

Атерогенность сыворотки крови как патогенетическая мишень для прямой антиатеросклеротической терапии

Чернова Е.В.¹, Собенин И.А.², Мельниченко А.А.¹, Карагодин В.П.¹, Орехов А.Н.^{1,2}

¹ — Научно-исследовательский институт атеросклероза, Инновационный центр Сколково, Москва, 143025, ул. Новая, д. 100, тел. +7(495)4120113, +7(495)4121557

² — ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, д/ 8, тел. +7(499)6012181

В настоящее время причины возникновения и механизмы развития атеросклероза изучены недостаточно. Соответственно, не существует методов прямой антиатеросклеротической профилактики и терапии, доступных для широкого применения при субклиническом атеросклерозе. Впервые установлено, что атерогенность сыворотки крови (АСК) напрямую связана с прогрессированием бессимптомного атеросклероза и является патогенетическим фактором, оказывающим влияние на течение атеросклеротического процесса. Обнаружено, что целенаправленное снижение АСК приводит к остановке развития и регрессии ранних атеросклеротических поражений. В качестве принципиального подхода к прямой антиатеросклеротической терапии впервые предложено использовать патогенетическое воздействие, основанное на подавлении процессов накопления холестерина в клетках сосудистой стенки как ключевого события атерогенеза на клеточно-молекулярном уровне.

Ключевые слова: атеросклероз, атерогенез, атерогенность, внутриклеточное накопление холестерина, анти-атеросклеротическая терапия

Введение

Современные представления о клеточно-молекулярных механизмах атерогенеза основываются на ключевом положении классической липидной теории атеросклероза о том, что ведущим признаком атеросклероза является накопление вне- и внутриклеточных липидов [1, 2, 45]. Источником накапливающихся липидов являются липопротеиды низкой плотности (ЛНП). При этом для проявления атерогенного эффекта необходима какая-либо химическая модификация липопротеидных частиц, поскольку нативные (неповрежденные) ЛНП не вызывают накопления липидов в клетках артериальной стенки.

Патогенетический подход к профилактике и лечению атеросклероза определяется возможностью устранения физической причины патологии, а именно, предотвращением накопления внутриклеточных липидов. Существует ряд возможностей для воздействия на этот процесс, а именно: устранение модифицированных ЛНП из кровотока, подавление процессов модификации нативных ЛНП, активация внутриклеточного метаболизма липидов, подавление захвата модифицированных ЛНП клетками, удаление накопленных липидов из клеток. Интегральной оценкой эффективности различных антиатеросклеротических воздействий являются снижение скорости накопления внутриклеточных липидов и уменьшение внутриклеточного пула эфиров холестерина [28].

В настоящее время не существует лекарственных средств, в полной мере обладающих прямым антиатеросклеротическим действием. Известно, что ряд лекарственных препаратов может способствовать снижению атерогенного потенциала сыворотки крови больных атеросклерозом [28]. Понятие «атерогенный потенциал» («атерогенность») означает способность сыворотки крови или ее компонентов вызывать накопление холестерина в клетках, культивируемых из не пораженной атеросклерозом интимы аорты человека. Феномен атерогенности впервые

был выявлен у больных коронарным атеросклерозом [5]. Целенаправленное снижение АСК может способствовать предотвращению накопления липидов в клетках артериальной стенки и, таким образом, подавлять атерогенез на его начальной стадии. Клеточный культуральный тест оказался оптимальным и адекватным способом моделирования ранних процессов атерогенеза на клеточном уровне [29]. Возникла настоятельная необходимость разработки клеточной модели для оценки антиатерогенного потенциала лекарств, основанная на использовании клеточного теста. Подобный подход сделал бы возможным проведение потокового скрининга лекарственных средств, обладающих антиатерогенным эффектом, а также исследований клинической эффективности антиатеросклеротической терапии.

Материалы и методы

Первичная культура субэндотелиальных клеток аорты человека

Выделение и культивирование клеток производили из грудного отдела аорт мужчин и женщин в возрасте 40–65 лет в течение 1,5–3 ч после внезапной смерти. Причиной смерти в подавляющем большинстве случаев была острая сердечно-сосудистая недостаточность. Субэндотелиальные клетки выделяли из различных участков интимы аорты, различавшихся по степени атеросклеротического поражения, путем обработки коллагеназой и культивировали в соответствии с методом Орехова и соавторов [31]. Обработку аутопсийного материала проводили в стерильных условиях. После механического удаления адвентиции аорту рассекали вдоль и промывали в среде 199, содержащей по 100 ед/мл пенициллина и стрептомицина и 2,5 мкг/мл фунгизона. Из лоскута аорты вырезали участки, не пораженные атеросклерозом, а также участки, соответствующие жировой полосе или липофиброзной

бляшке, в соответствии с классификацией Stary [50, 51]. Затем с помощью пинцетов интиму отделяли от меди, при этом разделение слоев происходило по внутренней пограничной эластической мембране. Полученный материал пинцетами разделяли на волокна. К измельченной интиме добавляли 0,15% раствор коллагеназы II типа (Worthington Diagnostic System, США) в среде 199, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Flow, Великобритания), 2 мМ L-глутамин, 100 ед/мл пенициллина, 100 ед/мл стрептомицина, 2,5 мкг/мл фунгизона (все реактивы Grand Island Biological Company — GIBCO, США) из расчета 10 мл раствора фермента на 1 г сырой ткани. Инкубацию интимы с коллагеназой проводили на водяной бане при 37°C с постоянным перемешиванием со скоростью 50 об/мин (Aquaterm, New Brunswick Scientific Company, США) до практически полного растворения ткани, что обычно занимало 2–3 ч. Эффективность растворения ткани оценивали визуально. Полученную суспензию клеток фильтровали через стерильную нейлоновую сетку и центрифугировали при 4°C в течение 20 мин при 1800 g на низкоскоростной центрифуге (Beckman TJ-6, Beckman Division, США). Осажденные клетки промывали в 10 мл ростовой среды 199, содержащей антибиотики и 10% эмбриональную телячью сыворотку, и повторно центрифугировали при тех же условиях. Осадок ресуспендировали в 10 мл ростовой среды и производили подсчет полученного количества клеток в счетной камере. Клетки рассаживали в пластиковый стерильный 96-гнездный микротест для тканевых культур (Nunclon, Дания) из расчета 2–4×10⁴ клеток на 1 см² культуральной поверхности. Клетки культивировали при 37°C в насыщенной водяными парами атмосфере, содержащей 95% воздуха и 5% углекислого газа в увлажняемом CO₂-инкубаторе (Forma Scientific, США). Смену среды проводили через день. Для экспериментов использовали 7–10-дневную первичную культуру клеток. Такая культура представляет собой смешанную клеточную популяцию, состоящую преимущественно из типичных и модифицированных гладкомышечных клеток [37]. Клетки, полученные из непораженных и атеросклеротических участков интимы аорты человека, культивировали отдельно и использовали в экспериментах различных типов, что позволяло в дальнейшем использовать две клеточные модели, различающихся по своим свойствам. Первичную культуру клеток, выделенных из не пораженных атеросклерозом участков интимы аорты, использовали для воспроизведения процессов атерогенеза на клеточном уровне и оценки антиатерогенных свойств исследуемых веществ. Антиатерогенным действием называли эффекты, препятствующие основным проявлениям атерогенеза на клеточном уровне, и, прежде всего, накоплению внутриклеточного холестерина. Первичную культуру клеток, выделенных из не пораженных атеросклерозом участков интимы аорты, использовали для оценки антиатеросклеротических свойств исследуемых веществ. Антиатеросклеротическим действием называли эффекты, проявляющиеся в уменьшении содержания внутриклеточного холестерина по сравнению с исходным уровнем.

Получение сыворотки крови

Кровь из локтевой вены в количестве 5–7 мл забирали стерильным одноразовым пластиковым шприцом в сухую пластиковую пробирку с завинчивающейся крышкой,

объемом 15 мл. Пробирку с кровью выдерживали при комнатной температуре в течение 1 часа для образования сгустка, затем в холодильнике при +4°C в течение 1 часа для ретракции сгустка. Сгусток отделяли стеклянной палочкой от стенок пробирки. Пробирку центрифугировали в настольной центрифуге Beckman TJ-6 при 1800 g в течение 15 мин. Полученную сыворотку крови (без примеси эритроцитов) разливали в пластиковые пробирки типа «Эппендорф» по 1 мл. Образцы сыворотки крови хранили в замороженном состоянии (при –18°C) до проведения измерения АСК и других биохимических параметров.

Культивирование клеток

с исследуемыми сыворотками крови человека

В день эксперимента культуральную среду заменяли на бессывороточную среду 199, содержащую по 100 ед/мл пенициллина и стрептомицина, 2,5 мкг/мл фунгизона и 2 мМ L-глутамин, и к ней добавляли исследуемую сыворотку крови в конечной концентрации 40% (при использовании первичной культуры субэндотелиальных клеток непораженной интимы аорты человека) или 10% (при использовании культуры моноцитов-макрофагов крови человека). При инкубации клеток с препаратами ЛНП к опытным культурам клеток добавляли среду 199 с антибиотиками и 10% эмбриональной телячьей сывороткой, содержащей 100 мкг/мл ЛНП (по белку). В качестве контроля использовали клетки, которые продолжали культивировать в среде 199, содержащей антибиотики и 10% эмбриональную телячью сыворотку. Обычно из 88 гнезд с первичными культурами клеток, размещенных на одном 96-луночном микротесте для культур тканей, 16 использовали в качестве контроля, остальные — в качестве опытных культур, причем на испытание каждой сыворотки (или образца ЛНП) отводили по 4 культуры. При использовании 48-луночных микротестов в качестве контроля использовали 8 гнезд. После добавления исследуемых сывороток крови (или образцов ЛНП) клетки инкубировали при 37°C в CO₂-инкубаторе в течение 24 ч (при использовании первичной культуры субэндотелиальных клеток непораженной интимы аорты человека) или 3 ч (при использовании культуры моноцитов-макрофагов крови человека). По окончании инкубации культуры тщательно отмывали от культуральной среды дважды 0,15 М изотоническим фосфатным буфером (ФИБ) (pH=7,35), затем дважды ФИБ, содержащим 0,2% бычий сывороточный альбумин (БСА) (Sigma Chemical Company, США), и еще трижды ФИБ.

Определение содержания внутриклеточного холестерина

По окончании инкубации липиды из клеток экстрагировали трижды смесью n-гексана и изопропанола в объемном отношении 3:2 по методу Naga и [10], каждая экстракция продолжалась по 30 мин. Экстракт переносили в чистый 96-гнездный микротест и выпаривали при комнатной температуре под током воздуха. Полученный сухой осадок растворяли в 25 мкл раствора, содержащего 15 мМ холат натрия и 0,05% Тритон X-100 (Sigma Chemical Company, США), добавляли по 25 мкл изопропанола и по 100 мкл раствора «Monotest» (Boehringer Mannheim, Германия) для определения общего холестерина. Ферментативный набор для определения общего холестерина содержал 0,2 ед/мл холестеринэстеразы, 0,1 ед/мл холестериноксидазы, 0,1 ед/мл пероксидазы хрена, 1 мМ

4-аминофеназона, 3 мМ фенола и 2 мМ 3,4-дихлорфенола в 50 мМ Трис-буфере, рН=7,7. В качестве стандарта использовали стандартный раствор холестерина в изопропанол-ле, 1 мг/мл (Boehringer Mannheim, Германия). Смесь инкубировали при 37°C в течение 30 мин, после чего измеряли оптическую плотность проб при длине волны 492 нм на автоматическом 8-канальном спектрофотометре «Multiscan Bichromatic» (LabSystems, Финляндия) и рассчитывали содержание общего холестерина в каждой пробе. При необходимости, содержание свободного внутриклеточного холестерина определяли в аликвотах липидного экстракта аналогичным образом, используя раствор «Monotest» (Boehringer Mannheim, Германия) для определения свободного холестерина, не содержащий холестеринэстеразы. Содержание эстерифицированного внутриклеточного холестерина определяли по разнице уровней общего и свободного холестерина.

Определение внутриклеточных липидов методом тонкослойной хроматографии

Липиды из клеток экстрагировали трижды смесью п-гексана и изопропанола в объемном отношении 3:2 по методу Naga и Radin [10], каждая экстракция продолжалась по 30 мин. Нейтральные липиды разделяли методом тонкослойной хроматографии на силикагеле Kieselgel 60 (E. Merck, Германия) в двух последовательных системах:

- бензол — диэтиловый эфир — этанол — уксусная кислота в объемном соотношении 50:40:2:0,2;
- п-гексан — диэтиловый эфир — уксусная кислота в объемном соотношении 90:10:1.

В качестве стандартов использовали холестерилолеат, триолеин и холестерин. Фосфолипиды хроматографировали в системе метилацетат — п-пропанол — хлороформ — метанол — 0,25% KCl в объемном соотношении 25:25:25:10:9 [49]. Сканирование хроматограммы проводили при длине волны 200 нм на сканнере Shimadzu CS-930 (Shimadzu Corporation, Япония).

