

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	5
Глава 1. Современные представления о клеточных механизмах атерогенеза и патогенетической профилактики атеросклероза	12
1.1. Эпидемиология атеросклероза и заболеваний атеросклеротического генеза	12
1.2. Интимальный слой артерий – морфологический субстрат для развития атеросклероза	27
1.3. Липидная теория атеросклероза	39
1.4. Современные подходы к профилактике и лечению атеросклероза	59
Глава 2. Разработка подходов к антиатеросклеротической терапии: материалы и методы	79
2.1. Первичная культура субэндотелиальных клеток аорты человека	79
2.2. Иммуноцитохимические методы	80
2.3. Культура моноцитов-макрофагов крови человека	81
2.4. Получение сыворотки крови	82
2.5. Выделение липопротеидов низкой плотности	82
2.6. Культивирование клеток с исследуемыми сыворотками крови человека или липопротеидами низкой плотности	83
2.7. Определение содержания внутриклеточного холестерина	84
2.8. Определение внутриклеточных липидов методом тонкослойной хроматографии	84
2.9. Определение клеточного белка	85
2.10. Расчет атерогенного эффекта (оценка атерогенности сыворотки крови)	85
2.11. Оценка антиатерогенного эффекта в модели <i>in vitro</i>	86
2.12. Оценка антиатеросклеротического эффекта в модели <i>in vitro</i>	86
2.13. Оценка антиатерогенного эффекта в модели <i>ex vivo</i>	87
2.14. Определение пролиферативной активности клеток	88
2.15. Определение синтеза клеточного белка	88
2.16. Определение синтеза коллагена	88
2.17. Изучение внутриклеточного метаболизма эфиров холестерина	89

2.18. Изучение внутриклеточного синтеза липидов	89
2.19. Определение активности внутриклеточных ферментов	90
2.20. Определение содержания липидов в крови	90
2.21. Окисляемость липопротеидов низкой плотности	91
2.22. Получение экстрактов исследуемых натуральных компонентов	91
2.23. Тонкослойная хроматография натуральных компонентов	91
2.24. Идентификация биологически активных компонентов	92
2.25. Экспериментальная модель атеросклероза	92
2.26. Клинико-лабораторное исследование по оценке прямого антиатерогенного действия «Алликор» в модели <i>ex vivo</i>	93
2.27. Клиническое исследование по влиянию препарата «Kwai» на биохимические факторы сердечно-сосудистого риска и атерогенность сыворотки крови	94
2.28. Ультразвуковое сканирование сосудов	94
2.29. Пилотное клиническое исследование по оценке прямого антиатеросклеротического действия препарата «Алликор»	95
2.30. Двойное слепое плацебо-контролируемое исследование «Мониторирование атеросклероза при снижении атерогенности сыворотки крови»	96
2.31. Методология проведения заочного эпидемиологического обследования	97
2.32. Методология проведения массовой оздоровительной программы по профилактике сердечно-сосудистых и острых респираторных вирусных заболеваний	98
2.33. Статистическая обработка данных	99
Глава 3. Разработка подходов к антиатеросклеротической терапии: результаты собственных исследований	100
3.1. Лабораторные исследования	100
3.1.1. Клеточные модели атерогенеза	100
3.1.1.1. Модель <i>in vitro</i>	100
3.1.1.2. Модель <i>ex vivo</i>	100
3.1.2. Адекватность клеточных моделей	101
3.1.3. Воспроизведение ключевых событий атерогенеза в клеточных	

моделях	103
3.1.4. Оценка распространенности атерогенности сыворотки крови с использованием модели <i>in vitro</i> и определение концепции патогенетической терапии атеросклероза	107
3.1.5. Изучение лекарственных и нелекарственных средств в отношении антиатеросклеротической и антиатерогенной активности	113
3.1.6. Исследование антиатеросклеротических свойств чеснока в модели <i>in vitro</i>	134
3.1.7. Механизмы антиатеросклеротической активности чеснока	140
3.1.8. Биологически активные компоненты чеснока	145
3.2. Исследования <i>in vivo</i>	151
3.2.1. Изучение антиатеросклеротической активности препарата на основе чеснока «Алликор» при экспериментальном атеросклерозе	151
3.3. Лабораторно-клинические исследования	154
3.3.1. Изучение антиатерогенного действия препарата «Алликор»	154
3.4. Клинические исследования	158
3.4.1. Изучение влияния препарата на основе чеснока «Kwai» на биохимические факторы сердечно-сосудистого риска и атерогенность сыворотки крови	158
3.4.2. Пилотное клиническое исследование по оценке прямого антиатеросклеротического действия препарата «Алликор»	161
3.4.3. Двойное слепое плацебо-контролируемое исследование «Мониторирование атеросклероза при снижении атерогенности сыворотки крови»	163
3.5. Клинико-эпидемиологические исследования и апробации	193
3.5.1. Изучение кардиопротекторного действия препарата «Алликор» в популяционных исследованиях	193
Обсуждение	199
Краткие выводы	217
Библиография	220

Список принятых сокращений

АГ	артериальная гипертензия
Апо-В	аполипопротеин В
АХАТ	ацилкоэнзим А : холестерин ацилтрансфераза
ГБ	гипертоническая болезнь
ГМГ-КоА	гидроксиметилглутарил-коэнзим А
ИБС	ишемическая болезнь сердца
ИМС	интимо-медиальный слой
ИФБ	изотонический фосфатный буфер
КБС	коронарная болезнь сердца
ЛВП	липопротеиды высокой плотности
ЛНП	липопротеиды низкой плотности
ЛОНП	липопротеиды очень низкой плотности
ЛПП	липопротеиды промежуточной плотности
ЛХАТ	лецитин-холестерин ацилтрансфераза
МДА	малоновый диальдегид
СД	сахарный диабет
ССЗ	сердечно-сосудистые заболевания
ХМ	хиломикроны
ЦИК	циркулирующие иммунные комплексы
цмЛНП	циркулирующие модифицированные ЛНП
НвА1с	гликозилированный гемоглобин

ВВЕДЕНИЕ

Атеросклероз является одной из наиболее важных медико-социальных проблем, и его клинические проявления занимают ведущее место в структуре заболеваемости и смертности [93]. Атеросклероз - многофакторное заболевание, для которого характерно развитие дегенеративных изменений в стенках крупных артерий с последующей окклюзией просвета сосудов и ограничением кровоснабжения жизненно важных органов, таких, как сердце, головной мозг, почки. Субклинический (бессимптомный) атеросклероз является наиболее широко распространенной патологией; атеросклеротические поражения артерий выявляются уже у молодых лиц и неуклонно прогрессируют в течение десятилетий, прежде чем приводят к развитию клинических проявлений. Уже в среднем возрасте у лиц без клинических проявлений атеросклероза частота выявления атеросклеротических поражений сосудов приближается к 100% [109, 293, 411]. 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. Эпидемиологические исследования выявили группу факторов, связанных с повышенным риском сосудистой окклюзии [96]. Факторы риска атеросклероза по своей сути являются клинико-биохимическими синдромами, способствующими развитию данной формы патологии. Устранение факторов риска является наиболее изученным и широко используемым способом первичной профилактики атеросклероза [192]. Такой подход является непрямым воздействием, поскольку он основан на изменении условий, не связанных с молекулярно-клеточными механизмами атерогенеза, но способствующих или препятствующих возникновению и прогрессированию атеросклеротических поражений. Существует также представление о прямом антиатеросклеротическом воздействии, то есть о патогенетических подходах, которые предотвращают возникновение и прогрессирование атеросклеротических поражений путем воздействия на молекулярно-клеточные механизмы атерогенеза в артериях человека, а в идеале вызывают регрессию атеросклероза [49, 51]. Подходы к патогенетически обоснованной профилактике и терапии атеросклероза находятся в стадии разработки.

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 [7, 24, 356]. 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. Круг известных прижизненных атерогенных модификаций ЛНП ограничен тремя вариантами: десиалированием, изменением суммарного поверхностного заряда и изменением гидратированной плотности липопротеидных частиц. Фактически, во всех случаях речь идет об одном и том же типе множественной атерогенной модификации, оцененной и использованием разных способов лабораторной диагностики. При наличии в крови достаточного количества модифицированных ЛНП начинают действовать дополнительные механизмы, усиливающие их атерогенный потенциал. В первую очередь, речь идет о формировании крупных липидсодержащих комплексов. Известно, что модифицированные липопротеиды в силу изменения поверхностного заряда приобретают способность к спонтанной агрегации. Кроме того, модифицированные ЛНП приобретают антигенные свойства и индуцируют синтез аутоантител, что в конечном итоге приводит к формированию ЛНП-содержащих иммунных комплексов. Модифицированные ЛНП также обладают повышенной авидностью к компонентам соединительнотканного матрикса. Все эти процессы приводят к появлению крупных ЛНП-содержащих частиц-агрегатов, метаболизм которых на клеточном уровне осуществляется альтернативными способами, отличными от классического рецепторного пути. Основным механизмом захвата таких частиц становится нерегулируемый фагоцитоз. Пути внутриклеточной деградации фагоцитированных ЛНП-содержащих частиц значительно отличаются от классического метаболизма нативных ЛНП, поэтому за короткое время происходит массивное внутриклеточное накопление остатков липопротеидных частиц, главным образом, в виде липидных капель. В гистологических исследованиях подобные клетки, называемые "пенистыми", являются непременным признаком атеросклеротического поражения.

Патогенетический подход к профилактике и лечению атеросклероза определяется возможностью устранения физической причины патологии, а именно, предотвращению накопления внутриклеточных липидов. Существует ряд возможностей для воздействия на этот процесс, например, 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 [51].

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 [51]. Понятие «атерогенный потенциал» («атерогенность») означает способность сыворотки крови или ее компонентов вызывать накопление холестерина в клетках, культивируемых из непораженной атеросклерозом интимы аорты человека. Феномен атерогенности впервые был выявлен у больных коронарным атеросклерозом [34]. Целенаправленное снижение атерогенности сыворотки крови может способствовать предотвращению накопления липидов в клетках артериальной стенки и, таким образом, подавлять атерогенез на его начальной стадии. Клеточный культуральный тест оказался наиболее оптимальным и адекватным способом моделирования ранних процессов атерогенеза на клеточном уровне [52]. 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.

