

КЛЕТОЧНЫЕ МОДЕЛИ ДЛЯ ПОИСКА ВЕЩЕСТВ, СПОСОБСТВУЮЩИХ ОБРАТНОМУ ТРАНСПОРТУ ХОЛЕСТЕРИНА

*А.Н. Орехов^{1,2}, И.А. Собенин², В.А. Орехова¹, А.А. Мельниченко¹, В.А. Мясоедова^{1,2},
Н.М. Мухамедова¹, Д.Д. Свиридов¹, В.П. Карагодин¹*

*¹Научно-исследовательский институт атеросклероза, 121355, Москва, ул. Ивана
Франко, д. 4, к. 1, тел. +7 (495) 4120113, +7 (495) 4121557, office@inat.ru,*

*²Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии РАМН,
125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8, тел. +7 (499) 6012181, niiopp@mail.ru*

Резюме:

Разработаны клеточные модели (клеточный культуральный тест), позволяющие оценивать отток холестерина из сосудистой стенки как интегральный показатель обратного транспорта холестерина. Модель в варианте *in vitro* была использована для оценки влияния на отток холестерина гиполипидемических препаратов, используемых для снижения уровня холестерина в крови, относящихся к различным классам фармакологических веществ. Обнаружено, что снижение холестерина в крови не всегда сопровождается снижением холестерина в сосудистой стенке. Влияние верапамила на отток холестерина, выявленное на модели *in vitro*, было подтверждено на модели *ex vivo*. На клеточной модели *in vitro* были испытаны бета-блокаторы и нитраты. Все антагонисты кальция подавляли пролиферативную активность атеросклеротических клеток. Бета-блокаторы вызывали прямые проатерогенные эффекты на уровне артериальных клеток. Нитраты не обладали эффектами, имеющими отношение к атеросклерозу. Полученные данные могут использоваться для создания новых антиатеросклеротических лекарственных средств и для изучения механизмов их действия.

Ключевые слова: холестерин, атеросклероз, клеточные модели, антиатеросклеротические средства.

CELL MODELS FOR SEARCH OF SUBSTANCES PROMOTING REVERSE CHOLESTEROL TRANSPORT

*A.N.Orekhov, I.A. Sobenin, V.A. Orekhova, A.A. Melnichenko, V.A.Myasoedova, N.M.
Muhamedova, D.D.Sviridov, V.P.Karagodin*

¹Institute for Atherosclerosis Research: 4-1 I. Franko Str., 121355, Moscow, Russia.

*²Institute of General Pathology and Pathophysiology: 8 Baltiyskaya Str., 125315, Moscow,
Russia.*

Summary:

Cultured cell models have been developed to study the cholesterol efflux from the arterial wall as an integral indicator of reverse cholesterol transport. The model *in vitro* mode has been used for an estimation of cholesterol efflux as an effect of different pharmacological substances which

usually reduce cholesterol level in blood. It is shown that cholesterol decrease in blood isn't always accompanied by cholesterol decrease in a vascular wall. Influence of verapamil on the cholesterol efflux revealed on model in vitro, has been confirmed on model ex vivo. On cellular model in vitro beta-blockers and nitrates have been tested. All calcium antagonists had ability to inhibit proliferative activity of cultured atherosclerotic cells. Beta-blockers caused direct proatherogenic effects in human aortic cells. Nitrates had no effect on atherosclerotic characteristics. The models and the results of in vivo and ex vivo experiments can be used to propose new antiatherosclerotic drugs and elucidate their mood of action.

Key words: cholesterol, atherosclerosis, cultured cell models, antiatherosclerotic drugs.

ВВЕДЕНИЕ

Причины возникновения и механизмы развития атеросклероза изучены пока недостаточно. На молекулярно-клеточном уровне ключевым моментом в атерогенезе является накопление внутриклеточных липидов, обусловленное наличием модифицированных ЛНП. В этом случае патогенетический подход к профилактике и лечению атеросклероза определяется возможностью устранения физической причины патологии, а именно, предотвращения 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.

