

## Разработка клеточных моделей для оценки обратного транспорта холестерина\*

Мельниченко А.А.<sup>1</sup>, Орехова В.А.<sup>1,3</sup>, Собенин И.А.<sup>1,2,3</sup>, Карагодин В.П.<sup>2</sup>, Орехов А.Н.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> — ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН,

Москва, 125315, ул. Балтийская, д. 8, тел. +7(499)6012181, niiopp@mail.ru

<sup>2</sup> — Научно-исследовательский институт атеросклероза, Инновационный центр Сколково,

Москва, 143025, ул. Новая, д. 100, тел. +7(495)4120113, +7(495)4121557, office@inat.ru

<sup>3</sup> — Лаборатория Медицинской генетики, НИИ клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова ФГБУ «РКНПК» МЗ РФ, Москва, 121552, ул. Черепковская, 15а, тел. +7(499) 149-17-08, clinics@inat.ru

Для оценки обратного транспорта холестерина (ХС) разработан высокочувствительный метод определения внутриклеточного ХС. В качестве клеточной модели использована первичная культура клеток, выделенных путем ферментного расщепления субэндотелия интимы аорты человека. Клеточная модель *in vitro* прошла лабораторные испытания и продемонстрировала применимость. В качестве агентов для испытаний был использован широкий ряд фармакологических веществ, включая природные продукты. Результаты показали, что метод *in vitro* подходит для изучения оттока ХС из культивируемых клеток, в том числе при применении липопротеидов высокой плотности (ЛВП) для терапии сердечно-сосудистых заболеваний. Клеточные модели также могут применяться в модели *ex vivo*, в которой к клеточной культуре добавляют не фармакологические агенты, а сыворотку крови пациентов, получавших различные лекарственные и природные препараты. Модель *ex vivo* имитирует процессы, которые происходят в организме, что, в свою очередь, позволяет легко интерпретировать полученные результаты. Поскольку сыворотка крови содержит все факторы, влияющие на отток ХС, данные, полученные в модели *ex vivo*, могут рассматриваться как надежный индикатор влияния всех возможных эффекторов оттока ХС.

**Ключевые слова:** липопротеиды высокой плотности, сердечно-сосудистые заболевания, терапия ЛВП, клеточные модели, модели *in vitro* и *ex vivo*

### Введение

В настоящее время широко признается тот факт, что разработка лекарственных средств для увеличения уровня ЛВП, вероятно, будет полезна в лечении сердечно-сосудистых заболеваний [4, 5, 9, 13, 18, 19, 21, 28, 29, 35]. Арсенал различных форм ЛВП-терапии далеко не исчерпан. В связи с этим, создание клеточной модели для развития ЛВП-терапии является современной и сложной задачей. Ожидаемым преимуществом клеточной модели для ЛВП-терапии является то, что полученные результаты могут быть легко интерпретированы и такая модель может в короткие сроки быть реализована для практических целей. В дополнение к широко используемому радиоизотопному методу определения ХС, мы предлагаем альтернативный (биохимический) высокочувствительный метод его определения для изучения оттока.

### Материалы и методы

1. *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 соавто-

ров [5, 9, 28, 35]. 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 [4, 13, 18]. Затем с помощью пинцетов интиму отделяли от меди, при этом разделение слоев происходило по внутренней пограничной эластической мембране [9]. 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 (Aqua-term, 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

\* Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки России

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  $2-4 \times 10^4$  клеток на  $1 \text{ см}^2$  культуральной поверхности. Клетки культивировали при  $37^\circ\text{C}$  в насыщенной водяными парами атмосфере, содержащей 95% воздуха и 5% углекислого газа, в увлажняемом  $\text{CO}_2$ -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 [9, 20, 21]. Клетки, полученные из непораженных и атеросклеротических участков интимы аорты человека, культивировали отдельно и использовали в экспериментах различных типов, что позволяло в дальнейшем получить две клеточных модели, различающихся по своим свойствам. Первичную культуру клеток, выделенных из непораженных 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 пораженных атеросклерозом участков интимы аорты, использовали для оценки антиатеросклеротических свойств исследуемых веществ. Антиатеросклеротическим действием называли эффекты, проявляющиеся в уменьшении содержания внутриклеточного ХС по сравнению с исходным уровнем.

**2. 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 ч для образования сгустка, затем в холодильнике при  $+4^\circ\text{C}$  в течение 1 ч 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 «Эпшендорф» по 1 мл. Образцы сыворотки крови хранили в замороженном состоянии (при  $-18^\circ\text{C}$ ) до проведения измерения атерогенности и других биохимических параметров.

**3. 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). В качестве контроля использовали клетки, которые продолжали культивировать в среде 199, содержащей антибиотики и 10% эмбриональную телячью сыворотку, которая содержит необходимые

факторы роста клеток, но не влияет на содержание внутриклеточных липидов [25]. 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. 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.

**4. Определение содержания внутриклеточного холестерина.** По окончании инкубации липиды из клеток экстрагировали трижды смесью n-гексана и изопропанола в объемном отношении 3:2 по методу Hara и Radin [11], 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 хлорид 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 ХС. Ферментативный набор для определения общего ХС 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, pH 7,7. В качестве стандарта использовали стандартный раствор ХС в изопропаноле, 1 мг/мл (Boehringer Mannheim, Германия). Смесью инкубировали при  $37^\circ\text{C}$  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 ХС в каждой пробе. При необходимости, содержание свободного внутриклеточного ХС определяли в аликвотах липидного экстракта аналогичным образом, используя раствор «Monotest» (Boehringer Mannheim, Германия) для определения свободного ХС, не содержащий холестеринэстеразы. Содержание эстерифицированного внутриклеточного ХС определяли по разнице уровней общего и свободного ХС.

