атеросклероз все чаще рассматривается как воспалительное расстройство. Иммуногистохимический анализ подтвердил присутствие в атеросклеротических поражениях поликлональных Т-клеток памяти. Эти CD4+ Т-лимфоциты реагируют с модифицированными ЛНП, что позволяет считать модифицированными липопротеиды главным объектом иммунной реакции в поражении. В развитых атеросклеротических бляшках Т-лимфоциты составляют 10-15% клеточной популяции и часто обнаруживаются в местах разрыва. Это популяция Т хэлперов-1 (Th1), секретирующая провоспалительные цитокины: интерферон- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), IL-2, TNF- $\alpha$ , которые стимулируют макрофаги и способствуют воспалению. Активированные Т-лимфоциты также экспрессируют лиганд к CD40, который связывает рецептор CD40 на макрофагах, В-лимфоцитах, эндотелиальных и гладкомышечных клетках (Hansson GK et al., 2002). Считается, что В-лимфоциты также участвуют в иммунной реакции при атеросклерозе, так как у пациентов с атеросклерозом в крови был обнаружен повышенный уровень циркулирующих антител к модифицированным ЛНП (Nicoletti A et al., 2000; Orekhov AN et al., 1991; Palinski W et al., 1989). Приведенные данные, позволили предположить, что иммуномодуляция, может быть использована для терапевтического воздействия на атеросклероз, как воспалительное расстройство сосудистой стенки.

### 16.8.1. Аутоантигены

В исследованиях, как на животных, так и на человеке было определено и изучено несколько предполагаемых антигенов-мишеней. Существует много данных, демонстрирующих значительную роль модифицированных ЛНП в наблюдаемом при атеросклерозе иммунном ответе. У нокаутных по apoE мышей с бляшками в аорте в поражениях были найдены CD4+ и CD8+ Т-лимфоциты, кроме того, у мышей был повышен уровень циркулирующих антител против модифицированных ЛНП. Более того, в атеросклеротических поражениях обнаруживали Т-лимфоциты, специфичные к эпитопам модифицированных липопротеидов (Hansson GK, 2001; Hansson GK et al., 2002).

Второй группой возможных аутоантигенов, является семейство белков теплового шока, которые секретируются поврежденными клетками. Они действуют как шапероны и ограничивают денатурацию других клеточных белков. Было показано, что белки теплового шока служат мишенью для аутоиммунной реакции при воспалительных нарушениях. Один из белков теплового шока - HSP70 был обнаружен в атеросклеротических бляшках человека, а экспериментальные исследования на кроликах показали, что иммунизация микобактериальным HSP65 приводит к образованию поражений атеросклеротического типа даже без гиперхолестеринемической диеты. Анти-HSP60 антитела были обнаружены в крови на моделях атеросклероза животных, при этом иммунизация HSP60 усиливала атеросклеротические проявления у мышей и кроликов. HSP60 также может активировать Toll-подобный рецептор-4 по механизму, сходному с действием эндотоксинов, что говорит о способности HSP60 активировать как Т-, так и В-клеточный иммунитет (Hansson GK,

2001; 2002; Hansson GK et al., 2002).

Существует предположение, что развитие атеросклероза обуславливается вирусной инфекцией. Эта гипотеза подтверждается обнаружением в атеросклеротических бляшках геномов вирусов, таких как простой герпес, цитомегаловирус, а также *Chlamydia pneumoniae*. Интересно отметить, что хламидийный HSP60 напоминает человеческий HSP6 и может вызывать аналогичную иммунную реакцию. Несмотря на эти данные, исследования, проведенные с целью установления связи между инфекционными агентами и атеросклерозом, до сих пор имеют противоречивые результаты (Hansson GK, 2001; 2002; Hansson GK et al., 2002; Nicoletti A et al., 2000).

#### **16.8.2. Иммуномодуляционная терапия**

В качестве иммуномодуляционной терапии атеросклероза изучались иммуносупрессорные агенты и направленная терапия для уменьшения уровня воспалительных цитокинов (Таблица 39). Было показано, что циклоспорин А – иммуносупрессорный агент, применяющийся при трансплантации органов, оказывает некое влияние на развитие атеросклероза, однако его роль до сих пор неизвестна из-за противоречивых результатов экспериментальных исследований. Например, у мышей C57BL/6 с гиперлипидемией, введение циклоспорина А приводило к прогрессии атеросклеротических поражений, что свидетельствует об атеропротективном действии опосредуемого Т-лимфоцитами ответа. В противоположность этим данным, в модели трансплантации сердца у крыс исследователи показали, что циклоспорин А не способствует развитию атеросклероза, а исследования, проведенные на мышах с недостаточностью CD4+CD8+ Т-

лимфоцитов, показали уменьшение формирования жировых полос, что говорит о возможном участии Т-лимфоцитов в патогенезе атеросклероза (Richter MH et al., 2002). Эти противоречивые результаты можно частично объяснить тем, что циклоспорин А ингибирует способность тимуса уничтожать аутореактивные Т-лимфоциты, что приводит к промискуитетному узнаванию главного комплекса гистосовместимости II (MHC II) на поверхности эндотелиальных клеток и увеличивает уровень IL-2, IFN- $\gamma$ , TFN- $\alpha$ . Совокупный эффект проявляется как острая воспалительная реакция в меди сосудистой стенки с последующим формированием неоинтимы (Chen W et al., 2001).

Многообещающие результаты дало применение рапамицина для ингибирования васкулопатии сердечного трансплантата. Рапамицин отличается от циклоспорина А тем, что ингибирует пролиферацию и миграцию клеток в ответ на аллоантигены, но не ингибирует синтез интерлейкинов при индуцированной антигеном активации Т-лимфоцитов. В ограниченном исследовании у пациентов, случайным образом получавших рапамицин, отмечали значительное уменьшение побочных эффектов, включая смерть, инфаркт миокарда, необходимость реваскуляризации или прогрессия атеросклероза коронарных артерий по сравнению с пациентами, которым была назначена традиционная иммуносупрессорная терапия. Интересно отметить, что значительную часть пациентов в обеих группах лечили циклоспорином А, но в группе, получавшей рапамицин уровень циклоспорина А был значительно ниже в течение последующего года по сравнению с пациентами, которым была назначена стандартная терапия (Mancini D et al., 2003).

Таблица 39. Иммуномодуляция

Агенты, использующиеся для иммуносупрессии

- Циклоспорин А
- Рапамицин

Терапия, направленная на уменьшение уровня  
воспалительных цитокинов

- Антагонист рецептора интерлейкина-1
- Блокатор фактора некроза опухоли- $\alpha$
- Антитела против CD40

Внутривенный иммуноглобулин

- Эпитопы-мишени для иммунизации
- Модифицированные ЛНП
- HSP60

По данным: Chen W et al., 2001; Dewberry R et al., 2000; Elhage R et al., 1998; Isoda K et al., 2003; Mancini D et al., 2003; Maron R et al., 2002; Richter MH et al., 2002; Schonbeck U et al., 2000; Wu R et al., 2003)

Терапия, направленная на уменьшение уровня воспалительных цитокинов, также оказалась успешной для уменьшения формирования атеросклеротических поражений. Антагонист рецептора IL-1, эндогенный ингибитор IL-1, уменьшал формирование жировых полос у мышей нокаутных по *aroE*. Экспрессия антагониста рецептора IL-1 была показана в эндотелиальных клетках коронарных артерий человека (Dewberry R et al., 2000; Elhage R et al., 1998). Роль IL-1 антагонизма была недавно подтверждена в исследовании с использованием мышей без антагониста рецептора IL-1. У этих мышей формирование неointимы после повреждения бедренной артерии было значи-



тельно ускорено по сравнению с мышами дикого типа (Isoda K et al., 2003). Попытки блокировать эффект TNF- $\alpha$  были не так успешны, поскольку уменьшают атеросклеротическое поражение только у самок мышей нокаутных по apoE (Elhage R et al., 1998).

Другие иммунные медиаторы, обнаруженные в атеросклеротических поражениях – это CD40 и CD40 лиганд, которые инициируют гуморальный и клеточный иммунный ответ. В модели атеросклероза у мышей с дефицитом рецепторов к ЛНП, лечение антителами против CD40 лиганда значительно уменьшало формирование поражений, что говорит об участии этой сигнальной системы в формировании атеросклеротического поражения (Schonbeck U et al., 2000).

Внутривенный иммуноглобулин (IVIG), который успешно используется для лечения аутоиммунных и системных воспалительных заболеваний также оказывал терапевтический эффект на моделях экспериментального атеросклероза. При инъекции IVIG нокаутным по apoE мышам уменьшается формирование жировых полос, а также тормозится прогрессия атеросклероза с образованием зрелого фиброжирового поражения. Несмотря на то, что механизм действия IVIG остается неясным, предполагается, что он может ингибировать синтез антител В-лимфоцитами, модулировать Т-лимфоциты и влиять на продукцию цитокинов, а также может ингибировать CD40, так как препарат IVIG содержит анти-CD40 и анти-CD40 лиганд. Интересно отметить, что препарат IVIG также содержит анти-ЛНП, что позволяет предполагать другой механизм его ингибирующего действия на развитие атеросклероза (Wu R et al., 2003).

Исследования, в которых изучалось применение иммунизации для терапии атеросклероза, были сфокусированы на

аутоантигенах, таких как модифицированные ЛНП и HSP60. При модификации ЛНП появляются новые эпитопы, которые распознаются как чужеродные. Таким образом, иммунизация модифицированными ЛНП, как было показано, подавляет развитие атеросклероза. HSP60 освобождается из клеток во время воспалительной реакции, он дает перекрестную реакцию с микобактериальным HSP65 и хламидийным HSP60. В эксперименте на мышах показали, что иммунизация микобактериальным HSP60 подавляет атерогенез, что связано с уменьшением числа макрофагов, Т-лимфоцитов и IFN- $\gamma$ , а также с повышением уровня противовоспалительного цитокина IL-10. Описанные исследования, позволяют предполагать терапевтический потенциал в случае иммунизации модифицированными ЛНП для лечения атеросклеротического поражения сосудов (Hansson GK, 2002; Maron R et al. 2002).

## **Заключение**

С развитием в последние годы представлений атеросклероз можно определить как комплексное нарушение в сосудистой стенке, которое сопровождается неэффективностью механизмов репарации и выраженной воспалительной реакцией. Применение методик переноса генов, антисмысловые технологии, трансплантации предшественников эндотелиальных клеток и иммуномодуляции, по-видимому, может способствовать уменьшению формирования атеросклеротических бляшек. Сильными сторонами этих подходов является современные высокие технологии. Слабые стороны – это отсутствие ясных фармакологических биомишеней, что является результатом недостатка знаний о патогенезе атеросклероза. Если эффективная технология нацелена на фармакологическую мишень, выбранную случайно, если для выбора мишени нет достаточных оснований, инновационный терапевтический подход может не работать, какой бы высокоэффективной не была применяемая технология. Вывод напрашивается сам собой – необходимо изучать механизмы атеросклероза человека, необходимо разрабатывать обоснованные теории и гипотезы, в том числе для поиска биомаркеров и фармакологических мишеней для создания эффективных способов диагностики, профилактики и терапии атеросклероза.

## Список цитированной литературы

- Abbott RD, Levy D, Kannel WB, Castelli WP, Wilson PW, Garrison RJ, Stokes J 3rd. Cardiovascular risk factors and graded treadmill exercise endurance in healthy adults: The Framingham Offspring Study. *Am J Cardiol* 1989;63(5):342-346.
- Adams CW. Permeability in atherosclerosis- an artefact with Evan's blue staining. *Atherosclerosis* 1981;39(1):131-135.
- Ahn JD, Morishita R, Kaneda Y, Lee SJ, Kwon KY, Choi SY, Lee KU, Park JY, Moon IJ, Park JG, Yoshizumi M, Ouchi Y, Lee IK. Inhibitory effects of novel AP-1 decoy oligodeoxynucleotides on vascular smooth muscle cell proliferation in vitro and neointimal formation in vivo. *Circ Res* 2002;90(12):1325-1332.
- Ahnadi CE, Berthezène F, Ponsin G. Simvastatin-induced decrease in the transfer of cholesterol esters from high density lipoproteins to very low and low density lipoproteins in normolipidemic subjects. *Atherosclerosis* 1993;99(2):219-228.
- Aidinian G, Weiswasser JM, Arora S, Abularrage CJ, Singh N, Sidawy AN. Carotid plaque morphologic characteristics. *Perspect Vasc Surg Endovasc Ther* 2006;18(1):63-70.
- Akopov SE, Orekhov AN, Tertov VV, Khashimov KA, Gabrielyan ES, Smirnov VN. Stable analogues of prostacyclin and thromboxane A2 display contradictory influences on atherosclerotic properties of cells cultured from human aorta. The effect of calcium antagonists. *Atherosclerosis* 1988;72(2-3):245-248.
- Alaupovic P. Apolipoproteins and lipoproteins. *Atherosclerosis* 1971;13(2):141-146
- ALLHAT Collaborative Research Group. Major cardiovascular events in hypertensive patients randomized to doxazosin vs chlorthalidone: the antihypertensive and lipid-lowering treat-

- ment to prevent heart attack trial (ALLHAT). JAMA 2000;283(15):1967-1975.
- ALLHAT Officers and Coordinators for the ALLHAT Collaborative Research Group. Major outcomes in high-risk hypertensive patients randomized to angiotensin-converting enzyme inhibitor or calcium channel blocker vs diuretic: The Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT). JAMA 2002a;288(23):2981-2997.
- ALLHAT Officers and Coordinators for the ALLHAT Collaborative Research Group. Major outcomes in moderately hypercholesterolemic, hypertensive patients randomized to pravastatin vs usual care: The Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT-LLT). JAMA 2002b;288(23):2998-3007.
- Alpers CE, Gordon D, Gown AM. Immunophenotype of vascular rejection in renal transplants. Mod Pathol 1990 Mar;3(2):198-203.
- Altschul R. Selected Studies on Arteriosclerosis. Thomas, Springfield, 1950.
- Amer M, Bead VR, Bathon J, Blumenthal RS, Edwards DN. Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in patients with cardiovascular disease: a cautionary tale. Cardiol Rev 2010;18(4):204-212.
- Aminbakhsh A., Mancini G.B. Carotid intima-media thickness measurements: what defines an abnormality? A systematic review. Clin Invest Med 1999;22(4):149-157.
- Andreeva ER, Pugach IM, Gordon D, Orekhov AN. Continuous sub-endothelial network formed by pericyte-like cells in human vascular bed. Tissue & Cell 1998;30(1):127-135.

- Andreeva ER, Orekhov AN, Smirnov VN. Quantitative estimation of lipid-laden cells in atherosclerotic lesions of the human aorta. *Acta Anatomica* 1991;141(4):316-323.
- Andreeva ER, Rekhter MD, Romanov YuA, Antonova GM, Antonov AS, Mironov AA, Orekhov AN. Stellate cells of aortic intima: II. Arborization of intimal cells in culture. *Tissue Cell* 1992;24(5):697-704.
- Andreeva ER, Serebryakov VN, Orekhov AN. Gap junctional communication in primary culture of cells derived from human aortic intima. *Tissue Cell* 1995;27(5):591-597.
- Andreeva ER, Pugach IM, Orekhov AN. Subendothelial smooth muscle cells of human aorta express macrophage antigen in situ and in vitro. *Atherosclerosis* 1997a;135(1):19-27.
- Andreeva ER, Pugach IM, Orekhov AN. Collagen-synthesizing cells in initial and advanced atherosclerotic lesions of human aorta. *Atherosclerosis* 1997;130(1-2):133-142.
- Andrews TC, Ballantyne CM, Hsia JA, Kramer JH. Achieving and maintaining National Cholesterol Education Program low-density lipoprotein cholesterol goals with five statins. *Am J Med* 2001;111():185-191.
- Antonov AS, Nikolaeva MA, Klueva TS, Romanov YuA, Babaev VR, Bystrevskaya VB, Perov NA, Repin VS, Smirnov VN. Primary culture of endothelial cells from atherosclerotic human aorta. Part 1. Identification, morphological and ultrastructural characteristics of two endothelial cell subpopulations. *Atherosclerosis* 1986;59(1):1-19.
- Aqel NM, Ball RY, Waldmann H, Mitchinson MJ. Identification of macrophages and smooth muscle cells in human atherosclerosis using monoclonal antibodies. *J Pathol* 1985;146(3):197-204.

- Arefieva TI, Provatorov SI, Samko AN, Krasnikova TL, Resink TJ, Erne P, Tkachuk VA, Chazov EI. Monocyte integrin expression and monocyte-platelet complex formation in humans with coronary restenosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2001;28(10):804-808.
- Arsenault BJ, Kritikou EA, Tardif JC. Regression of atherosclerosis. *Curr Cardiol Rep* 2012;14(4):443-449.
- Assmann G, Cullen P, Schulte H. Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Muenster (PRO-CAM) study. *Circulation* 2002;105(3):310-315.
- Assmus B, Schächinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Döbert N, Grünwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002;106(24):3009-3017.
- Astrup T. Fibrinolysis in the organism. *Blood* 1956;11(9):781-806.
- Austin MA, Breslow JL, Hennekens CH, Buring JE, Willett WC, Krauss RM. Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *JAMA* 1988;260(13):1917-1921.
- Avogaro P, Bon GB, Cazzolato G. Presence of a modified low density lipoprotein in humans. *Arteriosclerosis* 1988;8(1):79-87.
- Baldassarre D, Veglia F, Gobbi C, Gallus G, Ventura A, Crepaldi G, Fisicaro M, Rimondi S, Ricci G, Mancini M, Bong MG, Collatina S, Sirtori CR. Intima-media thickness after pravastatin stabilizes also in patients with moderate to no reduction in LDL-cholesterol levels: the carotid atherosclerosis Italian ultrasound study. *Atherosclerosis* 2000;151(2):575-583.
- Baldenkov GN, Akopov SE, Ryong LH, Orekhov AN. Prostacyclin, thromboxane A2 and calcium antagonists: effects on athero-

- sclerotic characteristics of vascular cells. *Biomed Biochim Acta* 1988;47(10-11):S324-S327.
- Balis JU, Haust MD, More RH. Electron-microscopic studies in human atherosclerosis; cellular elements in aortic fatty streaks. *Exp Mol Pathol* 1964;90:511-525.
- Basu SK, Brown MS, Ho YK, Goldstein JL. Degradation of low density lipoprotein . dextran sulfate complexes associated with deposition of cholesteryl esters in mouse macrophages. *J Biol Chem* 1979;254(15):7141-7146.
- Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, Blair R, Kearney M, Walsh K, Isner JM. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 1998;97(12):1114-1123.
- Bayes-Genis A, Campbell JH, Carlson PJ, Holmes DR Jr, Schwartz RS. Macrophages, myofibroblasts and neointimal hyperplasia after coronary artery injury and repair. *Atherosclerosis* 2002;163(1):89-98.
- Bel A, Messas E, Agbulut O, Richard P, Samuel JL, Bruneval P, Haguège AA, Menasché P. Transplantation of autologous fresh bone marrow into infarcted myocardium: a word of caution. *Circulation* 2003;108 Suppl 1:II247- II252.
- Bell DM. Markers for progression of coronary disease. *Pharmacotherapy* 2001;21(9 Pt 2):190S-194S.
- Bellosta S, Bernini F, Ferri N, Quarato P, Canavesi M, Arnaboldi L, Fumagalli R, Paoletti R, Corsini A. Direct vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Atherosclerosis* 1998;137 Suppl:S101- S109.
- Bentley JK, Beavo JA. Regulation and function of cyclic nucleotides. *Curr Opin Cell Biol* 1992;4(2):233-240.



- Bény JL, Connat JL. An electron-microscopic study of smooth muscle cell dye coupling in the pig coronary arteries. Role of gap junctions. *Circ Res* 1992;70(1):49-55.
- Bény JL, Gribi F. Dye and electrical coupling of endothelial cells in situ. *Tissue Cell* 1989;21(6):797-802.
- Berenson GS, Wattigney WA, Tracy RE, Newman WP 3rd, Srinivasan SR, Webber LS, Dalferes ER Jr, Strong JP. Atherosclerosis of the aorta and coronary arteries and cardiovascular risk factors in persons aged 6 to 30 years and studied at necropsy (The Bogalusa Heart Study). *Am J Cardiol* 1992;70(9):851-858.
- Besler C, Lüscher TF, Landmesser U. Molecular mechanisms of vascular effects of High-density lipoprotein: alterations in cardiovascular disease. *EMBO Mol Med* 2012;4(4):251-268.
- Bessede G, Miguët C, Gambert P, Neel D, Lizard G. Efficiency of homocysteine plus copper in inducing apoptosis is inversely proportional to gamma-glutamyl transpeptidase activity. *FASEB J* 2001;15(11):1927-1940.
- Betz E. Trends in experimental atherosclerosis. *Int Angiol* 1987;6(1):5-6.
- Bevilacqua MP. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol* 1993;11:767-804.
- Blair SN, Kampert JB, Kohl HW 3rd, Barlow CE, Macera CA, Paffenbarger RS Jr, Gibbons LW. Influences of cardiorespiratory fitness and other precursors on cardiovascular disease and all-cause mortality in men and women. *JAMA* 1996;276(3):205-210.
- Blankenhorn DH, Hodis HN. George Lyman Duff Memorial Lecture. Arterial imaging and atherosclerosis reversal. *Arterioscler Thromb* 1994;14(2):177-192.