В настоящее время не существует лекарственных средств, в полной мере обладающих прямым антиатеросклеротическим действием. Известно, что регулярный прием различных препаратов может сказываться на процессах накопления холестерина в клетках артериальной стенки [3]. Ряд лекарственных препаратов различных химических групп может способствовать снижению атерогенного потенциала сыворотки крови больных атеросклерозом. Понятие «атерогенный потенциал» («атерогенность») с точки зрения клеточной биологии означает способность сыворотки крови или ее компонентов вызывать накопление эфиров холестерина в клетках, культивируемых из непораженной атеросклерозом интимы аорты человека. Сыворотка крови здоровых лиц, в отличие от сыворотки крови больных атеросклерозом, не обладает атерогенными свойствами. Клеточный культуральный тест представляется наиболее оптимальным и адекватным способом моделирования ранних процессов атерогенеза на клеточном уровне. С

использованием клеточного теста была предложена модель “ex vivo” для оценки антиатерогенного потенциала лекарств. Подобный подход сделал возможным проведение серийных испытаний, необходимых для потокового скрининга лекарственных средств, обладающих антиатерогенным эффектом, а также эпидемиологических и проспективных исследований, в которых, как правило, обследуются значительные контингенты больных.

Отток холестерина, являющийся составной частью механизма обратного транспорта холестерина в организме – это обратная сторона накопления холестерина в артериальных клетках. Именно накопление внутриклеточного холестерина и его отток определяют, произойдет ли ретенция (удержание) холестерина в сосудистой стенке. Стимуляция оттока холестерина не менее важна для устранения риска развития атеросклероза, чем предотвращение накопления внутриклеточного холестерина. На клеточном уровне отток холестерина – это проявление регрессии атеросклероза.

ЦЕЛЬ

Целью настоящего исследования была разработка клеточных моделей для поиска фармакологических веществ прямого патогенетического антиатеросклеротического действия, основанного на оттоке холестерина из клеток сосудистой стенки.

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 часов 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 [10-12, 18]. 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 [15-17]. Затем с помощью пинцетов интиму отделяли от меди, при этом разделение слоев происходило по внутренней пограничной эластической мембране [12].

Для экспериментов использовали 7-10-дневную первичную культуру клеток. Такая культура представляет собой смешанную клеточную популяцию, состоящую преимущественно из типичных и модифицированных гладкомышечных клеток [1, 2, 12]. Клетки, полученные из непораженных и атеросклеротических участков интимы аорты человека, культивировали отдельно и использовали в экспериментах различных типов, что позволяло в дальнейшем использовать 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 холестерина по сравнению с исходным уровнем.

Культура моноцитов-макрофагов крови человека. Моноциты крови человека выделяли из крови здоровых добровольцев и культивировали до их созревания в макрофаги [4, 5]. Полученную чистую культуру моноцитов культивировали в CO₂-инкубаторе (5% CO₂ и 95% атмосферного воздуха) при 100% влажности и 37°C в течение 14 суток до превращения их в макрофаги [19]. Смену инкубационной среды проводили каждые 48 часов. В экспериментах использовали культуру на 14-й день культивирования. Полученную таким образом культуру моноцитов-макрофагов крови человека использовали в клинических исследованиях при серийных измерениях атерогенных свойств сыворотки крови (ее способности вызывать накопление внутриклеточного холестерина).

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-глутамина, 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 [13]. 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 Radin [6], каждая экстракция продолжалась по 30 мин. Содержание эстерифицированного внутриклеточного холестерина определяли по разнице уровней общего и свободного холестерина.

Определение внутриклеточных липидов методом тонкослойной хроматографии.

Липиды из клеток экстрагировали трижды смесью n-гексана и изопропанола в объемном отношении 3:2 по методу Naga и Radin [6], 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 и (б) n-гексан – диэтиловый эфир – уксусная кислота в объемном соотношении 90:10:1. Фосфолипиды хроматографировали в системе метилацетат – n-пропанол – хлороформ – метанол – 0,25% KCl в объемном соотношении 25:25:25:10:9.

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. [9].

Расчет атерогенного эффекта (оценка атерогенности сыворотки крови).

После определения содержания общего холестерина и белка вычисляли соотношение холестерин/белок в каждой пробе. Удельное содержание общего холестерина в клетках, выделенных из непораженных участков интимы аорты, колебалось в пределах 20-50 мкг/мг клеточного белка. Удельное содержание общего холестерина в моноцитах-макрофагах крови человека колебалось в пределах 8-20 мкг/мг клеточного белка. Среднее удельное содержание холестерина в контрольных клетках данной серии принималось за 100%, размах варьирования не превышал 8%. Атерогенный эффект исследуемых сывороток определяли по содержанию холестерина в опытных культурах и выражали в процентах от содержания внутриклеточного холестерина в контроле. Сыворотка крови пациента, вызывавшая статистически достоверное накопление внутриклеточного холестерина, рассматривалась как атерогенная.