**5. Определение внутриклеточных липидов методом тонкослойной хроматографии.** Липиды из клеток экстрагировали трижды смесью n-гексана и изопропанола в объемном отношении 3:2 по методу Hara и Radin [11], каждая экстракция продолжалась по 30 мин. Нейтральные липиды разделяли методом тонкослойной хроматографии на силикагеле Kieselgel 60 (E. Merck, Германия) в двух последовательных системах:

а) бензол — диэтиловый эфир — этанол — уксусная кислота в объемном соотношении 50:40:2:0,2;

б) n-гексан — диэтиловый эфир — уксусная кислота в объемном соотношении 90:10:1.

В качестве стандартов использовали холестерилолеат, триолеин и ХС. Фосфолипиды хроматографировали в системе метилацетат — n-пропанол — хлороформ — метанол — 0,25% KCl в объемном соотношении 25:25:25:10:9 (674). Сканирование хроматограммы проводили при дли-

не волны 200 нм на сканнере Shimadzu CS-930 (Shimadzu Corporation, Япония).

6. *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 ч, после чего определяли содержание клеточного белка в каждой пробе по методу Lowry с соавторами [17]. 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 ч, 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).

7. *Оценка оттока холестерина (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 ХС 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 ХС проводили, как описано выше. Содержание внутриклеточного ХС в контрольных клетках, инкубированных без добавления исследуемого вещества, принимали за 100%. Эффект на отток ХС (антиатеросклеротический эффект) исследуемых веществ определяли как их способность статистически достоверно снижать исходно высокое содержание внутриклеточного ХС.

8. *Оценка оттока холестерина (антиатеросклеротического эффекта) в модели ex vivo.* 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 ч при скрининговых исследованиях и при оценке краткосрочного действия, а также через 4, 8, 12 и 24 ч при оценке длительности эффекта). Инкубацию клеток из атеросклеротического поражения с сыворотками крови, экстракцию липидов из клеток и определение клеточного белка проводили, как описано выше. Эффект на отток холестерина (антиатеросклеротический эффект) исследуемых веществ в модели ex vivo определяли как их способность статистически достоверно снижать содержание ХС в культивируемых атеросклеротических клетках. Существенной особенностью данной модели является возможность оценки антиатеросклеротического 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.* Клетки, выделенные из нормальных или пораженных атеросклерозом участков интимы аорты человека, инкубировали в течение 24 ч в присутствии

10 мкКи/мл [<sup>3</sup>H]-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).

9. *Определение пролиферативной активности.* Клетки, выделенные из нормальной и атеросклеротической интимы аорты человека, инкубировали в течение 24 ч в присутствии 10 мкКи / мл [<sup>3</sup>H]-тимидина. После инкубации липиды экстрагировали из клеток, как описано выше, и клетки, закрепленные на пластиковых чашках, растворяли в 50 мл 0,2 N раствора NaOH при комнатной температуре в течение 12–16 ч. После растворения измеряли радиоактивность с помощью сцинтилляционного счетчика 1215 RackBeta II (LKB, Швеция).

10. *Определение синтеза коллагена.* Клетки, выделенные из нормальных или пораженных атеросклерозом участков интимы аорты человека, инкубировали в течение 24 ч в присутствии 5 мкКи/мл [<sup>3</sup>H]-пролина. По окончании инкубации включение меченого пролина в обработанную коллагеназой фракцию культуральной среды определяли по методу Peterkofsky и Diegelmann [26]. 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 мМ NERES, содержащего 0,2 мМ фенилметилсульфонилфторида, 0,25 мМ CaCl<sub>2</sub>, 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 ч 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 радиоактивность супернатанта на сцинтилляционном счетчике 1215 Rackbeta II (LKB, Швеция). Синтез коллагена определяли по формуле  $2 * ([dpm]_{образца} - [dpm]_{бланка}) / (\text{клеточный белок, мкг})$ .

11. *Проведение исследования ex vivo и in vivo.* В исследовании приняли участие здоровые добровольцы без признаков клинических проявлений атеросклероза или системных воспалительных заболеваний. Образцы крови были взяты у добровольцев непосредственно перед приемом вещества (пероральное введение), а также через определенные промежутки времени после перорального приема. Сыворотка была использована для определения влияния лекарственного средства (вещества) на отток ХС.

12. *Статистическая обработка данных.* Статистическую оценку достоверности различий проводили с использованием пакета SPSS версии 12.0 (SPSS Inc., США). Графическую обработку данных проводили с использова-

нием 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 варибельности 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 или парный t-тест. Для сравнения распределений номинальных показателей и категориальных величин использовали показатель  $\chi^2$  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

### Модель *in vitro*

В этом исследовании мы разработали новую модель, которая включает в себя культивирование клеток, выделенных из аорты человека, с целью проверки фармакологического эффекта различных веществ. Модель имитирует те процессы, которые происходят в организме человека, когда вводятся биологически активные вещества. Известно [8, 22, 24], что атеросклеротические изменения интимы аорты происходят сначала в субэндотелиальном слое, поэтому для модели клетки были выделены из этого слоя интимы. Для получения липидированных клеток первичную культуру получали с использованием клеток, выделенных из жировых атеросклеротических поражений. Важно подчеркнуть, что в культуре выделенные клетки содержали тот же избыток липидов, как в крови человека *in situ* [25]. Избыточный ХС, как известно, является основным проявлением атеросклероза на клеточном уровне [39]. Таким образом, при таком подходе не было необходимости искусственно загружать культивируемые клетки холестерином. Состав и содержание внутриклеточных липидов в культивируемых клетках этой модели были аналогичны составу и содержанию липидов в клетках атеросклеротического поражения в организме человека [25].