- Blankenhorn DH, Johnson RL, Nessim SA, Azen SP, Sanmarco ME, Selzer RH. The Cholesterol Lowering Atherosclerosis Study (CLAS): design, methods, and baseline results. *Control Clin Trials*. 1987a;8(4):356-387.
- Blankenhorn DH, Nessim SA, Johnson RL, Sanmarco ME, Azen SP, Cashin-Hemphill L. Beneficial effects of combined colestipol-niacin therapy on coronary atherosclerosis and coronary venous bypass grafts. *JAMA* 1987b;257(23):3233-40.
- Blankenhorn DH, Selzer RH, Crawford DW, Barth JD, Liu CR, Liu CH, Mack WJ, Alaupovic P. Beneficial effects of colestipol-niacin therapy on the common carotid artery. Two- and four-year reduction of intima-media thickness measured by ultrasound. *Circulation* 1993a;88(1):20-28.
- Blankenhorn DH, Azen SP, Krams DM, Mack WJ, Cashin-Hemphill L, Hodis HN, DeBoer LW, Mahrer PR, Masteller MJ, Vailas LI, Alaupovic P, Hirsch LJ; MARS Research Group. Coronary angiographic changes with lovastatin therapy. The Monitored Atherosclerosis Regression Study (MARS). *Ann Intern Med*. 1993b;119(10):969-976.
- Blankenhorn DH, Hodis HN. George Lyman Duff Memorial Lecture. Arterial imaging and atherosclerosis reversal. *Arterioscler Thromb* 1994;14(2):177-192.
- Bobryshev YV, Lord RS, Rainer S, Jamal OS, Munro VF. Vascular dendritic cells and atherosclerosis. *Pathol Res Pract* 1996;192(5):462-467.
- Bochkov VN, Matchin YG, Fuki IV, Lyakishev AA, Tkachuk VA. Platelets in patients with homozygous familial hypercholesterolemia are sensitive to  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilizing activity of low density lipoproteins. *Atherosclerosis* 1992;96(2-3):119-124.

- Boffetta P, Garfinkel L. Alcohol drinking and mortality among men enrolled in an American Cancer Society prospective study. *Epidemiology* 1990;1(5):342-348.
- Boisvert WA, Curtiss LK. Elimination of macrophage-specific apolipoprotein E reduces diet-induced atherosclerosis in C57BL/6J male mice. *J Lipid Res* 1999;40(5):806-813.
- Bond MG, Wilmoth SK, Enevold GL, Strickland HL. Detection and monitoring of asymptomatic atherosclerosis in clinical trials. *Am J Med* 1989;86(4A):33-36.
- Borhani NO, Mercuri M, Borhani PA, Buckalew VM, Canossa-Terris M, Carr AA, Kappagoda T, Rocco MV, Schnaper HW, Sowers JR, Bond MG. Final outcome results of the Multicenter Isradipine Diuretic Atherosclerosis Study (MIDAS). A randomized controlled trial. *JAMA* 1996 Sep 11;276(10):785-791.
- Bostom AG, Gohh RY, Liaugaudas G, Beaulieu AJ, Han H, Jacques PF, Dworkin L, Rosenberg IH, Selhub J. Prevalence of mild fasting hyperhomocysteinemia in renal transplant versus coronary artery disease patients after fortification of cereal grain flour with folic acid. *Atherosclerosis* 1999;145(1):221-224.
- Bostom AG, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH. Power Shortage: clinical trials testing the "homocysteine hypothesis" against a background of folic acid-fortified cereal grain flour. *Ann Intern Med* 2001;135(2):133-137.
- Boström K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM, Demer LL. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1993;91(4):1800-1809.
- Bots ML, Grobbee DE. Decline of coronary heart disease mortality in The Netherlands from 1978 to 1985: contribution of medical care and changes over time in presence of major cardiovascular risk factors. *J Cardiovasc Risk* 1996;3(3):271-276.

- Bots ML, Grobbee DE, Hofman A, Witteman JC. Common carotid intima-media thickness and risk of acute myocardial infarction: the role of lumen diameter. *Stroke* 2005;36(4):762-767.
- Branwood AW. *Modern Concepts of the Pathogenesis of Coronary Atherosclerosis*, Livingstone, Edinburgh, 1963.
- Brighton CT, Lorch DG, Kupcha R, Reilly TM, Jones AR, Woodbury RA 2nd. The pericyte as a possible osteoblast progenitor cell. *Clin Orthop Relat Res* 1992;(275):287-299.
- Brodsky VYa, Uryvaeva IB. *Genome Multiplication in Growth and Development*. Cambridge University Press, Cambridge, 1985.
- Brown BG, Zhao XQ, Chait A, Fisher LD, Cheung MC, Morse JS, Dowdy AA, Marino EK, Bolson EL, Alaupovic P, Frohlich J, Albers JJ. Simvastatin and niacin, antioxidant vitamins, or the combination for the prevention of coronary disease. *N Engl J Med* 2001;345(22):1583-1592.
- Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986;232(4746):34-47.
- Brownlee M, Vlassara H, Cerami A. Nonenzymatic glycosylation products on collagen covalently trap low-density lipoprotein. *Diabetes* 1985;34(9):938-941.
- Bruce C, Tall AR. Cholesteryl ester transfer proteins, reverse cholesterol transport, and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1995;6(5):306-311.
- Bucala R, Makita Z, Koschinsky T, Cerami A, Vlassara H. Lipid advanced glycosylation: pathway for lipid oxidation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(14):6434-6438.
- Buchwald AB, Wagner AH, Webel C, Hecker M. Decoy oligodeoxynucleotide against activator protein-1 reduces neointimal proliferation after coronary angioplasty in hypercholesterolemic minipigs. *J Am Coll Cardiol* 2002;39(4):732-738.

- Burchfiel CM, Reed DM, Marcus EB, Strong JP, Hayashi T. Association of diabetes mellitus with coronary atherosclerosis and myocardial lesions. An autopsy study from the Honolulu Heart Program. *Am J Epidemiol* 1993;137(12):1328-1340.
- Burger HG, MacLennan AH, Huang KE, Castelo-Branco C. Evidence-based assessment of the impact of the WHI on women's health. *Climacteric* 2012;15(3):281-287.
- Burke GL, Evans GW, Riley WA, Sharrett AR, Howard G, Barnes RW, Rosamond W, Crow RS, Rautaharju PM, Heiss G. Arterial wall thickness is associated with prevalent cardiovascular disease in middle-aged adults. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Stroke* 1995;26(3):386-391.
- Burns ER, Spaet TH, Stemerman MB. Response of the arterial wall to endothelial removal: an autoradiographic study. *Proc Soc Exp Biol Med* 1978;159(3):473-477.
- Businaro R, Tagliani A, Buttari B, Profumo E, Ippoliti F, Di Cristofano C, Capoano R, Salvati B, Riganò R. Cellular and molecular players in the atherosclerotic plaque progression. *Ann N Y Acad Sci* 2012;1262:134-141.
- Byington RP, Furberg CD, Crouse JR 3rd, Espeland MA, Bond MG. Pravastatin, Lipids, and Atherosclerosis in the Carotid Arteries (PLAC-II). *Am J Cardiol* 1995;76(9):54C-59C.
- Bystrevskaya VB, Lichkun VV, Krushinsky AV, Smirnov VN. Centriole modification in human aortic endothelial cells. *J Struct Biol* 1992;109(1):1-12.
- Campbell JH, Campbell GR. The cell biology of atherosclerosis—new developments. *Aust N Z J Med* 1997;27(4):497-500.
- Campbell JH, Campbell GR. Biology of the vessel wall and atherosclerosis. *Clin Exp Hypertens A* 1989;11(5-6):901-913.

- Campbell JH, Efendy JL, Han C, Girjes AA, Campbell GR. Haemopoietic origin of myofibroblasts formed in the peritoneal cavity in response to a foreign body. *J Vasc Res* 2000;37(5):364-371.
- Canner PL, Berge KG, Wenger NK, Stamler J, Friedman L, Prineas RJ, Friedewald W. Fifteen year mortality in Coronary Drug Project patients: long-term benefit with niacin. *J Am Coll Cardiol* 1986;8(6):1245-1255.
- Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH, Grayston JT, Muhlestein B, Giugliano RP, Cairns R, Skene AM; Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy-Thrombolysis in Myocardial Infarction 22 Investigators. Antibiotic treatment of Chlamydia pneumoniae after acute coronary syndrome. *N Engl J Med* 2005;352(16):1646-1654.
- Carroll MD, Kit BK, Lacher DA, Shero ST, Mussolino ME. Trends in lipids and lipoproteins in US adults, 1988-2010. *JAMA* 2012;308(15):1545-1554.
- Cassatella MA. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today* 1995;16(1):21-26.
- Catapano AL. Calcium antagonists and atherosclerosis. Experimental evidence. *Eur Heart J* 1997;18 Suppl A:A80-A86.
- Chambless LE, Zhong MM, Arnett D, Folsom AR, Riley WA, Heiss G. Variability in B-mode ultrasound measurements in the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Ultrasound Med Biol* 1996;22(5):545-554.
- Chambless LE, Heiss G, Folsom AR, Rosamond W, Szklo M, Sharrett AR, Clegg LX. Association of coronary heart disease incidence with carotid arterial wall thickness and major risk factors: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study, 1987-1993. *Am J Epidemiol* 1997;146(6):483-494.

- Chambless LE, Folsom AR, Clegg LX, Sharrett AR, Shahar E, Nieto FJ, Rosamond WD, Evans G. Carotid wall thickness is predictive of incident clinical stroke: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Am J Epidemiol* 2000;151(5):478-487.
- Chambless LE, Folsom AR, Davis V, Sharrett R, Heiss G, Sorlie P, Szklo M, Howard G, Evans GW. Risk factors for progression of common carotid atherosclerosis: the Atherosclerosis Risk in Communities Study, 1987-1998. *Am J Epidemiol* 2002;155(1):38-47.
- Chan FK, Goto S, Wu MS, Abola MT, Yeoh KG, Sutrisna B, Chua SS, Mahachai V, Turajane T, Wu B, Zeng QY, Sugano K. Burden of nonsteroidal anti-inflammatory and antiplatelet drug use in Asia: a multidisciplinary working party report. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012;10(7):753-760.
- Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979 Jul;59(3):527-605.
- Chapman MJ, Caslake M, Packard C, McTaggart F. New dimension of statin action on ApoB atherogenicity. *Clin Cardiol* 2003;26(1 Suppl 1):I7- I10.
- Chazov EI, Orekhov AN, Tertov VV, Pokrovsky SN, Adamova IYu, Lyakishev AA, Gratsianski NA, Nechaev AS, Perova NV, Khashimov KhA, Kurdanov KhA, Kukharchuk VV, Smirnov VN. Atherogenicity of blood plasma from patients with coronary atherosclerosis and its correction. *Atherosclerosis Reviews*. Vol. 17. Lipoproteins and Atherosclerosis. RI Levy, AN Klimov, VN Smirnov, HA Tyroler (eds). Raven Press, New York, 1988:9-20
- Chazov EI, Tertov VV, Orekhov AN, Lyakishev AA, Perova NV, Kurdanov KhA, Khashimov KhA, Novikov ID, Smirnov VN. Ath-

- erogenicity of blood serum from patients with coronary heart disease. *Lancet* 1986;2(8507):595-598.
- Chemnitz J, Collatz Christensen B. Repair in arterial tissue. Demonstration of fibronectin in the normal and healing rabbit thoracic aorta by the indirect immunoperoxidase technique. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1983;399(3):307-316.
- Chen RM, Fischer-Dzoga K. Effect of hyperlipemic serum lipoproteins on the lipid accumulation and cholesterol flux of rabbit aortic medial cells. *Atherosclerosis* 1977;28(3):339-353.
- Chen W, Thoburn CJ, Miura Y, Sommer M, Hruban R, Qian Z, Baldwin W, Hess AD. Autoimmune-mediated vasculopathy. *Clin Immunol* 2001;100(1):57-70.
- Chen YL, Yang YJ, Li YP, Chen YT, Ding YZ, Lin SJ. Role of endothelial cell mitosis in transendothelial transport of low density lipoprotein in hypercholesterolemic and normal rabbits. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* 1996;58(2):71-78.
- Chen YL, Jan KM, Lin HS, Chien S. Relationship between endothelial cell turnover and permeability to horseradish peroxidase. *Atherosclerosis* 1997;133(1):7-14.
- Chen ZY, Jiao R, Ma KY. Cholesterol-lowering nutraceuticals and functional foods. *J Agric Food Chem* 2008;56(19):8761-8773.
- Cheung MC, Austin MA, Moulin P, Wolf AC, Cryer D, Knopp RH. Effects of pravastatin on apolipoprotein-specific high density lipoprotein subpopulations and low density lipoprotein subclass phenotypes in patients with primary hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1993;102(1):107-119.
- Childs B, Emanuel D. Cytomegalovirus infection and compromise. *Exp. Hematol* 1993;21:198-200.
- Chistiakov DA, Sobenin IA, Bobryshev YV, Orekhov AN. Mitochondrial dysfunction and mitochondrial DNA mutations in athero-



- sclerotic complications in diabetes. *World J Cardiol* 2012;4(5):148-156.
- Collen D, Juhan-Vague I. Fibrinolysis and atherosclerosis. *Semin Thromb Hemost* 1988;14(2):180-183.
- Collins T, Ginsburg D, Boss JM, Orkin SH, Pober JS. Cultured human endothelial cells express platelet-derived growth factor B chain: cDNA cloning and structural analysis. *Nature* 1985;316(6030):748-750.
- Comparato C, Altana C, Bellosta S, Baetta R, Paoletti R, Corsini A. Clinically relevant pleiotropic effects of statins: drug properties or effects of profound cholesterol reduction? *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2001;11(5):328-343.
- Cooke JP, Bhatnagar R, Szuba A, Rockson SG. Fibroblast growth factor as therapy for critical limb ischemia: a case report. *Vasc Med* 1999;4(2):89-91.
- Cornhill JF, Herderick EE, Stary HC. Topography of human aortic sudanophilic lesions. *Monogr Atheroscler* 1990;15:13-19.
- Cornhill JF, Roach MR. Quantitative method for the evaluation of atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 1974;20(1):131-136.
- Cotton R, Wartman WB. Endothelial patterns in human arteries. Their relationship to age, vessel site and atherosclerosis. *Arch Pathol* 1961;71:3-12.
- Couchman JR, Gibson WT, Thom D, Weaver AC, Rees DA, Parish WE. Fibronectin distribution in epithelial and associated tissues of the rat. *Arch Dermatol Res* 1979;266(3):295-310.
- Coutard M, Osborne-Pellegrin MJ. "Spontaneous" endothelial injury and lipid accumulation in the rat caudal artery. *Am J Pathol* 1986;122(1):120-128.
- Craven TE, Ryu JE, Espeland MA, Kahl FR, McKinney WM, Toole JF, McMahan MR, Thompson CJ, Heiss G, Crouse JR 3rd.

- Evaluation of the associations between carotid artery atherosclerosis and coronary artery stenosis. A case-control study. *Circulation* 1990;82(4):1230-1242.
- Crouse JR 3rd, Byington RP, Bond MG, Espeland MA, Craven TE, Sprinkle JW, McGovern ME, Furberg CD. Pravastatin, Lipids, and Atherosclerosis in the Carotid Arteries (PLAC-II). *Am J Cardiol* 1995;75(7):455-459.
- Crouse JR 3rd, Raichlen JS, Riley WA, Evans GW, Palmer MK, O'Leary DH, Grobbee DE, Bots ML; METEOR Study Group. Effect of rosuvastatin on progression of carotid intima-media thickness in low-risk individuals with subclinical atherosclerosis: the METEOR Trial. *JAMA* 2007;297(12):1344-1353.
- Curtiss LK, Witztum JL. Plasma apolipoproteins AI, AII, B, CI, and E are glucosylated in hyperglycemic diabetic subjects. *Diabetes* 1985;34(5):452-461.
- Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991;251(4995):788-791.
- D'Agostino RB Sr, Grundy S, Sullivan LM, Wilson P; CHD Risk Prediction Group. Validation of the Framingham coronary heart disease prediction scores: results of a multiple ethnic groups investigation. *JAMA* 2001;286(2):180-187.
- Danesh J. Antibiotics in the prevention of heart attacks. *Lancet* 2005;365(9457):365-367.
- Daugherty A, Webb NR, Rateri DL, King VL. Thematic review series: The immune system and atherogenesis. Cytokine regulation of macrophage functions in atherogenesis. *J Lipid Res* 2005;46(9):1812-1822.

- Davidson MH, Maki KC, Dicklin MR, Feinstein SB, Witchger M, Bell M, McGuire DK, Provost JC, Liker H, Aviram M. Effects of consumption of pomegranate juice on carotid intima-media thickness in men and women at moderate risk for coronary heart disease. *Am J Cardiol* 2009;104(7):936-942.
- Davies MJ, Woolf N, Rowles P, Richardson PD. Lipid and cellular constituents of unstable human aortic plaques. *Basic Res Cardiol* 1994;89 Suppl 1:33-39.
- Davies PF. Vascular cell interactions with special reference to the pathogenesis of atherosclerosis. *Lab Invest* 1986;55(1):5-24.
- Davies PF, Remuzzi A, Gordon EJ, Dewey CF Jr, Gimbrone MA Jr. Turbulent fluid shear stress induces vascular endothelial cell turnover in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83(7):2114-2117.
- Davignon J. Methods and endpoint issues in clinical development of lipid-acting agents with pleiotropic effects. *Am J Cardiol* 1998;81(8A):17F-24F.
- De Groot E, Jukema JW, Montauban van Swijndregt AD, Zwinderman AH, Ackerstaff RG, van der Steen AF, Bom N, Lie KI, Bruschke AV. B-mode ultrasound assessment of pravastatin treatment effect on carotid and femoral artery walls and its correlations with coronary arteriographic findings: a report of the Regression Growth Evaluation Statin Study (REGRESS). *J Am Coll Cardiol* 1998; 31 (7) :1561-1567.
- de Kleijn MJ, Bots ML, Bak AA, Westendorp IC, Planellas J, Coelingh Bennink HJ, Witteman JC, Grobbee DE. Hormone replacement therapy in perimenopausal women and 2-year change of carotid intima-media thickness. *Maturitas* 1999;32(3):195-204.

- de Roos B. A key role for dietary bioactives in the prevention of atherosclerosis. *Mol Nutr Food Res* 2012;56(7):1001-1002.
- de Villiers TJ, Stevenson JC. The WHI: the effect of hormone replacement therapy on fracture prevention. *Climacteric* 2012;15(3):263-266.
- Dewberry R, Holden H, Crossman D, Francis S. Interleukin-1 receptor antagonist expression in human endothelial cells and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20(11):2394-2400.
- Díaz-Flores L, Gutiérrez R, Varela H, Rancel N, Valladares F. Microvascular pericytes: a review of their morphological and functional characteristics. *Histol Histopathol* 1991;6(2):269-286.
- Díaz-Flores L, Gutierrez R, Lopez-Alonso A, Gonzalez R, Varela H. Pericytes as a supplementary source of osteoblasts in periosteal osteogenesis. *Clin Orthop Relat Res* 1992;(275):280-286.
- Díaz-Flores L, Gutiérrez R, Madrid JF, Varela H, Valladares F, Acosta E, Martín-Vasallo P, Díaz-Flores L Jr. Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. *Histol Histopathol* 2009;24(7):909-969.
- Dimmeler S, Zeiher AM. Reactive oxygen species and vascular cell apoptosis in response to angiotensin II and pro-atherosclerotic factors. *Regul Pept* 2000;90(1-3):19-25.
- Doerr W. Arteriosclerosis without end. Principles of pathogenesis and an attempt at a nosologic classification. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1978;380(2):91-106.
- Doherty EA, Doudna JA. Ribozyme structures and mechanisms. *Annu Rev Biochem* 2000; 69:597-615.

- Downs JR, Clearfield M, Weis S, Whitney E, Shapiro DR, Beere PA, Langendorfer A, Stein EA, Kruyer W, Gotto AM Jr. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. JAMA 1998;279(20):1615-1622.
- Duff GL, McMillan GC, Ritchie AC. The morphology of early atherosclerotic lesions of the aorta demonstrated by the surface technique in rabbits fed cholesterol; together with a description of the anatomy of the intima of the rabbit's aorta and the spontaneous lesions which occur in it. Am J Pathol 1957;33(5):845-873.
- Duggal K, Tandon HD, Karmarkar MG, Ramalingaswami V. Diffuse intimal thickening of the aorta in India and its relation to atherosclerosis. J Pathol Bacteriol 1966;92(1):49-56.
- Dzau VJ, Mann MJ, Ehsan A, Griese DP. Gene therapy and genomic strategies for cardiovascular surgery: The emerging field of surgenomics. J Thorac Cardiovasc Surg 2001;121(2):206-216.
- Dzau VJ. Predicting the future of human gene therapy for cardiovascular diseases: what will the management of coronary artery disease be like in 2005 and 2010? Am J Cardiol 2003;92(9B):32N-35N.
- Ehsan A, Mann MJ, Dell'Acqua G, Dzau VJ. Long-term stabilization of vein graft wall architecture and prolonged resistance to experimental atherosclerosis after E2F decoy oligonucleotide gene therapy. J Thorac Cardiovasc Surg 2001;121(4):714-722.
- Elhage R, Maret A, Pieraggi MT, Thiers JC, Arnal JF, Bayard F. Differential effects of interleukin-1 receptor antagonist and tumor

- necrosis factor binding protein on fatty-streak formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 1998;97(3):242-244.
- Ellis MJ, Suman VJ, Hoog J, Lin L, Snider J, Prat A, Parker JS, Luo J, DeSchryver K, Allred DC, Esserman LJ, Unzeitig GW, Margenthaler J, Babiera GV, Marcom PK, Guenther JM, Watson MA, Leitch M, Hunt K, Olson JA. Randomized phase II neoadjuvant comparison between letrozole, anastrozole, and exemestane for postmenopausal women with estrogen receptor-rich stage 2 to 3 breast cancer: clinical and biomarker outcomes and predictive value of the baseline PAM50-based intrinsic subtype--ACOSOG Z1031. *J Clin Oncol* 2011;29(17):2342-2349.
- Ellison RC. Cheers! *Epidemiology* 1990;1(5):337-339.
- El-Sayyad HI, Abou-El-Naga AM, Gadallah AA, Bakr IH. Protective effects of *Allium sativum* against defects of hypercholesterolemia on pregnant rats and their offspring. *Int J Clin Exp Med* 2010;3(2):152-163.
- Emeson EE, Robertson AL Jr. T lymphocytes in aortic and coronary intimas. Their potential role in atherogenesis. *Am J Pathol* 1988;130(2):369-376.
- Empana JP, Ducimetière P, Arveiler D, Ferrières J, Evans A, Ruidavets JB, Haas B, Yarnell J, Bingham A, Amouyel P, Dallongeville J; PRIME Study Group. Are the Framingham and PROCAM coronary heart disease risk functions applicable to different European populations? The PRIME Study. *Eur Heart J* 2003;24(21):1903-1911.
- Epstein SE, Zhu J, Najafi AH, Burnett MS. Insights into the role of infection in atherogenesis and in plaque rupture. *Circulation* 2009;119(24):3133-3141.