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 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%. Эффект на отток холестерина (антиатеросклеротический эффект) исследуемых веществ определяли как их способность статистически достоверно снижать исходно высокое содержание внутриклеточного холестерина.

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 часов при скрининговых исследованиях и при оценке краткосрочного действия, а также через 4, 8, 12 и 24 часа при оценке длительности эффекта). Эффект на отток холестерина (антиатеросклеротический эффект) исследуемых веществ в модели ex vivo определяли как их способность статистически достоверно снижать содержание холестерина в культивируемых атеросклеротических клетках.

Определение пролиферативной активности. Клетки, выделенные из нормальных или пораженных атеросклерозом участков интимы аорты человека, инкубировали в течение 24 ч в присутствии 10 мКи/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 часов. 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 мКи/мл [³H]-пролина. По окончании инкубации включение

меченого пролина в обработанную коллагеназой фракцию культуральной среды определяли по методу Peterkofsky и Diegelmann [14].

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. 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

Испытание фармакологических веществ на разработанных моделях.

Разработанная клеточная модель в варианте *in vitro* была использована для оценки влияния на отток холестерина гиполипидемических препаратов, используемых для снижения уровня холестерина в крови, относящихся к различным классам фармакологических веществ. Среди них был ловастатин, относящийся к классу статинов, а также липостабил, содержащий липиды натурального происхождения. Были также испытаны ингибиторы ацил-КоА-холестерина-ацилтрансфераза (АХАТ) – фермента, принимающего участие в накоплении холестерина в клетках сосудистой стенки. Было обнаружено, что только липостабил достоверно снижал содержание холестерина в клетках, культивируемых из атеросклеротических поражений аорты человека, то есть вызывал обратный транспорт холестерина (Таблица 1). Ни статин, ни ингибиторы АХАТ не способствовали обратному транспорту холестерина из атеросклеротических клеток. Полученные данные являются ярким примером того, что снижение холестерина в крови не обязательно сопровождается снижением холестерина в сосудистой стенке. Так, сильное гиполипидемическое лекарственное средство ловастатин, снижающее уровень холестерина в крови путем подавления его синтеза, не способствовал обратному транспорту холестерина из атеросклеротических клеток. С другой стороны, липостабил, обладающий умеренным гиполипидемическим действием, обладал выраженным эффектом на отток холестерина. Экстраполируя этот эффект липостабила на ситуацию в организме, можно предполагать, что липостабил обладает антиатеросклеротическим действием, вызывая регрессию атеросклеротического поражения в сосуде.

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

Примечания.

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, $p < 0,05$.

В Таблице 2 приведены данные комплексной оценки влияния на атеросклеротические показатели культивируемых клеток известного лекарственного средства верапамила, относящегося к классу антагонистов кальция. Известно, что верапамил обладает антиатеросклеротическим действием, вызывая регрессию атеросклероза у больных с документированными атеросклеротическими поражениями сосудов [7]. В первичной культуре интимальных клеток аорты человека верапамил дозозависимо снижал содержание общего холестерина, то есть способствовал обратному транспорту холестерина. В отсутствие верапамила отток холестерина из клеток не наблюдался. При этом свободный (неэтерифицированный) холестерин не изменялся. Это свидетельствует о том, что снижение содержания холестерина в клетках происходит исключительно за счет эфиров холестерина. Наряду со снижением общего холестерина, наблюдалось уменьшение содержания двух других важнейших классов внутриклеточных липидов – фосфолипидов и триглицеридов. Таким образом, обратный транспорт холестерина 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.

Таблица 2 - Антиатеросклеротические эффекты верапамила в модели *in vitro*

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

Примечания.

- Контрольные уровни в контроле составили 12,2±0,2 dpm/мкг клеточного белка для включения меченого тимидина; 57,4±1,2, 71,4±10,9, 46,8±5,3, 12,1±1,7 30,8±1,6 мкг/10⁵ клеток для общего холестерина, фосфолипидов, свободного холестерина, триглицеридов и эфиров холестерина, соответственно; 2500±102 dpm/10³ клеток для включения меченого пролина.