Определение клеточного белка

Фиксированные на пластике клетки после экстракции липидов растворяли в 50 мкл 0,2 н. NaOH при комнатной температуре в течение 12—16 часов, после чего определяли содержание клеточного белка в каждой пробе по методу Lowry et al. [22]. К пробе добавляли 200 мкл свежеприготовленного 0,2 н. раствора NaOH, содержащего 0,01% тартрата калия-натрия, 0,005% сульфата меди и 0,02% карбоната натрия, затем 20 мкл 1 н. реактива Фолина—Кукалту (Sigma Chemical Company, США) и выдерживали при комнатной температуре в течение 1 часа, после чего измеряли оптическую плотность проб на спектрофотометре «Multiscan Bichromatic» при длине волны

690 нм и рассчитывали содержание клеточного белка в каждой пробе. В качестве стандарта использовали раствор БСА в 0,2 н. NaOH (1 мг/мл).

Оценка антиатеросклеротического эффекта в модели *in vitro*

Для изучения антиатеросклеротического действия исследуемых веществ использовали первичную культуру субэндотелиальных клеток из пораженных атеросклерозом участков интимы аорты человека. Удельное содержание общего холестерина в таких клетках обычно составляло 50—200 мкг/мг клеточного белка. В инкубационную среду добавляли исследуемое вещество в различных концентрациях. Обычно использовали логарифмический диапазон концентраций исследуемого вещества. Инкубацию, экстракцию липидов из клеток, определение клеточного белка и измерение удельного содержания общего холестерина проводили, как описано выше. Содержание внутриклеточного холестерина в контрольных клетках, инкубированных без добавления исследуемого вещества, принимали за 100%. Антиатеросклеротический эффект исследуемых веществ определяли как их способность статистически достоверно снижать исходно высокое содержание внутриклеточного холестерина.

Оценка антиатерогенного эффекта в модели *ex vivo*

В скрининговых и пилотных исследованиях с использованием модели *ex vivo* принимали участие здоровые добровольцы (в общей сложности 86 чел., преимущественно мужчины), не имеющие признаков клинических проявлений атеросклероза или системных воспалительных заболеваний, у которых, тем не менее, при первичном обследовании была выявлена АСК — способность сыворотки крови вызывать накопление липидов в культивируемых клетках. Исследования соответствовали требованиям, предъявляемым стандартом качественных клинических испытаний (Good Clinical Practice, GCP) к исследованиям фазы I и II. У добровольцев брали кровь непосредственно перед приемом исследуемого вещества, а также через соответствующие интервалы времени после его приема внутрь (обычно через 2, 4 и 6 часов при скрининговых исследованиях и при оценке краткосрочного антиатерогенного действия, а также через 4, 8, 12 и 24 часа при оценке длительности эффекта и подборе адекватного режима приема). Инкубацию клеток с сыворотками крови, экстракцию липидов из клеток, определение клеточного белка и расчет атерогенного потенциала сыворотки крови проводили, как описано выше. Антиатерогенный эффект исследуемых веществ в модели *ex vivo* определяли как их способность статистически достоверно снижать исходную атерогенность сыворотки крови. Су-

Таблица 1

Метаанализ распространенности атерогенности сыворотки крови

Обследованная группа	Количество обследованных	Частота выявления атерогенности, количество случаев и %	Среднее накопление холестерина в клетках, % от контроля
Здоровые лица (34)	42	8 (19%)	104±5
Здоровые лица (65)	22	4 (18%)	115±7
Здоровые лица (9)	24	4 (17%)	112±8
Итоговые результаты по группе "здоровые лица"	84	16 (19%)	114±4

шественной особенностью данной модели является возможность оценки антиатерогенного потенциала различных веществ (а также их активных метаболитов) после усвоения, распределения и биотрансформации в организме человека, т.е. получение специфических фармакодинамических характеристик.

Определение пролиферативной активности клеток

Клетки, выделенные из нормальных или пораженных атеросклерозом участков интимы аорты человека, инкубировали в течение 24 ч в присутствии 10 мкКи/мл [³H]-тимидина. По окончании инкубации липиды из клеток экстрагировали, как описано выше, а фиксированные на пластике клетки растворяли в 50 мкл 0,2 н. NaOH при комнатной температуре в течение 12–16 ч. После растворения радиоактивность измеряли на сцинтилляционном счетчике 1215 Rackbeta II (LKB, Швеция).

Определение синтеза коллагена

Клетки, выделенные из нормальных или пораженных атеросклерозом участков интимы аорты человека, инкубировали в течение 24 ч в присутствии 5 мкКи/мл [³H]-пролина. По окончании инкубации включение меченого пролина в обработанную коллагеназой фракцию культуральной среды определяли по методу Peterkofsky и Diegelmann [38]. Из культуры отбирали 500 мкл среды и переносили в стеклянные пробирки. Клетки промывали 2 раза по 250 мкл ФИБ и смывы переносили в те же пробирки. Пробы нагревали в течение 15 мин при 80°C для инактивации протеиназ. После охлаждения до +4°C в пробы добавляли 1 мл 20% ледяной трихлоруксусной кислоты (ТХУ), содержащей 2 мМ пролина. Спустя 10 мин пробы центрифугировали (10 мин, 3500 g). Супернатант отбрасывали, а осадок промывали трижды 1 мл 5% ТХУ, содержащей 1 мМ пролина. Промытый осадок растворяли в 0,4 мл 0,1 N NaOH, разделяли на аликвоты по 200 мкл и нейтрализовали равным объемом 0,08 N HCl. К одной из аликвот добавляли 80 мкл 60 mM HEPES, содержащего 0,2 мМ фенилметилсульфонилфторида, 0,25 мМ CaCl₂, 1,25 мМ N-этиленамида, и 20 мкл раствора коллагеназы (1 мг/мл) (Worthington Diagnostic System, США). К другой аликвоте, служившей бланком, добавляли те же вещества за исключением коллагеназы. Пробы инкубировали 4 часа при 37°C. Инкубацию останавливали добавлением 0,5 мл 10% ТХУ, содержащей 0,5% таниновой кислоты. После центрифугирования в течение 10 мин при 1800 g определяли радиоактив-

ность супернатанта на сцинтилляционном счетчике 1215 Rackbeta II (LKB, Швеция). Синтез коллагена определяли по формуле $2 * ([dpm]образца - [dpm]бланка) / (клеточный\ белок, мкг)$.

Ультразвуковое сканирование сосудов

Для оценки состояния стенки сонных артерий использовали ультразвуграфию высокого разрешения в В-режиме с использованием линейного сосудистого датчика с частотой 7,5 МГц. Протокол обследования включал сканирование левой и правой сонных артерий и области каротидного синуса с фокусировкой на задней стенке артерии в трех фиксированных проекциях — переднебоковой, боковой и заднебоковой [52]. Обследование проводили в положении лежа после 15-минутного отдыха. Все измерения проводили последовательно в течение одной сессии. Пропедуру сканирования записывали на видеоманитовфон высокого разрешения стандарта супер-VHS PAL. Анализ записей проводил сертифицированный оператор, не участвовавший в процессе рандомизации. Толщину интимо-медиального слоя (ИМС) измеряли с помощью компьютерной программы Prosound (R. Seltzer, USA). Измерения проводили на участке общей сонной артерии длиной 10 мм, противоположащем началу каротидного синуса. Толщину ИМС задней стенки общей сонной артерии определяли как расстояние от ведущего края первой эхогенной зоны до ведущего края второй эхогенной зоны. Среднее значение трех измерений (в переднебоковой, боковой и заднебоковой проекциях) рассматривали как интегральный показатель толщины ИМС.

Двойное слепое плацебо-контролируемое исследование «Мониторирование атеросклероза при снижении атерогенности сыворотки крови»

Данное рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование получило название «Мониторирование атеросклероза при снижении атерогенности», поскольку главной его задачей была оценка влияния снижения атерогенности сыворотки крови под действием Алликора на динамику изменений диффузного утолщения интимо-медиального слоя (ИМС) сонных артерий. Скрининговое обследование перед включением в исследование прошло 260 чел. Под последующим наблюдением находились 196 мужчин в возрасте от 40 до 74 лет, у которых при включении в исследование было выявлено бессимптомное раннее атеросклеротическое поражение

Таблица 2

Влияние липостабила, ловастатина и ингибиторов АХАТ на содержание холестерина в атеросклеротических клетках интимы аорты человека *in vitro*

Препарат	Содержание внутриклеточного холестерина, мкг/мг клеточного белка
Контроль	105±11
Ловастатин	110±10
CI-976	98±8
CL-277082	107±10
DuP-128	97±6
Липостабил	82±3*

Примечание. Клетки из пораженных атеросклерозом участков интимы аорты человека выделяли и культивировали, как описано в разделе «Материалы и методы». Влияние веществ на содержание внутриклеточного холестерина изучали в концентрации 10⁻⁶ М. Данные представляют средние значения, полученные в трех независимых экспериментах; * — достоверное снижение содержания внутриклеточного холестерина, p<0,05

общих сонных артерий, т.е. максимальная толщина ИМС при ультразвуковом сканировании сонных артерий в В-режиме составляла от 1,00 до 2,00 мм. Ультразвуковое исследование сосудов проводили, как описано выше. Включенные в исследование лица не имели хронических заболеваний, требующих постоянного приема кардиотропных, вазоактивных, липидснижающих, гипотензивных или сахароснижающих лекарственных средств. Потребность в регулярном (более 2 месяцев в году) приеме данных препаратов являлась критерием исключения. Главной оценкой эффекта лечения являлась скорость прогрессирования каротидного атеросклероза, которую определяли как увеличение среднего значения толщины ИМС дальней стенки двух артериальных сегментов — левой и правой общих сонных артерий. Для достижения равномерного распределения пациентов по группам наблюдения и обеспечения возможности выполнения статистического анализа результатов была проведена попарно-блоковая рандомизация пациентов с учетом возраста, систолического и диастолического артериального давления, частоты курения, семейного анамнеза сердечно-сосудистых заболеваний, уровня холестерина и триглицеридов сыворотки крови, исходной АСК и исходной толщины ИМС. После рандомизации одна группа участников исследования получала Алликор (таблетки, содержащие 150 мг чесночного порошка, покрытые оболочкой, ИНАТ-Фарма, Россия) по 1 таблетке 2 раза в сутки, другая группа получала плацебо в том же режиме. Таблетки Алликора и плацебо выглядели идентично. При включении в исследование все участники получили одинаковые рекомендации по соблюдению диеты и ведению здорового образа жизни.

Для оценки состояния стенки сонных артерий использовали ультразвукографию высокого разрешения в В-режиме с использованием линейного сосудистого датчика с частотой 7,5 МГц, как описано выше. Обследования проводили трижды в течение 1—3 нед. до включения в исследование, один раз в 3 мес. в течение первого года наблюдения, один раз в 6 мес. в течение второго года наблюдения, и трижды в течение 1—3 нед. по завершении исследования.

Для проведения биохимических анализов использовали сыворотку крови, полученную из венозной крови, взятой утром натощак. Содержание холестерина и триглицеридов определяли ферментативным методом с использованием наборов Boehringer Mannheim (Boehringer Mannheim GmbH, Germany), как описано выше. Атерогенный потенциал сыворотки крови оценивали по ее способности вызывать накопление холестерина в культивируемых клетках, как описано выше.

Статистическая обработка данных

Статистическую оценку достоверности различий проводили с использованием пакета SPSS версии 12.0 (SPSS Inc., США). Графическую обработку данных проводили с использованием пакета SigmaPlot версии 7.0 (SPSS Inc., США). Достоверными считали различия при 95% вероятности безошибочного прогноза. Характер распределения признака определяли с помощью F-теста и теста Колмогорова—Смирнова. После оценки вариабельности признака в отношении нормальности распределения для межгрупповых сравнений использовали тест Манна—Уитни или групповой t-тест, для оценки изменений показателей в динамике использовали тест Уилкоксона

Таблица 3

Антиатерогенное действие верапамила *ex vivo* при длительном приеме

Длительность приема препарата, недель	Содержание внутриклеточного холестерина, % от контроля
0	136±4 *
2	90±1 #
4	97±1 #
6	94±1 #
8	111±10
10	99±4 #

Примечание. Контрольные клетки, выделенные из непораженных участков интимы аорты, содержали 35±4 мкг холестерина на 1 мг клеточного белка; этот уровень принят за 100%. * — достоверное накопление внутриклеточного холестерина, $p < 0,05$; # — достоверное снижение атерогенности сыворотки крови, $p < 0,05$

Таблица 4

Антиатеросклеротическое действие экстракта чеснока в модели *in vitro*

Концентрация экстракта	Содержание свободного холестерина, % от контроля	Содержание эфиров холестерина, % от контроля	Включение [³ H]-тимидина, % от контроля
0,1 мкг/мл	91±4	93±4	92±5
1 мкг/мл	102±6	89±05	94±4
10 мкг/мл	90±6	85±4 *	85±5 *
100 мкг/мл	83±7 *	71±5 *	85±3 *
1000 мкг/мл	74±4 *	68±5 *	45±5 *

Примечание. В таблице представлены средние данные трех независимых экспериментов. Клетки из атеросклеротических участков интимы аорты человека выделяли и культивировали, как описано в разделе «Материалы и методы». Контрольные клетки, инкубированные без добавления экстракта чеснока, содержали 15,7-20,7 мкг свободного холестерина на 1 мг клеточного белка, 41,3-54,2 мкг эфиров холестерина на 1 мг клеточного белка, и включение [³H]-тимидина составляло 137-238 dpm/мг клеточного белка; * — достоверное снижение показателей по сравнению с контролем, $p < 0,05$

или парный t-тест. Для сравнения распределений номинальных показателей и категориальных величин использовали показатель χ^2 по Пирсону с поправкой по Йетсу. Для оценки связи клинико-биохимических показателей и их изменений использовали корреляционный анализ по Пирсону с поправкой Бонферрони и регрессионный анализ. В окончательном виде данные для непрерывных величин представляли в виде среднего арифметического значения с указанием стандартной ошибки.