Для того, чтобы оценить антиатеросклеротическую активность тестируемых веществ, в дополнение к оценке содержания внутриклеточного ХС анализировали содержание других классов липидов, пролиферативную активность культивируемых клеток и синтез коллагена в культуре клеток. Наряду с накоплением внутриклеточного ХС, увеличение пролиферативной активности и усиленный синтез компонентов внеклеточного матрикса, в особенности коллагена, известны как наиболее яркие проявления атеросклероза на клеточном уровне [2, 23, 31—33, 38].

Разработанная клеточная модель в варианте *in vitro* была использована для оценки влияния на отток холестерина гиполипидемических препаратов, используемых для снижения уровня ХС в крови, относящихся к различным классам фармакологических веществ. Среди них был *ловастатин*, относящийся к классу статинов [15], а также *липостабил*, содержащий липиды натурального происхождения [10, 30]. Были также испытаны ингибиторы ацил-КоА-холестерина-ацилтрансферазы (АХАТ) — фермента, принимающего участие в накоплении ХС в клетках сосудистой стенки [6, 7, 14, 27, 34, 36, 37]. Было обнаружено, что только липостабил достоверно снижал содержание ХС в клетках, культивируемых из атеросклеротических поражений аорты человека, т.е. вызывал обратный транспорт ХС (табл. 1). Ни статины, ни ингибиторы АХАТ не способствовали обратному транспорту ХС из атеросклеротических клеток (табл. 1).

Полученные данные являются ярким примером того, что снижение ХС в крови не обязательно сопровождается его снижением в сосудистой стенке. Так, сильное гиполипидемическое лекарственное средство ловастатин, снижающее уровень ХС в крови путем подавления его синтеза [3], не способствовало обратному транспорту ХС из атеросклеротических клеток. С другой стороны, липостабил, обладающий умеренным гиполипидемическим действием, обладал выраженным эффектом на отток ХС. Экстраполируя этот эффект липостабила на ситуацию в организме, можно предполагать, что липостабил обладает антиатеросклеротическим действием, вызывая регрессию атеросклеротического поражения в сосудах.

Неожиданным оказалось отсутствие эффекта у ингибиторов АХАТ. Эти соединения прямо участвуют во внутриклеточном метаболизме ХС, препятствуя этерификации свободного ХС [34]. Тем не менее, ингибиторы АХАТ не способствовали снижению ХС в атеросклеротических

Таблица 1

### Влияние липостабила, ловастатина и ингибиторов ацил-КоА-холестерина-ацилтрансферазы (АХАТ) на содержание холестерина в атеросклеротических клетках интимы аорты человека *in vitro*

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

Примечание. Клетки из пораженных атеросклерозом участков интимы аорты человека выделяли и культивировали, как описано в разделе "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,  $p < 0,05$

клетках, т.е. не повышали обратный транспорт холестерина. Можно предполагать, что эти соединения в лучшем случае обладают антиатерогенным эффектом, т.е. препятствуют возникновению и развитию атеросклеротического поражения, но не антиатеросклеротическим эффектом, проявляющемся в регрессии уже имеющихся атеросклеротических поражений.

В табл. 2 приведены данные комплексной оценки влияния на атеросклеротические показатели культивируемых клеток известного лекарственного средства *верапамил*, относящегося к классу антагонистов кальция. Известно, что верапамил обладает антиатеросклеротическим действием, вызывая регрессию атеросклероза у больных с документированными атеросклеротическими поражениями сосудов [12]. В первичной культуре интимальных клеток аорты человека верапамил дозозависимо снижал содержание общего ХС, т.е. способствовал обратному транспорту ХС. В отсутствие верапамила отток ХС из клеток не наблюдался. При этом свободный (неэтерифицированный) холестерин не изменялся. Это свидетельствует о том, что снижение содержания ХС в клетках происходит исключительно за счет эфиров ХС. Наряду со снижением общего ХС, наблюдалось уменьшение содержания двух других важнейших классов внутриклеточных липидов — фосфолипидов и триглицеридов. Таким образом, обратный транспорт ХС из атеросклеротических клеток сопровождается снижением внутриклеточного содержания других важнейших классов липидов, что должно способствовать освобождению клеток атеросклеротического поражения от избыточного жира. Такая регрессия клеточного липидоза может объяснять механизм антиатеросклеротического действия верапамила.

Верапамил вызывал дозозависимое существенное подавление пролиферативной активности культивируемых атеросклеротических клеток (табл. 2). Кроме того, верапамил подавлял синтез коллагена в первичной культуре клеток, выделенных из атеросклеротического поражения (табл. 2). Таким образом, верапамил не только способствует оттоку ХС из атеросклеротических клеток, но обладает и другими антиатеросклеротическими эффектами на уровне клеток сосудистой стенки, подавляя пролифера-

тивную и синтетическую активность, т.е. уменьшает или подавляет все основные проявления атеросклероза на клеточном уровне — липоидоз, пролиферацию и фиброз. Полученные данные демонстрируют важное свойство разработанной модели — ее использование для оценки оттока ХС, антиатеросклеротической активности в целом и для изучения механизма антиатеросклеротических эффектов различных агентов.

Верапамил, будучи представителем класса антагонистов кальция, является антиангинальным препаратом. Антиангинальные лекарственные средства широко применяются для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, морфологической основой которых является атеросклероз. Данные о прямых антиатеросклеротических эффектах верапамила на уровне артериальных клеток, выявленные на модели *in vitro*, стали побудительным мотивом для проверки других классов антиангинальных лекарственных средств на этой модели. В дополнение к верапамилу, были испытаны другие антагонисты кальция, в частности: нифедипин, дилтиазем, никардипин, циннаризин, папаверин. Кроме того, на разработанной клеточной модели *in vitro* были испытаны  $\beta$ -блокаторы и нитраты, которые наряду с антагонистами кальция являются наиболее широко используемыми классами антиангинальных препаратов [1]. Среди  $\beta$ -блокаторов использовались пропранолол, альprenолол, метопролол, пиндолол, тимолол. Нитратами, подвергнутыми испытанию на модели *in vitro*, были: нитроглицерин, изосорбид, нитропруссид.