- Достоверность отличий от контроля указана в таблице.

Верапамил вызывал дозозависимое существенное подавление пролиферативной активности культивируемых атеросклеротических клеток (Таблица 2). Кроме того, верапамил подавлял синтез коллагена в первичной культуре клеток, выделенных из атеросклеротического поражения (Таблица 2).

Таким образом, верапамил не только способствует оттоку холестерина из атеросклеротических клеток, но обладает и другими антиатеросклеротическими эффектами на уровне клеток сосудистой стенки, подавляя пролиферативную и синтетическую активность, то есть уменьшает или подавляет все основные проявления атеросклероза на клеточном уровне – липоидоз, пролиферацию и фиброз.

Влияние верапамила на отток холестерина, выявленный на модели *in vitro*, был подтвержден на модели *ex vivo*. В Таблице 3 приведены данные, полученные на разработанной модели *ex vivo*. Добровольцы однократно принимали верапамил в дозе 40 мг. Кровь брали до приема верапамила (время «0») и через 1 час, 2 часа, 4 часа и 8 часов после приема. Из образцов крови готовили сыворотку, и образцы сыворотки добавляли в первичную культуру атеросклеротических клеток. Можно видеть, что значимое снижение содержания внутриклеточного холестерина наблюдалось в случае добавления в культуру

сыворотки, приготовленной из крови, взятой спустя 2 часа после однократного приема верапамила (Таблица 3). Таким же эффектом обладали сыворотки, взятые через 4, 8 и 12 часов после приема верапамила. Следовательно, начиная с 2 часов после однократного приема верапамила, сыворотка крови приобретает антиатеросклеротические свойства, проявляющиеся в способствовании обратному оттоку холестерина из атеросклеротических клеток. Антиатеросклеротические свойства сыворотки сохраняются, по крайней мере, в течение 12 часов после приема. На разработанных клеточных моделях оттока холестерина в вариантах *in vitro* и *ex vivo* были испытаны различные фармакологические вещества. На модели *in vitro* сравнивали описанные выше эффекты верапамила с эффектами других лекарственных средств.

Таблица 3 - 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 *

Примечания.

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, $p < 0,05$.

В дополнение к верапамилу, были испытаны другие антагонисты кальция, в частности: нифедипин, дилтиазем, нитроглицерин, циннаризин, папаверин. Кроме того, на разработанной клеточной модели *in vitro* были испытаны бета-блокаторы и нитраты, которые, наряду с антагонистами кальция, являются наиболее широко используемыми классами антиангинальных препаратов.

Все исследованные антагонисты кальция способствовали оттоку холестерина из атеросклеротических клеток на разработанной клеточной модели *in vitro*, вызывая значимое снижение содержания внутриклеточного холестерина в культивируемых клетках атеросклеротического поражения аорты человека (Таблица 4). Помимо этого, все антагонисты кальция подавляли пролиферативную активность атеросклеротических

клеток (Таблица 4). Таким образом, можно утверждать о наличии у антагонистов кальция антиатеросклеротических эффектов, проявляемых на уровне клеток сосудистой стенки.

Напротив, все исследованные бета-блокаторы не только не способствовали оттоку холестерина из атеросклеротических клеток на разработанной модели *in vitro*, но и повышали в них содержание холестерина (Таблица 4). Параллельно все бета-блокаторы стимулировали пролиферативную активность культивируемых атеросклеротических клеток (Таблица 4). Таким образом, в противоположность антиатеросклеротическим эффектам антагонистов кальция, бета-блокаторы вызывают прямые проатерогенные эффекты на уровне артериальных клеток.

Третий класс антиангинальных препаратов – нитраты – не способствовал оттоку холестерина на модели *in vitro*. Нитраты не оказывали значимого влияния ни на содержание холестерина, ни на пролиферативную активность атеросклеротических клеток, то есть они не обладали эффектами, имеющими отношение к атеросклерозу (Таблица 4).

Таблица 4 - Влияние антагонистов кальция, бета-блокаторов и нитратов на содержание холестерина и пролиферативную активность клеток, выделенных из атеросклеротической бляшки

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

Примечания

1 * - достоверное снижение показателей по сравнению с контролем, $p < 0,05$;

2 # - достоверное повышение по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

При этом данные о прямых антиатеросклеротических эффектах антагонистов кальция, проатерогенных эффектах бета-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 [8].