Результаты

Воспроизведение ключевых событий атерогенеза в клеточных моделях

С помощью клеточной модели *in vitro* в условиях первичной культуры клеток интимы аорты человека, выделенных из непораженных участков, было установлено, что сыворотки крови больных с ангиографически документированным атеросклерозом коронарных артерий, в отличие от сыворотки крови здоровых лиц, способны вызывать основные проявления атеросклероза на клеточном уровне — стимулировать накопление липидов (главным образом, эфиров холестерина), усиливать пролиферативную активность клеток и синтез компонентов соединительнотканного матрикса.

На рис. 1 представлена зависимость содержания общего холестерина в культивируемых клетках после 24 ч инкубации с исследуемой сывороткой крови человека от концентрации сыворотки. Сыворотка крови здоровых лиц не вызвала достоверных изменений в содержании внутриклеточного холестерина даже при использовании высоких концентраций. Напротив, в данном эксперименте сыворотка крови больного атеросклерозом уже в концентрации 20% вызвала 2,5-кратное увеличение содержания холестерина в клетках, и этот эффект усиливался при использовании более высоких концентраций сыворотки крови.

В ряде последующих экспериментов было установлено, что накопление внутриклеточного холестерина, индуцированное сывороткой крови человека, сопровождается повышением пролиферативной активности клеток и усилением синтеза коллагена и общего белка.

Атерогенные и неатерогенные сыворотки отличались по способности увеличивать синтез общего белка и повы-

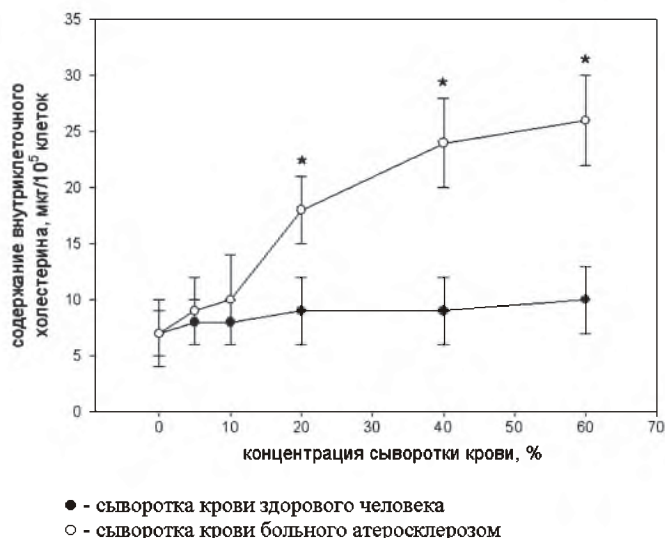


Рис. 1. Накопление внутриклеточного холестерина, индуцированное сывороткой крови человека.

* — достоверное увеличение содержания внутриклеточного холестерина, $p < 0,05$

шать пролиферативную активность. Была выявлена высокая корреляционная связь между содержанием внутриклеточного холестерина и пролиферативной активностью ($r=0,872$, $p < 0,0001$), а также синтезом белка ($r=0,826$, $p < 0,0001$). Существовала прямая корреляция между пролиферацией клеток и их синтетической активностью ($r=0,969$, $p < 0,0001$). Такая же связь была выявлена между количеством накопленного в клетках холестерина и пролиферативной активностью ($r=0,804$, $p=0,0002$), и синтетической активностью ($r=0,827$, $p=0,0001$).

Таким образом, атерогенные свойства сыворотки крови подразумевают стимулирующее воздействие на все три ключевых параметра атерогенеза на клеточном уровне: липоидоз, пролиферацию и фиброз. Накопление внутриклеточного холестерина является запускающим фактором для стимуляции пролиферативной активности клеток, синтеза белка и компонентов внеклеточного матрикса. Поэтому в дальнейших исследованиях в качестве интегрального показателя атерогенных свойств сыворотки крови мы использовали степень накопления внутриклеточного холестерина.

Таблица 5

Антиатерогенное действие экстракта чеснока в модели *in vitro*

Концентрация экстракта	Содержание свободного холестерина, % от контроля	Содержание эфиров холестерина, % от контроля	Включение [³ H]-тимидина, % от контроля
Атерогенная сыворотка крови (АС)	144±4	286±16	478±17
АС + 0,1 мкг/мл	137±7	193±12 *	464±13
АС + 1 мкг/мл	143±6	173±7 *	464±11
АС + 10 мкг/мл	141±6	150±4 *	464±17
АС + 100 мкг/мл	141±9	140±8 *	366±8 *
АС + 1000 мкг/мл	129±5 *	134±12 *	269±11 *

В таблице представлены средние данные трех независимых экспериментов. Клетки из непораженных участков интимы аорты человека выделяли и культивировали, как описано в разделе «Материалы и методы». Контрольные клетки, инкубированные без добавления атерогенной сыворотки крови и экстракта чеснока, содержали 11,7-16,8 мкг свободного холестерина на 1 мг клеточного белка, 6,8-14,2 мкг эфиров холестерина на 1 мг клеточного белка, и включение [³H]-тимидина составляло 79-277 dpm/мг клеточного белка; * — достоверное снижение показателей по сравнению с атерогенными эффектами сыворотки крови, $p < 0,05$

Оценка распространенности атерогенности сыворотки крови с использованием модели in vitro и определение концепции патогенетической терапии атеросклероза

Распространенность атерогенности сыворотки крови у больных с ангиографически документированным коронарным атеросклерозом, у больных сахарным диабетом 1 и 2 типа без клинических признаков ИБС, у больных системной красной волчанкой была нами изучена в ряде работ. Тем не менее, данных о распространенности явления атерогенности сыворотки крови у разных категорий лиц, в особенности, при субклиническом атеросклерозе, недостаточно.

Мы провели дополнительные клинико-лабораторные исследования по выявлению атерогенности сыворотки крови у практически здоровых лиц, при субклиническом атеросклерозе, при документированном атеросклерозе и сопоставили новые данные с уже имеющимися результатами исследований.

В рамках исследования по оценке атерогенных компонентов сыворотки крови, проводимом совместно с профессором М. Rubenfire (University of Michigan, Ann Arbor, США), были изучены 138 образцов сыворотки крови от лиц с гиперлипидемией (содержание холестерина в крови составляло более 6,2 ммоль/л), у которых при ангиографическом обследовании был выявлен гемодинамически незначимый (субклинический) атеросклероз коронарных артерий. У 82 пациентов (59%) была выявлена АСК, среднее накопление холестерина в клетках составило $170 \pm 6\%$ от контроля. Остальные 56 сывороток (41%) были неатерогенны. Среднее значение АСК во всей группе составило $143 \pm 8\%$.

В рамках исследования ASAP, проводимого под руководством профессора J. Salonen (University of Kuopio, Финляндия), нами были получены 58 образцов сыворотки крови от участников исследования. У них при ультразвуковом исследовании сонных артерий был выявлен субклинический каротидный атеросклероз, и при этом отсутствовали клинические признаки ИБС и липидные факторы риска ССЗ. У 38 участников исследования (66%) была выявлена АСК, среднее накопление холестерина в клетках составило $184 \pm 9\%$ от контроля. Остальные 20 сывороток (44%) были неатерогенны. Среднее значение АСК во всей группе составило $158 \pm 11\%$.

В собственном скрининговом исследовании мы оценили атерогенный потенциал сыворотки крови у 173 муж-

чин, имевших бессимптомный каротидный атеросклероз, выявленный при ультразвуковом исследовании, характеризовавшихся нормальным или умеренно повышенным содержанием холестерина в крови (до 6,0 ммоль/л). У 132 чел. (76%) было выявлено индуцированное сывороткой крови накопление холестерина в клетках из непораженной интимы аорты человека, которое составило в среднем $175 \pm 8\%$ от контроля. Остальные сыворотки (41 образец, или 34% случаев) были неатерогенны. Среднее значение АСК во всей группе составило $158 \pm 6\%$.

В этом же скрининговом исследовании атерогенность сыворотки крови была измерена у 46 мужчин, перенесших инфаркт миокарда, имевших диффузное утолщение интимо-медиального слоя сонных артерий, нормальный или умеренно повышенный уровень холестерина в крови (до 6,0 ммоль/л). У 36 пациентов (78%) сыворотка оказалась атерогенной, и накопление внутриклеточного холестерина составило $157 \pm 11\%$. У остальных 10 пациентов сыворотка крови не обладала атерогенными свойствами; среднее накопление холестерина во всей группе составило $144 \pm 8\%$.

Результаты проведенного метаанализа частоты выявления атерогенности сыворотки крови представлены в табл. 1.

У здоровых лиц, не имеющих факторов риска ИБС, АСК выявляется в 1/5 случаев. Не исключено, что у таких лиц имеется недиагностированный субклинический атеросклероз.

Уже при появлении документированного субклинического атеросклероза (или состояний, при которых с высокой долей вероятности можно предположить наличие субклинического атеросклероза — гиперлипидемии, сахарного диабета) доля лиц, имеющих атерогенную сыворотку крови, возрастает приблизительно до 70%. Наконец, при явном атеросклерозе, имеющем клинические проявления в виде ИБС, атерогенность выявляется почти в 90% случаев.

Показана высокая сопряженность АСК и явного (или предполагаемого с высокой долей вероятности) субклинического атеросклероза говорит о высокой сопряженности этих параметров ($\chi^2=79,46$; $p<0,0005$). При этом в случае выявления АСК отношение шансов составляет 10,4 (95% доверительный интервал от 5,6 до 19,4; $p<0,05$), относительный риск субклинического атеросклероза — 3,73 (95% доверительный интервал от 2,42 до 6,10; $p<0,05$),

Таблица 6

Исходные характеристики участников исследования

Показатель	Алликор (n=93)	Плацебо (n=103)
Средняя толщина ИМС, мм	0,929±0,015	0,937±0,015
Возраст, лет	60,4±1,1	61,5±0,8
Курение, n (%)	30 (32,3)	32 (31,1)
Отягощенный семейный анамнез по сердечно-сосудистым заболеваниям, n (%)	18 (19,4)	17 (16,5)
Систолическое АД, мм рт. ст.	133,3±1,3	131,9±1,4
Диастолическое АД, мм рт.ст	81,8±0,8	81,2±0,9
Холестерин, ммоль/л	6,14±0,12	6,02±0,10
Триглицериды, ммоль/л	2,17±0,14	2,23±0,12
Холестерин ЛВП, ммоль/л	1,07±0,03	1,10±0,03
Холестерин ЛНП, ммоль/л	4,06±0,10	3,88±0,09
Атерогенность сыворотки крови, % от контроля	156,2±5,1	156,4±5,2

диагностическая чувствительность — 95,3% (95% доверительный интервал от 92,9% до 97,1%), прогностическая значимость положительного результата — 71,0% (95% доверительный интервал от 69,2% до 72,3%), прогностическая значимость отрицательного результата — 81,0% (95% доверительный интервал от 71,5% до 81,2%). К сожалению, специфичность этого параметра при субклиническом атеросклерозе мала и составляет всего 34,2% (95% доверительный интервал от 30,2% до 37,3%).

Анализ сопряженности АСК и атеросклероза с клиническими проявлениями дает еще более высокую сопряженность этих параметров ($\chi^2=92,35$; $p<0,0005$). При выявлении АСК отношение шансов составляет 32,4 (95% доверительный интервал от 5,62 до 19,40; $p<0,05$), относительный риск манифестировавшего атеросклероза — 4,64 (95% доверительный интервал от 3,16 до 6,80; $p<0,05$), диагностическая чувствительность — 86,1% (95% доверительный интервал от 80,9% до 90,1%), специфичность — 84,0% (95% доверительный интервал от 76,5% до 89,7%); прогностическая значимость положительного результата — 88,4% (95% доверительный интервал от 83,0% до 92,5%), прогностическая значимость отрицательного результата — 81,0% (95% доверительный интервал от 73,8% до 86,5%). Несмотря на высокую диагностическую ценность и отличные показатели чувствительности и специфичности, при явном, атеросклерозе с клиническими проявлениями, диагностика этого заболевания с помощью трудоемкого клеточного теста, пожалуй, не имеет смысла.