Следует отметить, что широкое использование лекарственных препаратов с целью профилактики атеросклероза на ранних его стадиях может оказаться нецелесообразным из-за узких показаний для назначения, выраженных побочных эффектов и высокой стоимости лечения. Для ранней профилактики атеросклероза

возможно использование нелекарственных и лекарственных средств натурального происхождения, поскольку они практически не обладают побочными эффектами, оказывают регулирующее воздействие в физиологических границах и, как следствие, позволяют осуществлять длительный, практически пожизненный прием. Средства натурального происхождения могут обладать более широким спектром эффектов, чем лекарственные препараты, оказывая влияние на ряд факторов риска атеросклероза, осуществляя не прямое антиатеросклеротическое воздействие. Основопологающими принципами использования лекарственных и нелекарственных препаратов с целью профилактики атеросклероза являются патогенетический механизм действия и подтвержденная в клинических исследованиях эффективность.

Данная монография посвящена вопросам разработки способов патогенетической профилактики и лечения атеросклероза, основанных на подавлении клеточных проявлений атерогенеза. В частности, описаны клеточные модели, способные воспроизводить атерогенные проявления на клеточном уровне, для экспресс-оценки антиатеросклеротической активности различных продуктов. Представлены примеры успешного использования таких моделей для скрининга различных фармакологических веществ, приведшего к выявлению антиатеросклеротической активности и ее характеристике на клеточном уровне в отношении таких показателей, как накопление эфиров холестерина, пролиферативная и синтетическая активность клеток. Подробно описан процесс дальнейшей разработки средства антиатеросклеротической терапии - углубленное изучение механизмов антиатеросклеротического эффекта, выявление активных компонентов, проведение исследований по оценке антиатеросклеротической эффективности на животной модели, клинико-лабораторные и клинические исследования антиатеросклеротической эффективности у больных атеросклерозом, двойное слепое рандомизированное плацебо-контролируемое исследование по мониторингованию каротидного атеросклероза, и, наконец, масштабное апробационное исследование.

Результатом проведенной работы явилось то, что 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. Впервые

использован новый метод оценки эффективности терапевтического антиатерогенного воздействия, основанный на клеточной модели *ex vivo*, а также получило развитие использование клеточных моделей *in vitro* для оценки прямого антиатеросклеротического и антиатерогенного действия лекарственных средств и биологически активных веществ натурального происхождения. Оценена распространенность атерогенности сыворотки крови (ее способности вызывать накопление холестерина в первичной культуре клеток из интимы аорты человека) у лиц с субклиническим атеросклерозом, а также определена диагностическая ценность этого показателя. Впервые установлено, что атерогенность сыворотки крови напрямую связана с прогрессированием субклинического атеросклероза и является патогенетическим фактором, оказывающим влияние на течение атеросклеротического процесса. Установлено также, что целенаправленное снижение атерогенности сыворотки крови приводит к остановке развития и регрессии ранних атеросклеротических поражений. Получило дальнейшее развитие изучение прямого антиатерогенного действия ряда лекарственных и натуральных препаратов. Дополнены представления о механизмах действия лекарственных средств антиатеросклеротического действия. Разработаны способы снижения атерогенности сыворотки крови с помощью лекарственных и нелекарственных средств, и клиническая эффективность разработанных подходов к прямой антиатеросклеротической терапии подтверждена в контролируемых клинических исследованиях.

Изучена адекватность клеточных моделей на основе первичной культуры клеток из непораженных и пораженных атеросклерозом участков интимы аорты человека для воспроизведения ключевых проявлений атерогенеза на клеточном уровне. Разработана клеточная модель *ex vivo*, позволяющая оценивать изменения атерогенных свойств сыворотки крови человека под воздействием приема различных лекарственных и нелекарственных средств. Установлено, что атерогенность сыворотки крови человека тесно сопряжена с наличием субклинического и клинически выраженного атеросклероза и является патогенетическим фактором, определяющим прогрессирование атеросклеротических поражений. Разработано патогенетическое обоснование применения антиатерогенной терапии как способа прямого антиатеросклеротического воздействия.

Предложен алгоритм оценки антиатеросклеротической эффективности лекарственных и нелекарственных средств, основанный на использовании клеточных моделей и включающий оценку антиатерогенного и антиатеросклеротического действия исследуемого вещества *in vitro*, оценку антиатерогенного действия в модели *ex vivo*, исследование антиатеросклеротического действия при экспериментальном атеросклерозе и исследование прямого антиатеросклеротического действия в клинических исследованиях по регрессии атеросклероза. Выявлены группы препаратов, обладающих прямым антиатерогенным действием. Предложена стратегия прямой антиатеросклеротической терапии с помощью лекарственных средств и препаратов на основе натуральных компонентов, основанные на подавлении атерогенности сыворотки крови. Предложено использовать показатель атерогенности сыворотки крови для диагностики субклинического атеросклероза и мониторингирования эффективности антиатеросклеротической терапии в научных исследованиях.

Данная монография содержит ряд ключевых научных положений, которые явились результатом многолетних фундаментальных и прикладных исследований и, в свою очередь, позволили разработать принципиально новые подходы к терапии и профилактике атеросклероза. Эти ключевые положения можно сформулировать следующим образом:

- клеточные модели на основе первичной культуры клеток из непораженных и пораженных атеросклерозом участков интимы аорты человека позволяют адекватно воспроизводить все проявления атерогенеза на клеточном уровне и разрабатывать подходы к патогенетическому воздействию на течение атеросклероза;
- атерогенность сыворотки крови человека, рассматриваемая как ее способность индуцировать процессы атерогенеза на клеточном уровне в модели *in vitro*, тесно сопряжена с наличием субклинического и клинически выраженного атеросклероза;
- клеточная модель *ex vivo* позволяет оценивать изменения атерогенных свойств сыворотки крови человека под воздействием приема различных лекарственных средств и препаратов на основе натуральных компонентов, что отражает их биологическую активность после усвоения, распределения и биотрансформации в организме человека;

- возникновение атерогенных свойств сыворотки крови определяет прогрессирование атеросклероза, а спонтанное или индуцированное с помощью антиатерогенной терапии снижение атерогенности сыворотки крови вплоть до ее полного устранения вызывает регрессию атеросклероза;
- антиатерогенная терапия (целенаправленное снижение атерогенности сыворотки крови с помощью лекарственных или натуральных препаратов) является патогенетическим способом профилактики и терапии атеросклероза; при этом для профилактики и лечения субклинического атеросклероза при отсутствии показаний к назначению антиатерогенных лекарственных средств целесообразно использовать нелекарственные средства на основе натуральных компонентов.

Глава 1.

Современные представления о клеточных механизмах атерогенеза и патогенетической профилактики атеросклероза.

1.1. Эпидемиология атеросклероза и заболеваний атеросклеротического генеза.

О распространенности атеросклероза принято судить, главным образом, по частоте его клинических проявлений. Такой подход обусловлен слабым развитием и недостаточной информативностью современных методов диагностики атеросклероза, особенно на ранних этапах его развития. Заболевания, в основе которых лежит атеросклероз, являются источником высокой заболеваемости и смертности в индустриально развитых странах, в том числе, в России, Европе и Северной Америке. В последнее десятилетие наблюдается процесс эпидемиоподобной глобализации атеросклеротических заболеваний, что отражается в существенном росте сердечно-сосудистой заболеваемости и смертности в странах «третьего мира». Клинические исходы ишемической болезни сердца (ИБС), сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) и цереброваскулярных заболеваний в значительной степени являются атрибутом атеросклеротического процесса. Атеросклероз развивается сравнительно скрытно в молодом и раннем зрелом возрасте, и его клинические последствия зачастую не проявляются вплоть до 45-летнего возраста. Новейшие методы диагностики сейчас позволяют выявлять субклинический (бессимптомный) атеросклероз в различных регионах артериального русла. Подавляющее большинство работ, посвященных эпидемиологии атеросклероза, развивают тему клинических проявлений атеросклероза на популяционном уровне, описывают распространенность факторов риска ССЗ, и лишь некоторые исследования предоставляют информацию о частоте бессимптомного атеросклероза в различных возрастных группах у взрослого населения.

Сердечно-сосудистые заболевания являются ведущей причиной смерти у взрослых лиц, в различных популяциях составляя от 40% до 58% всех смертей, как у мужчин, так и у женщин [93]. Следует отметить, что в ряде стран за последние десятилетия произошло существенное изменение структуры смертности. Так, уровень смертности от ССЗ в США был весьма высок, достигнув пикового значения в 70-е годы и снизившись с тех пор более чем на 30%.

Очевидно, что это снижение было обусловлено множественными факторами, связанными с профилактикой и лечением больных ССЗ [295].

Несколько отличная ситуация была свойственна в течение двух последних десятилетий для частоты впервые возникшего сердечного приступа. В исследовании «Atherosclerosis Risk in Communities Study» (ARIC) была отслежена заболеваемость ИБС в США за последние 20 лет. Было отмечено лишь умеренное снижение частоты нефатальных инфарктов миокарда [339]. Значительное снижение сердечно-сосудистой смертности, умеренное снижение заболеваемости ИБС и старение населения привело к тому, что повышенная распространенность ССЗ в значительной степени связана с возрастом и полом. Если ССЗ имеются приблизительно у 30% мужчин и женщин в возрасте 50 лет, то в возрасте 75 лет их частота достигает приблизительно 75%. Как показало исследование «National Health and Nutrition Examination Survey» (NHANES III), проводившееся с 1988 по 1994 гг., в возрасте 20-75 лет ССЗ постоянно выявляются более часто у мужчин любых возрастных групп, чем у женщин [93]. Во Фрамингемском исследовании у 40-летних мужчин риск таких проявлений ИБС, как стенокардия, инфаркт миокарда и внезапная коронарная смерть, в течение последующей жизни составлял 49%. У женщин риск подобных проявлений ИБС в течение последующей жизни в любой возрастной группе был ниже, чем у мужчин [272].