Все исследованные антагонисты кальция способствовали оттоку ХС из атеросклеротических клеток на разработанной клеточной модели *in vitro*, вызывая значимое снижение содержания внутриклеточного ХС в культивируемых клетках атеросклеротического поражения аорты человека (табл. 3). Помимо этого, все антагонисты кальция подавляли пролиферативную активность атеросклеротических клеток (табл. 3). Таким образом, можно утверждать о наличии у антагонистов кальция антиатеросклеротических эффектов, проявляемых на уровне клеток сосудистой стенки. Напротив, все исследованные  $\beta$ -блокаторы не только не способствовали оттоку ХС из

Таблица 2

**Антиатеросклеротические эффекты верапамила в модели *in vitro***

Исследуемый параметр	Концентрация верапамила, М	Эффект верапамила, % от контроля
Общий холестерин	$10^{-7}$	$104 \pm 5$
	$10^{-6}$	$82 \pm 8$ ( $p < 0,05$ )
	$10^{-5}$	$61 \pm 4$ ( $p < 0,01$ )
Свободный холестерин	$5 \times 10^{-5}$	$90 \pm 8$
Фосфолипиды	$5 \times 10^{-5}$	$61 \pm 8$ ( $p < 0,05$ )
Триглицериды	$5 \times 10^{-5}$	$76 \pm 2$ ( $p < 0,05$ )
Включение [ $^3\text{H}$ ]-тимидина	$10^{-7}$	$86 \pm 7$
	$10^{-6}$	$50 \pm 2$ ( $p < 0,01$ )
	$10^{-5}$	$34 \pm 2$ ( $p < 0,001$ )
	$10^{-4}$	$20 \pm 2$ ( $p < 0,001$ )
Синтез коллагена	$5 \times 10^{-5}$	$74 \pm 5$ ( $p < 0,05$ )

Примечание. Контрольные уровни в контроле составили  $12,2 \pm 0,2$  распадов в минуту (dpm)/мкг клеточного белка для включения меченого тимидина;  $57,4 \pm 1,2$ ,  $71,4 \pm 10,9$ ,  $46,8 \pm 5,3$ ,  $12,1 \pm 1,7$   $30,8 \pm 1,6$  мкг/ $10^5$  клеток для общего холестерина, фосфолипидов, свободного холестерина, триглицеридов и эфиров холестерина соответственно;  $2500 \pm 102$  dpm/ $10^3$  клеток для включения меченого пролина. Достоверность отличий от контроля указана в таблице.

атеросклеротических клеток на разработанной модели *in vitro*, но и повышали в них содержание ХС (табл. 3). Параллельно все β-блокаторы стимулировали пролиферативную активность культивируемых атеросклеротических клеток (табл. 3). Таким образом, в противоположность антиатеросклеротическим эффектам антагонистов кальция, β-блокаторы вызывают прямые проатерогенные эффекты на уровне артериальных клеток. Третий класс антиангинальных препаратов — нитраты — не способствовал оттоку ХС на модели *in vitro*. Нитраты не оказывали значимого влияния ни на содержание ХС, ни на пролиферативную активность атеросклеротических клеток, т.е. они не обладали эффектами, имеющими отношение к атеросклерозу (табл. 3). Данные проведенных исследований служат яркой иллюстрацией использования разработанной клеточной модели оттока ХС *in vitro* для выявления эффективности различных фармакологических средств. При этом данные о прямых антиатеросклеротических эффектах антагонистов кальция, проатерогенных эффектах β-блокаторов и выявленное отсутствие эффектов, имеющих отношение к атеросклерозу, у

нитратов имеют важное самостоятельное значение для объяснения механизмов различного действия этих препаратов на развитие атеросклероза в артериальной стенке. Наши данные, полученные с помощью клеточной модели, получили поддержку по результатам клинического исследования. Так, А. Loaldi с соавторами [16] сообщили, что долгосрочный пероральный прием пропранолола усугубляет атеросклероз коронарных артерий у больных со стенокардией по сравнению с антагонистами кальция. Нифедипин оказывает наиболее полезный эффект на коронарный атеросклероз, подавляя развитие существующих и предотвращая появление новых атеросклеротических поражений. Изосорбид динитрат был менее эффективным в этом отношении, а терапия пропранололом показала наихудшие результаты.

В клеточной модели *in vitro* были исследованы и экстракты натуральных продуктов. Эксперименты проводились с экстрактом порошка сушеного чеснока (*Allium посевной*). Результаты представлены в табл. 4. Было обнаружено, что водный экстракт порошка чеснока в концентрации 1 мг/мл значительно уменьшал свободный и этери-

Таблица 3

**Влияние антагонистов кальция, β-блокаторов и нитратов на содержание холестерина и пролиферативную активность клеток, выделенных из атеросклеротической бляшки**