Тем не менее, при сравнении частоты выявления АСК при субклиническом и клиническом атеросклерозе мы получили гораздо более низкую сопряженность параметров ($\chi^2=13,43$; $p=0,0009$). Отношение шансов составило 3,1 (95% доверительный интервал от 1,6 до 6,1; $p<0,05$), относительный риск — 1,25 (95% доверительный интервал от 1,12 до 1,34; $p<0,05$), диагностическая чувствительность — всего 23,7% (95% доверительный интервал от 21,8% до 25,0%), специфичность — 91,0% (95% доверительный интервал от 85,5 до 94,8); прогностическая значимость положительного результата — 88,4% (95% доверительный интервал от 81,4% до 93,4%), прогностическая значимость отрицательного результата — всего 29,1% (95% доверительный интервал от 27,3% до 30,3%).

Последние статистики имеют серьезное значение. Наряду с данными о частоте выявления АСК у здоровых лиц и больных субклиническим и клиническим атеросклерозом,

они говорят о том, что АСК является эффективным способом ранней доклинической диагностики атеросклероза. Атерогенность появляется задолго до клинических проявлений заболевания и возрастает по мере прогрессирования атеросклероза. Этот факт указывает на патогенетическую роль атерогенного потенциала сыворотки крови в возникновении и развитии атеросклеротических поражений.

Возникло обоснованное предположение, что целенаправленное снижение атерогенности сыворотки крови будет способствовать предотвращению накопления липидов в клетках артериальной стенки и, таким образом, подавлять атерогенез на его начальной стадии. Этот принцип антиатеросклеротической терапии является проявлением патогенетического подхода, реализуемого через воздействие на молекулярно-клеточные механизмы атерогенеза.

Исследование лекарственных и нелекарственных средств в отношении антиатеросклеротической активности

Первичная культура клеток аорты человека была использована в качестве модели для выявления прямого антиатеросклеротического и антиатерогенного действия холестерин снижающих лекарственных средств: липостабила — полиненасыщенного фосфатидилхолина, ловастатина — ингибитора ГМГ-КоА редуктазы и трех ингибиторов ацил-КоА:холестерин ацилтрансферазы (АХАТ).

Двадцать шесть больных ИБС получали липостабил (Rhone-Poulenc Rorer GmbH, Германия) внутривенно ежедневно в течение 14 дней, а затем липостабил-форте по 6 капсул ежедневно в течение 6 мес. Двадцать семь больных ИБС получали плацебо в том же режиме. По исходным клинико-биохимическим характеристикам пациенты в опытной и контрольной группах существенно не различались. Кровь для анализа атерогенности брали при включении пациентов в исследование, по окончании курса внутривенной терапии и по окончании исследования.

Семь больных ИБС с гиперхолестеринемией (на фоне соблюдения гиполлипидемической диеты холестерин ЛНП при включении в исследование превышал 200 мг/дл) получали ловастатин (Merck Sharp & Dohme-Chibret AG, Швейцария) в суточной дозе 40 мг в течение 6 мес. Кровь для анализа атерогенности брали при включении пациентов в исследование и по окончании исследования.

Таблица 7

Результаты исследований по регрессии атеросклероза сонных артерий

Исследование	Препарат	Среднее изменение толщины ИМС, мм в год	
		Плацебо/Контроль	Лечение
PLAC II	Правастатин	0,068	0,059
KAPS	Правастатин	0,029	0,010
ASAP	Симвастатин	—	-0,009
PREVENT	Амлодипин	0,011	-0,015
ASAP	Аторвастатин	—	-0,020
CLAS	Холестипол, ниацин	0,010	-0,020
MARS	Ловастатин	0,015	-0,028
VHAS	Верапамил	—	-0,028
MACA	Алликор	0,015	-0,022

Ингибиторы АХАТ CI-976, CL-277082 и DuP-128 были получены от компании SmithKline Beecham Pharmaceuticals (Великобритания).

Прямые антиатеросклеротические и антиатерогенные эффекты были изучены *in vitro* в первичных культурах клеток интимы аорты человека, выделенных из атеросклеротических поражений или из непораженных участков, соответственно. Влияние исследованных веществ на содержание холестерина в клетках из атеросклеротических участков представлено в табл. 2.

Как показано в табл. 2, ловастатин и ингибиторы АХАТ не влияли на содержание холестерина в клетках, выделенных из атеросклеротической бляшки. Липостабил достоверно снижал содержание холестерина в таких клетках, т.е. проявлял прямое антиатеросклеротическое действие. Этот эффект липостабила проявлялся также и в концентрациях 10^{-4} М и 10^{-5} М и носил дозозависимый характер.

В культуре клеток, выделенных из непораженной интимы аорты человека, в качестве индуктора накопления холестерина использовали пулированную атерогенную сыворотку больных ИБС. В этой модели изучали способность исследуемых веществ подавлять накопление холестерина в клетках.

После двухнедельного внутривенного введения липостабила АСК в среднем была сравнима с величиной у больных, которым вводили плацебо и не отличалась значимо от изначальной атерогенности. Значимых различий не было выявлено и между средними значениями исходной АСК, а также сыворотки крови больных по окончании 6-месячной терапии липостабила или приема плацебо. Наблюдалась лишь некоторая тенденция к снижению АСК как в опытной, так и в контрольной группе, не достигшая статистической значимости, которая может быть объяснена изменением характера питания и образа жизни под влиянием постоянного контакта с врачом.

Антиатеросклеротическое действие липостабила *ex vivo* было оценено на клетках, культивируемых из атеросклеротической бляшки. Содержание холестерина в клетках, инкубированных с сывороткой крови больных, взятой до начала лечения, было принято за 100%. Спустя 6 мес. перорального приема липостабила сыворотка крови больных приобретала антиатеросклеротические свойства. Добавление сыворотки, взятой в конце лечения, приводило к значимому снижению содержания холестерина в клетках культивируемых из атеросклеротической бляшки (в среднем на $14 \pm 3\%$, $p < 0,05$). Следует отметить, что внутривенное введение липостабила в течение двух недель не приводило к подобному эффекту. У больных, принимавших плацебо, сыворотка крови не приобретала антиатеросклеротических свойств *ex vivo*.

В отличие от липостабила, антиатерогенный эффект *ex vivo* был выявлен у больных, которые в течение 6 мес. принимали ловастатин. Сыворотка крови всех больных изначально была атерогенной и вызывала существенное увеличение содержания внутриклеточного холестерина при инкубации с клетками непораженной интимы. Спустя 6 мес. лечения ловастатином АСК резко упала у всех больных. Это означает, что ловастатин обладает прямым антиатерогенным действием, проявляемым *ex vivo*.

Предотвращение перегрузки клеток холестерином или стимуляция оттока избыточного холестерина из клеток представляются важными для торможения развития ате-

росклеротического поражения в сосудистой стенке. Поскольку липостабил положительно влиял на оба процесса, его можно рассматривать как антиатеросклеротическое лекарственное средство.

Ловастатин и ингибиторы АХАТ проявили только антиатерогенный эффект в модели *in vitro*, но не имели антиатеросклеротических свойств. Сходство эффектов ловастатина и ингибиторов АХАТ можно объяснить тем, что ловастатин, являясь ингибитором ГМГ-КоА редуктазы, в то же время слабо ингибирует АХАТ. Функция АХАТ заключается в реэтерификации холестерина, попавшего в клетку в виде богатых эфирами холестерина ЛНП. Попадающие в клетку модифицированные ЛНП деградируют, содержащиеся в них эфиры холестерина превращаются в свободный холестерин, а затем под действием АХАТ свободный холестерин этерифицируется и в такой форме перегружает клетку, превращая ее в пенную. Подавление АХАТ должно приводить к снижению накопления этерифицированного холестерина в клетках, и это является объяснением антиатерогенного эффекта ловастатина и других ингибиторов АХАТ. Отсутствие антиатеросклеротического эффекта этих агентов также объяснимо, поскольку подавление активности АХАТ не может привести к оттоку холестерина, уже накопившегося в клетках из атеросклеротической бляшки.

Антиатеросклеротические и антиатерогенные эффекты липостабила, выявленные *in vitro*, были частично подтверждены на модели *ex vivo*. Сыворотка крови больных, принимавших липостабил, приобретала антиатеросклеротические свойства, снижая содержание холестерина в клетках бляшки. Однако на клетках из непораженной интимы антиатерогенный эффект липостабила *ex vivo* не был обнаружен. Можно предположить, что терапия липостабиллом не предотвращает первичное накопление холестерина в артериальных клетках, однако препятствует дальнейшей перегрузке липид-нагруженных клеток и способствует оттоку из них холестерина.

Длительная терапия ловастатином обнаружила существенный антиатерогенный эффект *ex vivo*. Однократный прием ловастатина также проявляет антиатерогенный эффект на модели *ex vivo*, однако не обнаруживает антиатеросклеротического эффекта, что совпадает с данными, полученными *in vitro*.

Сравнение антиатеросклеротических эффектов трех типов холестерин-снижающих агентов позволяет предположить, что липостабил имеет определенное преимущество по сравнению с ловастатином и ингибиторами АХАТ, если он может не только предотвращать возникновение атеросклеротического поражения, но и способствовать его регрессии. Однако клинические исследования показали, что ловастатин, наряду с торможением развития атеросклероза, вызывает его регрессию [4]. Эти факты вряд ли противоречат полученным в данной работе результатам. Возможно, применение лекарств, обладающих только прямым антиатерогенным действием, но не вызывающих регрессию поражений, создаст благоприятные условия для эндогенных процессов, способствующих конечному результату — регрессии атеросклероза.

Прямое антиатеросклеротическое действие одного из представителей класса антагонистов кальция — верапамила было исследовано в первичной культуре клеток, выделенных из липофиброзной бляшки интимы аорты человека. Верапамил во всех исследованных концентрациях

оказывал благоприятное действие на атеросклеротические клеточные индексы: снижал содержание внутриклеточных липидов, пролиферативную активность клеток и синтез коллагена — основного белкового компонента соединительнотканного матрикса.

Далее было проведено сравнительное *in vitro* исследование эффектов различных препаратов — представителей классов антагонистов кальция, бета-блокаторов и нитратов — на атеросклеротические индексы в культуре интимальных клеток, выделенных из атеросклеротических поражений. Эти эффекты свойственны антагонистам кальция как классу лекарственных препаратов. Бета-блокаторы, напротив, обладали проатеросклеротическим действием, т.е. во всех исследованных концентрациях вызывали дополнительное отложение холестерина в клетках и стимулировали пролиферацию. Эти эффекты были свойственны бета-блокаторам как классу лекарственных препаратов. Нитраты не проявили сколько-нибудь значимого действия на атеросклеротические индексы в культуре клеток, выделенных из поражений. Соответственно, эти две группы препаратов не представляли интереса для дальнейшего изучения.

Далее антиатеросклеротические эффекты верапамила были изучены в модели *ex vivo*. Здоровые добровольцы (8 чел.), мужчины в возрасте 40—46 лет, нормолипидемии, у которых сыворотка крови не обладала атерогенными свойствами, однократно принимали верапамил в дозе 40 мг. Кровь для исследования брали непосредственно перед приемом, а также через 1, 2, 4, 8 и 12 часов после приема верапамила. В культуре клеток, выделенных из атеросклеротических участков интимы аорты человека, оценивали способность сыворотки крови изменять содержание внутриклеточного холестерина.

Таким образом, верапамил обладает антиатеросклеротическими свойствами в модели *ex vivo*, что вполне соответствует данным, полученным в модели *in vitro*. Это означает, что после усвоения и распределения в организме человека верапамил (или его активные метаболиты) способны оказывать на метаболизм липидов в клетках сосудистой стенки такое же действие, как и при прямом добавлении в культуральную жидкость.

Модель *ex vivo* была также использована для характеристики антиатерогенного действия верапамила. В этой части исследования приняли участие 6 больных ИБС, которым по показаниям был назначен верапамил, и у которых при включении в исследование была выявлена атерогенность сыворотки крови. Больные наблюдались в течение 10 недель и сдавали кровь каждые 2 недели для определения атерогенного потенциала сыворотки. Результаты исследования приведены в табл. 3.

В данном исследовании показано, что регулярный прием верапамила приводит к полному устранению атерогенного потенциала сыворотки крови, что также сочетается с результатами, полученными в модели *in vitro* при искусственной индукции накопления холестерина в клетках.