Начало ишемической болезни сердца может проявляться различным образом. У женщин в качестве первого проявления ИБС преобладает стенокардия, затем следует инфаркт миокарда, затем – смерть от ИБС; при этом внезапная коронарная смерть чрезвычайно нехарактерна для женщин. У мужчин наблюдается совершенно другое распределение первых проявлений ИБС: инфаркт миокарда является самой частой формой, затем следуют стенокардия и смерть от ИБС [266]. Следует отметить, что в возрасте старше 40 лет внезапная смерть наиболее вероятно связана с атеросклеротическими поражениями коронарных артерий.

У женщин ИБС обычно возникает после менопаузы, и ее распространенность становится значительно выше, чем у других заболеваний, связанных со старением, таких как переломы, цереброваскулярная болезнь, рак молочной железы и рак матки. Считалось, что сниженная продукция эстрогенов после менопаузы является фактором, определяющим повышенный риск ИБС у пожилых женщин. Мета-анализ обсервационных исследований, проведенных в

70-е и 80-е годы, показал, что риск возникновения ИБС при заместительной эстрогенной терапии у женщин в постменопаузе снижается на 50% [195]. Был проведен ряд рандомизированных клинических исследований по оценке эффективности эстрогенов как кардиопротективных средств у женщин в постменопаузе. Результаты этих исследований не подтвердили заключений, полученных в обсервационных исследованиях. Например, в клиническом исследовании «Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study» (HERS) суммарный относительный риск ИБС не различался у женщин, принимающих или не принимающих эстрогены [220]. Неблагоприятное действие комбинированной заместительной гормональной терапии с использованием эстрогенов и прогестинов было выявлено в исследовании «Women's Health Initiative» (WHI) [343]. При заместительной терапии эстрогенами было отмечено снижение риска переломов и рака прямой кишки, но повышался риск рака молочной железы, сердечно-сосудистых заболеваний, тромбозов, инсультов и инфарктов миокарда. Авторы пришли к выводу, что нежелательные риски заместительной гормональной терапии в постменопаузе преобладают над возможными благоприятными эффектами, поэтому применение эстрогенов и прогестинов в постменопаузе с целью профилактики ИБС не было рекомендовано.

Наряду с оценкой распространенности ИБС и других ССЗ, как клинических проявлений атеросклероза, принято рассматривать эпидемиологию факторов риска ССЗ. Под факторами риска понимают различные клинические, биохимические и социальные показатели, сопряженные с повышенной вероятностью развития ССЗ в популяции. Существует несколько способов рассмотрения факторов риска ИБС и факторов риска атеросклероза. Общий подход заключается в подразделении факторов риска на определенно модифицируемые, потенциально модифицируемые и фиксированные.

Уровень холестерина в крови, артериальное давление, курение, образ жизни и поведенческие факторы находятся в списке определенно модифицируемых факторов риска. Потенциально модифицируемые факторы риска обычно включают более новые параметры, которые активно исследуются как содействующие повышению риска атеросклеротических заболеваний. Научные данные об этих факторах в целом менее надежны, чем информация об определенно модифицируемых факторах риска. Наконец, возраст, пол и семейный анамнез относятся к фиксированным факторам риска ИБС и атеросклероза.

Генетическая предрасположенность может рассматриваться в любой из этих групп и влиять на риск ИБС. Например, генетически обусловленная семейная гиперхолестеринемия в настоящее время относится к определенно модифицируемым факторам риска, поскольку современная липидснижающая терапия может снижать риск ИБС у таких лиц. Отклонения в липидном профиле и других показателях метаболизма могут иметь генетическую основу и увеличивать риск атеросклеротических заболеваний, особенно при наличии специфических условий окружающей среды или диетических особенностей.

Существует и другая схема оценки развития атеросклеротических заболеваний. В соответствии с этим подходом, фундаментальные факторы риска ведут к развитию субклинического (бессимптомного) атеросклероза с последующей клинической манифестацией, после которой могут наблюдаться различные исходы ССЗ. Факторы окружающей среды представляются особенно важными для развития субклинического атеросклероза, который может быть выявлен с помощью специальных методов обследования, включающих магнитно-резонансную томографию, ультразвуковое сканирование и такой физиологический метод, как измерение артериального давления на верхних и нижних конечностях (лодыжечно-плечевой индекс). Некоторые биохимические параметры могут быть использованы для оценки возникновения и развития атеросклероза. Например, липиды, глюкоза и гомоцистеин могут благоприятствовать развитию субклинического атеросклероза; гематологические и воспалительные механизмы могут ускорять прогрессирование субклинической болезни до стадии определенных клинических исходов. Эти примеры лишь иллюстрируют сложные патологические процессы, поэтому можно говорить о том, что различные факторы могут играть роль в прогрессировании заболевания от одной фазы атеросклероза к другой.

Повышенный уровень холестерина определенно связан с развитием ССЗ. Более чем у 300000 мужчин среднего возраста, проходивших первичное обследование в рамках исследования «Multiple Risk Factor Intervention Trial» (MRFIT), повышенные уровни холестерина были сопряжены с повышенным риском смерти от ИБС [288]. При повышении уровня холестерина от 200 мг/дл до 250 мг/дл риск ИБС повышается в два раза, а до 300 мг/дл – в три раза [260].

Холестерин липопротеидов высокой плотности (ЛВП) является мажорной фракцией общего холестерина плазмы крови и важной детерминантой риска ИБС

и инфаркта миокарда. Во Фрамингемском исследовании у женщин 12-летний риск инфаркта миокарда был положительно связан с уровнем холестерина и отрицательно – с уровнем холестерина ЛВП [84]. У них даже при нормальном уровне общего холестерина содержание холестерина ЛВП в крови обратно коррелировало с риском развития инфаркта миокарда. Сходные результаты были получены и у мужчин, а также подтверждены в других исследованиях, направленных на обоснование скрининговых измерений холестерина и холестерина ЛВП для оценки сердечно-сосудистого риска.

Были идентифицированы различные типы липопротеидных частиц, и в настоящее время доступны разнообразные методы исследования, позволяющие определить их плотность, размер, электрофоретические характеристики и магнитно-резонансные свойства. Изначально наибольшее внимание привлекали частицы липопротеидов низкой плотности (ЛНП). Впоследствии интересы исследователей распространились на все типы частиц, так как новейшие методы позволили проводить быстрое измерение количества липопротеидов и их концентраций [317]. Существуют сложные взаимосвязи между количеством частиц и обычно измеряемыми в крови уровнями липидов. Например, при повышении содержания триглицеридов увеличивается доля мелких плотных частиц ЛНП, а доля крупных, менее плотных ЛНП снижается [101]. Мелкие плотные частицы ЛНП ассоциируют с повышенным риском, но практическая польза подобных измерений для оценки риска ССЗ в проспективных исследованиях в настоящее время неясна [258].

Липопротеид (а) (Лп(а)) является признанной детерминантой риска ССЗ. Этот липопротеид имеет в своей основе частицу ЛНП, связанную с белком, имеющим гомологию к плазминогену. Были предложены различные методы измерения уровня Лп(а), но их стандартизация оказалась сложной из-за индивидуальных различий в составе частиц. Лп(а) в целом рассматривают как фактор риска ССЗ, особенно при его высоких концентрациях (выше 30 мг/дл) [353].

Риск ССЗ в значительной степени связан с уровнем артериального давления, и уровень систолического давления в целом более тесно связан с развитием ССЗ, чем уровень диастолического давления. Наличие систолической или диастолической гипертензии обычно повышает риск ССЗ в 1,6 раза; при комбинированной систолической и диастолической гипертензии этот риск

повышен уже в 2,0 раза [105]. Долговременные сравнительные исследования показали, что риск ССЗ уже повышен у лиц с высоко-нормальным артериальным давлением (систолическое давление 130-139 мм рт. ст. при диастолическом давлении 85-89 мм рт. ст.). Поскольку высоко-нормальное артериальное давление весьма распространено, оно связано со значительной частью сердечно-сосудистых катастроф, и на популяционном уровне является почти таким же важным фактором, как и явная гипертония [414]. Как показал анализ 61 проспективного обсервационного исследования по связи артериального давления и смертности, у лиц в возрасте 40-69 лет разница в 20 мм рт. ст. по систолическому давлению и 10 мм рт. ст. по диастолическому давлению приводит приблизительно к 2-кратной разнице в смертности от ишемической болезни сердца [267].

Курение, как правило, удваивает риск исходов ССЗ [136]. Пассивное курение связано с повышением риска ИБС приблизительно на 30% по сравнению с некурящими [385]. У лиц, подверженных воздействию табачного дыма, по сравнению с некурящими, повышена толщина интимо-медиального слоя сонных артерий – показателя субклинического атеросклероза [219].

В последние десятилетия наличие избыточной массы тела и ожирения все теснее связывают с повышенным риском ССЗ. Частота ожирения с 1960 по 2000 гг. повысилась с 10% до 27% у мужчин, и с 16% до 34% у женщин [300]. Распространенность избыточной массы тела возросла соответствующим образом, и сейчас считается, что более 50% взрослых лиц в индустриально развитых странах имеют избыточную массу тела или ожирение [167]. Ожирение вносит вклад в развитие ряда факторов риска ССЗ, особенно гипертонии, сахарного диабета, низкого холестерина ЛВП, повышенных триглицеридов, а также повышенных уровней маркеров воспаления. Увеличение массы тела у взрослых лиц в течение жизни связано с возрастанием суммарного риска ССЗ, и это явление отмечалось даже при умеренном нарастании массы тела, например, во Фрамингемском исследовании [432]. Анализ многолетних данных этого исследования показал, что ожирение ассоциировано приблизительно с 23% случаев ИБС у мужчин и 15% у женщин [430].