Препарат	Концентрация, М	Содержание внутриклеточного холестерина, % от контроля	Включение [ <sup>3</sup> H]-тимидина, % от контроля
<b>Антагонисты кальция</b>			
Верапамил	10 <sup>-6</sup> –10 <sup>-4</sup>	29 ± 7 — 69 ± 6 *	33 ± 4 — 65 ± 13 *
Нифедипин	10 <sup>-6</sup> –10 <sup>-4</sup>	48 ± 4 — 79 ± 4 *	37 ± 7 — 54 ± 5 *
Дилтиазем	10 <sup>-5</sup> –10 <sup>-4</sup>	61 ± 7 — 71 ± 8 *	49 ± 7 — 70 ± 6 *
Никардипин	10 <sup>-5</sup> –10 <sup>-4</sup>	68 ± 4 — 74 ± 5 *	56 ± 4 — 70 ± 5 *
Циннаризин	10 <sup>-6</sup> –10 <sup>-4</sup>	84 ± 9 — 99 ± 5	47 ± 7 — 70 ± 5 *
Папаверин	10 <sup>-5</sup> –10 <sup>-4</sup>	64 ± 6 — 66 ± 4 *	51 ± 1 — 55 ± 6 *
<b>Бета-блокаторы</b>			
Пропранолол	10 <sup>-9</sup> –10 <sup>-5</sup>	118 ± 7 — 127 ± 8 #	169 ± 9 — 181 ± 20 #
Альпренолол	10 <sup>-9</sup> –10 <sup>-4</sup>	132 ± 9 — 164 ± 10 #	138 ± 4 — 148 ± 10 #
Метопролол	10 <sup>-4</sup>	135 ± 4 #	129 ± 18
Пиндолол	10 <sup>-6</sup> –10 <sup>-4</sup>	132 ± 8 — 149 ± 17 #	143 ± 6 — 170 ± 12
Тимолол	10 <sup>-9</sup> –10 <sup>-6</sup>	130 ± 11 — 178 ± 9 #	140 ± 10 — 169 ± 18 #
<b>Нитраты</b>			
Нитроглицерин	10 <sup>-9</sup> –10 <sup>-4</sup>	83 ± 7 — 116 ± 7	96 ± 9 — 140 ± 21
Изосорбид	10 <sup>-9</sup> –10 <sup>-4</sup>	99 ± 15 — 119 ± 9	102 ± 5 — 124 ± 14
Нитропруссид	10 <sup>-9</sup> –10 <sup>-4</sup>	86 ± 4 — 118 ± 8	69 ± 17 — 106 ± 10

Примечание. Достоверное снижение показателей по сравнению с контролем, p<0,05; # — достоверное повышение по сравнению с контролем, p<0,05

Таблица 4

**Антиатеросклеротическое действие водного экстракта чеснока в модели *in vitro***

	Свободный холестерин, мкг/мг клеточного белка	Этерифицированный холестерин, мкг/мг клеточного белка	Включение тимидина, dpm/мг клеточного белка
Контроль	20,7 ± 0,9	41,3 ± 1,3	238 ± 8
0,1 мкг/мл	19,1 ± 1,1	39,0 ± 1,1	213 ± 7
1 мкг/мл	19,8 ± 0,9	39,4 ± 1,6	228 ± 5
10 мкг/мл	19,6 ± 1,3	40,3 ± 1,5	213 ± 10
100 мкг/мл	21,7 ± 1,3	36,5 ± 1,3 *	252 ± 2
1000 мкг/мл	17,1 ± 0,4 *	32,8 ± 1,9 *	56 ± 6 *

Примечание. \* — достоверное различие по сравнению с контролем (p<0,05)

фицированный ХС в культивируемых клетках, в дополнение к антипролиферативному действию (ингибирование синтеза ДНК). При концентрации 100 мкг/мл экстракта чеснока значительно снижался уровень внутриклеточного этерифицированного ХС. Таким образом, водный экстракт чеснока имеет прямое антиатеросклеротическое действие на клеточном уровне, вызывая отток ХС (снижение ХС и его сложных эфиров) и ингибирование синтеза ДНК в клетках.

Помимо чеснока, был исследован антиатеросклеротический эффект свеклы (*Beta обыкновенная*). Данные представлены в табл. 5. Видно, что водный экстракт порошка сушеной свеклы эффективно снижает внутриклеточный ХС, т.е. обладает антиатеросклеротическим действием.

Мы исследовали сочетание чеснока и свеклы. Показано, что эта комбинация не увеличивает антиатеросклеротическое действие чеснока (табл. 6).

#### Модель *ex vivo*

В качестве основы для разработки метода оценки оттока ХС *ex vivo* была использована технология модели *in vitro*. Существенным отличием *ex vivo* версии от *in vitro* модели было то, что к культуре клеток добавлялись не фармакологические агенты, а сыворотка крови больных, взятая после приема ими препаратов. Влияние препарата на отток ХС оценивали путем измерения содержания внутриклеточного ХС до и после добавления сыворотки крови пациента к клеточной культуре. Эта модель очень близка к ситуации в организме, поэтому легко интерпретировать полученные результаты. Так как сыворотка содержит все компоненты, которые могут повлиять на отток

ХС, данные следует рассматривать как интегральный показатель конечного результата влияния всех возможных эффекторов на отток ХС.

Эффект верапамила на отток ХС, выявленный в *in vitro* модели, был подтвержден с помощью *ex vivo* модели. В табл. 6 приведены данные, полученные при использовании *ex vivo* модели. Добровольцы получали верапамил в дозе 40 мг. Образцы крови отбирали до введения верапамила (время «0») и через 1 ч, 2 ч, 4 ч и 8 ч после введения. Образцы сыворотки крови были приготовлены и добавлены к первичной культуре атеросклеротических клеток. Видно, что значительное снижение внутриклеточного ХС наблюдалось в том случае, когда была добавлена сыворотка, полученная из крови, взятой через 2 ч после однократной дозы верапамила (табл. 7). Тот же эффект был у сыворотки, взятой через 4, 8 и 12 ч после введения верапамила. То есть, начиная с 2 ч после приема однократной дозы верапамила, сыворотка приобретает антиатеросклеротические свойства, проявляющиеся в развитии обратного оттока ХС из атеросклеротических клеток. Антиатеросклеротические свойства сыворотки сохраняются в течение, по крайней мере, 12 ч после введения.