- Esato K, Hamano K, Li TS, Furutani A, Seyama A, Takenaka H, Zempo N. Neovascularization induced by autologous bone marrow cell implantation in peripheral arterial disease. *Cell Transplant* 2002;11(8):747-752.
- Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Rotheneder M. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic Res Commun* 1989;6(1):67-75.
- Faggiotto A. Smooth muscle cell proliferation in atherosclerosis. *Agents Actions Suppl* 1988;26:201-221.
- Faggiotto A, Ross R. Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque. *Arteriosclerosis* 1984;4(4):341-356.
- Faggiotto A, Ross R, Harker L. Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Changes that lead to fatty streak formation. *Arteriosclerosis* 1984;4(4):323-340.
- Falcone DJ, Mated N, Shio H, Minick CR, Fowler SD. Lipoprotein-heparin-fibronectin-denatured collagen complexes enhance cholesteryl ester accumulation in macrophages. *J Cell Biol* 1984;99(4 Pt 1):1266-1274.
- Farmer JA. Pleiotropic effects of statins. *Curr Atheroscler Rep* 2000;2(3):208-217.
- Fei W, Tong T, Yifeng P, Jingli T, Weizhong G, Guangyu T, Daoying G, Yingsheng C. A modified rabbit model of carotid atherosclerotic plaque suitable for the stroke study and MRI evaluation. *Int J Neurosci* 2011;121(12):662-669.
- Filonzi EL, Zoellner H, Stanton H, Hamilton JA. Cytokine regulation of granulocyte-macrophage colony stimulating factor and macrophage colony-stimulating factor production in human arterial smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 1993;99(2):241-252.

- Fisher EA, Feig JE, Hewing B, Hazen SL, Smith JD. High-density lipoprotein function, dysfunction, and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32(12):2813-2820.
- Fogelman AM, Shechter I, Seager J, Hokom M, Child JS, Edwards PA. Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77(4):2214-2218.
- Fortuin FD, Vale P, Losordo DW, Symes J, DeLaria GA, Tyner JJ, Schaer GL, March R, Snell RJ, Henry TD, Van Camp J, Lopez JJ, Richenbacher W, Isner JM, Schatz RA. One-year follow-up of direct myocardial gene transfer of vascular endothelial growth factor-2 using naked plasmid deoxyribonucleic acid by way of thoracotomy in no-option patients. *Am J Cardiol* 2003;92(4):436-439.
- Fowler S, Shio H, Haley NJ. Characterization of lipid-laden aortic cells from cholesterol-fed rabbits. IV. Investigation of macrophage-like properties of aortic cell populations. *Lab Invest* 1979;41(4):372-378.
- Freedman DS, Newman WP 3rd, Tracy RE, Voors AE, Srinivasan SR, Webber LS, Restrepo C, Strong JP, Berenson GS. Black-white differences in aortic fatty streaks in adolescence and early adulthood: the Bogalusa Heart Study. *Circulation* 1988;77(4):856-864.
- Frick MH, Elo O, Haapa K, Heinonen OP, Heinsalmi P, Helo P, Huttunen JK, Kaitaniemi P, Koskinen P, Manninen V, et al. Helsinki Heart Study: primary-prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia. Safety of treatment,



- changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease. *N Engl J Med* 1987;317(20):1237-1245.
- Friedman M, Byers SO. Endothelial permeability in atherosclerosis. *Arch Pathol* 1963;76:99-105.
- Friedman MH, Henderson JM, Aukerman JA, Clingan PA. Effect of periodic alterations in shear on vascular macromolecular uptake. *Biorheology* 2000;37(4):265-277.
- Fry DL. Arterial intimal-medial permeability and coevolving structural responses to defined shear-stress exposures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283(6):H2341- H2355.
- Furberg CD, Psaty BM, Meyer JV. Nifedipine. Dose-related increase in mortality in patients with coronary heart disease. *Circulation* 1995;92(5):1326-1331.
- Furchgott RF, Jothianandan D, Cherry PD. Endothelium-dependent responses: the last three years. *Bibl Cardiol* 1984;(38):1-15.
- Fuster V, Gotto AM Jr. Risk reduction. *Circulation* 2000;102(20 Suppl 4):IV94-IV102.
- Gabella G. Smooth muscle cell junctions and structural aspects of contraction. *Br Med Bull* 1979;35(3):213-218.
- Gaede P, Vedel P, Larsen N, Jensen GV, Parving HH, Pedersen O. Multifactorial intervention and cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2003;348(5):383-393.
- Geer JC, Haust MD. Smooth muscle cells in atherosclerosis. Karger, Basel, 1972.
- Geer JC. Fine structure of human aortic intimal thickening and fatty streaks. *Lab Invest* 1965;14(10):1764-1783.
- Geroulakos G, O'Gorman D, Nicolaides A, Sheridan D, Elkeles R, Shaper AG. Carotid intima-media thickness: correlation with

- the British Regional Heart Study risk score. *J Intern Med* 1994a;235(5):431-433.
- Geroulakos G, O'Gorman DJ, Kalodiki E, Sheridan DJ, Nicolaides AN. The carotid intima-media thickness as a marker of the presence of severe symptomatic coronary artery disease. *Eur Heart J* 1994b;15(6):781-785.
- Giessler Ch, Fahr A, Tertov VV, Kudryashov SA, Orekhov AN, Smirnov VN, Mest H-J. Trapidil derivatives as potential anti-atherosclerotic drugs. *Arzneimittelforschung* 1987; 37-I: 538-541.
- Gimbrone MA Jr. Endothelial dysfunction and atherosclerosis. *J Card Surg* 1989;4(2):180-183.
- Ginter E. The epidemic of cardiovascular disease in Eastern Europe. *N Engl J Med* 1997;336(26):1915-1916.
- Goldschmidt-Clermont PJ. Loss of bone marrow-derived vascular progenitor cells leads to inflammation and atherosclerosis. *Am Heart J* 2003;146(4Suppl):S5-S12.
- Goldstein JL, Brown MS. Regulation of low-density lipoprotein receptors: implications for pathogenesis and therapy of hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Circulation* 1987;76(3):504-507.
- Goldstein JL, Brown MS. Lipoprotein receptors and the control of plasma LDL cholesterol levels. *Eur Heart J* 1992;13 Suppl B:34-36.
- Goldstein JL, Anderson RG, Brown MS. Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. *Nature* 1979a;279(5715):679-685.
- Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated

- low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979b;76(1):333-337.
- Goldstein JL, Anderson RG, Brown MS. Receptor-mediated endocytosis and the cellular uptake of low density lipoprotein. *Ciba Found Symp* 1982;(92):77-95.
- Goldstein JL, Brown MS, Anderson RG, Russell DW, Schneider WJ. Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu Rev Cell Biol* 1985;1:1-39.
- Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med* 1977;62(5):707-714.
- Görög P, Kakkar VV. Increased uptake of monocyte-treated low density lipoproteins by aortic endothelium in vivo. *Atherosclerosis* 1987;65(1-2):99-107.
- Görög P, Pearson JD. Surface determinants of low density lipoprotein uptake by endothelial cells. *Atherosclerosis* 1984;53(1):21-29.
- Görög P, Pearson JD. Sialic acid moieties on surface glycoproteins protect endothelial cells from proteolytic damage. *J Pathol* 1985;146(3):205-212.
- Görög P, Pearson JD, Kakkar VV. Generation of reactive oxygen metabolites by phagocytosing endothelial cells. *Atherosclerosis* 1988;72(1):19-27.
- Gotto AM Jr, Moon JE. Recent clinical studies of the effects of lipid-modifying therapies. *Am J Cardiol* 2012;110(1 Suppl):15A-26A.
- Gotto AM Jr. Dyslipidemia and atherosclerosis. A forecast of pharmaceutical approaches. *Circulation* 1993;87(4 Suppl):III54-III59.

- Gotto Jr AM Jr, Farmer JA. Pleiotropic effects of statins: do they matter? *Curr Opin Lipidol* 2001;12(4):391-394.
- Gough PJ, Raines EW. Gene therapy of apolipoprotein E-deficient mice using a novel macrophage-specific retroviral vector. *Blood* 2003;101:485-491.
- Gown AM, Tsukada T, Ross R. Human atherosclerosis. II. Immunocytochemical analysis of the cellular composition of human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1986;125(1):191-207.
- Grayston JT, Kronmal RA, Jackson LA, Parisi AF, Muhlestein JB, Cohen JD, Rogers WJ, Crouse JR, Borrowdale SL, Schron E, Knirsch C; ACES Investigators. Azithromycin for the secondary prevention of coronary events. *N Engl J Med* 2005;352(16):1637-1645.
- Greenland P, Gidding SS, Tracy RP. Commentary: lifelong prevention of atherosclerosis: the critical importance of major risk factor exposures. *Int J Epidemiol* 2002;31(6):1129-1134.
- Grines CL, Watkins MW, Helmer G, Penny W, Brinker J, Marmur JD, West A, Rade JJ, Marrott P, Hammond HK, Engler RL. Angiogenic Gene Therapy (AGENT) trial in patients with stable angina pectoris. *Circulation* 2002;105(11):1291-1297.
- Grines C, Rubanyi GM, Kleiman NS, Marrott P, Watkins MW. Angiogenic gene therapy with adenovirus 5 fibroblast growth factor-4 (Ad5FGF-4): a new option for the treatment of coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2003a;92(9B):24N-31N.
- Grines CL, Watkins MW, Mahmarian JJ et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of Ad5FGF-4 gene therapy and its effect on myocardial perfusion in patients with stable angina. *J Am Coll Cardiol* 2003b; 42:1339-1347.
- Griese DP, Ehsan A, Melo LG, Kong D, Zhang L, Mann MJ, Pratt RE, Mulligan RC, Dzau VJ. Isolation and transplantation of au-

- ologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy. *Circulation* 2003;108(21):2710-2715.
- Grobbbee DE, Bots ML. Statin treatment and progression of atherosclerotic plaque burden. *Drugs* 2003;63(9):893-911.
- Gross L, Epstein EZ, Kugel MA. Histology of the Coronary Arteries and their Branches in the Human Heart. *Am J Pathol* 1934;10(2):253-274.
- Grundy SM, Vega GL. What is meant by overproduction of apo B-containing lipoproteins? *Adv Exp Med Biol* 1991;285:213-222.
- Haberland ME, Fogelman AM. The role of altered lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. *Am Heart J* 1987;113(2 Pt 2):573-577.
- Haberland ME, Olch CL, Fogelman AM. Role of lysines in mediating interaction of modified low density lipoproteins with the scavenger receptor of human monocyte macrophages. *J Biol Chem* 1984;259(18):11305-11311.
- Haffner SM. Management of dyslipidemia in adults with diabetes. *Diabetes Care* 1998;21(1):160-178.
- Haller H. Endothelial function. General considerations. *Drugs* 1997;53 Suppl 1:1-10.
- Ham AW. Histology, Lippincott, Philadelphia, 1974.
- Ham AW, Cormack DH. Histology, Lippincott, Philadelphia, 1979.
- Hamano K, Nishida M, Hirata K, Mikamo A, Li TS, Harada M, Miura T, Matsuzaki M, Esato K. Local implantation of autologous bone marrow cells for therapeutic angiogenesis in patients with ischemic heart disease: clinical trial and preliminary results. *Jpn Circ J* 2001;65(9):845-847.

- Hamilton J.A. Colony-stimulating factors, cytokines and monocyte-macrophages some controversies. *Immunol. Today* 1993; 14:18-24.
- Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vase Biol* 2001; 21:1876-1890.
- Hansson GK. Vaccination against atherosclerosis: science or fiction? *Circulation* 2002; 106:1599-1601.
- Hansson GK, Jonasson L, Lojsthe B, Stemme S, Kocher O, Gabiani G. Localization of T lymphocytes and macrophages in fibrous and complicated human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 1988;72(2-3):135-141.
- Hansson GK, Holm J, Jonasson L. Detection of activated T lymphocytes in the human atherosclerotic plaque. *Am J Pathol* 1989;135(1):169-175.
- Hansson GK, Seifert PS, Olsson G, Bondjers G. Immunohistochemical detection of macrophages and T lymphocytes in atherosclerotic lesions of cholesterol-fed rabbits. *Arterioscler Thromb* 1991;11(3):745-750.
- Hansson GK, Libby P, Schönbeck U, Yan ZQ. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res* 2002;91(4):281-291.
- Haust MD, More R, Movat HZ. The role of smooth muscle cells in the fibrogenesis of atherosclerosis. *Am J Pathol* 1960;37: 377-389.
- Haust MD. Complications of atherosclerosis in the human abdominal aorta. *Monogr Atheroscler* 1986;14:43-48.
- Haust MD. Ciliated smooth muscle cells in atherosclerotic lesions of human aorta. *Am J Cardiovasc Pathol* 1987;1(1):115-129.
- Haust MD. Recent concepts on the pathogenesis of atherosclerosis. *CMAJ* 1989;140(8):929.

- Hayashidani S, Tsutsui H, Shiomi T, Ikeuchi M, Matsusaka H, Suematsu N, Wen J, Egashira K, Takeshita A. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. *Circulation* 2003;108(17):2134-2140.
- Hazel AL, Grzybowski DM, Friedman MH. Modeling the adaptive permeability response of porcine iliac arteries to acute changes in mural shear. *Ann Biomed Eng* 2003;31(4):412-419.
- Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart Protection Study of antioxidant vitamin supplementation in 20,536 high-risk individuals: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet* 2002;360(9326):23-33.
- Hedblad B, Wikstrand J, Janzon L, Wedel H, Berglund G. Low-dose metoprolol CR/XL and fluvastatin slow progression of carotid intima-media thickness: Main results from the Beta-Blocker Cholesterol-Lowering Asymptomatic Plaque Study (BCAPS). *Circulation* 2001;103(13):1721-1726.
- Hedman M, Hartikainen J, Syväne M, Stjernvall J, Hedman A, Kivelä A, Vanninen E, Mussalo H, Kauppila E, Simula S, Närvänen O, Rantala A, Peuhkurinen K, Nieminen MS, Laakso M, Ylä-Herttuala S. Safety and feasibility of catheter-based local intracoronary vascular endothelial growth factor gene transfer in the prevention of postangioplasty and in-stent restenosis and in the treatment of chronic myocardial ischemia: phase II results of the Kuopio Angiogenesis Trial (KAT). *Circulation* 2003;107(21):2677-2683.
- Heinroth-Hoffmann I, Kruger J, Tertov VV, Orekhov AN, Mest H-J. Influence of trapidil and trapidil derivatives on the content of cyclic nucleotides in human intima cells cultured from atherosclerotic plaques. *Drug Devel Res* 1990;19(4):321-327.

- Henry TD, Annex BH, McKendall GR, Azrin MA, Lopez JJ, Giordano FJ, Shah PK, Willerson JT, Benza RL, Berman DS, Gibson CM, Bajamonde A, Rundle AC, Fine J, McCluskey ER; VIVA Investigators. The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation* 2003;107(10):1359-1365.
- Hense HW, Schulte H, Löwel H, Assmann G, Keil U. Framingham risk function overestimates risk of coronary heart disease in men and women from Germany--results from the MONICA Augsburg and the PROCAM cohorts. *Eur Heart J* 2003;24(10):937-945.
- Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003;348(7):593-600.
- Himburg HA, Grzybowski DM, Hazel AL, LaMack JA, Li XM, Friedman MH. Spatial comparison between wall shear stress measures and porcine arterial endothelial permeability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286(5):H1916- H1922.
- Hoak JC. Platelets and atherosclerosis. *Semin Thromb Hemost* 1988;14(2):202-205.
- Hodis HN. Reversibility of atherosclerosis--evolving perspectives from two arterial imaging clinical trials: the cholesterol lowering atherosclerosis regression study and the monitored atherosclerosis regression study. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995;25 Suppl 4:S25-S31.
- Hodis HN, Mack WJ, LaBree L, Selzer RH, Liu C, Liu C, Alaupovic P, Kwong-Fu H, Azen SP. Reduction in carotid arterial wall thickness using lovastatin and dietary therapy: a randomized controlled clinical trial. *Ann Intern Med* 1996;124(6):548-556.



- Hodis HN, Mack WJ, LaBree L, Selzer RH, Liu CR, Liu CH, Azen SP. The role of carotid arterial intima-media thickness in predicting clinical coronary events. *Ann Intern Med* 1998;128(4):262-269.
- Hodis HN, Mack WJ, Lobo RA, Shoupe D, Sevanian A, Mahrer PR, Selzer RH, Liu CrCR, Liu Ch CH, Azen SP; Estrogen in the Prevention of Atherosclerosis Trial Research Group. Estrogen in the prevention of atherosclerosis. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 2001;135(11):939-953.
- Holman RL, McGill HC Jr, Strong JP, Geer JC. Observations on the natural history of atherosclerosis. *J La State Med Soc* 1958;110(11):361-369.
- Huang J, Ito Y, Morikawa M, Uchida H, Kobune M, Sasaki K, Abe T, Hamada H. Bcl-xL gene transfer protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;311(1):64-70.
- Hunink MG, Goldman L, Tosteson AN, Mittleman MA, Goldman PA, Williams LW, Tsevat J, Weinstein MC. The recent decline in mortality from coronary heart disease, 1980-1990. The effect of secular trends in risk factors and treatment. *JAMA* 1997;277(7):535-542.
- Hynes RO, Yamada KM. Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. *J Cell Biol* 1982;95(2 Pt 1):369-377.
- Inaba S, Egashira K, Komori K. Peripheral-blood or bone-marrow mononuclear cells for therapeutic angiogenesis? *Lancet* 2002;360(9350):2083.
- International Task Force for Prevention of Coronary Heart Disease. Pocket guide to prevention of coronary heart disease. Grunwald, Germany: Borm Bruckmeier Verlag GmbH, 2003.

- Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, Blair R, Haley L, Asahara T, Rosenfield K, Razvi S, Walsh K, Symes JF. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. *Lancet* 1996;348(9024):370-374.
- Isoda K, Shiigai M, Ishigami N, Matsuki T, Horai R, Nishikawa K, Kusuhara M, Nishida Y, Iwakura Y, Ohsuzu F. Deficiency of interleukin-1 receptor antagonist promotes neointimal formation after injury. *Circulation* 2003;108(5):516-518.
- Iwaguro H, Yamaguchi J, Kalka C, Murasawa S, Masuda H, Hayashi S, Silver M, Li T, Isner JM, Asahara T. Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. *Circulation* 2002;105(6):732-738.
- Iyama K, Ohzono K, Usuku G. Electron microscopical studies on the genesis of white adipocytes: differentiation of immature pericytes into adipocytes in transplanted preadipose tissue. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1979;31(2):143-155.
- Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Wilson PW, Rosenberg IH. The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. *N Engl J Med* 1999;340(19):1449-1454.
- Jain M, DerSimonian H, Brenner DA, Ngoy S, Teller P, Edge AS, Zawadzka A, Wetzel K, Sawyer DB, Colucci WS, Apstein CS, Liao R. Cell therapy attenuates deleterious ventricular remodeling and improves cardiac performance after myocardial infarction. *Circulation* 2001;103(14):1920-1927.
- Jensen BA, Hølund B, Clemmensen I. Demonstration of fibronectin in normal and injured aorta by an indirect immunoperoxidase technique. *Histochemistry* 1983;77(3):395-403.
- Jespersen CM, Als-Nielsen B, Damgaard M, Hansen JF, Hansen S, Helø OH, Hildebrandt P, Hilden J, Jensen GB, Kastrup J, Kol-

- mos HJ, Kjølner E, Lind I, Nielsen H, Petersen L, Gluud C; CLARICOR Trial Group. Randomised placebo controlled multicentre trial to assess short term clarithromycin for patients with stable coronary heart disease: CLARICOR trial. *BMJ* 2006;332(7532):22-27.
- Jiang F, Guo Y, Salvemini D, Dusting GJ. Superoxide dismutase mimetic M40403 improves endothelial function in apolipoprotein(E)-deficient mice. *Br J Pharmacol* 2003;139(6):1127-1134.
- Johnson TE, Umbenhauer DR, Hill R, Bradt C, Mueller SN, Levine EM, Nichols WW. Karyotypic and phenotypic changes during in vitro aging of human endothelial cells. *J Cell Physiol* 1992;150(1):17-27.
- Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis* 1986;6(2):131-138.
- Jonasson L, Holm J, Hansson GK. Smooth muscle cells express Ia antigens during arterial response to injury. *Lab Invest* 1988;58(3):310-315.
- Jores L. Herz und Gefasse; in Henke F, Lubarsch F (eds): *Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie*. Springer, Berlin, 1924.
- Jousilahti P, Vartiainen E, Pekkanen J, Tuomilehto J, Sundvall J, Puska P. Serum cholesterol distribution and coronary heart disease risk: observations and predictions among middle-aged population in eastern Finland. *Circulation* 1998;97(11):1087-1094.
- Kaartinen M, Penttilä A, Kovanen PT. Mast cells of two types differing in neutral protease composition in the human aortic intima. Demonstration of tryptase- and tryptase/chymase-containing

- mast cells in normal intimas, fatty streaks, and the shoulder region of atheromas. *Arterioscler Thromb* 1994;14(6):966-972.
- Kacharava AG, Tertov VV, Orekhov AN. Autoantibodies against low-density lipoprotein and atherogenic potential of blood. *Annals of Medicine* 1993;25(6):551-555.
- Kang S, Wu Y, Li X. Effects of statin therapy on the progression of carotid atherosclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis* 2004;177(2):433-442.
- Kannel WB. The worth of controlling plasma lipids. *Am J Cardiol* 1998;81(8):1047-1049.
- Kannel WB. Quest for an optimal population cardiovascular risk factor burden. *Eur Heart J* 2001;22(2):105-107.
- Kannel WB, Ellison RC. Alcohol and coronary heart disease: the evidence for a protective effect. *Clin Chim Acta* 1996;246(1-2):59-76.
- Kannel WB, Larson M. Long-term epidemiologic prediction of coronary disease. The Framingham experience. *Cardiology* 1993;82(2-3):137-152.
- Kannel WB, Wilson PW. An update on coronary risk factors. *Med Clin North Am* 1995;79(5):951-971.
- Kannel WB, Neaton JD, Wentworth D, Thomas HE, Stamler J, Hulley SB, Kjelsberg MO. Overall and coronary heart disease mortality rates in relation to major risk factors in 325,348 men screened for the MRFIT. Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Am Heart J* 1986;112(4):825-836.
- Kannel WB, D'Agostino RB, Sullivan L, Wilson PW. Concept and usefulness of cardiovascular risk profiles. *Am Heart J* 2004;148(1):16-26.
- Karman RJ, Garcia JG, Hart CM. Endothelial cell monolayer dysfunction caused by oxidized low density lipoprotein: attenua-

- tion by oleic acid. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 1997;56(5):345-53.
- Katsuda S, Boyd HC, Fligner C, Ross R, Gown AM. Human atherosclerosis. III. Immunocytochemical analysis of the cell composition of lesions of young adults. Am J Pathol 1992;140(4):907-914.
- Katsuda S, Coltrera MD, Ross R, Gown AM. Human atherosclerosis. IV. Immunocytochemical analysis of cell activation and proliferation in lesions of young adults. Am J Pathol 1993;142(6):1787-1793.
- Keller C, Spengel FA. Changes of atherosclerosis of the carotid arteries due to severe familial hypercholesterolemia following long-term plasmapheresis, assessed by duplex scan. Klin Wochenschr 1988;66(4):149-152.
- Keys A, Menotti A, Aravanis C, Blackburn H, Djordjevic BS, Buzina R, Dontas AS, Fidanza F, Karvonen MJ, Kimura N, et al. The seven countries study: 2,289 deaths in 15 years. Prev Med 1984a;13(2):141-154.
- Keys A, Karvonen MJ, Punsar S, Menotti A, Fidanza F, Farchi G. HDL serum cholesterol and 24-year mortality of men in Finland. Int J Epidemiol 1984b;13(4):428-435.
- Khachigian LM. Catalytic DNAs as potential therapeutic agents and sequence-specific molecular tools to dissect biological function. J Clin Invest 2000;106(10):1189-1195.
- Kim DN, Schmee J, Lee KT, Thomas WA. Atherosclerotic lesions in the coronary arteries of hyperlipidemic swine. Part 1. Cell increases, divisions, losses and cells of origin in first 90 days on diet. Atherosclerosis 1987;64(2-3):231-242.
- Kim DN, Scott RF, Schmee J, Thomas WA. Endothelial cell denudation, labelling indices and monocyte attachment in advanced

- swine coronary artery lesions. *Atherosclerosis* 1988;73(2-3):247-257.
- Kim HJ, Kurup IV. Nonenzymatic glycosylation of human plasma low density lipoprotein. Evidence for in vitro and in vivo glucosylation. *Metabolism* 1982;31(4):348-353.
- Kishikawa H, Shimokama T, Watanabe T. Localization of T lymphocytes and macrophages expressing IL-1, IL-2 receptor, IL-6 and TNF in human aortic intima. Role of cell-mediated immunity in human atherogenesis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1993;423(6):433-442.
- Klatsky AL. Alcohol, coronary disease, and hypertension. *Annu Rev Med* 1996;47:149-160.
- Klimov AN, Nagornev VA. Mechanisms of lipoprotein penetration into the arterial wall leading to development of atherosclerosis. *Atherosclerosis Rev* 1983;11:107-156.
- Koenig W. Inflammation and coronary heart disease: an overview. *Cardiol Rev* 2001;9(1):31-35.
- Kojimahara M, Yamazaki K, Ooneda G. Ultrastructural study of hemangiomas. 1. Capillary hemangioma of the skin. *Acta Pathol Jpn* 1981;31(1):105-115.
- Koscielny J, Klüssendorf D, Latza R, Schmitt R, Radtke H, Siegel G, Kiesewetter H. The antiatherosclerotic effect of *Allium sativum*. *Atherosclerosis* 1999;144(1):237-249.
- Koskinen P, Mänttari M, Manninen V, Huttunen JK, Heinonen OP, Frick MH.
- Coronary heart disease incidence in NIDDM patients in the Helsinki Heart Study. *Diabetes Care* 1992;15(7):820-825.
- Krauss RM, Eckel RH, Howard B, Appel LJ, Daniels SR, Deckelbaum RJ, Erdman JW Jr, Kris-Etherton P, Goldberg IJ, Kotchen TA, Lichtenstein AH, Mitch WE, Mullis R, Robinson K,

- Wyllie-Rosett J, St Jeor S, Suttie J, Tribble DL, Bazzarre TL. AHA Dietary Guidelines: revision 2000: A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association. *Stroke* 2000;31(11):2751-2766.
- Krauss RM, Burke DJ. Identification of multiple subclasses of plasma low density lipoproteins in normal humans. *J Lipid Res* 1982;23(1):97-104.
- Kreger BE, Kannel WB, Cupples LA. Electrocardiographic precursors of sudden unexpected death: the Framingham Study. *Circulation* 1987;75(3 Pt 2):II22-II24.
- Kritchevsky D. Dietary protein and experimental atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1993;676:180-187.
- Krolewski AS, Warram JH, Valsania P, Martin BC, Laffel LM, Christlieb AR. Evolving natural history of coronary artery disease in diabetes mellitus. *Am J Med* 1991;90(2A):56S-61S.
- Kroon AA, van Asten WN, Stalenhoef AF. Effect of apheresis of low-density lipoprotein on peripheral vascular disease in hypercholesterolemic patients with coronary artery disease. *Ann Intern Med* 1996;125(12):945-954.
166. Krushinsky AV, Orekhov AN, Smirnov VN. Stellate cells in the intima of human aorta. Application of alkaline dissociation method in the analysis of the vessel wall cellular content. *Acta Anat* 1983;117(3):266-269.
174. Kudryashov SA, Tertov VV, Orekhov AN, Geling NG, Smirnov VN. Regression of atherosclerotic manifestations in primary culture of human aortic cells: effects of prostaglandins. *Biomed Biochim Acta* 1984;43(8/9):S284-S286.
- Kuller LH, Ockene JK, Meilahn E, Wentworth DN, Svendsen KH, Neaton JD. Cigarette smoking and mortality. MRFIT Research Group. *Prev Med* 1991;20(5):638-654.

- Kutryk MJ, Foley DP, van den Brand M, Hamburger JN, van der Giessen WJ, deFeyter PJ, Bruining N, Sabate M, Serruys PW; ITALICS Trial. Local intracoronary administration of antisense oligonucleotide against c-myc for the prevention of in-stent restenosis: results of the randomized investigation by the Thoraxcenter of antisense DNA using local delivery and IVUS after coronary stenting (ITALICS) trial. *J Am Coll Cardiol* 2002;39(2):281-287.
- Kuusisto J, Mykkanen L, Pyörälä K, Laakso M. NIDDM and its metabolic control predict coronary heart disease in elderly subjects. *Diabetes* 1994;43(8):960-967.
- La Belle M, Krauss RM. Differences in carbohydrate content of low density lipoproteins associated with low density lipoprotein subclass patterns. *J Lipid Res* 1990;31(9):1577-1588.
- Lacolley P, Regnault V, Nicoletti A, Li Z, Michel JB. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles. *Cardiovasc Res* 2012;95(2):194-204.
- Langhans TH. Beitrage zur normalen und pathologischen Anatomie der Arterien. *Virchows Arch [A]* 1866;36:187-226.
- LaRosa JC, Hunninghake D, Bush D, Criqui MH, Getz GS, Gotto AM Jr, Grundy SM, Rakita L, Robertson RM, Weisfeldt ML, et al. The cholesterol facts. A summary of the evidence relating dietary fats, serum cholesterol, and coronary heart disease. A joint statement by the American Heart Association and the National Heart, Lung, and Blood Institute. The Task Force on Cholesterol Issues, American Heart Association. *Circulation* 1990;81(5):1721-1733.
- Lathi KG, Vale PR, Losordo DW, Cespedes RM, Symes JF, Esakof DD, Maysky M, Isner JM. Gene therapy with vascular endothelial growth factor for inoperable coronary artery disease: anes-



- thetic management and results. *Anesth Analg* 2001;92(1):19-25.
- Laufs U, Liao JK. Direct vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Trends Cardiovasc Med* 2000;10(4):143-148.
- Lavu M, Bhushan S, Lefer DJ. Hydrogen sulfide-mediated cardioprotection: mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci (Lond)* 2011;120(6):219-229.
- Layne MD, Patel A, Chen YH, Rebel VI, Carvajal IM, Pellacani A, Ith B, Zhao D, Schreiber BM, Yet SF, Lee ME, Storch J, Perrella MA. Role of macrophage-expressed adipocyte fatty acid binding protein in the development of accelerated atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *FASEB J* 2001;15(14):2733-2735.
- Lazarous DF, Unger EF, Epstein SE, Stine A, Arevalo JL, Chew EY, Quyyumi AA. Basic fibroblast growth factor in patients with intermittent claudication: results of a phase I trial. *J Am Coll Cardiol* 2000;36(4):1239-1244.
- Le Goff W, Guerin M, Chapman MJ. Pharmacological modulation of cholesteryl ester transfer protein, a new therapeutic target in atherogenic dyslipidemia. *Pharmacol Ther* 2004;101(1):17-38.
- Lederman RJ, Mendelsohn FO, Anderson RD, Saucedo JF, Tenaglia AN, Hermiller JB, Hillegass WB, Rocha-Singh K, Moon TE, Whitehouse MJ, Annex BH; TRAFFIC Investigators. Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomised trial. *Lancet* 2002;359(9323):2053-2058.
- Ledet T, Rasmussen LM, Heickendorff L, Barfod K, Thøgersen VB. The nature of large vessel disease in diabetes mellitus. *J Diabet Complications* 1990;4(2):63-65.

- Lee KT, Lee KJ, Lee SK, Imai H, O'Neal RM. Poorly differentiated subendothelial cells in swine aortas. *Exp Mol Pathol* 1970;13(1):118-129.
- Lee M, Rentz J, Bikram M, Han S, Bull DA, Kim SW. Hypoxia-inducible VEGF gene delivery to ischemic myocardium using water-soluble lipopolymer. *Gene Ther* 2003a;10(18):1535-1542.
- Lee M, Rentz J, Han SO, Bull DA, Kim SW. Water-soluble lipopolymer as an efficient carrier for gene delivery to myocardium. *Gene Ther* 2003b;10(7):585-593.
- Lei YP, Liu CT, Sheen LY, Chen HW, Lii CK. Diallyl disulfide and diallyl trisulfide protect endothelial nitric oxide synthase against damage by oxidized low-density lipoprotein. *Mol Nutr Food Res* 2010;54 Suppl 1:S42-S52.
- Li HR, Tertov VV, Vasil'ev AV, Tutel'yan VA, Orekhov AN. Anti-atherogenic and antiatherosclerotic effects of mushroom extracts revealed in human aortic intima cell culture. *Drug Devel Res* 1989;17(2):109-117.
- Li Q, Guo Y, Xuan YT, Lowenstein CJ, Stevenson SC, Prabhu SD, Wu WJ, Zhu Y, Bolli R. Gene therapy with inducible nitric oxide synthase protects against myocardial infarction via a cyclooxygenase-2-dependent mechanism. *Circ Res* 2003;92(7):741-748.
- Li Y, Takemura G, Kosai K, Yuge K, Nagano S, Esaki M, Goto K, Takahashi T, Hayakawa K, Koda M, Kawase Y, Maruyama R, Okada H, Minatoguchi S, Mizuguchi H, Fujiwara T, Fujiwara H. Postinfarction treatment with an adenoviral vector expressing hepatocyte growth factor relieves chronic left ventricular remodeling and dysfunction in mice. *Circulation* 2003;107(19):2499-2506.

- Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* 1995;91(11):2844-50.
- Libby P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am J Clin Nutr* 2006;83(2):456S-460S.
- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32(9):2045-2051.
- Libby P, Ridker PM, Hansson GK; Leducq Transatlantic Network on Atherothrombosis. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol* 2009;54(23):2129-2138.
- Libby P, DiCarli M, Weissleder R. The vascular biology of atherosclerosis and imaging targets. *J Nucl Med* 2010a;51 Suppl 1:33S-37S.
- Libby P, Okamoto Y, Rocha VZ, Folco E. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. *Circ J* 2010b;74(2):213-220.
- Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 2011;473(7347):317-325.
- Lichtenstein AH, Kennedy E, Barrier P, Danford D, Ernst ND, Grundy SM, Leveille GA, Van Horn L, Williams CL, Booth SL. Dietary fat consumption and health. *Nutr Rev* 1998;56(5 Pt 2):S3-S19.
- Lin PJ, Chang CH. Endothelium dysfunction in cardiovascular diseases. *Changcheng Yi Xue Za Zhi* 1994;17(3):198-210.
- Lindberg G, Råstam L, Gullberg B, Lundblad A, Nilsson-Ehle P, Hanson BS. Serum concentrations of total sialic acid and sialoglycoproteins in relation to coronary heart disease risk markers. *Atherosclerosis* 1993;103(2):123-129.

- Linder E, Stenman S, Lehto VP, Vaheri A. Distribution of fibronectin in human tissues and relationship to other connective tissue components. *Ann N Y Acad Sci* 1978;312:151-159.
- Loaldi A, Polese A, Montorsi P, De Cesare N, Fabbicocchi F, Ravagnani P, Guazzi MD. Comparison of nifedipine, propranolol and isosorbide dinitrate on angiographic progression and regression of coronary arterial narrowings in angina pectoris. *Am J Cardiol* 1989;64(8):433-439.
- Loewenstein WR. Junctional intercellular communication and the control of growth. *Biochim Biophys Acta* 1979;560(1):1-65.
- Lonn E, Yusuf S, Dzavik V, Doris C, Yi Q, Smith S, Moore-Cox A, Bosch J, Riley W, Teo K; SECURE Investigators. Effects of ramipril and vitamin E on atherosclerosis: the study to evaluate carotid ultrasound changes in patients treated with ramipril and vitamin E (SECURE). *Circulation* 2001;103(7):919-925.
- Lonn EM, Yusuf S, Jha P, Montague TJ, Teo KK, Benedict CR, Pitt B. Emerging role of angiotensin-converting enzyme inhibitors in cardiac and vascular protection. *Circulation* 1994;90(4):2056-2069.
- Lopes-Virella MF, Klein RL, Lyons TJ, Stevenson HC, Witztum JL. Glycosylation of low-density lipoprotein enhances cholesteryl ester synthesis in human monocyte-derived macrophages. *Diabetes* 1988;37(5):550-557.
- Losordo DW, Vale PR, Hendel RC, Milliken CE, Fortuin FD, Cummings N, Schatz RA, Asahara T, Isner JM, Kuntz RE. Phase 1/2 placebo-controlled, double-blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation* 2002;105(17):2012-2018.

- Losordo DW, Vale PR, Symes JF, Dunnington CH, Esakof DD, Maysky M, Ashare AB, Lathi K, Isner JM. Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation* 1998;98(25):2800-2804.
- Lowe HC, Chesterman CN, Khachigian LM. Catalytic antisense DNA molecules targeting Egr-1 inhibit neointima formation following permanent ligation of rat common carotid arteries. *Thromb Haemost* 2002;87(1):134-140.
- Lyons TJ, Klein RL, Baynes JW, Stevenson HC, Lopes-Virella MF. Stimulation of cholesteryl ester synthesis in human monocyte-derived macrophages by low-density lipoproteins from type 1 (insulin-dependent) diabetic patients: the influence of non-enzymatic glycosylation of low-density lipoproteins. *Diabetologia* 1987;30()916-923.
- MacIntyre A, Hammond CJ, Little CS, Appelt DM, Balin BJ. Chlamydia pneumoniae infection alters the junctional complex proteins of human brain microvascular endothelial cells. *FEMS Microbiol Lett* 2002;217(2):167-172.
- MacMahon S, Sharpe N, Gamble G, Hart H, Scott J, Simes J, White H. Effects of lowering average of below-average cholesterol levels on the progression of carotid atherosclerosis: results of the LIPID Atherosclerosis Substudy. LIPID Trial Research Group. *Circulation* 1998;97(18):1784-1790.
- Madri JA, Dreyer B, Pitlick FA, Furthmayr H. The collagenous components of the subendothelium. Correlation of structure and function. *Lab Invest* 1980;43(4):303-315.
- Mahley RW, Innerarity TL, Weisgraber KB, Oh SY. Altered metabolism (in vivo and in vitro) of plasma lipoproteins after selective

- chemical modification of lysine residues of the apoproteins. *J Clin Invest* 1979;64(3):743-750.
- Maier JA, Statuto M, Ragnotti G. Senescence stimulates U937-endothelial cell interactions. *Exp Cell Res* 1993;208(1):270-274.
- Mäkinen K, Manninen H, Hedman M, Matsi P, Mussalo H, Alhava E, Ylä-Herttuala S. Increased vascularity detected by digital subtraction angiography after VEGF gene transfer to human lower limb artery: a randomized, placebo-controlled, double-blinded phase II study. *Mol Ther* 2002;6(1):127-133.
- Malik AB, Lynch JJ, Cooper JA. Endothelial barrier function. *J Invest Dermatol* 1989;93(2 Suppl):62S-67S.
- Mancini D, Pinney S, Burkhoff D, LaManca J, Itescu S, Burke E, Edwards N, Oz M, Marks AR. Use of rapamycin slows progression of cardiac transplantation vasculopathy. *Circulation* 2003;108(1):48-53.
- Mancini GB, Miller ME, Evans GW, Byington R, Furberg CD, Pitt B; PREVENT Study Group. Prospective randomized evaluation of the vascular effects of norvasc. Post hoc analysis of coronary findings from the prospective randomized evaluation of the vascular effects of the Norvasc trial (PREVENT). *Am J Cardiol* 2002;89(12):1414-1416.
- Mancini GB, Pitt B. Coronary angiographic changes in patients with cardiac events in the Prospective Randomized Evaluation of the Vascular Effects of Norvasc Trial (PREVENT). *Am J Cardiol* 2002;90(7):776-778.
- Mann MJ, Gibbons GH, Kernoff RS, Diet FP, Tsao PS, Cooke JP, Kaneda Y, Dzau VJ. Genetic engineering of vein grafts resistant to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(10):4502-4506.

- Mann MJ, Whittemore AD, Donaldson MC, Belkin M, Conte MS, Polak JF, Orav EJ, Ehsan A, Dell'Acqua G, Dzau VJ. Ex-vivo gene therapy of human vascular bypass grafts with E2F decoy: the PREVENT single-centre, randomised, controlled trial. *Lancet* 1999;354(9189):1493-1498.
- Marmot MG, Elliott P. Public health measures for blood pressure control in the whole community. *Clin Exp Hypertens A*. 1989;11(5-6):1171-1186.
- Maron R, Sukhova G, Faria AM, Hoffmann E, Mach F, Libby P, Weiner HL. Mucosal administration of heat shock protein-65 decreases atherosclerosis and inflammation in aortic arch of low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* 2002;106(13):1708-1715.
- Masood DE, Roach EC, Beauregard KG, Khalil RA. Impact of sex hormone metabolism on the vascular effects of menopausal hormone therapy in cardiovascular disease. *Curr Drug Metab* 2010;11(8):693-714.
- Maximow A. Binbegewebe und blutbildende Gewebe; in Anonymous *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*. Arch Exper Zellforsch, 1927.
- McCullagh KG, Duance VC, Bishop KA. The distribution of collagen types I, III and V (AB) in normal and atherosclerotic human aorta. *J Pathol* 1980;130(1):45-55.
- McFarlane SI, Muniyappa R, Francisco R, Sowers JR. Clinical review 145: Pleiotropic effects of statins: lipid reduction and beyond. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(4):1451-1458.
- McGill HC Jr, McMahan CA, Gidding SS. Preventing heart disease in the 21st century: implications of the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) study. *Circulation* 2008;117(9):1216-1227.