Повышенная распространенность сахарного диабета 2 типа следует по пятам за эпидемией ожирения. Распространенность сахарного диабета 2 типа повышается с возрастом независимо от пола, и в 50-летнем возрасте диабет наблюдается примерно у 4% населения [204]. Сахарный диабет является мощным

самостоятельным фактором риска атеросклероза. Поражение крупных артерий при сахарном диабете обуславливает неблагоприятный прогноз течения заболевания. Ускоренное развитие коронарного и периферического атеросклероза считается одним из наиболее частых и тяжелых поздних осложнений сахарного диабета. Результаты обширных эпидемиологических исследований свидетельствуют, что при сахарном диабете атеросклероз развивается в более раннем возрасте и прогрессирует быстрее, чем в общей популяции. Также отмечается повышенная частота сосудистых поражений и их клинических проявлений, включая ИБС [375]. При диабете смертность от ИБС в 2-4 раза выше, чем в общей популяции. Хотя у больных диабетом отмечается высокая частота других факторов риска, таких, как гиперлипидемия, артериальная гипертензия и ожирение, сахарный диабет сам по себе сочетается с высокой частотой сердечно-сосудистых заболеваний [131]. Множественный регрессионный анализ выявляет независимость диабета от остальных факторов риска.

Многие факторы риска ССЗ имеют большую распространенность по сравнению с ожидаемыми величинами. Считается, что инсулинорезистентность отвечает за кластеризацию различных факторов, особенно повышенного артериального давления, повышенного уровня глюкозы натощак, повышенного уровня триглицеридов, сниженного холестерина ЛВП, повышенного отложения абдоминального жира. Наличие трех и более вышеперечисленных признаков получило наименование метаболического синдрома, причем некоторые из этих критериев специфичны для определенного пола [309]. Метаболический синдром имеется примерно у 24% взрослых лиц в индустриально развитых странах, и его распространенность существенно зависит от возраста, изменяясь от 7% у лиц в возрасте 20-29 лет до 43% у лиц в возрасте 60-69 лет [172]. Было установлено, что наличие метаболического синдрома у взрослых лиц сочетается с повышенным риском сахарного диабета, ИБС и смерти от ССЗ [257].

Разнообразные факторы, связанные с гематологическими, эндотелиальными или воспалительными процессами, были изучены в связи с их ролью в развитии ССЗ. В ранних исследованиях изучали роль лейкоцитоза, впоследствии обратили внимание на уровень фибриногена. Мета-анализ показал, что уровень фибриногена, соответствующий верхней трети наблюдаемых значений, приводит к удвоению риска возникновения ИБС и повторного инфаркта [152]. В Европейском исследовании оценивали значимость уровней фибриногена,

фактора фон Виллебранда, антигена тканевого активатора плазминогена и С-реактивного белка у больных стенокардией. Как показал категорийный анализ с использованием распределения по квинтилям, любой из этих маркеров оказался тесно связанным с повышенным риском последующих проявлений ИБС [403]. Дальнейшие исследования показали, что маркеры воспаления, особенно С-реактивный белок, тесно связаны с повышенным риском клинических проявлений атеросклероза, в том числе, с первичным и повторным инфарктом миокарда, а также инсультом [337]. Измерение уровня маркеров воспаления, прежде всего, С-реактивного белка, в настоящее время считается оправданным дополнением к оценке мажорных факторов риска с целью определения абсолютного риска для последующей первичной профилактики ИБС.

Уровень гомоцистеина в крови также активно изучался в отношении связи с риском ССЗ. Исследования, проведенные в начале 1990-х годов, показали, что недостаточное потребление витаминов группы В (фолиевой кислоты, витаминов В₆ и В₁₂) связано с повышенным содержанием гомоцистеина в крови. У лиц с повышенным уровнем гомоцистеина наблюдался более высокий риск ССЗ [145].

Генетические отклонения и вариабельность генов вносят вклад в развитие атеросклероза. Хорошо известные заболевания, например, семейная гиперхолестеринемия, имеют вполне определенные причины возникновения. Взятые вместе, они, по всей вероятности, обуславливают около 5% причин инфаркта миокарда [191]. Разные аллели аполипопротеида Е связаны с риском развития сердечно-сосудистых заболеваний. Аллель аполипопротеида Е4 встречается приблизительно у 24% населения; при этом риск ИБС повышен в 1,5 раза. Это позволяет заключить, что такой вариант генома может обусловить приблизительно 10-15% случаев коронарной болезни сердца [434]. Вариабельность некоторых других генов, в том числе, ангиотензинпревращающего фермента [132], липопротеида (а) [287], белка-переносчика эфиров холестерина [442], печеночной липазы [158] и метилентетрагидрофолатредуктазы (МТГФР), ответственной за метаболизм фолиевой кислоты и гомоцистеина [247], позволяет считать их генами-кандидатами, изучаемыми в связи с их влиянием на метаболические факторы и риск ССЗ.

Среди клинических проявлений атеросклероза, отличных от ИБС, заслуживает внимания церебральный атеросклероз. Необходимо отметить

сходства и различия факторов риска атеросклероза, которые лежат в основе ИБС и нарушений мозгового кровообращения. Приблизительно 60% инсультов являются ишемическими. Возраст, предшествующие сосудистые заболевания, артериальное давление, курение и сахарный диабет являются наиболее важными предикторами церебрального атеросклероза, но липиды не имеют определяющего значения [359]. Геморрагические инсульты отчасти связаны с врожденной патологией сосудов, склонностью к кровотечениям, возрастом, черепно-мозговыми травмами и артериальным давлением. С другой стороны, мерцание предсердий, пороки митрального клапана, заболевания сердца и дуги аорты, по-видимому, повышают риск развития ишемического инсульта [108].

Поражение периферических артерий нижних конечностей приводит к частичной окклюзии крупных артерий, сосудистой недостаточности и уменьшению артериального кровотока. Заболевание может быть распознано по клинической картине перемежающейся хромоты, а особенно важными детерминантами его развития являются сахарный диабет, курение и артериальное давление [307]. Исследование «Peripheral Arterial Disease Awareness, Risk and Treatment: New Resources for Survival» (PARTNERS), проводившееся у 6900 пациентов в возрасте 50-59 лет, имевших в анамнезе курение или сахарный диабет, показало, что распространенность ИБС и периферического атеросклероза имеет следующий характер. Периферический атеросклероз имеется у 13% пациентов, сочетание периферического атеросклероза и ИБС – у 16%, только ИБС – у 24%, отсутствие этих заболеваний – у 47% [212].

Риск клинических проявлений атеросклероза может быть рассчитан с помощью уравнений мультифакторного прогноза, с использованием таблиц подсчета баллов, специальных калькуляторов или компьютерных программ. Наиболее часто переменными величинами для оценки риска клинических проявлений ССЗ являются возраст, систолическое артериальное давление, курение, холестерин, холестерин ЛВП и сахарный диабет. Этот подход был апробирован в США в нескольких обсервационных исследованиях [151, 429]. В Германии был разработан алгоритм оценки риска возникновения ИБС у мужчин, в котором использовался несколько другой набор переменных [99]. В Европейском исследовании, охватывающем несколько стран, также был разработан алгоритм для оценки риска смерти от ССЗ [146]. Для больных сахарным диабетом 2 типа в Великобритании было разработано уравнение риска

ИБС, в котором учитывается также уровень гликозилированного гемоглобина и длительность диабета [391]. Специальные уравнения оценки риска были разработаны для прогноза инсульта, перемежающейся хромоты и отдельных проявлений ИБС [95, 306, 435]. Оценка сердечно-сосудистого риска с помощью мультифакторных уравнений – динамический процесс, и новая информация постоянно учитывается, поскольку она может изменить применяемые подходы.

Следует отметить, что коррелятивная связь факторов риска ССЗ и клинических проявлений атеросклероза выявляется лишь в масштабах популяции, а сами сердечно-сосудистые заболевания, в основе которых лежит атеросклероз, имеют вероятностный характер. Распространенные суждения о патогенетической роли факторов риска в развитии атеросклероза следует считать поверхностными и упрощенными, поскольку факторы риска являются лишь внешними проявлениями сложных молекулярно-клеточных механизмов атерогенеза.

Говоря о распространенности атеросклероза как патологического процесса, поражающего крупные артерии эластического и мышечно-эластического типа, мы можем оперировать гораздо меньшим количеством данных. Прежде всего, это связано с методологическими сложностями диагностики атеросклероза, особенно его доклинических латентных форм. До недавнего времени диагностика атеросклероза, особенно невозвышающихся поражений (липидных точек и липидных полос), была исключительно патоморфологической, что в немалой степени затрудняло оценку истинной распространенности атеросклероза.

Атеросклероз развивается и прогрессирует в сосудистой системе с различной скоростью. Аорта является наиболее вероятным регионом для развития раннего атеросклероза. В аорте уже в подростковом и юношеском периоде часто встречаются жировые полосы, как было отмечено в ранних исследованиях, проведенных у жертв военных действий [297], а также в масштабном исследовании «The pathobiological determinants of atherosclerosis in youth» (PDAY) [294, 296]. Впрочем, предлагают и другую расшифровку аббревиатуры PDAY – «Premature Development of Atherosclerosis in Youth». Это исследование заслуживает того, чтобы рассмотреть его результаты подробнее. Исследование, организованное на базе 14 научных центров в США, было начато в 1985 году и продолжалось более 15 лет. Был исследован аутопсийный материал, полученный от 3000 молодых людей, погибших в возрасте от 15 до 34 лет. У этих лиц не было

признаков сердечно-сосудистых или других хронических заболеваний, и подавляющее большинство из них погибло в результате несчастного случая. Наиболее существенные результаты исследования PDAY [293] можно кратко изложить следующим образом. Абсолютно все исследованные случаи характеризовались наличием липидных полос в каком-либо сегменте артериальной системы. Атеросклеротические поражения средней степени выраженности (липидные бляшки) развивались из липидных полос в аорте и коронарных артериях с разной частотой, которая варьировала в зависимости от возраста; тем не менее, в возрастном интервале от 15 до 34 лет эта частота неуклонно возрастала. Возвышающиеся атеросклеротические поражения ранее всего развивались в аорте, а не в коронарных артериях, и такие липидсодержащие поражения обнаруживали уже у подростков и молодых людей в возрасте 15-20 лет. Наличие концентрических атеросклеротических отложений в коронарных артериях, содержащих большое количество клеточных воспалительных элементов, коррелировало с уровнем циркулирующих иммунных комплексов. Ожирение являлось несомненным фактором риска для развития сосудистых поражений. Возвышенные атеросклеротические поражения в брюшном отделе аорты значительно чаще выявлялись у курильщиков в возрасте от 25 до 34 лет. Курение и артериальная гипертензия оказывали наибольшее влияние на распространенность выраженных атеросклеротических поражений: частота выявления липофиброзных бляшек возрастала в 6 и 4 раза, соответственно. Липофиброзные бляшки с некротическим атероматозным ядром (выраженные атеросклеротические поражения) были выявлены у 10% лиц, и 80% из них были курильщиками. Безусловно, можно спорить о том, является ли наличие липидных полос в аорте молодых людей патогенетическим предвестником выраженных атеросклеротических поражений; тем не менее, у 10% лиц этой возрастной группы уже имеются подобные поражения, и абсолютно все они морфологически ассоциированы с ранними атеросклеротическими поражениями.