В *ex vivo* модели изучалось и антиатеросклеротическое действие таблеток из порошка чеснока (150 мг). Уже через 2 ч после однократного перорального приема таблетки сыворотка приобретает способность к снижению внутриклеточного холестерина. Эффект сохраняется в течение по меньшей мере 6 ч после приема (табл. 8). Длительный прием чесночных таблеток в течение 12 мес. приводит к сохранению устойчивого антиатеросклеротического эффекта (табл. 9).

Таблица 5

#### Влияние на обратный транспорт холестерина водного экстракта порошка свеклы в модели *in vitro*

	Внутриклеточный холестерин	
	мкг/мг клеточного белка	% от контроля
Контроль	142,9 ± 7,8	100 ± 5
0,2 мкг/мл	84,1 ± 3,0	59 ± 2 *
0,1 мкг/мл	105,3 ± 6,1	74 ± 4 *
0,01 мкг/мл	113,4 ± 7,3	79 ± 5 *
0,001 мкг/мл	121,6 ± 2,3	85 ± 2 *

Примечание. \* — достоверное различие по сравнению с контролем (p<0,05)

Таблица 6

#### Эффект на обратный транспорт холестерина комбинации чеснока и свеклы

	Внутриклеточный холестерин	
	мкг/мг клеточного белка	% от контроля
Контроль	89,1 ± 3,6	100,0 ± 4,0
Чеснок, 0,1 мкг/мл	63,9 ± 4,9	71,7 ± 5,5 *
Чеснок, 0,01 мкг/мл	65,5 ± 3,3	73,5 ± 3,7 *
Свекла, 0,1 мкг/мл	78,5 ± 3,3	88,1 ± 3,7 *
Свекла, 0,01 мкг/мл	84,7 ± 6,5	95,1 ± 7,3
Чеснок, 0,1 + свекла, 0,1 мкг/мл	66,8 ± 1,5	75,0 ± 1,7 *
Чеснок, 0,1 + свекла, 0,01 мкг/мл	75,5 ± 3,2	84,7 ± 3,6 *
Чеснок, 0,01 + свекла, 0,1 мкг/мл	76,6 ± 5,7	86,0 ± 6,4 *
Чеснок, 0,01 + свекла, 0,01 мкг/мл	87,7 ± 5,5	98,4 ± 6,2

Примечание. \* — достоверное различие по сравнению с контролем (p<0,05)

Таблица 7

**Антиатеросклеротическое действие верапамила в модели *ex vivo***

Время после приема препарата, ч	Содержание внутриклеточного холестерина, % от контроля
0	104 ± 3
1	91 ± 11
2	55 ± 10 *
4	44 ± 4 *
8	46 ± 3 *
12	59 ± 6 *

Примечание. Контрольные клетки, выделенные из атеросклеротического поражения, содержали 221 ± 13 мкг холестерина на 1 мг клеточного белка; этот уровень принят за 100%; \* — достоверное снижение уровня внутриклеточного холестерина,  $p < 0,05$

Таблица 8

**Оценка антиатеросклеротического действия таблетки чесночного порошка (150 мг) на модели *ex vivo***

Время после приема препарата, ч	Содержание внутриклеточного холестерина, мкг/мг клеточного белка	% от контроля
Контроль	110,5 ± 5,2	100 ± 5
0	107,8 ± 4,0	95 ± 4
2	90,5 ± 4,5	82 ± 4 *
4	83,0 ± 2,4	75 ± 2 *
6	83,8 ± 4,6	76 ± 4 *

Примечание. \* — значительное снижение уровня внутриклеточного холестерина,  $p < 0,05$

Таблица 9

**Антиатеросклеротический эффект длительного приема таблеток чесночного порошка (150 мг при однократном приеме) на модели *ex vivo***

Продолжительность лечения	Содержание холестерина в атеросклеротических клетках после 24 ч инкубации с исследуемой сывороткой крови, % от контроля
1 мес. до начала лечения	100 ± 1
Начало лечения (0 месяцев)	100 ± 1
0,5 мес. после начала	70 ± 14
1 мес.	71 ± 11
1,5 мес.	70 ± 5 *
2 мес.	68 ± 6 *
3 мес.	67 ± 8 *
4 мес.	74 ± 9 *
5 мес.	74 ± 4 *
6 мес.	72 ± 1 *
7 мес.	74 ± 6 *
8 мес.	68 ± 10 *
12 мес.	75 ± 11

Примечание. \* — значительное антиатеросклеротическое действие,  $p < 0,05$

### Заключение

В настоящем исследовании были применены клеточные модели, разработанные на основе первичной культуры клеток интимы аорты человека. Первичную культуру клеток, выделенных из пораженных атеросклерозом участков интимы аорты, использовали для оценки антиатеросклеротических свойств исследуемых веществ. Антиатеросклеротический эффект, проявлялся в уменьшении содержания внутриклеточного ХС по сравнению с исходным уровнем. Снижение содержания ХС в атеросклеротических клетках является интегральным показателем его оттока. На основе первичной культуры клеток, культиви-

руемых из непораженной атеросклерозом интимы аорты человека, была разработана и применена модель *ex vivo*, заключающаяся в оценке изменений атерогенных свойств сыворотки крови под воздействием приема различных лекарственных средств. Существенной 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.

В нашем исследовании были оценены антиатеросклеротические активности различных препаратов как в условиях *in vitro*, так и на моделях *ex vivo*. Мы также провели



скрининг растений, потенциально пригодных для ЛВП-терапии. Мы считаем, что разработанная *ex vivo* модель точно имитирует ситуацию в организме человека при приеме биологически активных веществ. Кроме того, легко интерпретировать результаты, полученные в этой модели, и экстраполировать данные для клинических целей. Так как сыворотка крови, которая используется в модели *ex vivo*, содержит все компоненты, которые влияют на отток ХС, полученные данные должны рассматриваться как интегральный показатель всех возможных эффекторов на отток ХС в клетках сосудистой стенки человека как при однократном приеме, так и при приеме в течение длительного времени.