Было проведено клиническое исследование влияния другого антагониста кальция — амлодипина безилата (Pfizer Eastern Europe Division, Бельгия) — на атерогенные характеристики сыворотки крови больных ИБС. В исследовании были включены 20 больных ИБС в сочетании с гипертонической болезнью. На основании измерений исходной атерогенности сыворотки крови были сформиро-

ваны 2 группы по 10 пациентов — с атерогенной и неатерогенной сывороткой крови. Под наблюдением находились амбулаторные пациенты, мужчины в возрасте от 37 до 64 лет, имевшие показания для назначения антагонистов кальция. Критериями исключения были гиперхолестеринемия свыше 300 мг/дл, сахарный диабет, алкоголизм, сопутствующие хронические заболевания сердца и сосудов, крови, желудочно-кишечного тракта, печени и почек. Кровь для исследования забирали накануне назначения препарата, а также в 1, 7, 14, 21 и 28 день терапии. Длительность исследования составила 28 дней.

При включении в исследование сыворотка крови в «атерогенной» группе была способна вызывать 1,7—3,4-кратное увеличение содержания холестерина в клетках из непораженной интимы аорты человека (в среднем накопление холестерина составляло $212 \pm 17\%$ от контроля). Достоверное снижение показателя АСК было отмечено через 3 недели терапии амлодипином, а к концу исследования атерогенность была снижена в 2 раза по сравнению с исходным уровнем (в среднем накопление холестерина составляло $156 \pm 11\%$ от контроля). Таким образом, амлодипин обладает антиатерогенным действием при оценке в модели *ex vivo*.

При включении в исследование сыворотка крови в «неатерогенной» группе не оказывала достоверного влияния на содержания холестерина в клетках из атеросклеротической интимы аорты человека. Через 3 и 4 недели лечения были выявлены благоприятные эффекты амлодипина. Сыворотка крови приобретала антиатеросклеротические свойства, т.е. уменьшала содержание холестерина в клетках из атеросклеротической бляшки на $28 \pm 4\%$ и $24 \pm 5\%$, соответственно. Таким образом, амлодипин обладает также антиатеросклеротическим действием при оценке в модели *ex vivo*.

Итогом данного этапа работы может явиться следующее заключение. В проведенных скрининговых исследованиях антиатеросклеротических и антиатерогенных свойств лекарственных средств с использованием клеточных моделей *in vitro* и *ex vivo* было установлено, что перспективными средствами прямого антиатеросклеротического действия являются кальциевые антагонисты (эффект класса), статины (ловастатин) и эссенциальные фосфолипиды (липостабил). В качестве условно эффективных лекарственных средств можно рассматривать ингибиторы АХАТ. Бета-блокаторы необходимо рассматривать как препараты, потенциально обладающие проатерогенным действием (эффект класса). Нитраты не оказывают эффекта на процессы накопления липидов в клетках из артериальной стенки (свойство класса).

Исследование антиатеросклеротических свойств чеснока в модели in vitro

На данном этапе исследования были изучены антиатеросклеротические и антиатерогенные свойства порошка чеснока (Lichtwer Pharma GmbH, Германия), стандартизованного по содержанию аллицина (1,3%) и эффективности его высвобождения (0,6%), в клеточной модели *in vitro*. Водный экстракт порошка чеснока был приготовлен, как описано в разделе «Материалы и методы».

В первичной культуре клеток, выделенных из атеросклеротических участков интимы аорты человека, экстракт порошка чеснока в диапазоне концентраций 10—1000 мкг/мл после 24-часовой инкубации вызывал

статистически достоверное снижение содержания эфиров холестерина и подавлял пролиферативную активность клеток, о чем судили по включению меченого [³H]-тимидина. Результаты представлены в табл. 4. В диапазоне концентраций 100—1000 мкг/мл экстракт порошка чеснока также снижал содержание свободного холестерина в культивируемых клетках. Эти результаты говорят о прямом антиатеросклеротическом (терапевтическом) действии биологически активных компонентов чеснока, реализуемом на клеточном уровне.

В первичной культуре клеток, выделенных из непораженных участков интимы аорты человека, накопление внутриклеточного холестерина и усиление пролиферативной активности было индуцировано инкубацией клеток с пулированной атерогенной сывороткой крови больных с документированным коронарным атеросклерозом. Инкубация с атерогенной сывороткой крови привела к 1,5-кратному увеличению содержания внутриклеточного свободного холестерина, 3-кратному увеличению уровня эфиров холестерина и 5-кратному увеличению включения меченого [³H]-тимидина. При ко-инкубации клеток с экстрактом порошка чеснока в диапазоне концентраций 0,1—1000 мкг/мл происходило достоверное подавление накопления эфиров холестерина, в концентрации 1000 мкг/мл отмечалось подавление накопления свободного холестерина, и в диапазоне концентраций 100—1000 мкг/мл экстракт порошка чеснока препятствовал повышению пролиферативной активности клеток (табл. 5). Эти результаты говорят о прямом антиатерогенном (профилактическом) действии биологически активных компонентов чеснока, реализуемом на клеточном уровне.

Результаты этого эксперимента подтвердили данные об антиатерогенном эффекте экстракта чеснока *in vitro*, что проявляется в существенном уменьшении накопления свободного холестерина и его эфиров, индуцированного атерогенной сывороткой крови. Кроме того, было показано, что атерогенная сыворотка крови, помимо накопления свободного и этерифицированного холестерина в клетках, вызывает также накопление внутриклеточных триглицеридов, а экстракт чесночного порошка полностью устраняет этот эффект. Как и в культуре атеросклеротических клеток, экстракт чеснока в высокой концентрации не влияет на содержание фосфолипидов в клетках.

Было отмечено, что ряд антиатеросклеротических эффектов экстракта чеснока в модели *in vitro* проявлялся при использовании достаточно малой концентрации 10 мкг/мл, что приблизительно соответствует терапевтическим дозам препаратов на основе чеснока. Поэтому было предпринято изучение антиатерогенного действия коммерческого препарата на основе чеснока Kwai (Lichtwer Pharma GmbH, Германия) в модели *ex vivo*. Исследование было выполнено у 5 больных ИБС с ангиографически документированным коронарным атеросклерозом.

За 24 часа инкубации с клетками из непораженной интимы аорты человека сыворотки крови этих больных вызывали накопление внутриклеточного холестерина, в среднем на $68 \pm 11\%$ сверх исходного уровня ($p < 0,05$) (содержание общего холестерина в контрольных клетках составило $24,5 \pm 2,8$ мкг/мг клеточного белка). Через 2 часа после однократного перорального приема 900 мг порошка чеснока в форме таблеток Kwai сыворотка крови утрачивала атерогенные свойства и не вызывала достоверного

накопления холестерина в культивируемых клетках. Наблюдавшееся повышение содержания холестерина составляло $17 \pm 6\%$ сверх контрольного уровня, что не достигло уровня статистической значимости. Таким образом, прием таблеток на основе чесночного порошка способствует существенному снижению АСК, что полностью совпадает с данными, полученными нами относительно антиатерогенной активности порошка чеснока в модели *ex vivo*.

Результаты данного этапа исследования позволили предположить, что антиатерогенный и антиатеросклеротический эффект чеснока может проявляться не только в клеточных моделях *in vitro* и *ex vivo*, но и *in vivo*. Это предположение предстояло проверить в экспериментах на животной модели атеросклероза, а также в клинических исследованиях соответствующего дизайна.

На предыдущих этапах было установлено, что сыворотка крови больных субклиническим и манифестировавшим атеросклерозом обладает атерогенными свойствами, т.е. вызывает накопление внутриклеточного холестерина в условиях культуры клеток. Возникло предположение, что целенаправленное снижение АСК будет способствовать предотвращению накопления липидов в клетках артериальной стенки и, таким образом, подавлять атерогенез на его начальной стадии. В качестве препарата, способствующего этому, было предложено использовать Алликор — препарат пролонгированного действия на основе чеснока. На предыдущих этапах исследования было установлено, что прием Алликора приводит к существенному снижению АСК у больных атеросклерозом, подавляет процессы накопления внутриклеточных липидов, а также препятствует развитию пролиферативных и воспалительных клеточных реакций и избыточному синтезу компонентов матрикса. Было также установлено, что компоненты чеснока стимулируют внутриклеточный гидролиз эфиров холестерина и подавляют процессы этерификации холестерина в клетках интимы аорты человека, а также снижают синтез липидов в клетках, способствуя снижению внутриклеточного содержания эфиров холестерина. Таким образом, Алликор непосредственно влияет на все основные составляющие атеросклеротического процесса, поэтому его можно рассматривать как саногенетическое средство.

Для оценки роли снижения атерогенности крови как способа патогенетического воздействия на процессы атерогенеза было проведено двухлетнее двойное слепое плацебо-контролируемое исследование, в котором оценивалось влияние длительного приема Алликора на прогрессирование бессимптомных атеросклеротических поражений в сонных артериях. Дизайн исследования, методика проведения обследований и критерии включения рассмотрены в разделе «Материалы и методы».

Исходно в исследование было включено 260 чел. Три человека отказались от участия в исследовании сразу же после прохождения первичного скринингового обследования. В течение исследования из 257 включенных лиц из-под наблюдения выбыл 61 чел. (26 в основной группе и 35 в группе плацебо). Из них 2 случая выбытия было связано с побочными эффектами (жалобы со стороны желудочно-кишечного тракта, оба случая в основной группе). Одиннадцать пациентов умерло (4 в основной группе, 7 в группе плацебо). В основной группе было 3 случая внезапной смерти (острый инфаркт миокарда, ОИМ) и один

случай тромбоэмболии легочной артерии (ТЭЛА). В группе плацебо было 4 случая внезапной смерти (ОИМ), один случай острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК), один случай ТЭЛА и один случай метастатического рака тонкого кишечника. Двенадцать пациентов выбыло из-за назначения лекарственных средств в связи с выявлением сердечно-сосудистых или других заболеваний (4 в основной группе, 8 в группе плацебо). В их числе в основной группе было 2 случая ОНМК, один случай ОИМ, один случай рака предстательной железы; в группе плацебо было 3 случая ОИМ, три случая ОНМК и 2 случая нестабильной стенокардии. Семь пациентов выбыли из исследования по причине утери контакта с ними (4 в основной группе, 3 в группе плацебо). Двадцать больных выбыло по собственному желанию (8 в основной группе, 12 в группе плацебо). Девять пациентов были исключены из исследования в связи с несоблюдением требований протокола исследования (4 в основной группе, 5 в группе плацебо). Таким образом, к окончанию двухлетнего срока исследования под наблюдением находилось 196 чел. (93 в основной группе, 103 в группе плацебо). Показатель качества приема препарата составил 92% в обеих группах.

Анализ результатов исследования состоял из двух этапов. Первый этап был связан с оценкой исходного статуса включенных в исследование пациентов и выявлению связи клинико-биохимических параметров со степенью выраженности субклинического атеросклероза. Этот анализ оказалось возможным провести у всех 260 пациентов, прошедших скрининговое обследование. Второй этап включал оценку динамики клинико-биохимических параметров в течение 2 лет наблюдения у 196 пациентов и выявлению их взаимосвязи с течением субклинического атеросклероза, оцениваемого по изменениям толщины ИМС сонных артерий.

Как указывалось выше, к окончанию двухлетнего срока исследования под наблюдением осталось 196 чел. (93 в основной группе, 103 в группе плацебо), и показатель качества приема препарата составил 92% в обеих группах.

В табл. 6 представлены исходные характеристики участников исследования, наблюдавшихся в течение двух лет. Основная группа и группа плацебо не различались по основным демографическим, клиническим и биохимическим показателям, а также были сравнимы по исходной толщине ИМС. Поэтому последующий анализ динамики изменений толщины ИМС проводили без учета ковариации с другими параметрами.

Изменения толщины ИМС сонных артерий, происшедшие в течение исследования, были формально оценены как прогрессирование, регрессия или стабильное состояние на основании статистически достоверных различий между средними значениями трех обследований при включении в исследование и трех обследований по его завершении. У пациентов, принимавших Алликор, существенное увеличение толщины ИМС в одной или обеих сонных артериях было отмечено у 30 чел. (32,2%), а существенное уменьшение — у 44 чел. (47,3%). У 8 пациентов (8,6%) наблюдалось стабильное состояние, и у остальных 11 человек (11,8%) были отмечены разнонаправленные изменения, т.е. прогрессирование атеросклеротического процесса в одной артерии и регрессия поражений — в другой. В группе плацебо прогрессирование атеросклероза было отмечено в 50 случаях (48,5%), спонтанная регрессия — в 31 случае (30,1%), стабильное состояние на-

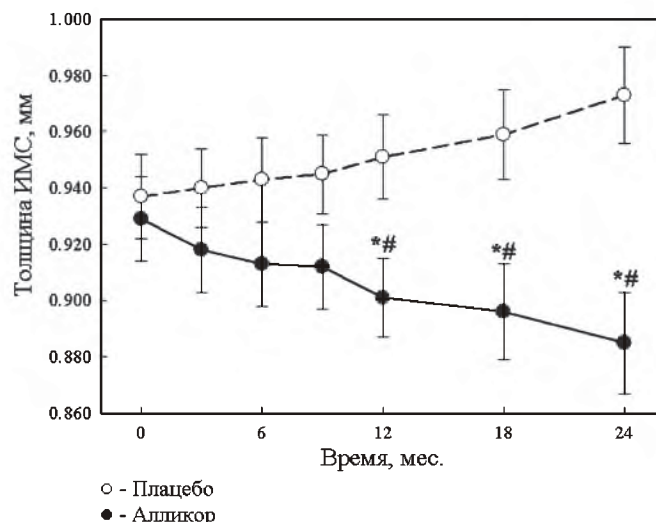


Рис. 2. Динамика изменений толщины интимо-медиального слоя.
* — статистически значимое отличие ($p < 0,05$) от данных на начало исследования;
— статистически значимое отличие ($p < 0,05$) от плацебо

блюдалось у 11 больных (10,7%), и разнонаправленные изменения — у остальных 7 пациентов (6,8%). Различия в направленности изменений толщины ИМС сонных артерий между основной группой и группой плацебо были статистически достоверными ($\chi^2 = 9,788$, $p = 0,020$).