В других патоморфологических исследованиях также отмечают высокую распространенность атеросклероза у молодых лиц. Так, в исследовании «Bogalusa Heart Study» было проведено 204 аутопсии у лиц в возрасте от 2 до 39 лет, погибших в результате несчастного случая. Липидные полосы в коронарных артериях были обнаружены у 50% лиц в возрасте от 2 до 15 лет, и у 85% лиц в возрасте от 26 до 39 лет. Атеросклеротические липофиброзные бляшки в

коронарных артериях были выявлены у 8% лиц в возрасте от 2 до 15 лет, у 33% - в возрасте от 16 до 20 лет, у 52% - в возрасте от 21 до 25 лет, и у 67% - в возрасте от 26 до 39 лет [109].

В юношеском возрасте в аорте часто отмечается формирование бляшек и кальцификация, особенно в области дуги аорты и бифуркации на уровне устьев подвздошных артерий. Кальцификация становится распространенным явлением у 50-летних мужчин и женщин в равной степени. Степень кальцификации, оцененная радиографическими методами, определяет прогноз клинических проявлений сердечно-сосудистых заболеваний в большей степени, чем традиционные факторы риска [433].

Прижизненная диагностика атеросклероза опирается на инструментальные методы обследования. Коронароангиография была впервые проведена Sohen в 1957 году. Введение селективной коронароангиографии в клиническую практику состоялось почти 50 лет назад, и это явилось революционным прорывом в современную эру сердечно-сосудистой медицины. С другой стороны, этот диагностический метод сфокусировал внимание исследователей на просвете сосуда и увел в сторону от изучения патологии артериальной стенки.

Традиционный взгляд на атеросклероз, сформировавшийся под влиянием ангиографических исследований, определял сужение просвета сосуда из-за постепенного увеличения атеросклеротической бляшки как единственно возможное естественное течение атеросклероза, приводящее к стенозированию. Выраженный стеноз коронарных артерий приводил к клинической манифестации атеросклероза в форме стабильной стенокардии, а разрыв атеросклеротической бляшки и тромбоз – к картине острого инфаркта миокарда, нестабильной стенокардии и внезапной коронарной смерти.

Однако накапливающиеся клинические данные приходили во все большее противоречие с традиционным представлением о естественном течении атеросклероза. Большинство инфарктов миокарда (более 50% случаев) не были связаны с выраженным стенозом коронарных артерий, а возникали из-за разрывов бляшек, зачастую не выявляемых с помощью ангиографических методов исследования. Почти у 62% мужчин и 50% женщин инфаркт миокарда являлся начальной манифестацией ИБС, без предшествующей картины коронарного стеноза и стенокардии [271]. Более того, риск разрыва атеросклеротической бляшки и образования тромба значительно выше на стадии формирования

незрелой бляшки с тонкой фиброзной покрывкой, чем при зрелой бляшке с относительно небольшим некротическим атероматозным ядром и прочной фиброзной капсулой [308].

В качестве альтернативного взгляда на естественное течение атеросклероза Glagov et al. в 1987 году предложили гипотезу ремоделирования сосудов, основанную на гистологическом анализе поражений коронарных сосудов [185]. По этим представлениям, ранняя стадия атеросклероза характеризуется образованием бляшки в стенке сосуда, что сопровождается компенсаторным растяжением наружной эластической мембраны; при этом не происходит изменения просвета сосуда. Возвышающиеся стенозирующие атеросклеротические поражения, обнаруживаемые при ангиографии, появляются только после того, как атеросклеротическая бляшка начинает занимать более 40% площади над наружной эластической мембраной. Введение в исследовательскую и клиническую практику внутрисосудистого ультразвукового сканирования блестяще подтвердило и существенно расширило гипотезу ремоделирования [311, 312, 405]. Так, было проведено прижизненное исследование коронарных сосудов с помощью внутрисосудистого ультразвукового сканирования у 262 реципиентов после трансплантации сосудов от практически здоровых доноров. Средний возраст доноров составил 33 года, и у 97% из них ангиографические данные исключали наличие атеросклероза. Тем не менее, атероматозные изменения, определяемые как увеличение толщины интимальной оболочки более 0,5 мм, были идентифицированы с помощью ультразвукового исследования у значительной части доноров. В возрасте до 20 лет подобные поражения были обнаружены в 17% случаев, в возрасте от 20 до 29 лет – у 37%, в возрасте от 30 до 39 лет – у 60%, в возрасте от 40 до 49 лет – у 71%, и в возрасте старше 50 – у 85% доноров [411].

В настоящее время сформировался вполне корректный клинический взгляд на течение атеросклероза в целом и коронарной болезни в частности: атеросклероз – не патология просвета сосуда, а поражение артериальной стенки; поэтому именно развитие, прогрессирование и стабилизация атеросклеротической бляшки в сосудистой стенке определяет клинические исходы атеросклеротического процесса.

Современные методы исследования позволяют выявлять субклинический атеросклероз в артериях меньшего диаметра. Сонные артерии оценивают с

помощью ультразвукового исследования в В-режиме, а последнее время – с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ). Выраженный стеноз сонных артерий у пожилых лиц коррелирует с курением, артериальным давлением и уровнем холестерина в крови на протяжении последних лет [431], а увеличенная толщина интимо-медиального слоя сонных артерий является предвестником последующих клинических проявлений сердечно-сосудистых заболеваний [314].

В течение последних лет сканирование сонных артерий на наличие кальцификации рассматривалось, как целесообразная стратегия для выявления лиц, имеющих высокий риск развития клинических проявлений сердечно-сосудистых заболеваний [331]. В настоящее время полученных данных еще недостаточно, но проводящиеся исследования (например, исследование «Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis») дадут критическую оценку эффективности использования новейших диагностических методов при массовых обследованиях населения [113].

Таким образом, можно сделать вывод, что истинная распространенность атеросклероза существенно превышает распространенность его клинических проявлений. На основании данных патоморфологических и инструментальных исследований установлено, что ранние атеросклеротические поражения возникают уже в юном возрасте и скрытно прогрессируют в течение десятилетий. Ранее существовавшие представления о том, что атеросклероз у мужчин начинается развиваться в возрасте после 40 лет, а у женщин – после наступления менопаузы, должны подвергнуться пересмотру. Соответственно, представления о сроках, методах и длительности профилактических антиатеросклеротических воздействий также должны подвергнуться ревизии. Следует говорить о том, что распространенность атеросклероза в возрастной категории старше 50 лет неуклонно приближается к 100%, а клиническая манифестация атеросклероза в той или иной форме носит вероятностный характер и обусловлена дополнительным воздействием ряда факторов, не связанных с патогенезом атеросклероза, например, артериальным давлением, состоянием свертывающей и противосвертывающей систем крови и др.

Так что же такое атеросклероз? В рамках липидной теории атеросклероза, сформулированной Н.Н. Аничковым в начале XX века, атеросклероз определяется как «заболевание артерий, выражающееся в инфильтрации их стенки

холестерином, с последующим развитием соединительнотканых утолщений (бляшек)» [7]. Более поздние определения в своей основе опираются на формулировку Н.Н. Аничкова или, во всяком случае, не противоречат ей. Примерами подобных определений могут служить следующие: «атеросклероз – изменение артериальных сосудов, выражающееся в уплотнении, утолщении стенок сосудов и образовании в них липидсодержащих атеросклеротических бляшек, которые суживают просвет»; «общий патологический процесс, связанный с нарушением обмена, основным морфологическим проявлением которого является отложение липидов в интима артерий крупного и среднего калибра с последующим разрастанием соединительной ткани»; «распространенное хроническое заболевание, характеризующееся возникновением в стенках артерий очагов липидной инфильтрации и разрастанием соединительной ткани с образованием фиброзных бляшек, суживающих просвет и нарушающих физиологические функции пораженных артерий, что приводит к органам и общим расстройствам кровообращения» [8, 15]. 40 лет назад в своей знаменитой книге «Гипертоническая болезнь и атеросклероз» А.Л. Мясников дал уточненное определение атеросклероза: «патологический процесс, основой которого является липоидоз (отложение липидов, главным образом холестерина, в интима артерий эластического типа) с последующим образованием соединительнотканых очаговых уплотнений – бляшек» [10].

Существуют и неудачные определения, не отражающие сущность атеросклероза как патологического процесса, поражающего артериальную стенку, например: «атеросклероз – заболевание кровеносных сосудов, ведущее к постепенному сужению их просвета», «хроническое заболевание артерий, сопровождающееся уплотнением сосудистой стенки», и т.д. Относительно неудачной формулировкой понятия является определение, используемое в США: «атеросклероз – чрезмерная фиброзно-жировая пролиферативная воспалительная реакция артериальной стенки на повреждение, в развитии которой участвуют различные клеточные элементы – гладкомышечные клетки, макрофаги, лимфоциты и тромбоциты» [357]. Мы в своей оценке атеросклероза как хронического дегенеративного патологического процесса, развивающегося в интимальном слое артерий эластического и мышечно-эластического типа, придерживаемся классической формулировки Аничкова-Мясникова, поскольку она наиболее точно отражает основные патогенетические механизмы

атеросклероза. Она позволяет модифицировать содержание термина, используя современные фундаментальные знания в области клеточной и молекулярной биологии, патоморфологии и биохимии. Кроме того, эта формулировка является принципиальной для разработки патогенетических методов профилактики и лечения атеросклероза.