- McGill HC Jr. George Lyman Duff memorial lecture. Persistent problems in the pathogenesis of atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1984;4(5):443-451.
- McMahan CA, Gidding SS, Malcom GT, Tracy RE, Strong JP, McGill HC Jr; Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth Research Group. Pathobiological determinants of atherosclerosis in youth risk scores are associated with early and advanced atherosclerosis. *Pediatrics* 2006;118(4):1447-1455.
- McTavish D, Sorkin EM. Pravastatin. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in hypercholesterolaemia. *Drugs* 1991;42(1):65-89.
- Melnick JL, Adam E, Debaeky ME. Cytomegalovirus and atherosclerosis. *Eur Heart J* 1993;14(suppl K):30-38.
- Mercuri M., Bond M.G., Sirtori C.R. Pravastatin reduces carotid intima-media thickness progression in an asymptotic hypercholesterolemic mediterranean population: the Carotid Atherosclerosis Italian Ultrasound Study. *Am J Med* 1996; 101(6):627-634.
- Mitchell JR, Schwartz CJ. Relationship between arterial disease in different sites. A study of the aorta and coronary, carotid, and iliac arteries. *Br Med J* 1962;1(5288):1293-1301.
- Mittleman MA, Maclure M, Tofler GH, Sherwood JB, Goldberg RJ, Muller JE. Triggering of acute myocardial infarction by heavy physical exertion. Protection against triggering by regular exertion. Determinants of Myocardial Infarction Onset Study Investigators. *N Engl J Med* 1993;329(23):1677-1683.
- Mittleman MA, Siscovick DS. Physical exertion as a trigger of myocardial infarction and sudden cardiac death. *Cardiol Clin* 1996;14(2):263-270.



- Molenaar R, Visser WJ, Verkerk A, Koster JF, Jongkind JF. Peroxidative stress and in vitro ageing of endothelial cells increases the monocyte-endothelial cell adherence in a human in vitro system. *Atherosclerosis* 1989;76(2-3):193-202.
- Morishita R. Recent progress in gene therapy for cardiovascular disease. *Circ J* 2002;66(12):1077-1086.
- Morishita R, Kaneda Y, Ogiwara T. Therapeutic potential of oligonucleotide-based therapy in cardiovascular disease. *BioDrugs* 2003;17(6):383-389.
- Movat HZ, More RH, Haust MD. The diffuse intimal thickening of the human aorta with aging. *Am J Pathol* 1958;34(6):1023-1031.
- Moyer CF, Sajuthi D, Tulli H, Williams JK. Synthesis of IL-1 alpha and IL-1 beta by arterial cells in atherosclerosis. *Am J Pathol* 1991;138(4):951-960.
- Muhs A, Heublein B, Schletter J, Herrmann A, Rüdiger M, Sturm M, Grust A, Malms J, Schrader J, von der Leyen HE. Preclinical evaluation of inducible nitric oxide synthase lipoplex gene therapy for inhibition of stent-induced vascular neointimal lesion formation. *Hum Gene Ther* 2003;14(4):375-383.
- Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group. Multiple risk factor intervention trial. Risk factor changes and mortality results. *JAMA* 1982;248(12):1465-1477.
- Munro JM, van der Walt JD, Munro CS, Chalmers JA, Cox EL. An immunohistochemical analysis of human aortic fatty streaks. *Hum Pathol* 1987;18(4):375-380.
- Nagy J, Csiky B, Kovacs T, Wittmann I. Endothelial dysfunction. *Orv Hetil* 2001;142(31):1667-1672.
- Nakamura H, Sakurai I. Intimal cell population and location in arteries of Japanese children and youth. *Angiology* 1992;43(3 Pt 1):229-243.

- Natali PG, Galloway D, Nicotra MR, De Martino C. Topographic association of fibronectin with elastic fibers in the arterial wall. An immunohistochemical study. *Connect Tissue Res* 1981;8(3-4):199-204.
- National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection E.a.T.o.H.B.C.i.A.A.T.P.I. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002;106(25):3143-3421.
- Nayak RC, Berman AB, George KL, Eisenbarth GS, King GL. A monoclonal antibody (3G5)-defined ganglioside antigen is expressed on the cell surface of microvascular pericytes. *J Exp Med* 1988;167(3):1003-1015.
- Nestel PJ. Lipoprotein protein receptors and their relation to atherosclerosis. *Circ Res* 1980;46(6 Pt 2):I106- I109.
- Nicoletti A, Caligiuri G, Hansson GK. Immunomodulation of atherosclerosis: myth and reality. *J Intern Med* 2000;247(3):397-405.
- Nissen SE, Tsunoda T, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Cooper CJ, Yasin M, Eaton GM, Lauer MA, Sheldon WS, Grines CL, Halpern S, Crowe T, Blankenship JC, Kerensky R. Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003;290(17):2292-2300.
- Nofer JR, Levkau B, Wolinska I, Junker R, Fobker M, von Eckardstein A, Seedorf U, Assmann G. Suppression of endothelial cell apoptosis by high density lipoproteins (HDL) and HDL-associated lysosphingolipids. *J Biol Chem* 2001;276(37):34480-34485.

- Oalmann MC, Strong JP, Tracy RE, Malcom GT. Atherosclerosis in youth: are hypertension and other coronary heart disease risk factors already at work? *Pediatr Nephrol* 1997;11(1):99-107.
- Ockene JK, Kuller LH, Svendsen KH, Meilahn E. The relationship of smoking cessation to coronary heart disease and lung cancer in the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *Am J Public Health* 1990;80(8):954-958.
- O'Connor CM, Dunne MW, Pfeffer MA, Muhlestein JB, Yao L, Gupta S, Benner RJ, Fisher MR, Cook TD; Investigators in the WIZARD Study. Azithromycin for the secondary prevention of coronary heart disease events: the WIZARD study: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003;290(11):1459-1466.
- O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, Manolio TA, Burke GL, Wolfson SK Jr. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. *N Engl J Med* 1999;340(1):14-22.
- O'Malley JP, Illingworth DR. Apolipoprotein epsilon 4 and coronary artery disease. *Lancet* 1992;340(8831):1350-1351.
- O'Neal RM. Derivation of intimal smooth muscle cells in normal arteries and atherosclerotic plaques. An overview. *Prog Biochem Pharmacol* 1977;13:69-72.
- Orekhov AN. In vitro models of antiatherosclerotic effects of cardiovascular drugs. *Am J Cardiol* 1990;66(21):231-281.
- Orekhov AN, Kosykh VA, Repin VS, Smirnov VN. Cell proliferation in normal and atherosclerotic human aorta. II. Autoradiographic observation on deoxyribonucleic acid synthesis in primary cell culture. *Lab Invest* 1983a;48(6):749-754.
- Orekhov AN, Tertov VV, Smirnov VN. Prostacyclin analogues as anti-atherosclerotic drugs. *Lancet* 1983b;2(8348):521.

- Orekhov AN, Andreeva ER, Shekhonin BV, Tertov VV, Smirnov VN. Content and localization of fibronectin in normal intima, atherosclerotic plaque, and underlying media of human aorta. *Atherosclerosis* 1984a;53(2):213-219.
- Orekhov AN, Andreeva ER, Tertov VV, Krushinsky AV. Dissociated cells from different layers of adult human aortic wall. *Acta Anat (Basel)* 1984b;119(2):99-105.
- Orekhov AN, Karpova II, Tertov VV, Rudchenko SA, Andreeva ER, Krushinsky AV, Smirnov VN. Cellular composition of atherosclerotic and uninvolved human aortic subendothelial intima. Light-microscopic study of dissociated aortic cells. *Am J Pathol* 1984c;115(1):17-24.
- Orekhov AN, Andreeva ER, Krushinsky AV, Smirnov VN: Primary cultures of enzyme-isolated cells from normal and atherosclerotic human aorta. *Med Biol* 1984d;62(4):255-259.
- Orekhov AN, Misharin AYu, Tertov VV, Khashimov KhA, Pokrovsky SN, Repin VS, Smirnov VN. Artificial HDL as an anti-atherosclerotic drug. *Lancet* 1984e;2(8412):1149-1150.
- Orekhov AN, Tertov VV, Novikov ID, Krushinsky AV, Andreeva ER, Lankin VZ, Smirnov VN. Lipids in cells of atherosclerotic and uninvolved human aorta. I. Lipid composition of aortic tissue and enzyme isolated and cultured cells. *Exp Mol Pathol* 1985a;42(1):117-137.
- Orekhov AN, Tertov VV, Smirnov VN. Lipids in cells of atherosclerotic and uninvolved human aorta. II. Lipid metabolism in primary culture. *Exp Mol Pathol* 1985b;43(2):187-195.
- Orekhov AN, Andreeva ER, Krushinsky AV, Novikov ID, Tertov VV, Nestaiko GV, Khashimov KhA, Repin VS, Smirnov VN: Intimal cells and atherosclerosis. Relationship between the number of

- intimal cells and major manifestations of atherosclerosis in the human aorta. *Am J Pathol* 1986a;125(2):402-415.
- Orekhov AN, Tertov VV, Kudryashov SA, Khashimov KhA, Smirnov VN. Primary culture of human aortic intima cells as a model for testing antiatherosclerotic drugs. Effects of cyclic AMP, prostaglandins, calcium antagonists, antioxidants, and lipid-lowering agents. *Atherosclerosis* 1986b;60(2):101-110.
- Orekhov AN, Krushinsky AV, Andreeva ER, Repin VS, Smirnov VN: Adult human aortic cells in primary culture: heterogeneity in shape. *Heart Vessels* 1986c;2(4):193-201.
- Orekhov AN, Tertov VV, Khashimov KhA, Kudryashov SA, Smirnov VN. Antiatherosclerotic effects of verapamil in primary culture of human aortic intimal cells. *J Hypertension* 1986d;4(suppl 6): S153- S155.
- Orekhov AN, Tertov VV, Mazurov AV, Andreeva ER, Repin VS, Smirnov VN. "Regression" of atherosclerosis in cell culture: effects of stable prostacyclin analogues. *Drug Devel Res* 1986e;9(3):189-201.
- Orekhov AN, Andreeva ER, Tertov VV: The distribution of cells and chemical components in the intima of human aorta. *Soc Med Rev A Cardiol* 1987a;1:75-100.
- Orekhov AN, Tertov VV, Mukhin DN, Koteliansky VE, Glukhova MA, Khashimov KhA, Smirnov VN. Association of low-density lipoprotein with particulate connective tissue matrix components enhances cholesterol accumulation in cultured subendothelial cells of human aorta. *Biochim Biophys Acta* 1987b;928(3):251-258.
- Orekhov AN, Tertov VV, Khashimov KhA, Kudryashov SA, Smirnov VN. Evidence of anti-atherosclerotic action of verapamil from

- direct effects on arterial cells. *Am J Cardiol* 1987c;59(5):495-496.
- Orekhov AN, Tertov VV, Pokrovsky SN, Adamova IYu, Martsenyuk ON, Lyakishev AA, Smirnov VN. Blood serum atherogenicity associated with coronary atherosclerosis. Evidence for non-lipid factor providing atherogenicity of low-density lipoproteins and an approach to its elimination. *Circ Res* 1988a;62(3):421-429.
- Orekhov AN, Baldenkov GN, Tertov VV, Li Hwa Ryong, Kozlov SG, Lyakishev AA, Tkachuk VA, Ruda MYa, Smirnov VN. Cardiovascular drugs and atherosclerosis: effects of calcium antagonists, beta-blockers, and nitrates on atherosclerotic characteristics of human aortic cells. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 1988b;12(Suppl 6):S66-S68.
- Orekhov AN, Ruda MYa, Baldenkov GN, Tertov VV, Khashimov KhA, Li HR, Lyakishev AA, Kozlov SG, Tkachuk VA, Smirnov VN. Atherogenic effects of beta blockers on cells cultured from normal and atherosclerotic aorta. *Am J Cardiol* 1988c;61(13):1116-1117.
- Orekhov AN, Tertov VV, Mukhin DN, Koteliansky VE, Glukhova MA, Frid MG, Sukhova GK, Khashimov KhA, Smirnov VN. Insolubilization of low density lipoprotein induces cholesterol accumulation in cultured subendothelial cells of human aorta. *Atherosclerosis* 1989a;79(1):59-70.
- Orekhov AN, Tertov VV, Mukhin DN, Mikhailenko IA. Modification of low density lipoprotein by desialylation causes lipid accumulation in cultured cells. Discovery of desialylated lipoprotein with altered cellular metabolism in the blood of atherosclerotic patients. *Biochem Biophys Res Commun* 1989b;162(1):206-211.

- Orekhov A, Tertov V, Mukhin D. Atherogenic changes in arterial cells caused by modified (desialylated) low density lipoprotein circulating in the blood of atherosclerotic patients. *Advances in Vascular Pathology* 1989. Proceedings of the 15th World Congress of the International Union of Angiology, Rome 17-22 September 1989. Volume 2. A Strano, S Novo (eds). Excerpta Medica, Amsterdam, New York, Oxford, 1989, 1369-1374.
- Orekhov AN, Tertov VV, Kudryashov SA, Smirnov VN. Triggerlike stimulation of cholesterol accumulation and DNA and extracellular matrix synthesis induced by atherogenic serum or low density lipoprotein in cultured cells. *Circ Res* 1990a;66(2):311-320.
- Orekhov AN, Baldenkov GN, Tertov VV, Ruda MYa, Khashimov KhA, Kudryashov SA, Li HR, Kozlov SG, Lyakishev AA, Tkachuk VA, Smirnov VN. Antiatherosclerotic effects of calcium antagonists. Study in human aortic cell culture. *Herz* 1990b;15(2):139-145.
- Orekhov AN, Tertov VV, Mukhin DN. Desialylated low density lipoprotein - naturally occurring lipoprotein with atherogenic potency. *Atherosclerosis* 1991a;86(2):153-161.
- Orekhov AN, Kalenich OS, Tertov VV, Novikov ID. Lipoprotein immune complexes as markers of atherosclerosis. *Int J Tissue React* 1991b;13(5):233-236.
- Orekhov AN, Tertov VV, Kabakov AE, Adamova IYu, Pokrovsky SN, Smirnov VN. Autoantibodies against modified low density lipoprotein. Nonlipid factor of blood plasma that stimulates foam cell formation. *Arterioscler Thromb* 1991c;11(2):316-326.
- Orekhov A.N., Tertov V.V. Atherogenic factors of blood: desialylated LDL and anti-LDL autoantibodies. New aspects of metabolism and behavior of mesenchymal cells during the pathogenesis of

- arteriosclerosis. Hauss W.H., Wissler R.W., Bauch H.-J., Eds. Westdeutscher Verlag, Dusseldorf, 1991d, 73-85.
- Orehhov AN, Kalenich OS, Tertov VV, Perova NV, Novikov ID, Lya-kishev AA, Deev AD, Ruda MYa. Diagnostic value of immune cholesterol as a marker for atherosclerosis. *J Cardiovasc Risk* 1995;2(5):459-466.
- Orehhov AN, Grünwald J. Effects of garlic on atherosclerosis. *Nutrition* 1997;13(7-8):656-663.
- Orehhov AN, Andreeva ER, Mikhailova IA, Gordon D. Cell proliferation in normal and atherosclerotic human aorta: proliferative splash in lipid-rich lesions. *Atherosclerosis* 1998;139(1):41-48.
- Orehhov AN, Andreeva ER, Andrianova IV, Bobryshev YV. Peculiarities of cell composition and cell proliferation in different type atherosclerotic lesions in carotid and coronary arteries. *Atherosclerosis* 2010;212(2):436-443.
- Orehhov AN, Sobenin IA, Korneev NV, Kirichenko TV, Myasoedova VA, Melnichenko AA, Balcells M, Edelman ER, Bobryshev YV. Anti-Atherosclerotic Therapy Based on Botanicals. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov* 2012 [Epub ahead of print]
- Orlandi A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Spagnoli LG. Aging, smooth muscle cells and vascular pathobiology: implications for atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2006;188(2):221-230.
- Owens GK, Hollis TM. Relationship between inhibition of aortic histamine formation, aortic albumin permeability and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1979;34(4):365- 373.
- Paffenbarger RS Jr, Hyde RT, Wing AL, Hsieh CC. Physical activity, all-cause mortality, and longevity of college alumni. *N Engl J Med* 1986;314(10):605-613.
- Pahor M, Psaty BM, Alderman MH, Applegate WB, Williamson JD, Furberg CD. Therapeutic benefits of ACE inhibitors and other



- antihypertensive drugs in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2000;23(7):888-892.
- Palatini P. Elevated heart rate in cardiovascular diseases: a target for treatment? *Prog Cardiovasc Dis* 2009;52(1):46-60.
- Palinski W, Rosenfeld ME, Ylä-Herttuala S, Gurtner GC, Socher SS, Butler SW, Parthasarathy S, Carew TE, Steinberg D, Witztum JL. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(4):1372-1376.
- Palman C, Bowen-Pope DF, Brooks JJ. Platelet-derived growth factor receptor (beta-subunit) immunoreactivity in soft tissue tumors. *Lab Invest* 1992;66(1):108-115.
- Parker F, Odland GF. A correlative histochemical, biochemical and electron microscopic study of experimental atherosclerosis in the rabbit aorta with special reference to the myo-intimal cell. *Am J Pathol* 1966;48(2):197-239.
- Pearson T.A., Laurora I., Chu H., Kafonek S. The lipid treatment assessment project (L-TAP): a multicenter survey to evaluate the percentages of dyslipidemic patients receiving lipid-lowering therapy and achieving low-density lipoprotein cholesterol goals. *Arch Intern Med* 2000;160(4):459-467.
- Pecher P, Schumacher BA. Angiogenesis in ischemic human myocardium: clinical results after 3 years. *Ann Thorac Surg* 2000;69(5):1414-1419.
- Pedersen O., Gaede P. Intensified multifactorial intervention and cardiovascular outcome in type 2 diabetes: the Steno-2 study. *Metabolism* 2003;52(8 Suppl 1):19-23.
- Pellegrini CN, Vittinghoff E, Lin F, Hulley SB, Marcus GM. Statin use is associated with lower risk of atrial fibrillation in women with coronary disease: the HERS trial. *Heart* 2009;95(9):704-708.

- Penn MS, Rangaswamy S, Saidel GM, Chisolm GM. Macromolecular transport in the arterial intima: comparison of chronic and acute injuries. *Am J Physiol* 1997;272(4 Pt 2):H1560-1570.
- Persoons MC, Daemen MJ, Bruning JH, Bruggeman CA. Active cytomegalovirus infection of arterial smooth muscle cells in immunocompromised rats. A clue to herpesvirus-associated atherogenesis? *Circ Res* 1994;75(2):214-220.
- Phelps JE, DePaola N. Spatial variations in endothelial barrier function in disturbed flows in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278(2):H469-476.
- Pietilä K, Nikkari T. Role of the arterial smooth muscle cell in the pathogenesis of atherosclerosis. *Med Biol* 1983;61(1):31-44.
- Pignoli P, Tremoli E, Poli A, Oreste P, Paoletti R. Intimal plus medial thickness of the arterial wall: a direct measurement with ultrasound imaging. *Circulation* 1986;74(6):1399-1406.
- Pitt B, Byington RP, Furberg CD, Hunninghake DB, Mancini GB, Miller ME, Riley W. Effect of amlodipine on the progression of atherosclerosis and the occurrence of clinical events. PREVENT Investigators. *Circulation* 2000;102(13):1503-1510.
- Poredos P. Endothelial dysfunction in the pathogenesis of atherosclerosis. *Clin Appl Thromb Hemost* 2001;7(4):276-280.
- Postiglione A, Cortese C, Fischetti A, Cicerano U, Gnasso A, Gallotta G, Grossi D, Mancini M. Plasma lipids and geriatric assessment in a very aged population of south Italy. *Atherosclerosis* 1989;80(1):63-68.
- Poston RN, Haskard DO, Coucher JR, Gall NP, Johnson-Tidey RR. Expression of intercellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 1992;140(3):665-673.

- Prasad K. Natural products in regression and slowing of progression of atherosclerosis. *Curr Pharm Biotechnol* 2010;11(8):794-800.
- Prior JT, Jones DB. Structural alterations within the aortic intima in infancy and childhood. *Am J Pathol* 1952;28(5):937-951.
- Probstfield JL, Margitic SE, Byington RP, Espeland MA, Furberg CD. Results of the primary outcome measure and clinical events from the Asymptomatic Carotid Artery Progression Study. *Am J Cardiol* 1995;76(9):47C-53C.
- Puchtler H, Sweat F, Terry MS, Conner HM. Investigation of staining, polarization and fluorescence-microscopic properties of myoendothelial cells. *J Microsc* 1969;89(1):95-104.
- Puerta-Fernández E, Romero-López C, Barroso-delJesus A, Berzal-Herranz A. Ribozymes: recent advances in the development of RNA tools. *FEMS Microbiol Rev* 2003;27(1):75-97.
- Quillard T, Libby P. Molecular imaging of atherosclerosis for improving diagnostic and therapeutic development. *Circ Res* 2012;111(2):231-244.
- Rabkin SW, Cheng KM. A genetic abnormality of cardiac myocytes from the blind mutant (RC) chick heart: abnormalities of cardiac structure and choline transport. *Basic Res Cardiol* 1992;87(6):610-617.
- Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 2003;9(6):702-712.
- Raidoo DM, Ramsaroop R, Naidoo S, Muller-Esterl W, Bhoola KD. Kinin receptors in human vascular tissue: their role in atherosclerotic disease. *Immunopharmacology* 1997;36(2-3):153-160.