Таким образом, случаи прогрессирования атеросклероза преобладали в группе плацебо, в то время как применение Алликора оказывало благоприятное действие, заключающееся в существенном увеличении числа случаев регрессии поражений, главным образом, за счет уменьшения частоты случаев прогрессирования атеросклероза.

Динамика абсолютных изменений толщины ИМС сонных артерий представлена на рис. 2. Тенденция к уменьшению толщины ИМС в основной группе была отмечена уже после первых 3 мес. исследования, но существенное отличие, как от исходного значения, так и от показателей в группе плацебо, было зарегистрировано только после 12 мес. лечения.

При последующих обследованиях различие между пациентами, принимавшими Алликор или плацебо, возрастало, и при этом сохранялось его статистическая значимость. Если в группе плацебо отмечалось умеренное увеличение толщины ИМС сонных артерий со средней скоростью $0,015 \pm 0,008$ мм в год при средней исходной толщине ИМС $0,931 \pm 0,009$ мм, то в основной группе изменения в толщине ИМС 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 толщины ИМС 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), хотя различие и не достигло уровня статистической значимости.

Положительный эффект Алликора был также выявлен при сравнении подгрупп пациентов, у которых отмечалась регрессия или прогрессирование атеросклеротических поражений. В основной группе у больных с прогрессированием атеросклероза ($n = 30$) толщина ИМС за 2 года увеличилась на $0,029 \pm 0,011$ мм, а в группе плацебо ($n = 50$)

— на $0,070 \pm 0,016$ мм ($p=0,038$). Аналогично, спонтанная регрессия атеросклероза в группе плацебо ($n=31$) характеризовалась уменьшением толщины ИМС на $0,041 \pm 0,014$ мм, а в основной группе ($n=44$) — на $0,082 \pm 0,015$ мм за 2 года наблюдения ($p=0,049$).

При включении в исследование АСК отсутствовала у 17 пациентов в группе плацебо (16,5%), а у остальных 86 чел. сыворотка крови была атерогенной, т.е. вызывала статистически достоверное накопление холестерина в культивируемых клетках (в 1,21—3,91 раза). В среднем АСК у больных в группе плацебо составила $166,3 \pm 5,5\%$ от контроля. У пациентов основной группы атерогенность сыворотки крови исходно отсутствовала у 23 чел. (24,7%), и была выявлена у 70 участников исследования, у которых сыворотка крови вызывала 1,22—3,53-кратное увеличение содержания внутриклеточного холестерина. В среднем АСК у больных в основной группе составила $172,1 \pm 5,8\%$ от контроля.

У больных с исходно неатерогенной сывороткой крови в группе плацебо ($n=17$) к концу исследования атерогенность была выявлена у 11 чел.; в основной группе ($n=23$) — у 9 чел., у остальных 14 пациентов сыворотка крови оставалась неатерогенной. Различия между группами пациентов, принимавших Алликор или плацебо, были статистически достоверными ($\chi^2=11,023$, $p<0,001$), т.е. применение Алликора предотвращало возникновение АСК.

У больных с исходно атерогенной сывороткой крови в группе плацебо спонтанное снижение атерогенности было отмечено у 26 чел., дальнейшее усиление атерогенного потенциала сыворотки крови — у 32 чел., и в 26 случаях атерогенность сохранялась на прежнем уровне. В основной группе АСК снизилась у 39 чел., повысилась у 13 чел. и осталась неизменной у 18 чел. Различия между группами были статистически достоверными ($\chi^2=11,274$, $p=0,004$), т.е. прием Алликора приводил к снижению атерогенного потенциала сыворотки крови.

Общая динамика изменений показателей АСК представлена на рис. 3. В группе плацебо среднее значение атерогенного потенциала по сравнению с исходными показателями за 2 года наблюдения существенно не изменилось. Напротив, у пациентов, принимавших Алликор, способность сыворотки крови вызывать накопление холестерина в клетках существенно снизилась ($p=0,016$) приблизительно на 30% от исходного уровня (95% доверительный интервал (ДИ) составил от 16,9% до 41,0%) уже после первых 3 мес. лечения, и достигнутый эффект сохранялся в течение всего дальнейшего наблюдения. Анализ общей линейной модели выявил статистически достоверное отличие в динамике изменений АСК между пациентами, принимавшими Алликор или плацебо ($p=0,008$).

Наличие или отсутствие АСК при включении в исследование, равно как и исходное значение атерогенного потенциала сыворотки крови не коррелировали с последующими изменениями толщины ИМС. Тем не менее, степень изменения АСК в ходе наблюдения была достоверно связана с изменениями толщины ИМС общих сонных артерий ($r=0,144$, $p=0,045$). У больных с исходно неатерогенной сывороткой крови взаимосвязь этих показателей была еще выше ($r=0,342$, $p=0,031$), очевидно, за счет тех пациентов из группы плацебо, у которых атерогенность

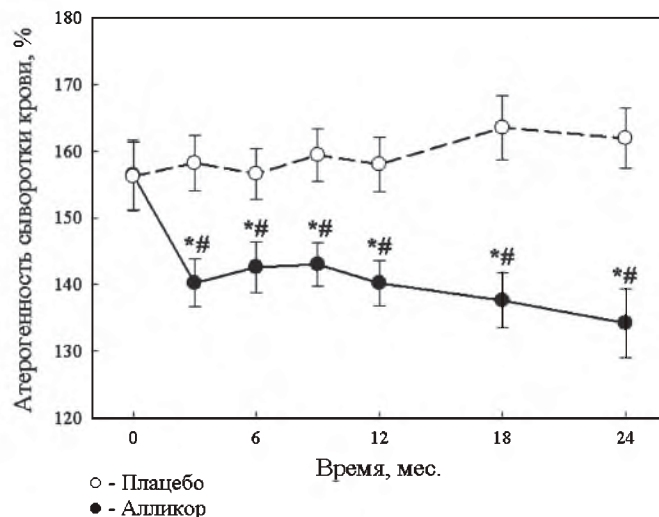


Рис. 3. Динамика изменений атерогенного потенциала сыворотки крови.

* — статистически значимое отличие ($p<0,05$) от данных на начало исследования;

— статистически значимое отличие ($p<0,05$) от плацебо

сыворотки крови появилась в ходе наблюдения; для них коэффициент корреляции составил 0,517, $p=0,034$.

У больных с исходно атерогенной сывороткой крови корреляция между изменениями уровня АСК и толщины ИМС достигла уровня статистической значимости только в основной группе ($r=0,254$, $p=0,034$), поскольку на фоне приема Алликора у большинства этих пациентов наблюдалось как снижение атерогенного потенциала, так и уменьшение толщины ИМС.

Не было выявлено зависимости исходной толщины ИМС и ее изменений за 2 года наблюдения от исходных показателей липидного профиля. Изменения толщины ИМС коррелировали с изменениями некоторых липидных параметров, происшедшими в течение исследования. Так, была выявлена тенденция к зависимости между динамикой толщины ИМС и изменениями уровня холестерина ЛВП ($r=-0,134$, $p=0,061$), а в группе плацебо эта корреляция была статистически достоверной ($r=-0,227$, $p=0,021$). У больных с исходно неатерогенной сывороткой крови эта корреляция также существовала ($r=-0,321$, $p=0,044$), у больных с исходно атерогенной сывороткой крови такая зависимость была отмечена как тенденция ($r=-0,198$, $p=0,068$). Кроме того, у пациентов, у которых АСК не изменилась за время исследования, была выявлена корреляция между изменениями толщины ИМС и уровня холестерина ЛНП ($r=0,295$, $p=0,018$).

Обсуждение

Для атеросклероза характерно сочетание множественных морфологических, гистологических и гемореологических изменений в артериях эластического или мышечно-эластического типа [46]. Патогенетическое лечение атеросклероза должно подразумевать, по меньшей мере, предотвращение дальнейшего прогрессирования атеросклеротических поражений, уменьшение размеров липидно-некротического ядра и стабилизацию фиброзной покрышки атеросклеротической бляшки. Такой подход тео-

ретически должен привести к регрессии имеющихся поражений.

Несколько лет назад было установлено, что сыворотка крови большинства больных атеросклерозом, в отличие от сыворотки крови здоровых лиц, способна вызывать накопление липидов в культивируемых клетках, т.е. обладает атерогенным потенциалом [5, 55]. Атерогенность сыворотки крови связана, прежде всего, с присутствием в ней модифицированных ЛНП [55—57], и в некоторой степени — атерогенных факторов нелипидной природы [17, 35, 36]. АСК, выявляемая в исследованиях с использованием культуры клеток, может служить интегральной характеристикой процесса накопления внутриклеточных липидов, ключевого звена атерогенеза. Существенное снижение АСК может оказать положительный эффект на естественное течение атеросклероза. Известно, что внутриклеточное накопление липидов при атерогенезе является триггерным событием, индуцирующим последующие патологические изменения в сосудистой стенке — усиленный синтез компонентов соединительнотканного матрикса, миграцию гематогенных клеток, повышение пролиферативной активности и развитие воспалительной реакции. Тем не менее, механизмы взаимоотношений этих различных по своей сущности процессов остаются малоизученными. Атерогенные свойства сыворотки крови подразумевают стимулирующее воздействие на все три ключевых параметра атерогенеза на клеточном уровне: липидоз, пролиферацию и фиброз. В работах В.В. Тертова с соавторами, А.Н. Орехова с соавторами было продемонстрировано, что накопление внутриклеточного холестерина является запускающим фактором для стимуляции пролиферативной активности клеток, синтеза белка и компонентов внеклеточного матрикса [29, 53, 58], и инициирующим событием в атерогенезе считают именно избыточное отложение холестерина в клетках артериальной стенки.

Для оценки антиатерогенной и антиатеросклеротической активности различных лекарственных и нелекарственных средств мы использовали клеточные модели *in vitro* и *ex vivo*. Проведенное сравнение антиатеросклеротических эффектов трех типов холестерин-снижающих агентов (ловастатина, липостабила и ингибитора АХАТ), позволило предположить, что липостабил имеет определенное преимущество по сравнению с ловастатином и ингибиторами АХАТ, если он может не только предотвращать возникновение атеросклеротического поражения, но и способствовать его регрессии в модели *in vitro*. Однако клинические исследования показали, что ловастатин, наряду с торможением развития атеросклероза, вызывает его регрессию [4]. Эти факты вряд ли противоречат полученным в данной работе результатам. Возможно, применение лекарств, обладающих только прямым антиатерогенным действием, но не вызывающих регрессию поражений, создаст благоприятные условия для эндогенных процессов, способствующих конечному результату — регрессии атеросклероза. Было установлено также, что антагонисты кальция (верапамил, амлодипин) обладают антиатеросклеротическими свойствами в моделях *in vitro* и *ex vivo*. Итак, в проведенных скрининговых исследованиях антиатеросклеротических и антиатерогенных свойств лекарственных средств было установлено, что перспективными средствами прямого антиатеросклеротического действия являются кальциевые антагонисты (эффект

класса), статины (ловастатин) и эссенциальные фосфолипиды (липостабил). В качестве условно эффективных лекарственных средств можно рассматривать ингибиторы АХАТ. Бета-блокаторы необходимо рассматривать как препараты, потенциально обладающие проатерогенным действием (эффект класса). Нитраты не оказывают эффекта на процессы накопления липидов в клетках из артериальной стенки (свойство класса).

Прямое влияние чеснока и препаратов на его основе на развитие и прогрессирование атеросклероза является объектом постоянной дискуссии [12—14, 18, 19, 21]. При этом антиатеросклеротический эффект чеснока зачастую связывают с его гипополипидемическим действием. Действительно, лабораторными и клиническими исследованиями было показано, что чеснок способен снижать содержание холестерина и ЛНП в крови [3, 19, 27, 40, 41, 52]. Предполагают, что механизм липидснижающего действия чеснока основан на подавлении ГМГ-КоА редуктазы [8, 9, 47].