Для рассмотрения последнего аспекта необходимо обратиться к современным представлениям о морфологии артериальной стенки, патоморфологии атеросклероза и клеточно-молекулярных механизмов формирования атеросклеротических поражений.

1.2. Интимальный слой артерий – морфологический субстрат для развития атеросклероза.

В строении артериальной стенки у человека принято выделять три слоя (оболочки), существенно различающихся между собой по морфологии, клеточному и биохимическому составу: (I) ближайшая к просвету сосуда внутренняя, или интимальная оболочка (интима, tunica intima); (II) средняя, или медиальная оболочка (медия, tunica media) и (III) наружная, или адвентициальная оболочка (адвентиция, tunica adventitia). Оболочки структурно разделены эластическими мембранами: внутренней, отделяющей интиму от меди, и наружной, отделяющей медию от адвентиции. При рассмотрении молекулярно-клеточных механизмов атерогенеза наибольший интерес представляет интимальная оболочка артерий эластического и мышечно-эластического типа, поскольку атеросклеротические поражения сосудов возникают и развиваются исключительно в этой пространственно ограниченной области артериальной стенки [7, 181]. Именно ограниченность морфологического субстрата атеросклеротического процесса заставляет более подробно рассмотреть морфологические, клеточные и биохимические особенности интимы артерий человека, что позволит выявить возможную связь структуры, функции и патологии.

Интимальная оболочка артерий взрослого человека состоит из двух слоев, имеющих четкие морфологические границы [7, 234]. Внутренний (прилегающий к просвету сосуда) слой интимы отделен от просвета сосуда однослойной эндотелиальной выстилкой, лежащей на базальной эндотелиальной мембране. Этот внутренний слой имеет различные названия, что определяется его

биохимическими или морфологическими особенностями: эластико-гиперпластический [304], соединительнотканый [205], протеогликановый [381], прилуминальный [415]. Наружный, прилегающий к медию слой интимы, называемый также слоем Йореса, отделен от внутреннего слоя внутренней пограничной пластинкой, а от медию – внутренней эластической мембраной [304]. Этот слой, в соответствии со своими клеточно-биохимическими особенностями, носит название мышечно-эластического. Слои интимы наиболее хорошо идентифицируются в артериях эластического и мышечно-эластического типа. В артериях мышечного типа, напротив, интимальная оболочка представляется морфологически однородной, поскольку представлена мышечно-эластическим слоем.

Слои интимы существенно отличаются друг от друга. В наружном (протеогликановом) слое клеточные элементы представляют собой гетерогенную популяцию [418], а волокна соединительно-тканного матрикса не имеют четкой ориентации относительно оси сосуда [380]. Мышечно-эластический слой представляется более упорядоченным, поскольку содержит хорошо выраженные эластические волокна и гладкомышечные клетки вытянутой формы, ориентированные вдоль длинной оси сосуда. Мышечно-эластический слой в нормальной (не пораженной атеросклерозом) интима артерий, по сравнению с протеогликановым, содержит гораздо большее количество эластиновых волокон. Напротив, в протеогликановом слое выявляется больше волокон коллагена и ретикулина. Слои также отличаются друг от друга по составу гликозаминогликанов [415].

При возникновении и прогрессировании атеросклеротических поражений толщина интимального слоя существенно возрастает, и в атеросклеротических бляшках достигает наибольшей величины [304]. Наиболее существенные изменения происходят в протеогликановом слое интимы. В жировой полосе толщина мышечно-эластического слоя не увеличивается по сравнению с непораженными участками интимы, и даже в области атеросклеротической бляшки возрастает всего на 10-11% по сравнению с нормой. Напротив, протеогликановый слой утолщается в области жировой полосы почти в 2 раза, а в области атеросклеротической бляшки – в среднем в 4 раза по сравнению с непораженной интимой. Собственно, он и составляет ту часть возвышающегося атеросклеротического поражения, которое выпячивается в просвет сосуда,

уменьшая его проходимость. В отдельных случаях толщина протеогликанового слоя в атеросклеротической бляшке может в 10-20 раз превосходить его толщину в норме [44].

В непораженном сосуде слои интимы не различаются по содержанию коллагена. В атеросклеротических поражениях содержание коллагена преимущественно увеличивается в протеогликановом слое интимы [44].

Слои интимы различаются также по локализации и содержанию в них липидов. Во внешне непораженных участках интимы липиды представляют собой внеклеточные капли и гранулы, которые в небольшом количестве расположены вдоль эластических мембран. В зонах жировых полос обнаруживаются внутри- и внеклеточные липиды, которые локализуются в основном в прилежащей к просвету части протеогликанового слоя интимы. По направлению к мышечно-эластическому слою и далее количество липидсодержащих структур убывает. В липофиброзных бляшках основная часть липидов сосредоточена в протеогликановом слое в ядре и в плечах бляшки. Таким образом, в атеросклеротических поражениях содержание липидов увеличивается преимущественно в протеогликановом слое интимы [44].

Современные представления о морфологическом субстрате атеросклеротического процесса [12] можно вкратце изложить следующим образом. Атеросклеротическим изменениям в значительно большей степени подвержен протеогликановый слой интимы артерий человека, ближайший к просвету сосуда. Наружный, мышечно-эластический слой интимы, в значительно меньшей степени участвует в формировании атеросклеротических поражений. Именно за счет разрастания протеогликанового слоя происходит утолщение всей интимы. В этом же слое происходит преимущественное накопление коллагена и липидов, что определяет степень выраженности фиброза и липоидоза. Логично предположить, что структурные и биохимические различия между слоями обусловлены в основном различием их клеточного состава.

Далее следует рассмотреть роль субэндотелиальных клеток интимы артерий в атерогенезе. При возникновении и прогрессировании атеросклеротических поражений значительно изменяется количество клеток в интимальной оболочке артерий, причем снова выявляются существенные различия между протеогликановым и мышечно-эластическим слоями. В

протеогликановом слое число клеток в жировой полосе возрастает в 1,5 раза, а в бляшке – в 2 раза по сравнению с нормой. Напротив, в мышечно-эластическом слое атеросклеротических поражений, по сравнению с неизмененными участками, число клеток существенно не изменяется [39, 41, 46]. Таким образом, атеросклеротические изменения сопровождаются увеличением клеточности протеогликанового слоя.

В классических работах по изучению клеточного состава интимы артерий человека было установлено, что популяция клеток сосудистой стенки гетерогенна и представлена двумя большими субпопуляциями: отростчатыми интимоцитами (оседлыми клетками) и округлыми клетками, по морфологии сходными с лейкоцитами периферической крови (пришлыми гематогенными клетками) [7, 40]. Отмечалось, что субэндотелиальные оседлые клетки по морфологии отличаются от типичных гладкомышечных клеток медиальной оболочки. Их называли фибробластами интимы [259], клетками мезенхимального резерва организма [40], перицитами или сосудистым камбием [28]. Однако развитие методов электронной микроскопии позволило идентифицировать интимоциты крупных артерий как модифицированные гладкомышечные клетки, и такое представление стало доминирующим [133].

Использование иммуноцитохимических методов типирования с помощью антител, специфичных к различным типам мезенхимальных клеток, в дальнейшем позволило расширить представления о клеточном составе интимы крупных артерий в норме и при атеросклеротических поражениях. Помимо гладкомышечных клеток, экспрессирующих мышечный альфа-актин [243], в интиме были идентифицированы также клетки гематогенного происхождения: макрофаги [98, 305], лимфоциты [164, 201], тучные клетки [237], дендритические клетки [117].

В работе Е.Р. Андреевой и др. было определено общее число клеток в участках непораженной интимы и в областях атеросклеротических поражений на вертикальных срезах аорты [1]. В ряду «непораженная интима → начальное поражение → жировая полоса → фиброатерома → фиброзная бляшка» имеет место колоколообразное увеличение клеточности интимы с максимумом, приходящимся на выраженные жировые поражения. С помощью иммуноцитохимических методов было установлено, что клеточный состав интимы артерий человека изменяется в зависимости от степени выраженности

атеросклеротического поражения [12]. Как в нормальной, так и в пораженной атеросклерозом интима доля гладкомышечных клеток, положительно окрашиваемых антителами против мышечного α -актина, составляет почти 50% от общей клеточной популяции. Соответственно, остальные клетки (около 50% общей популяции) не были идентифицированы как гладкомышечные с помощью этого маркера [1]. Клетки гематогенного происхождения (лимфоциты и макрофаги) локализуются только в субэндотелиальной части интимы в протеогликановом слое. Их доля в норме составляет не более 5%, а по мере возникновения и прогрессирования атеросклеротических поражений в ряду «норма → начальные поражения → жировая полоса → липофиброзная бляшка» прогрессивно увеличивается почти до 20%. Соответственно, доля оседлых клеток снижается с 95-97% до 80-85% [12].

Для идентификации субэндотелиальных клеток были использованы антитела против перицитов. Доля клеток, экспрессирующих антиген перицитов 3G5, снижалась в участках жировых поражений по сравнению с непораженной интимой с 31% до 5% в фиброатероме. Основная часть этих клеток была обнаружена в субэндотелиальном пространстве протеогликанового слоя интимы. В мышечно-эластическом слое такие клетки встречались крайне редко [1, 2]. Клетки, имеющие другой перицитарный антиген – 2A7, характерный для перицитов из областей активного ангиогенеза, выявлялись только в участках выраженных атеросклеротических поражений и отсутствовали в непораженной интима. Максимального значения доля 2A7-положительных клеток достигала в липофиброзных бляшках, в основном в фиброзных участках покрышки.