- Rainsford KD. Anti-inflammatory drugs in the 21st century. *Subcell Biochem* 2007;42:3-27.
- Rajagopalan S, Mohler E 3rd, Lederman RJ, Saucedo J, Mendelsohn FO, Olin J, Blebea J, Goldman C, Trachtenberg JD, Pressler M, Rasmussen H, Annex BH, Hirsch AT; Regional Angiogenesis With Vascular Endothelial Growth Factor trial. Regional Angiogenesis with Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in peripheral arterial disease: Design of the RAVE trial. *Am Heart J* 2003;145(6):1114-1118.
- Rajagopalan S, Shah M, Luciano A, Crystal R, Nabel EG. Adenovirus-mediated gene transfer of VEGF(121) improves lower-extremity endothelial function and flow reserve. *Circulation* 2001;104(7):753-755.
- Reidy MA. A reassessment of endothelial injury and arterial lesion formation. *Lab Invest* 1985;53(5):513-520.
- Reilly KB, Srinivasan S, Hatley ME, Patricia MK, Lannigan J, Bolick DT, Vandenhoff G, Pei H, Natarajan R, Nadler JL, Hedrick CC. 12/15-Lipoxygenase activity mediates inflammatory monocyte/endothelial interactions and atherosclerosis in vivo. *J Biol Chem* 2004;279(10):9440-9450.
- Reinhart KM, Talati R, White CM, Coleman CI. The impact of garlic on lipid parameters: a systematic review and meta-analysis. *Nutr Res Rev* 2009;22(1):39-48.
- Rekhter MD, Andreeva ER, Mironov AA, Orekhov AN: Three-dimensional cytoarchitecture of normal and atherosclerotic intima of human aorta. *Am J Pathol* 1991;138(3):569-580.
- Repin VS, Dolgov VV, Zaikina OE, Novikov ID, Antonov AS, Nikolaeva MA, Smirnov VN. Heterogeneity of endothelium in human aorta. A quantitative analysis by scanning electron microscopy. *Atherosclerosis* 1984;50(1):35-52.

- Riccioni G, Sblendorio V. Atherosclerosis: from biology to pharmacological treatment. *J Geriatr Cardiol* 2012;9(3):305-317.
- Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31(5):986-1000.
- Richardson M, Hadcock SJ, DeReske M, Cybulsky MI. Increased expression in vivo of VCAM-1 and E-selectin by the aortic endothelium of normolipemic and hyperlipemic diabetic rabbits. *Arterioscler Thromb* 1994;14(5):760-769.
- Richter MH, Richter H, Barten M, Schramm D, Weinert M, Gummert J, Mohr FW, Olbrich HG. Cyclosporin A does not enhance the development of transplant vasculopathy: experimental study in a rat cardiac transplant model. *Transplant Proc* 2002;34(5):1479-1480.
- Ridker PM, Howard CP, Walter V, Everett B, Libby P, Hensen J, Thuren T; on behalf of the CANTOS Pilot Investigative Group. Effects of Interleukin-1 $\beta$  Inhibition With Canakinumab on Hemoglobin A1c, Lipids, C-Reactive Protein, Interleukin-6, and Fibrinogen: A Phase IIb Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Circulation* 2012;126(23):2739-2748.
- Ridker PM, Thuren T, Zalewski A, Libby P. Interleukin-1 $\beta$  inhibition and the prevention of recurrent cardiovascular events: rationale and design of the Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS). *Am Heart J* 2011;162(4):597-605.
- Riley WA, Barnes RW, Applegate WB, Dempsey R, Hartwell T, Davis VG, Bond MG, Furberg CD. Reproducibility of noninvasive ultrasonic measurement of carotid atherosclerosis. The Asymptomatic Carotid Artery Plaque Study. *Stroke* 1992;23(8):1062-1068.

- Rimm E.B., Klatsky A., Grobbee D., Stampfer M.J. Review of moderate alcohol consumption and reduced risk of coronary heart disease: is the effect due to beer, wine, or spirits. *BMJ* 1996;312(7033):731-736.
- Rimm EB, Stampfer MJ, Ascherio A, Giovannucci E, Colditz GA, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med* 1993;328(20):1450-1456.
- Rimm EB, Willett WC, Hu FB, Sampson L, Colditz GA, Manson JE, Hennekens C, Stampfer MJ. Folate and vitamin B6 from diet and supplements in relation to risk of coronary heart disease among women. *JAMA* 1998;279(5):359-364.
- Rodriguez C, Raposo B, Martinez-Gonzalez J, Casani L, Badimon L. Low density lipoproteins downregulate lysyl oxidase in vascular endothelial cells and the arterial wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22(9):1409-1414.
- Roessner A, Herrera A, Höning HJ, Vollmer E, Zwadlo G, Schürmann R, Sorg C, Grundmann E. Identification of macrophages and smooth muscle cells with monoclonal antibodies in the human atherosclerotic plaque. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1987;412(2):169-174.
- Romanov YA, Balyasnikova IV, Bystrevskaya VB, Byzova TV, Ilyinskaya OP, Krushinsky AV, Latsis RV, Soboleva EL, Tararak EM, Smirnov VN. Endothelial heterogeneity and intimal blood-borne cells. Relation to human atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1995;748:12-37.
- Rong JX, Rangaswamy S, Shen L, Dave R, Chang YH, Peterson H, Hodis HN, Chisolm GM, Sevanian A. Arterial injury by cholesterol oxidation products causes endothelial dysfunction and ar-

- terial wall cholesterol accumulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18(12):1885-1894.
- Rosei EA, Dal Palù C, Leonetti G, Magnani B, Pessina A, Zanchetti A. Clinical results of the Verapamil inHypertension and Atherosclerosis Study. VHAS Investigators. *J Hypertens* 1997;15(11):1337-1344.
- Rosenfeld ME, Campbell LA. Pathogens and atherosclerosis: update on the potential contribution of multiple infectious organisms to the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2011;106(5):858-867.
- Rosenfeld ME, Ylä-Herttuala S, Lipton BA, Ord VA, Witztum JL, Steinberg D. Macrophage colony-stimulating factor mRNA and protein in atherosclerotic lesions of rabbits and humans. *Am J Pathol* 1992;140(2):291-300.
- Rosengart TK, Lee LY, Patel SR, Kligfield PD, Okin PM, Hackett NR, Isom OW, Crystal RG. Six-month assessment of a phase I trial of angiogenic gene therapy for the treatment of coronary artery disease using direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing the VEGF121 cDNA. *Ann Surg* 1999;230(4):466-470; discussion 470-472.
- Rosengart TK, Lee LY, Patel SR, Sanborn TA, Parikh M, Bergman GW, Hachamovitch R, Szulc M, Kligfield PD, Okin PM, Hahn RT, Devereux RB, Post MR, Hackett NR, Foster T, Grasso TM, Lesser ML, Isom OW, Crystal RG. Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease. *Circulation* 1999;100(5):468-474.

- Ross R. Atherosclerosis: the role of endothelial injury, smooth muscle proliferation and platelet factors. *Triangle* 1976;15(2-3):45-51.
- Ross R. Atherosclerosis: a question of endothelial integrity and growth control of smooth muscle. *Harvey Lect* 1981-1982;77:161-182.
- Ross R. Platelet-derived growth factor. *Annu Rev Med* 1987;38:71-79.
- Ross R. Endothelial dysfunction and atherosclerosis. Endothelial cell dysfunctions. Simionescu M, Simionescu N., Eds., Plenum Press, New York, 1992, 295-307.
- Ross R. Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol* 1995;57:791-804.
- Ross R, Agius L. The process of atherogenesis--cellular and molecular interaction: from experimental animal models to humans. *Diabetologia* 1992;35 Suppl 2:S34- S40.
- Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* 1973;180(4093):1332-1339.
- Ross R, Bowen-Pope D, Raines EW, Faggiotto A. Endothelial injury: blood-vessel wall interactions. *Ann N Y Acad Sci* 1982;401:260-264.
- Ross R, Faggiotto A, Bowen-Pope D, Raines E. The role of endothelial injury and platelet and macrophage interactions in atherosclerosis. *Circulation* 1984a;70(5 Pt 2):III77- III82.
- Ross R, Wight TN, Strandness E, Thiele B. Human atherosclerosis. I. Cell constitution and characteristics of advanced lesions of the superficial femoral artery. *Am J Pathol* 1984b;114(1):79-93.



- Ross R, Bowen-Pope DF, Raines EW. Platelet-derived growth factor and its role in health and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1990;327(1239):155-169.
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993a;362(6423):801-809.
- Ross R. Rous-Whipple Award Lecture. Atherosclerosis: a defense mechanism gone awry. *Am J Pathol* 1993b;143(4):987-1002.
- Ross R. Cellular and molecular studies of atherogenesis. *Atherosclerosis* 1997;131 Suppl:S3-S4.
- Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340(2):115-126.
- Rubins HB, Robins SJ, Collins D, Fye CL, Anderson JW, Elam MB, Faas FH, Linares E, Schaefer EJ, Schectman G, Wilt TJ, Wittes J. Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group. *N Engl J Med* 1999;341(6):410-418.
- Ruel M, Laham RJ, Parker JA, Post MJ, Ware JA, Simons M, Sellke FW. Long-term effects of surgical angiogenic therapy with fibroblast growth factor 2 protein. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;124(1):28-34.
- Russell DW, Lehrman MA, Südhof TC, Yamamoto T, Davis CG, Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. The LDL receptor in familial hypercholesterolemia: use of human mutations to dissect a membrane protein. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986;51 Pt 2:811-819.
- Ryan US. The endothelial surface and responses to injury. *Fed Proc* 1986;45(2):101-108.

- Sachs ES. Effects of autolysis in vitro on the fine structure of human aortic intimal cells. *J Atheroscler Res* 1967;7(5):549-565.
- Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JM, Wun CC, Davis BR, Braunwald E. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med* 1996;335(14):1001-1009.
- Sacks FM, Svetkey LP, Vollmer WM, Appel LJ, Bray GA, Harsha D, Obarzanek E, Conlin PR, Miller ER 3rd, Simons-Morton DG, Karanja N, Lin PH; DASH-Sodium Collaborative Research Group. Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet. DASH-Sodium Collaborative Research Group. *N Engl J Med* 2001;344(1):3-10.
- Saito T, Kuang JQ, Lin CC, Chiu RC. Transcoronary implantation of bone marrow stromal cells ameliorates cardiac function after myocardial infarction. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;126(1):114-123.
- Sakai Y, Kim DK, Iwasa S, Liang J, Watanabe T, Onodera M, Nakauchi H. Bone marrow chimerism prevents atherosclerosis in arterial walls of mice deficient in apolipoprotein E. *Atherosclerosis* 2002;161(1):27-34.
- Salisbury BG, Falcone DJ, Minick CR. Insoluble low-density lipoprotein-proteoglycan complexes enhance cholesteryl ester accumulation in macrophages. *Am J Pathol* 1985;120(1):6-11.
- Salonen JT, Nyyssönen K, Salonen R, Lakka HM, Kaikkonen J, Porkkala-Sarataho E, Voutilainen S, Lakka TA, Rissanen T, Leskinen L, Tuomainen TP, Valkonen VP, Ristonmaa U, Poulsen HE. Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis

- Prevention (ASAP) study: a randomized trial of the effect of vitamins E and C on 3-year progression of carotid atherosclerosis. *J Intern Med* 2000;248(5):377-386.
- Salonen JT, Salonen R. Ultrasound B-mode imaging in observational studies of atherosclerotic progression. *Circulation* 1993;87(3 Suppl):II56- II65.
- Salonen R, Nyssönen K, Porkkala-Sarataho E, Salonen JT. The Kuopio Atherosclerosis Prevention Study (KAPS): effect of pravastatin treatment on lipids, oxidation resistance of lipoproteins, and atherosclerotic progression. *Am J Cardiol* 1995;76(9):34C-39C.
- Salonen R, Nyssönen K, Porkkala E, Rummukainen J, Belder R, Park JS, Salonen JT. Kuopio Atherosclerosis Prevention Study (KAPS). A population-based primary preventive trial of the effect of LDL lowering on atherosclerotic progression in carotid and femoral arteries. *Circulation* 1995;92(7):1758-1764.
- Sazonova M, Budnikov E, Khasanova Z, Sobenin I, Postnov A, Orekhov A. Studies of the human aortic intima by a direct quantitative assay of mutant alleles in the mitochondrial genome. *Atherosclerosis* 2009;204(1):184–190.
- Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994;344(8934):1383-1389.
- Schaefer EJ, Lamon-Fava S, Ausman LM, Ordovas JM, Clevidence BA, Judd JT, Goldin BR, Woods M, Gorbach S, Lichtenstein AH. Individual variability in lipoprotein cholesterol response to National Cholesterol Education Program Step 2 diets. *Am J Clin Nutr* 1997;65(3):823-830.

- Schlingemann RO, Rietveld FJ, de Waal RM, Ferrone S, Ruiter DJ. Expression of the high molecular weight melanoma-associated antigen by pericytes during angiogenesis in tumors and in healing wounds. *Am J Pathol* 1990;136(6):1393-1405.
- Schönbeck U, Sukhova GK, Shimizu K, Mach F, Libby P. Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(13):7458-7463.
- Schönfelder M. Ortologie und Patologie der Langhans-Zellen der Aortenintima des Menschen. *Pathol Microbiol (Basel)*. 1969;33(3):129-145.
- Schrader JW, Moyer C, Ziltener HJ, Reinisch CL. Release of the cytokines colony-stimulating factor-1, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and IL-6 by cloned murine vascular smooth muscle cells. *J Immunol* 1991;146(11):3799-3808.
- Schulman IH, Zachariah M, Raj L. Calcium channel blockers, endothelial dysfunction, and combination therapy. *Aging Clin Exp Res* 2005;17(4 Suppl):40-45.
- Schumacher B, Pecher P, von Specht BU, Stegmann T. Induction of neoangiogenesis in ischemic myocardium by human growth factors: first clinical results of a new treatment of coronary heart disease. *Circulation* 1998;97(7):645-650.
- Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA. A modern view of atherogenesis. *Am J Cardiol* 1993;71(6):9B-14B.
- Schwartz SM. Smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis. *J Clin Invest*. 1997 Dec 1;100(11 Suppl):S87-9.
- Schwartz SM, Benditt EP. Clustering of replicating cells in aortic endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976 Feb;73(2):651-653.
- Schwartz SM, Ross R. Cellular proliferation in atherosclerosis and hypertension. *Prog Cardiovasc Dis* 1984;26(5):355-372.

- Schwartz SM, deBlois D, O'Brien ER. The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis. *Circ Res* 1995;77(3):445-465.
- Schwartz SM, Virmani R, Rosenfeld ME. The good smooth muscle cells in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2000;2(5):422-429.
- Schwarz N. The role of fibrin sealant in osteoinduction. *Ann Chir Gynaecol Suppl.* 1993;207:63-8.
- Scott RF, Jones R, Daoud AS, Zumbo O, Coulston F, Thomas WA. Experimental atherosclerosis in rhesus monkeys. II. Cellular elements of proliferative lesions and possible role of cytoplasmic degeneration in pathogenesis as studied by electron microscopy. *Exp Mol Pathol* 1967;7(1):34-57.
- Scott RF, Kim DN, Schmee J, Thomas WA. Atherosclerotic lesions in coronary arteries of hyperlipidemic swine. Part 2. Endothelial cell kinetics and leukocyte adherence associated with early lesions. *Atherosclerosis* 1986a;62(1):1-10.
- Scott RF, Reidy MA, Kim DN, Schmee J, Thomas WA. Intimal cell mass-derived atherosclerotic lesions in the abdominal aorta of hyperlipidemic swine. Part 2. Investigation of endothelial cell changes and leukocyte adherence associated with early smooth muscle cell proliferative activity. *Atherosclerosis* 1986b;62(1):27-38.
- Scott-Burden T, Vanhoutte PM. Regulation of smooth muscle cell growth by endothelium-derived factors. *Tex Heart Inst J* 1994;21(1):91-97.
- Sedmak DD, Guglielmo AM, Knight DA, Birmingham DJ, Huang EH, Waldman WJ. Cytomegalovirus inhibits major histocompatibility class II expression on infected endothelial cells. *Am J Pathol* 1994a;144(4):683-692.

- Sedmak DD, Knight DA, Vook NC, Waldman JW. Divergent patterns of ELAM-1, ICAM-1, and VCAM-1 expression on cytomegalovirus-infected endothelial cells. *Transplantation* 1994b;58(12):1379-1385.
- Seed M, Hoppichler F, Reaveley D, McCarthy S, Thompson GR, Boerwinkle E, Utermann G. Relation of serum lipoprotein(a) concentration and apolipoprotein(a) phenotype to coronary heart disease in patients with familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med* 1990;322(21):1494-1499.
- Seelos C, Gmeiner B, Kapiotis S, Cerni C. Oxidized low-density-lipoprotein triggers programmed death of endothelial cells. *Biochem Mol Biol Int* 1997;42(5):1015-1022.
- Sellke FW, Laham RJ, Edelman ER, Pearlman JD, Simons M. Therapeutic angiogenesis with basic fibroblast growth factor: technique and early results. *Ann Thorac Surg* 1998;65(6):1540-1544.
- Sever PS, Dahlöf B, Poulter NR, Wedel H, Beevers G, Caulfield M, Collins R, Kjeldsen SE, Kristinsson A, McInnes GT, Mehlsen J, Nieminen M, O'Brien E, Ostergren J; ASCOT investigators. Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial--Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 2003;361(9364):1149-1158.
- Shaper AG. Alcohol and coronary heart disease. *Eur Heart J* 1995;16(12):1760-1764.
- Shearman CW, Kalf GF. DNA replication by a membrane-DNA complex from rat liver mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 1977;182(2):573-586.

- Kang S, Wu Y, Li X. Effects of statin therapy on the progression of carotid atherosclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis* 2004;177(2):433-442.
- SHEP Cooperative Research Group. Prevention of stroke by antihypertensive drug treatment in older persons with isolated systolic hypertension. Final results of the Systolic Hypertension in the Elderly Program (SHEP). *JAMA* 1991;265(24):3255-3264.
- Shepherd J, Barter P. Lipid-lowering - translating evidence into benefits. *Atheroscler Suppl* 2002;2(4):1-3.
- Shepherd J, Blauw GJ, Murphy MB, Bollen EL, Buckley BM, Cobbe SM, Ford I, Gaw A, Hyland M, Jukema JW, Kamper AM, Macfarlane PW, Meinders AE, Norrie J, Packard CJ, Perry IJ, Stott DJ, Sweeney BJ, Twomey C, Westendorp RG; PROSPER study group. PROspective Study of Pravastatin in the Elderly at Risk. Pravastatin in elderly individuals at risk of vascular disease (PROSPER): a randomised controlled trial. *Lancet* 2002;360(9346):1623-1630.
- Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, McKillop JH, Packard CJ. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med* 1995;333(20):1301-1307.
- Shepro D, Morel NM: Pericyte physiology. *FASEB J* 1993, 7:1031-1038
- Sheridan JD, Larson DM: Junctional communication in the periferal vasculature. Pitts JD, Finbow ME (eds): *The functional integration of cells in animal tissue*. University Press, New York, Cambrige 1982, 263-283.
- Siddiqui AJ, Blomberg P, Wårdell E, Hellgren I, Eskandarpour M, Islam KB, Sylvén C. Combination of angiopoietin-1 and vascular

- endothelial growth factor gene therapy enhances arteriogenesis in the ischemic myocardium. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;310(3):1002-1009.
- Siefert SA, Sarkar R. Matrix metalloproteinases in vascular physiology and disease. *Vascular* 2012;20(4):210-216.
- Silverstein SC, Steinman RM, Cohn ZA. Endocytosis. *Annu Rev Biochem* 1977;46:669-722.
- Silvestre JS, Gojova A, Brun V, Potteaux S, Esposito B, Duriez M, Clergue M, Le Ricousse-Roussanne S, Barateau V, Merval R, Groux H, Tobelem G, Levy B, Tedgui A, Mallat Z. Transplantation of bone marrow-derived mononuclear cells in ischemic apolipoprotein E-knockout mice accelerates atherosclerosis without altering plaque composition. *Circulation* 2003;108(23):2839-2842.
- Simionescu M., Simionescu N. Proatherosclerotic events: pathobiochemical changes occurring in the arterial wall before monocyte migration. *FASEBJ* 1993;7:1359-1366.
- Simon A, Gariépy J, Moyse D, Levenson J. Differential effects of nifedipine and co-amlozide on the progression of early carotid wall changes. *Circulation* 2001;103(24):2949-2954.
- Simon A, Giral P, Levenson J. Extracoronary atherosclerotic plaque at multiple sites and total coronary calcification deposit in asymptomatic men. Association with coronary risk profile. *Circulation* 1995;92(6):1414-1421.
- Simons M, Annex BH, Laham RJ, Kleiman N, Henry T, Dauerman H, Udelson JE, Gervino EV, Pike M, Whitehouse MJ, Moon T, Chronos NA. Pharmacological treatment of coronary artery disease with recombinant fibroblast growth factor-2: double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Circulation* 2002;105(7):788-793.



- Sims DE. Recent advances in pericyte biology--implications for health and disease. *Can J Cardiol* 1991;7(10):431-443.
- Sinapius D. Über das Aortenendotel. *Virchows Arch* 1952;322(6):662-694.
- Singer DE, Nathan DM, Anderson KM, Wilson PW, Evans JC. Association of HbA1c with prevalent cardiovascular disease in the original cohort of the Framingham Heart Study. *Diabetes* 1992;41(2):202-208.
- Singh M, Bedi US. Is atherosclerosis regression a realistic goal of statin therapy and what does that mean? *Curr Atheroscler Rep* 2013;15(1):294.
- Slavina ES, Madanat AY, Pankov YuA, Syrkin AL, Tertov VV, Orekhov AN. Diabetes mellitus and atherosclerosis. *N Engl J Med* 1987;317(13):836.
- Slevin M, Ahmed N, Wang Q, McDowell G, Badimon L. Unique vascular protective properties of natural products: supplements or future main-line drugs with significant anti-atherosclerotic potential? *Vasc Cell* 2012;4(1):9.
- Smilde TJ, van Wissen S, Wollersheim H, Trip MD, Kastelein JJ, Stalenhoef AF. Effect of aggressive versus conventional lipid lowering on atherosclerosis progression in familial hypercholesterolaemia (ASAP): a prospective, randomised, double-blind trial. *Lancet* 2001;357(9256) :577-581.
- Smirnov VN, Orekhov AN. Smooth muscle cells from adult human aorta. *Cell Culture Techniques in Heart and Vessel Research*. HM Piper (ed). Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York-London-Paris-Tokyo-Hong Kong, 1990, 271-289.
- Smith EB. The relationship between plasma and tissue lipids in human atherosclerosis. *Adv Lipid Res* 1974;12(0):1-49.