Есть основания полагать, что разработанные модели могут быть полезны не только для клинического испытания различных веществ, но и для изучения механизмов их антиатерогенного действия.

### Список литературы

1. Ahmed T.A., Karalis I., Jukema J.W. Emerging drugs for coronary artery disease. From past achievements and current needs to clinical promises // *Expert Opinion on Emerging Drugs*. — 2011. — Vol. 16—2. — P. 203—233.
2. Andreeva E.R., Pugach I.M., Orekhov A.N. Collagen-synthesizing cells in initial and advanced atherosclerotic lesions of human aorta // *Atherosclerosis*. — 1997. — Vol. 130 — 1—2. — P. 133—142.
3. Bach T.J., Lichtenthaler H.K. Mevinolin: a highly specific inhibitor of microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase of radish plants // *Zeitschrift für Naturforschung. Section C: Biosciences*. — 1982. — Vol. 37—1—2. — P. 46—50.
4. Drew B.G., Fidge N.H., Gallon-Beaumier G. et al. High-density lipoprotein and apolipoprotein AI increase endothelial NO synthase activity by protein association and multisite phosphorylation // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2004. — Vol. 101—18. — P. 6999—7004.
5. Eren E., Yilmaz N., Aydin O. High Density Lipoprotein and its Dysfunction // *Open Biochemical Journal*. — 2012. — Vol. 6. — P. 78—93.
6. Farese R.V., Jr. The nine lives of ACAT inhibitors // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. — 2006. — Vol. 26—8. — P. 1684—1686.
7. Fazio S., Dove D.E., Linton M.F. ACAT inhibition: bad for macrophages, good for smooth muscle cells? // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. — 2005. — Vol. 25—1. — P. 7—9.
8. Glukhova M.A., Kabakov A.E., Frid M.G. et al. Modulation of human aorta smooth muscle cell phenotype: a study of muscle-specific variants of vinculin, caldesmon, and actin expression // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 1988. — Vol. 85—24. — P. 9542—9546.
9. Guey L.T., Pullinger C.R., Ishida B.Y. et al. Relation of increased prebeta-1 high-density lipoprotein levels to risk of coronary heart disease // *American Journal of Cardiology*. — 2011. — Vol. 108—3. — P. 360—366.
10. Gundermann K.J., Kuenker A., Kuntz E. et al. Activity of essential phospholipids (EPL) from soybean in liver diseases // *Pharmacological Reports*. — 2011. — Vol. 63—3. — P. 643—659.
11. Hara A., Radin N.S. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent // *Analytical Biochemistry*. — 1978. — Vol. 90—1. — P. 420—426.
12. Hernandez R.H., Armas-Hernandez M.J., Velasco M. et al. Calcium antagonists and atherosclerosis protection in hypertension // *American Journal of Therapeutics*. — 2003. — Vol. 10—6. — P. 409—414.
13. Kekulawala J.R., Murphy A., D'Souza W. et al. Impact of freezing on high-density lipoprotein functionality // *Analytical Biochemistry*. — 2008. — Vol. 379—2. — P. 213—215.
14. Leon C., Hill J.S., Wasan K.M. Potential role of acyl-coenzyme A: cholesterol transferase (ACAT) inhibitors as hypolipidemic and antiatherosclerosis drugs // *Pharmaceutical Research*. — 2005. — Vol. 22—10. — P. 1578—1588.
15. Leung A., Schaefer E.W., Tempelhof M.W. et al. Emphasizing statin safety in the hospitalized patient // *The American Journal of Medicine*. — 2012. — Vol. 125—9. — P. 845—853.
16. Loidal A., Polese A., Montorsi P. et al. Comparison of nifedipine, propranolol and isosorbide dinitrate on angiographic progression and regression of coronary arterial narrowings in angina pectoris // *The American Journal of Cardiology*. — 1989. — Vol. 64—8. — P. 433—439.
17. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *The Journal of Biological Chemistry*. — 1951. — Vol. 19—3. — P. 265—275.
18. Murphy A.J., Chin-Dusting J.P., Sviridov D. et al. The anti-inflammatory effects of high density lipoproteins // *Current Medicinal Chemistry*. — 2009. — Vol. 16—6. — P. 667—675.
19. Nicholls S.J., Ballantyne C.M., Barter P.J. et al. Effect of two intensive statin regimens on progression of coronary disease // *New England Journal of Medicine*. — 2011. — Vol. 22. — P. 2078—2087.
20. Nofer J.R., Levkau B., Wolinska I. et al. Suppression of endothelial cell apoptosis by high density lipoproteins (HDL) and HDL-associated lysosphingolipids // *The Journal of Biological Chemistry*. — 2001. — Vol. 276—37. — P. 34480—34485.
21. Nofer J.R., Walter M., Kehrel B. et al. HDL3-mediated inhibition of thrombin-induced platelet aggregation and fibrinogen binding occurs via decreased production of phosphoinositide-derived second messengers 1,2-diacylglycerol and inositol 1,4,5-tris-phosphate // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. — 1998. — Vol. 18—6. — P. 861—869.
22. Orekhov A.N., Andreeva E.R., Mikhailova I.A. et al. Cell proliferation in normal and atherosclerotic human aorta: proliferative splash in lipid-rich lesions // *Atherosclerosis*. — 1998. — Vol. 139—1. — P. 41—48.
23. Orekhov A.N., Andreeva E.R., Andrianova I.V. et al. Peculiarities of cell composition and cell proliferation in different type atherosclerotic lesions in carotid and coronary arteries // *Atherosclerosis*. — 2010. — Vol. 212—2. — P. 436—443.
24. Orekhov A.N., Andreeva E.R., Krushinsky A.V. et al. Intimal cells and atherosclerosis. Relationship between the number of intimal cells and major manifestations of atherosclerosis in the human aorta // *The American Journal of Pathology*. — 1986. — Vol. 125—2. — P. 402—415.
25. Orekhov A.N., Tertov V.V., Novikov I.D. et al. Lipids in cells of atherosclerotic and uninvolved human aorta. I. Lipid composition of aortic tissue and enzyme isolated and cultured cell // *Experimental and Molecular Pathology*. — 1985. — Vol. 42—1. — P. 117—137.
26. 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—6. — P. 988—984.
27. Pillarisetti S., Alexander C.W., Saxena U. Atherosclerosis — new targets and therapeutics. *Current Medicinal Chemistry // Cardiovascular and Hematological Agents*. — 2004. — Vol. 2—4. — P. 327—342.
28. Remaley A.T., Amar M., Sviridov D. HDL-replacement therapy: mechanism of action, types of agents and potential clinical indications *Expert Review of Cardiovascular Therapy*. — 2008. — Vol. 6—9. — P. 1203—1215.
29. Rosenson R.S., Brewer H.B., Jr., Davidson W.S. et al. Cholesterol efflux and atheroprotection: advancing the concept of reverse cholesterol transport // *Circulation*. — 2012. — Vol. 125—15. — P. 1905—1919.
30. Rotunda A.M., Kolodney M.S. Mesotherapy and phosphatidylcholine injections: historical clarification and review // *Dermatologic Surgery*. — 2006. — Vol. 32—4. — P. 465—480.
31. Sadowitz B., Seymour K., Gahtan V. et al. The role of hyaluronic acid in atherosclerosis and intimal hyperplasia // *The Journal of Surgical Research*. — 2012. — Vol. 173—2. — P. e63—e72.
32. Siasos G., Tousoulis D., Kioufis S. et al. Inflammatory mechanisms in atherosclerosis: the impact of matrix metalloproteinases // *Current Topics in Medicinal Chemistry*. — 2012. — Vol. 12—10. — P. 1132—1148.
33. Siefert S.A., Sarkar R. Matrix metalloproteinases in vascular physiology and disease // *Vascular*. — 2012. — Vol. 20—4. — P. 210—216.
34. Singh V., Tiwari R.L., Dikshit M. et al. Models to study atherosclerosis: a mechanistic insight // *Current Vascular Pharmacology*. — 2009. — Vol. 7—1. — P. 75—109.
35. Soran H., Hama S., Yadav R. et al. HDL functionality // *Current Opinion in Lipidology*. — 2012. — Vol. 23—4. — P. 353—366.