В отличие от гипополипидемического эффекта, нами был исследован прямой антиатеросклеротический и антиатерогенный эффект чеснока, т.е. его способность влиять на атеросклеротический процесс в клетках из артериальной стенки *in vitro*. В качестве модели мы использовали первичную культуру клеток аорты человека, ферменты, полученные из клеток аорты и водный экстракт чесночного порошка. Экстракт чеснока снижал содержание триглицеридов, эфиров холестерина и свободного холестерина в атеросклеротических клетках, культивируемых из бляшки, и препятствовал накоплению этих липидов в нормальных клетках, культивируемых из неповрежденной интимы, т.е. вызывал прямой антиатеросклеротический (терапевтический) и антиатерогенный (профилактический) эффекты, соответственно.

Нами был проведен ряд предварительных исследований, в которых было продемонстрировано устойчивое снижение уровня АСК, происходящее на фоне длительного приема препаратов на основе чеснока. Итак, у нас в руках оказалась инструмент, с помощью которого можно было осуществлять прямое патогенетическое воздействие на атеросклероз, основанное не на подавлении накопления липидов в клетках сосудистой стенки. Тем не менее, оставался нерешенным вопрос о клинической эффективности такого воздействия. Действительно, несмотря на четкую эпидемиологическую связь АСК с распространенностью субклинического и манифестировавшего атеросклероза, на демонстрацию возможностей антиатеросклеротической антиатерогенной терапии на клеточном уровне с использованием моделей первичной культуры клеток, выделенных из пораженных и неповрежденных атеросклерозом участков артерий, роль АСК в прогрессировании атеросклероза оставалась неизвестной.

С целью выявления роли АСК в атерогенезе, было проведено двойное слепое плацебо-контролируемое исследование «Мониторирование атеросклероза при снижении атерогенности сыворотки крови» у мужчин с бессимптомным атеросклерозом. Для мониторинга атеросклероза был использован неинвазивный диагностический метод, а именно, ультрасонография сонных артерий высокого разрешения.

Главной фундаментальной задачей данного двойного слепого плацебо-контролируемого рандомизированного исследования была проверка гипотезы о влиянии сниже-

ния АСК на начальную стадию атерогенеза, а именно, на избыточное накопление холестерина в сосудистой стенке, что морфологически проявляется как развитие диффузного интимального утолщения. На клиническом уровне подавление процессов атерогенеза оценивалось методами ультразвуковой диагностики с измерением толщины ИМС. В исследование были включены пациенты с бессимптомным атеросклерозом сонных артерий, считающие себя здоровыми (условно здоровыми). Результаты исследования говорят о том, что длительная антиатерогенная терапия приводит к существенному уменьшению толщины ИМС сонных артерий. Регрессия субклинического атеросклероза значительно чаще наблюдалась у пациентов, принимавших Алликор, чем в группе плацебо. В целом этот антиатеросклеротический эффект развивался в соответствии со снижением АСК. Статистический анализ полученных данных выявил четкую сопряженность изменений толщины ИМС и изменений АСК в ходе исследования. Снижение АСК вплоть до полного ее устранения было сопряжено с регрессией атеросклероза, а возникновение АСК — напротив, определяло прогрессирование раннего атеросклероза. Тем не менее, у части пациентов была выявлена также зависимость изменений толщины ИМС от динамики некоторых липидных показателей, в частности, холестерина ЛВП и ЛНП, особенно в группе плацебо и у тех больных, у которых не произошло изменения атерогенного потенциала сыворотки крови. Эти наблюдения подтверждают роль нарушений липидного обмена в атерогенезе. Поскольку препараты на основе чеснока обладают умеренным гиполипидемическим действием [11, 19–21], то прямое антиатеросклеротическое действие Алликора на уровне сосудистой стенки, обусловленное предотвращением накопления внутриклеточного холестерина, вполне может быть поддержано влиянием чеснока на липидные факторы риска атеросклероза, в частности, на содержание холестерина ЛВП и ЛНП в крови. Следует также отметить, что полученные результаты хорошо сочетаются с данными исследования, проведенного в Германии, в котором было показано, что прием чесночных таблеток в течение 4 лет подавлял увеличение объема атеросклеротических бляшек в сонных и бедренных артериях [3].

Мы сравнили результаты проведенного исследования с данными ряда зарубежных исследований, в которых изучали влияние различных лекарственных средств на прогрессирование атеросклероза [4, 8, 9, 27, 39, 40, 41, 52], и главной оценкой эффекта лечения было изменение толщины ИМС сонных артерий (табл. 7). Из данных, приведенных в таблице, следует, что уменьшение толщины ИМС сонных артерий, полученное в нашем исследовании, вполне сравнимо с результатами наиболее успешных зарубежных исследований.

Следует отметить, что в большинстве исследований были использованы мощные гиполипидемические препараты, в том числе, ингибиторы гидроксиметилглутарил-коэнзим А редуктазы, а также антагонисты кальциевых каналов. Соответственно, благоприятное действие этих препаратов на течение атеросклероза было соотносимо со значительным снижением уровня холестерина ЛНП, мажорного фактора риска атеросклероза, или со снижением гипертензивного стресса на уровне артериальной стенки. В нашем исследовании были выявлены умеренные изменения липидного профиля сыворотки крови,

при этом снижение уровня триглицеридов и повышение уровня холестерина ЛВП наблюдалось как в основной, так и в плацебо группе, что может быть связано с более точным выполнением рекомендаций по соблюдению диеты пациентами, участвующими в исследовании. Умеренное повышение уровня общего холестерина в группе плацебо отчасти было связано с повышением холестерина ЛВП. Тем не менее, уровень холестерина ЛНП в группе плацебо также несколько повысился, что может быть связано с возрастным прогрессированием нарушений липидного обмена [11, 47]. Применение Алликора явно предотвращало повышение уровня холестерина ЛВП с возрастом. Следовательно, Алликор обладает умеренным гиполипидемическим действием, что в целом свойственно чесночным препаратам [11, 19–21, 52, 60, 62]. Необходимо отметить, что в данном исследовании изменение толщины ИМС сонных артерий было слабо связано с изменениями липидных показателей, что опять-таки заставляет предполагать наличие механизмов антиатеросклеротического действия препаратов на основе чеснока, отличных от гиполипидемических эффектов.

Выводы

1. Атерогенность сыворотки крови (способность индуцировать атерогенез на клеточном уровне в модели *in vitro*) тесно сопряжена с наличием субклинического и клинически выраженного атеросклероза; у практически здоровых лиц атерогенность выявляется в 20% случаев, при субклиническом атеросклерозе — в 70% случаев, и при наличии клинических проявлений атеросклероза — в 90% случаев.

2. Атерогенность сыворотки крови, выявляемая в клеточной модели *in vitro*, является диагностическим критерием субклинического атеросклероза, характеризующимся 3,7-кратным относительным риском, 95% чувствительностью, 71% диагностической значимостью положительного результата и 81% диагностической значимостью отрицательного результата.

3. Возникновение атерогенности сыворотки крови сопряжено с ростом диффузного интимального утолщения в сонных артериях и определяет прогрессирование субклинического атеросклероза.

4. Спонтанное или индуцированное с помощью антиатерогенной терапии снижение атерогенности сыворотки крови вплоть до ее полного устранения вызывает регрессию субклинического атеросклероза.

5. Антиатерогенная терапия (снижение атерогенности сыворотки крови с помощью лекарственных или нелекарственных средств) является патогенетическим способом профилактики и терапии субклинического атеросклероза.

Список литературы

1. Аничков Н.Н. Частная патологическая анатомия. — М. — Л., Медгиз, 1947.
2. Хавкин Т.Н. О развитии атеросклеротических изменений аорты человека // Арх. патол. — 1950. — Т. 12. — С. 23–33.
3. Agarwal K.C. Therapeutic actions of garlic constituents // Med. Res. Rev. — 2003. — Vol. 16. — P. 111–124.
4. Blankenhorn D.H., Azen S.P., Krams D.M., Mack W.J., Cashin H., Hodis H.N., DeBoer L.W., Mahrer P.R., Masteller M.J., Vailas L.I. Coronary angiographic changes with lovastatin therapy. The Monitored Atherosclerosis Regression Study (MARS). The

MARS Research Group // *Ann. Intern. Med.* — 1993. — Vol. 119, №10. — P. 969–976.

5. Chazov E.I., Tertov V.V., Orekhov A.N., Lyakishev A.A., Perova N.V., Kurdanov Kh.A., Khashimov Kh.A., Novikov I.D., Smirnov V.N. (Чазов Е.И., Тертов В.В., Орехов А.Н., Лякишев А.А., Перова Н.В., Курданов Х.А., Хашимов Х.А., Новиков И.Д., Смирнов В.Н.). Atherogenicity of blood serum from patients with coronary heart disease // *Lancet.* — 1986. — Vol. 2. — P. 595–598.

6. Fisher-Dzoga K., Jones K., Vesselinovich D., Wissler R.W. Ultrastructural and immunohistochemical studies of primary cultures of aortic medial cells // *Exp. Mol. Pathol.* — 1973. — Vol. 18. — P. 162–176.

7. Fogelman A.M., Schechter I., Seager J., Hokom M., Child J.S., Edwards P.A. Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages // *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* — 1980. — Vol. 77. — P. 2214–2218.

8. Gebhardt R. Inhibition of cholesterol biosynthesis by a water garlic extract in primary cultures of rat hepatocytes // *Arzneim.-Forsch. / Drug Res.* — 1991. — Vol. 41, №8. — P. 800–804.

9. Gebhardt R., Beck H., Wagner K.G. Inhibition of cholesterol biosynthesis by allicin and ajoene in rat hepatocytes and HepG2 cells // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1994. — Vol. 1213. — P. 57–62.

10. Hara A., Radin N.S. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent // *Anal. Biochem.* — 1978. — Vol. 90, №1. — P. 420–426.

11. Harenberg J., Giese C., Zimmermann R. Effect of dried garlic on blood coagulation, fibrinolysis, platelet aggregation and serum cholesterol levels in patients with hyperlipoproteinemia // *Atherosclerosis.* — 1988. — Vol. 74, №3. — P. 247–249.

12. Ho S.E., Ide N., Lau B.H. S-allyl cysteine reduces oxidant load in cells involved in the atherogenic process // *Phytomedicine.* — 2001. — Vol. 8, №1. — P. 39–46.

13. Ide N., Lau B.H. Garlic compounds protect vascular endothelial cells from oxidized low density lipoprotein-induced injury // *J. Pharm. Pharmacol.* — 1997. — Vol. 49, №9. — P. 908–911.

14. Ide N., Lau B.H. Aged garlic extract attenuates intracellular oxidative stress // *Phytomedicine.* — 1999. — Vol. 6, №2. — P. 125–131.

15. Innerarity T.L., Mahley R.W. Enhanced binding by cultured human fibroblasts of apo-E-containing lipoproteins as compared with low density lipoproteins // *Biochemistry.* — 1978. — Vol. 17, №8. — P. 1440–1447.

16. Jonasson L., Holm J., Skalli O., Bondjers G., Hansson G.K. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque // *Arteriosclerosis.* — 1986. — Vol. 6. — P. 131–138.

17. Kacharava A.G., Tertov V.V., Orekhov A.N. (Качарова А.Г., Тертов В.В., Орехов А.Н.). Autoantibodies against low-density lipoprotein and atherogenic potential of blood // *Ann. Med.* — 1993. — Vol. 25, №6. — P. 551–555.

18. Kendler B.S. Garlic (*Allium sativum*) and onion (*Allium cepa*): a review of their relationship to cardiovascular disease // *Prev. Med.* — 1987. — Vol. 16, №5. — P. 670–685.

19. Lau B., Lam F., Wang-Chen R. Effect of odor-modified garlic preparation on blood lipids // *Nutr. Res.* — 1987. — Vol. 7. — P. 139–149.

20. Lau B.H. Suppression of LDL oxidation by garlic // *J. Nutr.* — 2001. — Vol. 131, №3s. — P. 985S–988S.

21. Lau B.H., Adetumbi M.A., Sanches A. *Allium sativum* (garlic) and atherosclerosis: a review // *Nutr. Res.* — 1983. — Vol. 3. — P. 119–125.

22. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall B.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193. — P. 265–275.

23. Lyons T.J., Klein R.L., Baynes J.W., Stevenson H.C., Lopes-Virella M.F. 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. — Vol. 30. — P. 916–923.

24. Malcolm G.T., Strong J.P., Restrepo C. Atherosclerosis and lipid composition of the abdominal aorta // *Lab. Invest.* — 1984. — Vol. 50. — P. 79–86.

25. Mancini G.B., Miller M.E., Evans G.W., Byington R., Furberg C.D., Pitt B. Post hoc analysis of coronary findings from the prospective randomized evaluation of the vascular effects of the Norvasc

trial (PREVENT) // *Am. J. Cardiol.* — 2002. — Vol. 89, №12. — P. 1414–1416.