- Smith EB, Evans PH, Downham MD. Lipid in the aortic intima. The correlation of morphological and chemical characteristics. *J Atheroscler Res* 1967;7(2):171-186.
- Smith EB, Slater RS. The microdissection of large atherosclerotic plaques to give morphologically and topographically defined fractions for analysis. 1. The lipids in the isolated fractions. *Atherosclerosis* 1972;15(1):37-56.
- Smith G.D., Shipley M.J., Rose G. Intermittent claudication, heart disease risk factors, and mortality. *Circulation* 1990;82(6):1925-1931.
- Smith NL, Wiley JR, Legault C, Rice KM, Heckbert SR, Psaty BM, Tracy RP, Cushman M. Effect of progestogen and progestogen type on hemostasis measures in postmenopausal women: the Postmenopausal Estrogen/Progestin Intervention (PEPI) Study. *Menopause* 2008;15(6):1145-1150.
- Sobenin IA, Tertov VV, Orekhov AN, Smirnov VN. Synergetic effect of desialylated and glycated low density lipoproteins on cholesterol accumulation in cultured smooth muscle intimal cells. *Atherosclerosis* 1991;89(2,3):151-154.
- Sobenin IA, Tertov VV, Koschinsky T, Bunting CE, Slavina ES, Dedov II, Orekhov AN. Modified low density lipoprotein from diabetic patients causes cholesterol accumulation in human intimal aortic cells. *Atherosclerosis* 1993;100(1):41-54.
- Sobenin IA, Tertov VV, Orekhov AN. Characterization of chemical composition of native and modified low density lipoprotein occurring in the blood of diabetic patients. *Int Angiol* 1994;13(1):78-83.
- Sobenin IA, Tertov VV, Orekhov AN. Atherogenic modified LDL in diabetes. *Diabetes* 1996;45(Suppl 3):S35-S39.

- Sobenin IA, Sazonova MA, Ivanova MM, Zhelankin AV, Myasoedova VA, Postnov AY, Nurbaev SD, Bobryshev YV, Orekhov AN. Mutation C3256T of mitochondrial genome in white blood cells: novel genetic marker of atherosclerosis and coronary heart disease. *PLoS One* 2012a;7(10):e46573.
- Sobenin IA, Sazonova MA, Postnov AY, Bobryshev YV, Orekhov AN. Mitochondrial mutations are associated with atherosclerotic lesions in the human aorta. *Clin Dev Immunol* 2012b;2012:832464.
- Sobenin IA, Karagodin VP, Melnichenko AC, Bobryshev YV, Orekhov AN. Diagnostic and Prognostic Value of Low Density Lipoprotein-Containing Circulating Immune Complexes in Atherosclerosis. *J Clin Immunol* 2012c [Epub ahead of print]
- Sobenin IA, Orekhova VA, Melnichenko A, Bobryshev YV, Orekhov AN. Low density lipoprotein-containing circulating immune complexes have better prognostic value in carotid intima-media thickness progression than other lipid parameters. *Int J Cardiol* 2012d Oct 13.
- Soloperto G, Casciaro S. Progress in atherosclerotic plaque imaging. *World J Radiol* 2012;4(8):353-371.
- Sorci-Thomas MG, Thomas MJ. High density lipoprotein biogenesis, cholesterol efflux, and immune cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32(11):2561-2565.
- Sowers JR, Epstein M, Frohlich ED. Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease: an update. *Hypertension* 2001;37(4):1053-1059.
- Stadius ML, Rowan R, Fleischhauer JF, Kernoff R, Billingham M, Gown AM. Time course and cellular characteristics of the iliac artery response to acute balloon injury. An angiographic, morphometric, and immunocytochemical analysis in the cholesterol

- ol-fed New Zealand white rabbit. *Arterioscler Thromb* 1992;12(11):1267-1273.
- Staessen JA, Fagard R, Thijs L, Celis H, Arabidze GG, Birkenhäger WH, Bulpitt CJ, de Leeuw PW, Dollery CT, Fletcher AE, Forette F, Leonetti G, Nachev C, O'Brien ET, Rosenfeld J, Rodicio JL, Tuomilehto J, Zanchetti A. Randomised double-blind comparison of placebo and active treatment for older patients with isolated systolic hypertension. The Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) Trial Investigators. *Lancet* 1997;350(9080):757-764.
- Stamler J, Dyer AR, Shekelle RB, Neaton J, Stamler R. Relationship of baseline major risk factors to coronary and all-cause mortality, and to longevity: findings from long-term follow-up of Chicago cohorts. *Cardiology* 1993;82(2-3):191-222.
- Stampfer MJ, Hennekens CH, Manson JE, Colditz GA, Rosner B, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *N Engl J Med* 1993;328(20):1444-1449.
- Stangeby DK, Ethier CR. Coupled computational analysis of arterial LDL transport -- effects of hypertension. *Comput Methods Biomech Biomed Engin* 2002;5(3):233-241.
- Stary HC. Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. *Arteriosclerosis* 1989;9(1 Suppl):I19- I32.
- Stary HC. Composition and classification of human atherosclerotic lesions. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1992;421(4):277-290.
- Stary HC. Changes in components and structure of atherosclerotic lesions developing from childhood to middle age in coronary arteries. *Basic Res Cardiol* 1994;89 Suppl 1:17-32.

- Stary HC. Lipid and macrophage accumulations in arteries of children and the development of atherosclerosis. *Am J Clin Nutr* 2000;72(5 Suppl):1297S-1306S.
- Stary HC. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20(5):1177-1178.
- Stary HC, Malinow MR. Ultrastructure of experimental coronary artery atherosclerosis in cynomolgus macaques. A comparison with the lesions of other primates. *Atherosclerosis* 1982;43(2-3):151-175.
- Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1994;89(5):2462-2478.
- Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15(9):1512-1531.
- Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989;320(14):915-924.
- Steinberg D. Clinical trials of antioxidants in atherosclerosis: are we doing the right thing? *Lancet* 1995;346(8966):36-38.

- Steinberg D. A critical look at the evidence for the oxidation of LDL in atherogenesis. *Atherosclerosis* 1997;131 Suppl:S5-S7.
- Steinberg D. Is there a potential therapeutic role for vitamin E or other antioxidants in atherosclerosis? *Curr Opin Lipidol* 2000;11(6):603-607.
- Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DS, Witztum JL, Steinberg D. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81(12):3883-3887.
- Stemerman MB. Vascular intimal components: precursors of thrombosis. *Prog Hemost Thromb* 1974a;2(0):1-47.
- Stemerman MB. Thrombosis and connective tissue interrelationships in arteriosclerosis. *Adv Exp Med Biol* 1974b;43(0):315-34.
- Stemerman MB. Vascular injury: platelets and smooth muscle cell response. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1981;294(1072):217-224.
- Stenman S, Vaheri A. Distribution of a major connective tissue protein, fibronectin, in normal human tissues. *J Exp Med* 1978;147(4):1054-1064.
- Stenman S, von Smitten K, Vaheri A. Fibronectin and atherosclerosis. *Acta Med Scand Suppl* 1980;642:165-170.
- Still WJ, O'Neal RM. Electron microscopic study of experimental atherosclerosis in the rat. *Am J Pathol* 1962;40:21-35.
- Strong JP, Eggen DA, Oalman MC, Richards ML, Tracy RE. Pathology and epidemiology of atherosclerosis. *J Am Diet Assoc* 1973;62(3):262-268.

- Strong JP, McGill HC Jr. The natural history of aortic atherosclerosis: relationship to race, sex, and coronary lesions in new orleans. *Exp Mol Pathol* 1963;52:SUPPL1:15-27.
- Sugano M, Makino N, Sawada S, Otsuka S, Watanabe M, Okamoto H, Kamada M, Mizushima A. Effect of antisense oligonucleotides against cholesteryl ester transfer protein on the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *J Biol Chem* 1998;273(9):5033-5036.
- Sugano M, Makino N. Changes in plasma lipoprotein cholesterol levels by antisense oligodeoxynucleotides against cholesteryl ester transfer protein in cholesterol-fed rabbits. *J Biol Chem* 1996;271(32):19080-19083.
- Sugimoto T, Inui K, Shimazaki Y. Gene therapy for myocardial angiogenesis: with direct intramuscular gene transfer of naked deoxyribonucleic acid encoding vascular endothelial growth factor and cell transplantation of vascular endothelial growth factor transfected H9c2 myoblast. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;51(5):192-197.
- Suzuki J, Isobe M, Morishita R, Nishikawa T, Amano J, Kaneda Y. Antisense Bcl-x oligonucleotide induces apoptosis and prevents arterial neointimal formation in murine cardiac allografts. *Cardiovasc Res* 2000;45(3):783-787.
- Suzuki J, Isobe M, Morishita R, Aoki M, Horie S, Okubo Y, Kaneda Y, Sawa Y, Matsuda H, Ogihara T, Sekiguchi M. Prevention of graft coronary arteriosclerosis by antisense cdk2 kinase oligonucleotide. *Nat Med* 1997;3(8):900-903.
- Svindland A. The localization of sudanophilic and fibrous plaques in the main left coronary bifurcation. *Atherosclerosis* 1983;48(2):139-145.

- Sytkowski P.A., Kannel W.B., Agostino R.B. Changes in risk factors and the decline in mortality from cardiovascular disease. The Framingham Heart Study. *N Engl J Med* 1990;322(23):1635-1641.
- Szmitko PE, Fedak PW, Weisel RD, Stewart DJ, Kutryk MJ, Verma S. Endothelial progenitor cells: new hope for a broken heart. *Circulation* 2003;107(24):3093-3100.
- Tabit CE, Holbrook M, Shenouda SM, Dohadwala MM, Widlansky ME, Frame AA, Kim BH, Duess MA, Kluge MA, Levit A, Keaney JF Jr, Vita JA, Hamburg NM. Effect of sulfasalazine on inflammation and endothelial function in patients with established coronary artery disease. *Vasc Med* 2012;17(2):101-107.
- Takács E, Hársing J, Füzesi S, Jellinek H. Development of arteriosclerosis after i.v. administered fat in rabbits. *Pathol Res Pract* 1987;182(1):34-39.
- Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 2001;81(1):153-208.
- Takebayashi S, Kubota I, Kamio A, Takagi T. Ultrastructural aspects of human atherosclerosis; role of the foam cells and modified smooth muscle cells. *J Electron Microsc* (Tokyo) 1972;21(4):301-313.
- Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21(11):1712-1719.
- Tall AR, Yvan-Charvet L, Westerterp M, Murphy AJ. Cholesterol efflux: a novel regulator of myelopoiesis and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32(11):2547-2452.
- Tanganelli P, Bianciardi G, Simoes C, Attino V, Tarabochia B, Weber G. Distribution of lipid and raised lesions in aortas of young people of different geographic origins (WHO-ISFC PBDAY



- Study). World Health Organization-International Society and Federation of Cardiology. Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth. *Arterioscler Thromb* 1993;13(11):1700-1710.
- Taniyama Y, Morishita R, Aoki M, Nakagami H, Yamamoto K, Yamazaki K, Matsumoto K, Nakamura T, Kaneda Y, Ogihara T. Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat and rabbit hindlimb ischemia models: preclinical study for treatment of peripheral arterial disease. *Gene Ther* 2001;8(3):181-189.
- Tardif JC, Grégoire J, L'Allier PL, Ibrahim R, Lespérance J, Heironen TM, Kouz S, Berry C, Bassar R, Lavoie MA, Guertin MC, Rodés-Cabau J; Effect of rHDL on Atherosclerosis-Safety and Efficacy (ERASE) Investigators. Effects of reconstituted high-density lipoprotein infusions on coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. *JAMA* 2007;297(15):1675-1682.
- Tardif JC, Lesage F, Harel F, Romeo P, Pressacco J. Imaging biomarkers in atherosclerosis trials. *Circ Cardiovasc Imaging* 2011;4(3):319-333.
- Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T, Imaizumi T; Therapeutic Angiogenesis using Cell Transplantation (TACT) Study Investigators. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 2002;360(9331):427-435.
- Taylor AJ, Kent SM, Flaherty PJ, Coyle LC, Markwood TT, Vernalis MN. ARBITER: Arterial Biology for the Investigation of the Treatment Effects of Reducing Cholesterol: a randomized trial comparing the effects of atorvastatin and pravastatin on carot-

- id intima medial thickness. *Circulation* 2002;106(16):2055-2060.
- Taylor AJ, Sullenberger LE, Lee HJ, Lee JK, Grace KA. Arterial Biology for the Investigation of the Treatment Effects of Reducing Cholesterol (ARBITER) 2: a double-blind, placebo-controlled study of extended-release niacin on atherosclerosis progression in secondary prevention patients treated with statins. *Circulation* 2004;110(23):3512-3517.
- Taylor AJ, Lee HJ, Sullenberger LE. The effect of 24 months of combination statin and extended-release niacin on carotid intima-media thickness: ARBITER 3. *Curr Med Res Opin* 2006;22(11):2243-2250.
- Taylor AJ, Villines TC, Stanek EJ, Devine PJ, Griffen L, Miller M, Weissman NJ, Turco M. Extended-release niacin or ezetimibe and carotid intima-media thickness. *N Engl J Med* 2009;361(22):2113-2122.
- Tell GS, Howard G, McKinney WM. Risk factors for site specific extracranial carotid artery plaque distribution as measured by B-mode ultrasound. *J Clin Epidemiol* 1989;42(6):551-559.
- Tertov VV, Orekhov AN, Repin VS, Smirnov VN. Dibutyryl cyclic AMP decrease proliferative activity and the cholesteryl ester content in cultured cells of atherosclerotic human aorta. *Biochem Biophys Res Commun* 1982;109(4):1228-1233.
- Tertov VV, Orekhov AN, Smirnov VN. Cyclic AMP and cyclic GMP content in a short-term organ culture of normal and atherosclerotic human aorta. *Artery* 1986a;13(6):373-382.
- Tertov VV, Orekhov AN, Smirnov VN. Agents that increase cellular cyclic AMP inhibit proliferative activity and decrease lipid content in cells cultured from atherosclerotic human aorta. *Artery* 1986b;13(6):365-372.

- Tertov VV, Orekhov AN, Smirnov VN. Effect of cyclic AMP on lipid accumulation and metabolism in human atherosclerotic aortic cells. *Atherosclerosis* 1986c;62(1):55-64.
- Tertov VV, Orekhov AN, Kudryashov SA, Klibanov AL, Ivanov NN, Torchilin VP, Smirnov VN. Cyclic nucleotides and atherosclerosis: studies in primary culture of human aortic cells. *Exp Mol Pathol* 1987a;47(3):377-389.
- Tertov VV, Orekhov AN, Grigorian GYu, Kurennaya GS, Kudryashov SA, Tkachuk VA, Smirnov VN. Disorders in the system of cyclic nucleotides in atherosclerosis: cyclic AMP and cyclic GMP content and activity of related enzymes in human aorta. *Tissue Cell* 1987b;19(1):21-28.
- Tertov VV, Orekhov AN, Li Hwa Ryong, Smirnov VN. Intracellular cholesterol accumulation is accompanied by enhanced proliferative activity of human aortic intimal cells. *Tissue Cell* 1988a;20(6):849-854.
- Tertov VV, Panosyan AG, Akopov SE, Orekhov AN. The effects of eicosanoids and lipoxygenase inhibitors on the lipid metabolism of aortic cells. *Biomed Biochim Acta* 1988b;47(10/11):S286-S288.
- Tertov VV, Sobenin IA, Gabbasov ZA, Popov EG, Orekhov AN. Lipoprotein aggregation as an essential condition of intracellular lipid accumulation caused by modified low density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1989a;163(1):489-494.
- Tertov VV, Orekhov AN, Martsenyuk ON, Perova NV, Smirnov VN. Low density lipoproteins isolated from the blood of patients with coronary heart disease induce the accumulation of lipids in human aortic cells. *Exp Mol Pathol* 1989b;50(3):337-347.
- Tertov VV, Sobenin IA, Tonevitsky AG, Orekhov AN, Smirnov VN. Isolation of atherogenic modified (desialylated) low density lip-

- oprotein from blood of atherosclerotic patients: separation from native lipoprotein by affinity chromatography. *Biochem Biophys Res Commun* 1990a;167(3):1122-1127.
- Tertov VV, Orekhov AN, Kacharava AG, Sobenin IA, Perova NV, Smirnov VN. Low density lipoprotein-containing circulating immune complexes and coronary atherosclerosis. *Exp Mol Pathol* 1990b;52(3):300-308.
- Tertov VV, Orekhov AN, Sayadyan KhS, Serebrennikov SG, Kacharava AG, Lyakishev AA, Smirnov VN. Correlation between cholesterol content in circulating immune complexes and atherogenic properties of CHD patients' serum manifested in cell culture. *Atherosclerosis* 1990c;81(3):183-189.
- Tertov VV, Sobenin IA, Gabbasov ZA, Popov EG, Yaroslavov AA, Smirnov VN, Orekhov AN. Three types of naturally occurring modified lipoproteins induce intracellular lipid accumulation due to lipoprotein aggregation. *Circ Res* 1992a;71(1):218-228.
- Tertov VV, Sobenin IA, Orekhov AN. Aggregation of modified lipoproteins and lipid accumulation in human aortic cells. *Molecular Biology of Atherosclerosis. Proceedings of the 57th European Atherosclerosis Society Meeting*. Ed. MJ Halpern. John Libbey & Company Ltd, 1992b, 37-44.
- Tertov VV, Sobenin IA, Gabbasov ZA, Popov EG, Jaakkola O, Solakivi T, Nikkari T, Smirnov VN, Orekhov AN. Multiple-modified desialylated low density lipoproteins that cause intracellular lipid accumulation. Isolation, fractionation and characterization. *Lab Invest* 1992c;67(5):665-675.
- Tertov, VV, Sobenin IA, Orekhov AN. Characterization of desialylated low density lipoproteins which caused intracellular lipid accumulation. *Int J Tissue Reac* 1992d;14(4):155-162.

- Tertov VV, Sobenin IA, Gabbasov ZA, Popov EG, Yaroslavov AA, Smirnov VN, Orekhov AN. Three types of naturally occurring modified lipoproteins induce intracellular lipid accumulation due to lipoprotein aggregation. *Circ Res* 1992e;71(1):218-228.
- Tertov VV, Sobenin IA, Gabbasov ZA, Popov EG, Yaroslavov AA, Jauhiainen M, Ehnholm C, Smirnov VN, Orekhov AN. Three types of naturally occurring modified lipoproteins induce intracellular lipid accumulation in human aortic intimal cells- the role of lipoprotein aggregation. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992f;30(4):171-179.
- Tertov VV, Orekhov AN, Sobenin IA, Morrisett JD, Gotto AM., Jr, Guevara JG, Jr. Carbohydrate content of protein and lipid components in sialic acid-rich and -poor low density lipoproteins from subjects with and without coronary artery disease. *J Lipid Res* 1993;34(3):365-375.
- Tertov VV, Sobenin IA, Orekhov AN. Modified (desialylated) low-density-lipoprotein measured in serum by lectin-sorbent assay. *Clin Chem* 1995a;41(7):1018-1021.
- Tertov VV, Kaplun VV, Dvoryantsev SN, Orekhov AN. Apolipoprotein B-bound lipids as a marker for evaluation of low density lipoprotein oxidation in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 1995b;214(2):608-613.
- Tertov VV, Bittolo-Bon G, Sobenin IA, Cazzolato G, Orekhov AN, Avogaro P. Naturally occurring modified low density lipoproteins are similar if not identical: more electronegative and desialylated lipoprotein subfractions. *Exp Mol Pathol* 1995c;62(3):166-172.
- Tertov V.V., Nazarova V.L., Orekhov A.N. Naturally occurring modified low density lipoprotein of atherosclerotic patients. *Advances in Lipoprotein and Atherosclerosis Research, Diagnosis-*

- tics and Treatment. Proceedings of the 8th International Dresden Lipid Symposium 1994. Held at Dresden, June 10-12, 1994. W. Jaross, M. Hanefeld, S. Bergmann, H. Dude (eds.). Gustav Fischer Verlag, Jena. 1995d, 57-65.
- Tertov VV, Sobenin IA, Orekhov AN. Similarity between naturally occurring modified desialylated, electronegative and aortic low density lipoprotein. *Free Rad Res* 1996a;25(4):313-319.
- Tertov VV, Sobenin IA, Orekhov AN, Jaakkola O, Solakivi T, Nikkari T. Characteristics of low density lipoprotein isolated from circulating immune complexes. *Atherosclerosis* 1996b;122(2):191-199.
- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993;329(14):977-986.
- The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial results. I. Reduction in incidence of coronary heart disease. *JAMA* 1984a;251(3):351-364.
- The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial results. II. The relationship of reduction in incidence of coronary heart disease to cholesterol lowering. *JAMA* 1984b;251(3):365-374.
- The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. *N Engl J Med* 1998;339(19):1349-1357.