36. Tiwari R.L., Singh V., Barthwal M.K. Macrophages: an elusive yet emerging therapeutic target of atherosclerosis // *Medicinal Research Reviews*. — 2008. — Vol. 28—4. — P. 483—544.

37. Tomoda H., Omura S. Potential therapeutics for obesity and atherosclerosis: inhibitors of neutral lipid metabolism from microorganisms // *Pharmacology & Therapeutics*. — 2007. — Vol. 115—3. — P. 375—889.

38. Wang J.C., Bennett M. Aging and atherosclerosis: mechanisms, functional consequences, and potential therapeutics for cellular

senescence // *Circulation Research*. — 2012. — Vol. 111—2. — P. 245—259.

39. Yuan Y., Li P., Ye J. Lipid homeostasis and the formation of macrophage-derived foam cells in atherosclerosis // *Protein & Cell*. — 2012. — Vol. 3—3. — P. 173—181.

Посмунна 14.01.2013

## ***Development of novel cell models for the evaluation of cholesterol efflux***

**Melnichenko A.A.<sup>1,2</sup>, Orekhova V.A.<sup>1,3</sup>, Sobenin I.A.<sup>1,2,3</sup>, Karagodin V.P.<sup>2</sup>, Orekhov A.N.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> — Laboratory of Cellular Mechanisms of Atherogenesis, Institute of General Pathology and Pathophysiology, Russian Academy of Medical Sciences, 8, Baltiyskaya Street, 125315, Moscow, Russia

<sup>2</sup> — Institute for Atherosclerosis Research, Skolkovo Innovative Center, POB №21, 121609, Moscow, Russia

<sup>3</sup> — Laboratory of Medical Genetics, A.N. Myasnikov Institute of Clinical Cardiology, Russian Cardiology Research and Production Complex, Ministry of Healthcare and Social Development, 15a 3<sup>rd</sup> Cherepkovskaya Street, 121552, Moscow, Russia

*For evaluation of cholesterol efflux we use a sensitive method for determination of intracellular cholesterol. As a cellular model, primary culture of subendothelial cells isolated by enzymatic digestion from the intima of the human aorta is used in our approach. In this study our in vitro cellular model has undergone testing and demonstrated its applicability. As agents for the testing a wide number of pharmacologic substances, including natural products with pharmacologic properties have been used. The results showed that the in vitro method is suitable for study of cholesterol efflux from cultured cells and this model can be successfully used for HDL therapy against cardiovascular disease. Our cellular model can be also used in ex vivo version when not pharmacological agents but the serum of patients treated with different drugs is added to the cell culture. This model mimics very closely the situation which actually occurs in the body making easy to interpret the results obtained. Because the serum contains all the components that affect the cholesterol efflux, the data obtained in this ex vivo model can be considered as a reliable indicator of the influence of all possible effectors on cholesterol efflux.*

**Key words:** high density lipoprotein; cardiovascular diseases; HDL therapy; cell models; in vitro model; ex vivo model