Как в непораженной интима, так и в областях атеросклеротических поражений, присутствуют клетки гематогенного происхождения [1, 32]. С помощью антител CD45 часть клеток была охарактеризована как Т и В лимфоциты. Чем более выражено жировое поражение, тем выше доля клеток, экспрессирующих CD45 антиген. По сравнению с непораженной интимой в атеросклеротических поражениях доля клеток моноцитарного происхождения, имеющих CD14 антиген, увеличивается незначительно и остается низкой даже в липофиброзной бляшке. Большая часть CD68-положительных клеток (макрофагов) по морфологии представляет собой те же клетки, что имеют и CD14 антиген. Однако, среди клеток, содержащих CD68 антиген, удалось обнаружить отростчатые клетки, отличающиеся по морфологии от типичных макрофагов. При

двойном окрашивании с использованием антител против α -актина и CD68 в отростках этих клеток были выявлены актиновые филаменты. В интима атеросклеротически измененных участков доля CD68-положительных клеток увеличивалась по сравнению с непораженными областями. В областях жировых поражений увеличивалось количество клеток, одновременно экспрессирующих два антигена – CD68 и α -актин [1, 2]. Это означает, что субэндотелиальные интимоциты способны экспрессировать антиген CD68, характерный для макрофагов и обычно свойственный клеткам гематогенного происхождения. В первичной культуре клеток интимы количество клеток, экспрессирующих одновременно альфа-актин и CD68-антиген, увеличивается при индукции внутриклеточного накопления липидов с помощью модифицированных ЛНП [31]. По-видимому, наличие антигена CD68 является не признаком моноцитарного происхождения клеток, а маркером их фагоцитарной активности, возрастающей при формировании атеросклеротических поражений.

В качестве специфического маркера тканевых макрофагов были использованы антитела MAC3, которые не давали перекреста с гладкомышечными клетками. Доля MAC3-положительных клеток возрастала в интима атеросклеротических участков по сравнению с непораженной интимой с максимумом, приходящимся на липофиброзные поражения [1].

Данные литературы о количестве гематогенных клеток в интима атеросклеротически измененных участков артерий в целом достаточно противоречивы. Результаты исследований на экспериментальных животных моделях атеросклероза говорят о преобладающем количестве макрофагов в интима пораженных участков [377, 408]. Макрофагам придают особое значение в атерогенезе как клеткам, способным накапливать липиды и превращаться в пенистые клетки [381]. Обнаружение значительного количества CD68-положительных клеток в атеросклеротических участках артерий человека породило представление, что именно макрофаги представляют основной тип клеток, определяющих формирование и прогрессирование атеросклеротических поражений [194]. В работе Kaartinen et al. [237], связанной с изучением интимы брюшной аорты человека, получены данные о содержании макрофагов в участках жировых полос и в липофиброзных бляшках (23% и 42% соответственно). На основании подобных результатов делается вывод о том, что основная роль в развитии атеросклеротических изменений принадлежит клеткам гематогенного

происхождения. Действительно, происходит увеличение относительное содержание макрофагов в поражениях. Однако эти изменения не носят такого ярко выраженного характера, как считалось ранее. Таким образом, не оспаривая значения макрофагов в формировании атеросклеротических поражений, надо отметить, что в интима аорты человека они не являются преобладающим типом клеток.

Часть оседлых субэндотелиальных клеток не имеет маркера гладкомышечных клеток (альфа-актина). Возможно, это является результатом фенотипических изменений, происходящих с клетками интимы в процессе физиологической адаптации и патологических изменений артериальной стенки. В классических трудах по морфологии сосудистой стенки было высказано предположение, что оседлые клетки интимы представляют собой популяцию, отличающуюся по происхождению и функции от типичных гладкомышечных клеток медиа [7, 40]. Это предположение подтверждается недавним исследованием, в котором были описаны звездчатые клетки в интима аорты человека, экспрессирующие антигены дендритических клеток [117].

Таким образом, результаты иммуноцитохимических исследований свидетельствуют, что протеогликановый слой интимы населен как оседлыми клетками, так и клетками гематогенного происхождения. В атеросклеротическом поражении доля оседлых клеток, экспрессирующих мышечный альфа-актин, практически не изменяется по сравнению с непораженной интимой, а доля гематогенных клеток возрастает, но не становится преобладающей. Оседлые клетки интимы, кроме антигена гладкомышечных клеток, могут экспрессировать несвойственный им антиген макрофагов CD68. Напротив, клетки мышечно-эластического слоя интимы крупных артерий – это практически гомогенная клеточная популяция, представленная гладкомышечными клетками.

Достаточно давно было высказано предположение о том, что клетки интимы объединены в сеть [356]. В дальнейшем с помощью сканирующей электронной микроскопии было показано, что в протеогликановом слое непораженной интимы аорты все клетки контактируют друг с другом в горизонтальной плоскости, образуя сеть [62]. Клеточные сети, расположенные на разных уровнях, также связаны между собой, формируя трехмерную клеточную сеть. Так или иначе, все клеточные отростки контактируют с отростком или телом другой клетки. Между отростками клеток наблюдаются свободные пространства,

заполненные соединительнотканым матриксом. Таким образом, протеогликановый слой интимы можно рассматривать не как совокупность изолированных клеток, а как единую клеточную систему [12, 62]. В то же время, клетки мышечно-эластического слоя интимы не образуют сети, характерной для клеток протеогликанового слоя.

Клеточная система интимы претерпевает существенные изменения при атеросклерозе. В жировых полосах клетки обычно содержат большое количество липидов [1, 29, 57]. С этим может быть связано увеличение размеров клеток и образование на их поверхности выпуклостей из-за подлежащих липидных капель и везикул. Липидные везикулы обнаруживаются также и вне клеток, что может быть результатом их «отпочковывания» от клеточных отростков. Не исключено, что этот процесс приводит к разрушению межклеточных контактов и разобщению клеток [12].

В атеросклеротических бляшках изменения в клеточной системе проявляются в еще большей степени. В поверхностных слоях соединительнотканной покрышки атеросклеротической бляшки клетки располагаются поодиночке или небольшими группами и могут содержать липидные включения. В более глубоких слоях интимы число отростчатых клеток увеличивается, но единой сети они не формируют. В участках интимы, расположенных рядом с плечами атеросклеротических бляшек, но не имеющих внешних признаков атеросклеротического поражения, обнаруживается трехмерная клеточная сеть, характерная для непораженных участков. Клетки, составляющие эту сеть, не образуют контактов с фрагментами клеточной сети, которые можно видеть в самой атеросклеротической бляшке [12, 62].

Таким образом, в протеогликановом слое интимы при атеросклеротических поражениях происходит разобщение клеточной сети, которое в атеросклеротических бляшках завершается полной изоляцией клеток. Известно, что регуляция жизнедеятельности клеток, входящих в единую тканевую систему, осуществляется через специализированные межклеточные соединения – щелевые контакты [406]. Щелевые контакты играют существенную роль в регуляции тканевого гомеостаза, так как через них происходит непосредственный транспорт клеточных метаболитов, вторичных мессенджеров и других биологически активных молекул из клетки в клетку. Наличие специализированных клеточных контактов является чертой, характерной для дифференцированных клеточных

систем с высокой степенью межклеточной интеграции [153, 273]. Возможно, одной из причин, лежащих в основе нарушения целостности клеточной сети при атеросклерозе, могут быть нарушения в функционировании щелевых контактов. Степень межклеточной коммуникации можно оценить по экспрессии основных белков, формирующих щелевые контакты, например, коннексина-43. Этот белок локализуется на поверхности клеток в виде так называемых коннексиновых бляшек. Было установлено, что при возникновении и прогрессировании атеросклеротических поражений количество коннексиновых бляшек в пересчете на клетку снижается в несколько раз. В глубоких участках атеросклеротических поражений клеточная сеть сохраняет свою целостность, а в поверхностных участках подвергается деструкции [12].

Вкратце роль субэндотелиальных клеток артериальной интимы в атерогенезе можно изложить следующим образом. Принципиальным клеточным типом, представленным в протеогликановом слое интимы, являются модифицированные гладкомышечные клетки. Они отличаются от типичных гладкомышечных клеток медиальной оболочки и имеют несколько длинных отростков, что позволяет им формировать сеть. В них значительно меньше сократительных органелл, но хорошо развита шероховатая эндоплазматическая сеть. Они экспрессируют ряд антигенов, которых нет в типичных гладкомышечных клетках, и которые могут свидетельствовать о некоторых функциональных особенностях: антигены перицитов, антиген макрофагов, скэвенджер-рецептор [11, 12, 16, 30]. В непораженных участках интимы клетки протеогликанового слоя контактируют друг с другом с помощью отростков и образуют трехмерную сеть. В атеросклеротических поражениях степень межклеточной коммуникации снижается, и происходит физическое нарушение контактов между клетками, возможно, вследствие накопления внутриклеточных липидов.

Основные проявления атеросклероза (ключевые морфофункциональные и биохимические характеристики атеросклеротических поражений) связаны с изменениями на уровне клеток. Накопление липидов приводит к формированию пенистых клеток. Локальное увеличение клеточности – это результат пролиферации или миграции клеток. Накопление соединительнотканного матрикса – это результат синтетической активности клеток.

Накопление внутриклеточных липидов в артериальной стенке принято обозначать термином «липоидоз». Во внешне неизмененных участках интимы липиды накапливаются в основном внеклеточно. Характерной чертой даже самых начальных стадий атеросклеротического поражения является появление в них клеток с липидными включениями [7, 24, 356]. Была определена доля клеток с липидными включениями в непораженной интиме и в атеросклеротических поражениях [29]. Больше всего клеток с липидными включениями наблюдалось в жировых полосах (до 25%); они располагались в поверхностной части протеогликанового слоя. В атеросклеротических бляшках наибольшая часть клеток с липидными включениями обнаруживалась в глубине протеогликанового слоя, ближе к внутренней пограничной пластинке. В мышечно-эластическом слое доля липидсодержащих клеток была наивысшей в атеросклеротических бляшках, но даже там она не превышала 5%.