26. McCullagh K.G., Duance V.C., Bishop K.A. The distribution of collagen types I, III and V(AB) in normal and atherosclerotic human aorta // *J. Pathol.* — 1980. — Vol. 130. — P. 45–55.

27. Morcos N.C. Modulation of lipid profile by fish oil and garlic combination // *J. Nat. Med. Assoc.* — 1997. — Vol. 89. — P. 673–678.

28. Orekhov A.N., Tertov V.V., Kudryashov S.A., Khashimov Kh.A., Smirnov V.N. (Орехов А.Н., Тертов В.В., Кудряшов С.А., Хашимов Х.А., Смирнов В.Н.). 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.* — 1986. — Vol. 60. — P. 101–110.

29. Orekhov A.N., Tertov V.V., Kudryashov S.A., Smirnov V.N. (Орехов А.Н., Тертов В.В., Кудряшов С.А., Смирнов В.Н.). Triggerlike stimulation of cholesterol accumulation and DNA and extracellular matrix synthesis induced by atherogenic serum or low density lipoprotein in cultured cells // *Circ. Res.* — 1990. — Vol. 66, №2. — P. 311–320.

30. Orekhov A.N., Andreeva E.R., Krushinsky A.V., Novikov I.D., Tertov V.V., Nestaiko G.V., Khashimov Kh.A., Repin V.S., Smirnov V.N. (Орехов А.Н., Андреева Е.Р., Крушинский А.В., Новиков И.Д., Тертов В.В., Нестайко Г.В., Хашимов Х.А., Репин В.С., Смирнов В.Н.). Intimal cells and atherosclerosis. Relationship between the number of intimal cells and major manifestations of atherosclerosis in the human aorta // *Am. J. Pathol.* — 1986. — Vol. 125, №2. — P. 402–415.

31. Orekhov A.N., Andreeva E.R., Krushinsky A.V., Smirnov V.N. (Орехов А.Н., Андреева Е.Р., Крушинский А.В., Смирнов В.Н.). Primary cultures of enzyme-isolated cells from normal and atherosclerotic human aorta // *Med. Biol.* — 1984. — Vol. 62, №4. — P. 255–259.

32. Orekhov A.N., Andreeva E.R., Tertov V.V. (Орехов А.Н., Андреева Е.Р., Тертов В.В.). The distribution of cells and chemical components in the intima of human aorta // *Soc. Med. Rev. A Cardiol.* — 1987. — Vol. 1. — P. 75–100.

33. Orekhov A.N., Tertov V.V., Smirnov V.N. (Орехов А.Н., Тертов В.В., Смирнов В.Н.). Lipids in cells of atherosclerotic and uninvolved human aorta. II. Lipid metabolism in primary culture // *Exp. Mol. Pathol.* — 1985. — Vol. 43, №2. — P. 187–195.

34. Orekhov A.N., Kosykh V.A., Repin V.S., Smirnov V.N. (Орехов А.Н., Косых В.А., Репин В.С., Смирнов В.Н.). Cell proliferation in normal and atherosclerotic human aorta. I. Flow cytofluorometric determination of cellular deoxyribonucleic acid content // *Lab. Invest.* — 1983. — Vol. 48, №4. — P. 395–398.

35. Orekhov A.N., Tertov V.V., Kabakov A.E., Adamova I.Yu., Pokrovsky S.N., Smirnov V.N. (Орехов А.Н., Тертов В.В., Кабаков А.Е., Адамова И.Ю., Покровский С.Н., Смирнов В.Н.). Autoantibodies against modified low density lipoprotein. Nonlipid factor of blood plasma that stimulates foam cell formation // *Arterioscler. Thromb.* — 1991. — Vol. 11, №2. — P. 316–326.

36. Orekhov A.N., Tertov V.V., Pokrovsky S.N., Adamova I.Yu., Martsenyuk O.N., Lyakishev A.A., Smirnov V.N. (Орехов А.Н., Тертов В.В., Покровский С.Н., Адамова И.Ю., Марценюк О.Н., Лякишев А.А., Смирнов В.Н.). Blood serum atherogenicity associated with coronary atherosclerosis. Evidence for nonlipid factor providing atherogenicity of low-density lipoproteins and an approach to its elimination // *Circ. Res.* — 1988. — Vol. 62, №3. — P. 421–429.

37. Orekhov A.N., Tertov V.V., Novikov I.D., Krushinsky A.V., Andreeva E.R., Lankin V.Z., Smirnov V.N. (Орехов А.Н., Тертов В.В., Новиков И.Д., Крушинский А.В., Андреева Е.Р., Ланкин В.З., Смирнов В.Н.). Lipids in cells of atherosclerotic and uninvolved human aorta. I. Lipid composition of aortic tissue and enzyme-isolated and cultured cells // *Exp. Mol. Pathol.* — 1985. — Vol. 42, №1. — P. 117–137.

38. Peterkofsky B., Diegelmann R. Use of mixture of proteinase free collagenases for specific assay of radioactive collagen in the presence of other proteins // *Biochemistry.* — 1971. — Vol. 10. — P. 988–984.

39. Pitt B., Byington R.P., Furberg C.D., Hunninghake D.B., Mancini G.B., Miller M.E., Riley W. Effect of amlodipine on the progression of atherosclerosis and the occurrence of clinical events. PREVENT Investigators // *Circulation.* — 2000. — Vol. 102, №13. — P. 1503–1510.

40. Rahman K. Historical perspective on garlic and cardiovascular disease // *J. Nutr.* — 2001. — Vol. 131, №3s. — P. 977S–979S.
41. Reuter H.D., Koch H.P., Lawson L.D. Therapeutic effects of garlic and its preparations // *Garlic / Koch H.P., Lawson L.D., eds.* — Williams and Wilkins, London, UK, 1996. — P. 135–162.
42. Ross R. Atherosclerosis: a problem of the biology of the arterial wall cells and their interaction with blood components // *Arteriosclerosis.* — 1981. — Vol. 1. — P. 293–311.
43. Ross R. The smooth muscle cell. II. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers // *J. Cell Biol.* — 1971. — Vol. 50. — P. 172–186.
44. Schechter I., Fogelman A.M., Haberland M.E., Seager J., Horkom M., Edwards P.A. The metabolism of native and malondialdehyde-altered low density lipoproteins by human monocyte-macrophages // *J. Lipid Res.* — 1981. — Vol. 22. — P. 63–74.
45. Schonfelder M. Ortologie und patologie der Langhans-zellen der aortenintima des menschen // *Patol. Microbiol.* — 1969. — Vol. 33. — P. 129–145.
46. Schwartz C.J., Valente A.J., Sprague E.A. A modern view of atherogenesis // *Am. J. Cardiol.* — 1993. — Vol. 71, №6. — P. 9B–14B.
47. Sendl A., Schliack M., Loser R., Stanislaus F., Wagner H. Inhibition of cholesterol synthesis in vitro by extracts and isolated compounds prepared from garlic and wild garlic // *Atherosclerosis.* — 1992. — Vol. 94. — P. 79–85.
48. Shekhonin B.V., Domogatskii S.P., Muzykantov V.R., Idelson G.L., Rukosuev V.S. (Шехонин Б.В., Домогатский С.П., Музыкантов В.Р., Идельсон Г.Л., Рукосев В.С.). Distribution of type I, III, IV and V collagen in normal and atherosclerotic human arterial wall: immunomorphological characteristics // *Coll. Relat. Res.* — 1985. — Vol. 5. — P. 355–368.
49. Skipsky V.P., Barclay M., Barclay R.K., Fetzer V.A., Good J.J., Archibald F.M. Lipid composition of human serum lipoproteins // *Biochem. J.* — 1967. — Vol. 104. — P. 340–352.
50. Stary H.C. Natural History and Histological Classification of Atherosclerotic Lesions: An Update // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2000. — Vol. 20, №5. — P. 1177–1178.
51. Stary H.C., Chandler A.B., Glagov S., Guyton J.R., Insull W., Rosenfeld M.E., Schaffer S.A., Schwartz C.J., Wagner W.D., Wissler R.W. 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. — Vol. 89. — P. 2462–2478.
52. Steiner M., Khan A.H., Holbert D., Lin R.I. A double-blind crossover study in moderately hypercholesterolemic men that compared the effect of aged garlic extract and placebo administration on blood lipids // *Am. J. Clin. Nutr.* — 1996. — Vol. 64, №6. — P. 866–870.
53. Tertov V.V., Orekhov A.N., Ryong L.H., Smirnov V.N. (Тертов В.В., Орехов А.Н., Ли Хва Рен, Смирнов В.Н.). Intracellular cholesterol accumulation is accompanied by enhanced proliferative activity of human aortic intimal cells // *Tissue Cell.* — 1988. — Vol. 20. — P. 849–854.
54. Tertov V.V., Orekhov A.N., Nikitina N.A., Perova N.V., Lyakishev A.A., Serebrennikov S.G., Gratziansky N.A., Nechaev A.S., Smirnov V.N. (Тертов В.В., Орехов А.Н., Никитина Н.А., Перова Н.В., Лякишев А.А., Серебренников С.Г., Грацианский Н.А., Нечаев А.С., Смирнов В.Н.). Peritoneal macrophages: a model for detecting atherogenic potential in patients' blood serum // *Ann. Med.* — 1989. — Vol. 21, №6. — P. 455–459.
55. Tertov V.V., Orekhov A.N., Martsenyuk O.N., Perova N.V., Smirnov V.N. (Тертов В.В., Орехов А.Н., Марценюк О.Н., Перова Н.В., Смирнов В.Н.). 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.* — 1989. — Vol. 50, №3. — P. 337–347.
56. Tertov V.V., Sobenin I.A., Gabbasov Z.A., Popov E.G., Jaakkola O., Solakivi T., Nikkari T., Smirnov V.N., Orekhov A.N. (Тертов В.В., Собенин И.А., Габбасов З.А., Попов Е.Г., Яаккола О., Солакиви Т., Никкари Т., Смирнов В.Н., Орехов А.Н.). Multiple-modified desialylated low density lipoproteins that cause intracellular lipid accumulation. Isolation, fractionation and characterization // *Lab. Invest.* — 1992. — Vol. 67, №5. — P. 665–675.
57. Tertov V.V., Sobenin I.A., Orekhov A.N. (Тертов В.В., Собенин И.А., Орехов А.Н.). Characterization of desialylated low-density lipoproteins which cause intracellular lipid accumulation // *Int. J. Tissue React.* — 1992. — Vol. 14, №4. — P. 155–162.
58. Tertov V.V., Sobenin I.A., Gabbasov Z.A., Popov E.G., Orekhov A.N. (Тертов В.В., Собенин И.А., Габбасов З.А., Попов Е.Г., Орехов А.Н.). Lipoprotein aggregation as an essential condition of intracellular lipid accumulation caused by modified low density lipoproteins // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1989. — Vol. 163, №1. — P. 489–494.
59. Vlassara H., Brownlee M., Cerami A. Specific macrophage receptor activity for advanced glycosylation end products inversely correlates with insulin levels in vivo // *Diabetes.* — 1988. — Vol. 37, №4. — P. 456–461.
60. Warshafsky S., Kamer R.S., Sivak S.L. Effect of garlic on total serum cholesterol. A meta-analysis // *Ann. Intern. Med.* — 1993. — Vol. 119, №7. — Pt 1. — P. 599–605.
61. Weisgraber K.H., Innerarity T.L., Mahley R.W. Role of lysine residues of plasma lipoproteins in high affinity binding to cell surface receptors on human fibroblasts // *J. Biol. Chem.* — 1978. — Vol. 253, №24. — P. 9053–9062.
62. Yeh Y.Y., Liu L. Cholesterol-lowering effect of garlic extracts and organosulfur compounds: human and animal studies // *J. Nutr.* — 2001. — Vol. 131, №3s. — P. 989S–993S.

Поступила 9.03.2013

Serum atherogenicity as a pathogenetic target for direct anti-atherosclerotic therapy

Chernova E.V.¹, Sobenin I.A.², Melnichenko A.A.¹, Karagodin V.P.¹, Orekhov A.N.^{1,2}

¹ — Institute for Atherosclerosis Research, Skolkovo Innovative Center, PO Box №21, 121609, Moscow, Russia

² — Institute of General Pathology and Pathophysiology, Russian Academy of Medical Sciences, Baltiyskaya Str. 8, 125315, Moscow, Russia

Currently, the causes and mechanisms of atherosclerosis are not fully understood. Accordingly, there are no direct methods of prevention and treatment of atherosclerosis which could be widely used in subclinical stage patients. We established that atherogenicity of blood serum is directly linked to the progression of asymptomatic atherosclerosis and influences the course of atherosclerosis. We found that targeted reduction of serum atherogenicity abrogates development and causes regression of early atherosclerotic lesions. For the first time, inhibition at cellular and molecular level of the key atherogenic event — cholesterol storage in vascular wall cells — is proposed to be used as the principal approach to direct anti-atherosclerotic therapy.

Key words: atherosclerosis, atherogenicity, intracellular cholesterol accumulation, anti-atherosclerotic therapy