Итак, нами разработаны наиболее приближенные к ситуации в организме клеточные модели, позволяющие оценивать отток холестерина как интегральный показатель важнейшего проявления обратного транспорта холестерина. Полученные данные позволяют с оптимизмом рассматривать возможность применения разработанных моделей для создания новых антиатеросклеротических лекарственных средств и для изучения механизмов их действия.

Работа была поддержана Министерством образования и науки Российской Федерации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреева Е.Р., Михайлова И.А., Пугач И.М., Орехов А.Н. 1999. Клеточный состав атеросклеротических поражений аорты человека. *Ангиол. Сосуд. Хир.* 5: 6-26.
2. Андреева Е.Р., Тертов В.В., Мухин Д.Н., Орехов А.Н. 1985. Клеточный состав и биохимические особенности аорты человека. *Бюлл. ВКНЦ АМН СССР.* 8: 63-71.
3. Ackermann R.T., Mulrow C.D., Ramirez G. et al. 2001. Garlic shows promise for improving some cardiovascular risk factors. *Arch. Intern. Med.* 161: 813-824.
4. Adams D.O. 1979. Macrophages. *Methods Enzymol.* 58: 494-505.
5. Edelson P.J., Kohn Z.A. 1976. Purification and Cultivation of Monocytes and Macrophages. In: *In vitro methods in cell-mediated and tumor Immunity.* Bloom B.R., David J.R., eds. Academic Press, Inc., New York. 333-340.
6. Hara A., Radin N.S. 1978. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal. Biochem.* 90: 420-426.
7. Hernández R.H., Armas-Hernández M.J., Velasco M. et al. 2003. Calcium antagonists and atherosclerosis protection in hypertension. *Am. J. Ther.* 10: 409-414.
8. Loaldi A., Polese A., Montorsi P. et al. 1989. Comparison of nifedipine, propranolol and isosorbide dinitrate on angiographic progression and regression of coronary arterial narrowings in angina pectoris. *Am. J. Cardiol.* 64: 433-439.

9. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall B.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
10. Orekhov A.N., Andreeva E.R., Krushinsky A.V., Smirnov V.N. 1984. Primary cultures of enzyme-isolated cells from normal and atherosclerotic human aorta. *Med. Biol.* 62: 255-259.
11. Orekhov A.N., Karpova I.I., Tertov V.V. et al. 1984. Cellular composition of atherosclerotic and uninvolved human aortic subendothelial intima. Light-microscopic study of dissociated aortic cells. *Am. J. Pathol.* 115: 17-24.
12. Orekhov A.N., Tertov V.V., Novikov I.D. et al. 1985. Lipids in cells of atherosclerotic and uninvolved human aorta. I. Lipid composition of aortic tissue and enzyme-isolated and cultured cells. *Exp. Mol. Pathol.* 42: 117-137.
13. Orekhov A.N., Tertov V.V., Smirnov V.N. 1985. Lipids in cells of atherosclerotic and uninvolved human aorta. II. Lipid metabolism in primary culture. *Exp. Mol. Pathol.* 43: 187-195.
14. Peterkofsky B., Diegelmann R. 1971. Use of mixture of proteinase free collagenases for specific assay of radioactive collagen in the presence of other proteins. *Biochemistry.* 10: 988-984.
15. Sary H.C. 1992. Composition and classification of human atherosclerotic lesions. *Virchows. Arch. (A).* 421: 277-290.
16. Sary H.C., Chandler A.B., Glagov S., et al. 1994. 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.* 89: 2462-2478.
17. Sary H.C. 2000. Natural History and Histological Classification of Atherosclerotic Lesions: An Update. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20: 1177-1178.
18. Tertov V.V., Orekhov A.N., Ryong L.H., Smirnov V.N. 1988. Intracellular cholesterol accumulation is accompanied by enhanced proliferative activity of human aortic intimal cells. *Tissue. Cell.* 20: 849-854.
19. Virella G., Mudoz J.F., Galbraith G.M.P. et al. 1995. Activation of human monocyte-derived macrophages by immune complexes containing low-density lipoprotein. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 75: 179-189.