- Thomas AC, Campbell JH. Smooth muscle cells of injured rat and rabbit arteries in culture: contractile and cytoskeletal proteins. *Atherosclerosis* 2001;154(2):291-299.
- Thomas WA, Jones R, Scott RF, Morrison E, Goodale MF, Imai H. Production of early atherosclerotic lesions in rats characterized by proliferation of "modified smooth muscle cells". *Exp Mol Pathol* 1963;52:SUPPL1:40-61.
- Thomas WA, Florentin RA, Nam SC, Kim DN, Jones RM, Lee KT. Proliferative phase of atherosclerosis in swine fed cholesterol. *Arch Pathol* 1968;86(6):621-643.
- Thompson GR. Towards a new era: is coronary artery disease reversible? *Cardiology* 1990;77 Suppl 4:66-69.
- Thompson GR. Primary hyperlipidaemia. *Br Med Bull* 1990;46(4):986-1004.
- Thompson PD. Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(8), pp. 1319-1321.
- Thompson PD, Lim V. Physical Activity in the Prevention of Atherosclerotic Coronary Heart Disease. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 2003;5(4):279-285.
- Thompson PD, Buchner D, Pina IL, Balady GJ, Williams MA, Marcus BH, Berra K, Blair SN, Costa F, Franklin B, Fletcher GF, Gordon NF, Pate RR, Rodriguez BL, Yancey AK, Wenger NK; American Heart Association Council on Clinical Cardiology Subcommittee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention; American Heart Association Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism Subcommittee on Physical Activity. Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease: a statement from the Council on Clinical Cardiology (Subcommittee on Exercise,

- Rehabilitation, and Prevention) and the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism (Subcommittee on Physical Activity). *Circulation* 2003;107(24):3109-3116.
- Toborek M, Barger SW, Mattson MP, Barve S, McClain CJ, Hennig B. Linoleic acid and TNF- $\alpha$  cross-amplify oxidative injury and dysfunction of endothelial cells. *J Lipid Res* 1996;37(1):123-135.
- Tokunaga O, Fan JL, Watanabe T. Atherosclerosis- and age-related multinucleated variant endothelial cells in primary culture from human aorta. *Am J Pathol* 1989;135(6):967-976
- Tracy RE. Association of cardiomegaly with coronary artery histopathology and its relationship to atheroma. *J Atheroscler Thromb* 2011;18(1):32-41.
- Tracy RE. Evidence concerning resistance to atheroma by media-like islands in the intima of coronary arteries. *Atherosclerosis* 2005;178(1):49-56.
- Tracy RE. Medial thickenings of coronary artery and the aging risk factor for atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2001;155(2):337-346.
- Trautmann A. Functions of gap junction channels in the open and closed states. *Biochem Soc Trans* 1988;16:534-536
- Tsukada T, Rosenfeld M, Ross R, Gown AM. Immunocytochemical analysis of cellular components in atherosclerotic lesions. Use of monoclonal antibodies with the Watanabe and fat-fed rabbit. *Arteriosclerosis* 1986;6(6):601-613.
- Tsukada T, Tipples D, Gordon D, Ross R, Gown AM. HHF35, a muscle-actin-specific monoclonal antibody. I. Immunocytochemical and biochemical characterization. *Am J Pathol* 1987;126(1):51-60.



- Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Mähönen M, Tolonen H, Ruokoko-ski E, Amouyel P. Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA project populations. Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease. *Lancet* 1999;353(9164):1547-1557.
- Turner R.C. The UK Prospective Diabetes Study. A review. *Diabetes Care* 1998;21 Suppl 3:C35-C38.
- Turner RC, Cull CA, Frighi V, Holman RR. Glycemic control with diet, sulfonylurea, metformin, or insulin in patients with type 2 diabetes mellitus: progressive requirement for multiple therapies (UKPDS 49). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *JAMA* 1999;281(21):2005-2012.
- Vale PR, Losordo DW, Milliken CE, Maysky M, Esakof DD, Symes JF, Isner JM. Left ventricular electromechanical mapping to assess efficacy of phVEGF(165) gene transfer for therapeutic angiogenesis in chronic myocardial ischemia. *Circulation* 2000;102(9):965-974.
- Valsania P, Zarich SW, Kowalchuk GJ, Kosinski E, Warram JH, Krolewski AS. Severity of coronary artery disease in young patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Am Heart J* 1991;122(3 Pt 1):695-700.
- Van Craeyveld E, Gordts SC, Nefyodova E, Jacobs F, De Geest B. Regression and stabilization of advanced murine atherosclerotic lesions: a comparison of LDL lowering and HDL raising gene transfer strategies. *J Mol Med (Berl)* 2011;89(6):555-567.
- van der Wal AC, Das PK, Tigges AJ, Becker AE. Adhesion molecules on the endothelium and mononuclear cells in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1992;141(6):1427-1433.

- van Haaren PM, VanBavel E, Vink H, Spaan JA. Localization of the permeability barrier to solutes in isolated arteries by confocal microscopy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285(6):H2848- H2856.
- Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 2001;89(1):E1- E7.
- Vega GL, Denke MA, Grundy SM. Metabolic basis of primary hypercholesterolemia. *Circulation* 1991;84(1):118-128.
- Velican C, Velican D, Tâncu I. The relationship between intimal necrosis and lipid accumulation during the onset and progression of atherosclerotic lesions. *Med Interne* 1988;26(2):97-107.
- Velican C. Studies on intimal connective tissue of human arteries. *Acta Anat (Basel)* 1968;71(4):519-541.
- Velican C. Topochemistry of acid carbohydrates in the human aortic and coronary intima. *J Atheroscler Res* 1967;7(4):517-526.
- Velican D, Velican C. Histochemical study on the glycosaminoglycans (acid mucopolysaccharides) of the human coronary arteries. *Acta Histochem* 1977;59(2):190-200.
- Veltri KL, Espiritu M, Singh G. Distinct genomic copy number in mitochondria of different mammalian organs. *J Cell Physiol* 1990;143(1):160-164.
- Verhamme P, Kerkhof F, Buysschaert I, Rietzschel E, de Groot E. Carotid intima-media thickness: more than a research tool? *Acta Cardiol* 2010;65(1):59-66.
- Verschuren WM, Jacobs DR, Bloemberg BP, Kromhout D, Menotti A, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Dontas AS, Fidanza F, et al. Serum total cholesterol and long-term coronary heart

- disease mortality in different cultures. Twenty-five-year follow-up of the seven countries study. *JAMA* 1995;274(2):131-136.
- Vesselinovitch D. Animal models and the study of atherosclerosis. *Arch Pathol Lab Med* 1988;112(10):1011-1017.
- Vidyashankar S, Sambaiah K, Srinivasan K: Regression of preestablished cholesterol gallstones by dietary garlic and onion in experimental mice. *Metabolism* 2010;59:1402-1412
- Vijayagopal P, Srinivasan SR, Jones KM, Radhakrishnamurthy B, Berenson GS. Complexes of low-density lipoproteins and arterial proteoglycan aggregates promote cholesteryl ester accumulation in mouse macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1985;837(3):251-261.
- Virchow RV: Phlobose und Thrombose im Gefass-system; in *Gesammelte Abhandlungen zur wissebschaftlichen Medizin*. Frankfurt, Meidinger, 1856
- Vogel TR, Shindelman LE, Nackman GB, Graham AM. Efficacious use of nitinol stents in the femoral and popliteal arteries. *J Vasc Surg* 2003;38(6):1178-1184.
- Voss R, Cullen P, Schulte H, Assmann G. Prediction of risk of coronary events in middle-aged men in the Prospective Cardiovascular Muenster Study (PROCAM) using neural networks. *Int J Epidemiol* 2002;31(6):1253-1262.
- Waksman R, Torguson R, Kent KM, Pichard AD, Suddath WO, Satler LF, Martin BD, Perlman TJ, Maltais JA, Weissman NJ, Fitzgerald PJ, Brewer HB Jr. A first-in-man, randomized, placebo-controlled study to evaluate the safety and feasibility of autologous delipidated high-density lipoprotein plasma infusions in patients with acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2010;55(24):2727-2735.

- van der Wal AC, Das PK, Bentz van de Berg D, van der Loos CM, Becker AE. Atherosclerotic lesions in humans. In situ immunophenotypic analysis suggesting an immune mediated response. *Lab Invest* 1989;61(2):166-170.
- Walker JF, Tobert JA. The clinical efficacy and safety of lovastatin and MK-733--an overview. *Eur Heart J* 1987;8 Suppl E:93-E:96.
- Wang JG, Staessen JA, Gong L, Liu L. Chinese trial on isolated systolic hypertension in the elderly. Systolic Hypertension in China (Syst-China) Collaborative Group. *Arch Intern Med* 2000;160(2):211-220.
- Wang K, Kessler PD, Zhou Z, Penn MS, Forudi F, Zhou X, Tarakji K, Kibbe M, Kovesdi I, Brough DE, Topol EJ, Lincoff AM. Local adenoviral-mediated inducible nitric oxide synthase gene transfer inhibits neointimal formation in the porcine coronary stented model. *Mol Ther* 2003;7(5 Pt 1):597-603.
- Watanabe T, Tokunaga O. Multinucleated variant endothelial cell. Its characterization and relation to atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1990;598:217-222.
- Weinstein DB, Heider JG. Antiatherogenic properties of calcium antagonists. State of the art. *Am J Med* 1989;86(4A):27-32.
- Weitz-Schmidt G, Welzenbach K, Brinkmann V, Kamata T, Kallen J, Bruns C, Cottens S, Takada Y, Hommel U. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nat Med* 2001;7(6):687-692.
- Werner N, Nickenig G, Laufs U. Pleiotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Basic Res Cardiol* 2002;97(2):105-116.
- Westendorp IC, in 't Veld BA, Bots ML, Akkerhuis JM, Hofman A, Grobbee DE, Witteman JC. Hormone replacement therapy

- and intima-media thickness of the common carotid artery: the Rotterdam study. *Stroke* 1999;30(12):2562-2567.
- Wick G. Atherosclerosis - an autoimmune disease due to an immune reaction against heat-shock protein 60. *Herz* 2000;25(2):87-90.
- Wigren M, Nilsson J, Kolbus D. Lymphocytes in atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 2012;413(19-20):1562-1568.
- Wiklund O, Witztum JL, Carew TE, Pittman RC, Elam RL, Steinberg D. Turnover and tissue sites of degradation of glucosylated low density lipoprotein in normal and immunized rabbits. *J Lipid Res* 1987;28(9):1098-1109.
- Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL, Tracey WR, Pollock JS, Harrison DG, Marsden PA. Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17(11):2479-2488.
- Wilens SL. The nature of diffuse intimal thickening of arteries. *Am J Pathol* 1951;27(5):825-839.
- Williams SK, Matthews MA, Wagner RC. Metabolic studies on the micropinocytic process in endothelial cells. *Microvasc Res* 1979;18(2):175-184.
- Winkleby MA, Robinson TN, Sundquist J, Kraemer HC. Ethnic variation in cardiovascular disease risk factors among children and young adults: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *JAMA* 1999;281(11):1006-1013.
- Wissler RW, Group PD. Atheroarteritis: a combined immunological and lipid imbalance. *Int J Cardiol* 1996;54 Suppl:S37-S49.
- Wissler RW, Strong JP. Risk factors and progression of atherosclerosis in youth. PDAY Research Group. *Pathological Determinants of Atherosclerosis in Youth*.

- nants of Atherosclerosis in Youth. *Am J Pathol* 1998;153(4):1023-1033.
- Wissler RW, Vesselinovitch D. Experimental models of human atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1968;149(2):907-922
- Wissler RW. Update on the pathogenesis of atherosclerosis. *Am J Med*. 1991 Jul 31;91(1B):3S-9S.
- Witztum JL, Fisher M, Pietro T, Steinbrecher UP, Elam RL. Nonenzymatic glucosylation of high-density lipoprotein accelerates its catabolism in guinea pigs. *Diabetes* 1982;31(11):1029-1032.
- Witztum JL, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? *Trends Cardiovasc Med* 2001;11(3-4):93-102.
- Wood KM, Cadogan MD, Ramshaw AL, Parums DV. The distribution of adhesion molecules in human atherosclerosis. *Histopathology* 1993;22(5):437-444.
- Woolf N. The pathology of atherosclerosis with particular reference to the effects of hyperlipidaemia. *Eur Heart J* 1987;8 Suppl E:3-14.
- Wright HP. Mitosis patterns in aortic endothelium. *Atherosclerosis* 1972;15(1):93-100.
- Wu R, Shoenfeld Y, Sherer Y, Patnaik M, Matsuura E, Gilburd B, Koike T, Peter JB. Anti-idiotypes to oxidized LDL antibodies in intravenous immunoglobulin preparations--possible immunomodulation of atherosclerosis. *Autoimmunity* 2003;36(2):91-97.
- Xu Q, Zhang Z, Davison F, Hu Y. Circulating progenitor cells regenerate endothelium of vein graft atherosclerosis, which is diminished in ApoE-deficient mice. *Circ Res* 2003;93(8):e76- e86.
- Yamada S, Guo X, Yoshizawa M, Li Z, Matsuyama A, Hashimoto H, Sasaguri Y. Primary desmoplastic cutaneous leiomyosarcoma

- associated with high MIB-1 labeling index: a teaching case giving rise to diagnostic difficulties on a small biopsy specimen. *Pathol Res Pract* 2011;207(11):728-732.
- Yamamoto K, Morishita R, Tomita N, Shimozato T, Nakagami H, Kikuchi A, Aoki M, Higaki J, Kaneda Y, Ogihara T. Ribozyme oligonucleotides against transforming growth factor-beta inhibited neointimal formation after vascular injury in rat model: potential application of ribozyme strategy to treat cardiovascular disease. *Circulation* 2000;102(11):1308-1314.
- Ylä-Herttuala S. Gene expression in atherosclerotic lesions. *Herz* 1992;17(5):270-276.
- Ylä-Herttuala S, Alitalo K. Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth. *Nat Med* 2003;9(6):694-701.
- Yoshida M, Horimoto H, Mieno S, Nomura Y, Okawa H, Nakahara K, Sasaki S. Intra-arterial bone marrow cell transplantation induces angiogenesis in rat hindlimb ischemia. *Eur Surg Res* 2003;35(2):86-91.
- Yoshimura S, Morishita R, Hayashi K, Yamamoto K, Nakagami H, Kaneda Y, Sakai N, Ogihara T. Inhibition of intimal hyperplasia after balloon injury in rat carotid artery model using cis-element 'decoy' of nuclear factor-kappaB binding site as a novel molecular strategy. *Gene Ther* 2001;8(21):1635-42.
- Yusuf HR, Giles WH, Croft JB, Anda RF, Casper ML. Impact of multiple risk factor profiles on determining cardiovascular disease risk. *Prev Med* 1998;27(1):1-9.
- Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, Bosch J, Sleight P. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 2000;342(3):154-160.

- Zanchetti A. Antiatherosclerotic effects of antihypertensive drugs: recent evidence and ongoing trials. Clin Exp Hypertens 1996a;18(3-4):489-499.
- Zanchetti A. Trials investigating the anti-atherosclerotic effects of antihypertensive drugs. J Hypertens Suppl 1996b;14(2):S77-S80.
- Zanchetti A., Magnani B., Dal P. Atherosclerosis and calcium antagonists: the VHAS. The Verapamil-Hypertension Atherosclerosis Study (VHAS) Investigators. J Hum Hypertens 1992;6 Suppl 2:S45-S48.
- Zanchetti A, Rosei EA, Dal Palù C, Leonetti G, Magnani B, Pessina A. The Verapamil in Hypertension and Atherosclerosis Study (VHAS): results of long-term randomized treatment with either verapamil or chlorthalidone on carotid intima-media thickness. J Hypertens 1998;16(11):1667-1676.
- Zhang L, Gasper WJ, Stass SA, Ioffe OB, Davis MA, Mixson AJ. Angiogenic inhibition mediated by a DNzyme that targets vascular endothelial growth factor receptor 2. Cancer Res 2002;62(19):5463-5469.
- Zou Y, Takano H, Mizukami M, Akazawa H, Qin Y, Toko H, Sakamoto M, Minamino T, Nagai T, Komuro I. Leukemia inhibitory factor enhances survival of cardiomyocytes and induces regeneration of myocardium after myocardial infarction. Circulation 2003;108(6):748-53.
- Андреева ЕР, Тертов ВВ, Мухин ДН, Орехов АН. Клеточный состав и биохимические особенности аорты человека. Бюлл ВКНЦ АМН СССР 1985,8(2):63-71.
- Андреева ЕР, Тертов ВВ, Орехов АН. Усиление пролиферативной активности клеток интимы аорты человека при накоплении внутриклеточного холестерина. Цитология 1989,31(9):1092.



- Аничков НН. Частная патологическая анатомия. Выпуск II. Сердце и сосуды. Второе издание, Медгиз, Москва-Ленинград, 1947
- Заварзин АА, Щелкунов СИ, Учебник гистологии, Медгиз, Ленинград, 1954
- Заварзин АА. Синтез ДНК и кинетика клеточных популяций в онтогенезе млекопитающих. Наука, Ленинград, 1976.
- Ильинская ОП, Балясиикова ИВ, Локтионова СА. Пролиферативное поведение культивируемых эндотелиальных клеток аорты человека и экспрессия молекул адгезии. Бюлл эксп биол мед 1996;122(8):214-217.
- Ильинская ОП, Локтионова СА, Арефьева АМ, Яровая ЕБ, Калинина НИ, Тарарак ЭМ. Популяционная динамика полиплоидных клеток эндотелия аорты человека в онтогенезе и при атеросклерозе. Ангиол сосуд хир 1999;5(приложение):61-71.
- Каменская НЛ. Морфология эндотелия грудной аорты человека. Докл АН СССР 1952;83(5):741-745.
- Котелянский ВЭ, Орехов АН, Тертов ВВ, Хашимов ХА, Глухова МА, Фрид МГ, Орнатская ОИ, Василевская ТД, Смирнов ВН. Влияние компонентов экстрацеллюлярного матрикса на накопление липидов в клетках человека. Бюлл эксп биол мед 1987;104(4):562-564.
- Назарова ВЛ, Андреева ЕР, Тертов ВВ, Гельдиева БС, Орехов АН. Иммуноцитохимическое изучение локализации сквенджер-рецептора в гладкомышечных клетках аорты человека. Бюлл эксп биол мед 1995;120(2):195-198.
- Орехов АН, Тертов ВВ. Митогенная активность липопротеидов низкой плотности, выделенных из крови больных с коронарным атеросклерозом. Цитология 1989;31(8):1116-1117.

- Романов Ю.А., Антонов А. С. Морфологические и функциональные особенности эндотелия аорты человека. Цитология 1992;34(2):11—17.
- Романов ЮА, Антонов АС. Морфологические и функциональные особенности эндотелия аорты человека. 1. Два варианта организации эндотелиального монослоя при атеросклерозе. Цитология 1991;33(3):7-15.
- Романов ЮА, Ходакова ТГ, Кабаева НВ, Дормененва ЕВ, Пронин АГ. Кластерная организация эндотелия аорты человека: возможная роль в атерогенезе. Ангиология и сосудистая хирургия 1999;5(приложение):166-180.
- Тарарак ЭМ, Сухова ГК. Электронногистохимическое изучение состояния гликокаликса и эндоцитоза эндотелия аорты человека а процессе атерогенеза. Ангиология и сосудистая хирургия 1999;5(приложение):204-217.
- Тертов ВВ, Орехов АН, Косых ВА, Репин ВС. Метаболизм липидов в клетках атеросклеротической аорты человека. Исследования в первичной культуре. Бюлл эксп биол мед 1982;94(1):83-85
- Тертов ВВ, Собенин ИА, Габбасов ЗА, Попов ЕГ, Орехов АН. Агрегаты модифицированных липопротеидов низкой плотности вызывают накопление липидов в клетках интимы аорты человека *in vitro*. Бюлл эксп биол мед 1990;110(1):34-36.
- Тертов ВВ, Собенин ИА, Тоневицкий АГ, Орехов АН. Выделение десиалированных липопротеидов низкой плотности из крови больных ишемической болезнью сердца с помощью аффинной хроматографии. Бюлл эксп биол мед 1990;110(5):606-609.

- Тертов ВВ, Табагари СИ, Орехов АН. Содержание циклических нуклеотидов в органной культуре нормальной и пораженной атеросклерозом аорты человека. Бюлл эксп биол мед 1989;107(5):575-576.
- Хавкин ТН. О развитии атеросклеротических изменений аорты человека. Арх пат 1950;12(1):23-33.
- Цинзерлинг В.Д. Морфология атеросклероза человека. Клини 1937;15(4):521—528.
- Шевченко О.П., Шевченко А.О. Статины. Ингибиторы ГМГ-КоА-редуктазы. Реафарм, Москва, 2003.
- Щелкунов СИ. Интима малых артерий и вен. Арх биол наук, 1935,35(4):609-637.
- Щелкунов СИ. Основные принципы клеточной дифференцировки. Медицина, Москва, 1977







MoreBooks!  
publishing



# yes **i want morebooks!**

Покупайте Ваши книги быстро и без посредников он-лайн – в одном из самых быстрорастущих книжных он-лайн магазинов! окружающей среде благодаря технологии Печати-на-Заказ.

Покупайте Ваши книги на  
**[www.more-books.ru](http://www.more-books.ru)**

---

Buy your books fast and straightforward online - at one of world's fastest growing online book stores! Environmentally sound due to Print-on-Demand technologies.

Buy your books online at  
**[www.get-morebooks.com](http://www.get-morebooks.com)**



VDM Verlagsservicegesellschaft mbH

Heinrich-Böcking-Str. 6-8  
D - 66121 Saarbrücken

Telefon: +49 681 3720 174  
Telefax: +49 681 3720 1749

info@vdm-vsg.de  
[www.vdm-vsg.de](http://www.vdm-vsg.de)