Пролиферация (увеличение клеточности) является еще одной значимой характеристикой атеросклероза на клеточном уровне. При подсчете числа интимальных клеток на срезах и определении количества клеток в суспензии после спиртово-щелочной диссоциации [41, 42] было выявлено в среднем двукратное локальное увеличение клеток в атеросклеротических поражениях, причем наибольшее число клеток выявлялось в липофиброзных поражениях. Основную часть клеток интимы (84-93%) составляют оседлые клетки, и именно изменение численности оседлых клеток определяет увеличение клеточности в атеросклеротических поражениях по сравнению с непораженной интимой. Наибольшее количество пролиферирующих клеток приходится на поражения с преобладанием липоидоза – жировые полосы и липофиброзные бляшки. Там пролиферирующих клеток примерно в 10-20 раз больше, чем в непораженной интиме. Пролиферативный индекс (отношение числа пролиферирующих клеток к общему числу клеток) у оседлых клеток во всех атеросклеротических поражениях значимо выше, чем в непораженной интиме. Наивысший пролиферативный индекс оседлых клеток выявлен в фиброзной бляшке, где он приблизительно в 8 раз выше, чем в непораженной интиме. Пролиферативный индекс гематогенных клеток превосходит пролиферативный индекс оседлых клеток, однако его значение в норме не отличается от значений в атеросклеротических поражениях и сходно с пролиферативным индексом лейкоцитов периферической крови [2, 3, 12]. Таким образом, клеточность атеросклеротических поражений изменяется за

счет пролиферации оседлых клеток и миграции гематогенных клеток из кровотока. В жировых поражениях (жировые полосы и липофиброзные бляшки) происходит «всплеск» пролиферативной активности оседлых клеток. В отличие от оседлых клеток, пролиферативная активность гематогенных клеточных элементов не стимулируется при атеросклерозе [43].

Еще одним неперенным проявлением атеросклероза на клеточном уровне является фиброз – синтез и накопление внеклеточного матрикса. Этот процесс, сопровождающийся образованием соединительно-тканной покрывки – самое важное из атеросклеротических проявлений с клинической точки зрения. Общее содержание коллагена возрастает только в протеогликановом, но не мышечно-эластическом слое интимы [44]. В непораженной интиме нет клеток, синтезирующих проколлаген I типа – основной интерстициальный коллаген, накапливаемый в атеросклеротических бляшках. В атеросклеротических поражениях в протеогликановом слое интимы аорты такие клетки составляют от 6% (начальные поражения) до 18% (жировые полосы) всей клеточной популяции. Эти результаты хорошо согласуются с данными иммуноцитохимического изучения локализации различных типов коллагена в атеросклеротических поражениях [44, 63, 292]. Формирование даже самых ранних атеросклеротических поражений сопровождается появлением клеток, способных синтезировать коллаген I типа. Формирование жировых полос сопровождается значительным увеличением доли коллаген-синтезирующих клеток. В ряду «начальное поражение → жировая полоса → липофиброзная бляшка → фиброзная бляшка» имеется «всплеск» синтетической активности клеток, приходящийся на жировые поражения – жировые полосы и липофиброзные бляшки [12]. Гиперсекреция внеклеточного матрикса может являться как одной из причин, так и следствием нарушения целостности клеточной системы интимы в атеросклеротических поражениях.

Непораженные участки артерий человека и участки с атеросклеротическими поражениями принято идентифицировать макроскопически, а затем микроскопически в соответствии с классификацией Совета по атеросклерозу Американского Общества по изучению сердца (тем, что является современной классификацией атеросклеротических поражений) [382, 383].

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

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

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

Липофиброзные бляшки (Va тип поражения) при макроскопическом изучении выглядят как сильно выступающие над люминальной поверхностью желтоватые или перламутровые, круглые или эллипсоидные образования. Микроскопически в этих поражениях обнаруживают все изменения, характерные для жировых полос: накопление внутриклеточных липидов, разрастание внеклеточного матрикса. Кроме этого в липофиброзных бляшках выявляют массивное некротическое ядро и расположенную над ним соединительно-тканную покрышку. В липофиброзных бляшках имеются участки, по морфологии похожие на участки жировых поражений – плечи липофиброзных бляшек.

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

VI, VII и VIII типы поражений представляют собой осложненные атеросклеротические бляшки со значимыми элементами физического разрыва, тромбоза, кровоизлияний, кальцификации. Такие бляшки имеют значение для определения клинического состояния пациента, а в плане естественного течения атеросклероза являются терминальной стадией атеросклеротического процесса, приводящей к фатальному клиническому исходу. Тем не менее, для разработки патогенетических подходов к профилактике и терапии атеросклероза эти типы поражений в настоящее время не представляют потенциальных возможностей [382].

Значение современной патоморфологической классификации атеросклеротических поражений заключается в том, что она адекватно отражает естественное течение атеросклеротического процесса и позволяет определить ключевые этапы формирования поражений на макроскопическом и микроскопическом уровне, и, следовательно, определить возможности терапевтических воздействий на этапе субклинического (бессимптомного) атеросклероза.

1.3. Липидная теория атеросклероза.

Липидная теория атеросклероза была сформулирована российскими учеными Н.Н. Аничковым и А.Н. Халатовым в начале XX века. Она оказалась одной из самых долгоживущих теорий в медицине – до сих пор она не только не опровергнута, но и не претерпела каких-либо радикальных изменений. Последующие исследования в области атеросклероза опирались на ключевые положения данной теории и дополняли ее за счет использования новых методологических подходов, позволивших сделать новые открытия. В рамках данной теории атеросклероз был определен как «заболевание артерий, выражающееся в инфильтрации их стенки холестерином, с последующим развитием соединительнотканых утолщений (бляшек)» (Аничков Н.Н., 1947) [7]. Липидная теория атеросклероза была впоследствии подтверждена патоморфологическими и биохимическими исследованиями, а также методами клеточной биологии. Изучение системы транспорта липидов в кровотоке привело к открытию липопротеидов, что подтвердило положение липидной теории о том, что эфиры холестерина, откладывающиеся в сосудистой стенке при

атеросклерозе, поступают из крови. Поэтому целесообразно рассмотреть возможную роль различных классов липопротеидов в атерогенезе.

Липопротеиды – это специализированная система липидно-гликопротеидных комплексов, осуществляющих транспорт липидов в плазме крови и интерстициальной жидкости. Пространственная организация липопротеидных частиц может быть описана как сферическое или дисковидное образование, в ядре которого находятся неполярные липиды, нерастворимые в воде (эферы холестерина), а поверхностные слои ядра образованы липидами, имеющими полярные химические группы (триглицериды, свободный холестерин и, наконец, фосфолипиды). Снаружи липидное ядро стабилизировано апобелком (как правило, гликопротеидом). Апобелок имеет гидрофобные участки, погруженные в липидное ядро, и гидрофильные участки, обращенные в водную фазу. Предположение о подобном строении липопротеидных частиц было подтверждено исследованиями с использованием рентгенструктурного анализа [107]. Именно при такой пространственной организации липидсодержащая частица способна может циркулировать в водной среде, то есть в плазме крови и интерстициальной жидкости.

Появление методов ультрацентрифугирования [269] и их дальнейшее совершенствование позволило подробно охарактеризовать физико-химические свойства различных классов липопротеидов. Так, с помощью ультрацентрифугирования в градиенте плотности были выделены следующие основные классы липопротеидов: хиломикроны (ХМ), существующие в крови непродолжительное время после приема жирной пищи; липопротеиды очень низкой плотности (ЛОНП) и промежуточной плотности (ЛПП); липопротеиды низкой плотности (ЛНП) (в этой фракции в небольшом количестве могут присутствовать более плотные липопротеиды(а)) и липопротеиды высокой плотности классов 2 (ЛВП-2) и 3 (ЛВП-3) [193]. Липопротеиды плазмы крови имеют различные физико-химические характеристики и, соответственно, отличаются по выполняемой ими функции [402].

Что очень существенно, липопротеиды отличаются друг от друга не только по физико-химическим свойствам, но и по апобелкам (аполипопротеидам), входящим в состав липопротеидных частиц. Для каждого класса липопротеидов существует свой уникальный набор апобелков. Именно апобелки определяют

судьбу липопротеидной частицы – появление и циркуляцию в кровотоке, деградацию и элиминирование [279].

Существующее разнообразие апобелков и липопротеидов обусловлено сложностью липидного обмена в организме человека, который должен обеспечить органы и ткани достаточным количеством различных жиров – фосфолипидов, триглицеридов и холестерина. Существует два источника поступления липидов в кровь, поэтому все жиры, которые циркулируют в составе липопротеидов, можно разделить на экзогенные липиды, поступающие с пищей, и эндогенные, синтезирующиеся главным образом в печени.

Метаболизм экзогенных липидов фактически полностью описывается хиломикроновым циклом [334]. Единственным классом липопротеидов, принимающим участие в метаболизме жиров, поступающих с пищей, являются хиломикроны – крупные короткоживущие частицы. В просвете кишечника происходит ферментативный гидролиз поступивших с пищей неполярных липидов (главным образом, триглицеридов и эфиров холестерина) с образованием свободных жирных кислот, моно- и диглицеридов и свободного холестерина. В таком состоянии продукты гидролиза всасываются эпителием тонкого кишечника. В клетках эпителия тонкого кишечника осуществляется ресинтез триглицеридов и в небольшом количестве – эфиров холестерина. Там же синтезируются апобелки классов В-48 и А. В результате экзогенные липиды из эпителиальных клеток кишечника поступают через лимфу в сосудистое русло в составе хиломикронов. В крови между ЛВП-3 и ХМ происходит обмен апобелками: ХМ приобретают апобелки С и Е, ЛВП-3 получают апо-А. Частица ХМ, несущая апо-В-48 и апо-Е, может быть захвачена клетками печени за счет взаимодействия с апоВ/Е-рецепторами гепатоцитов. Кроме того, эта частица также способна связаться с протеогликанами эндотелия сосудов за счет присутствия апо-С-I и апо-С-III. На поверхности эндотелия имеется фермент липопротеидлипаза (триглицеридлипаза), который осуществляет гидролиз триглицеридов. При связывании ХМ с протеогликанами эндотелия апо-С-II активирует триглицеридлипазу, а апо-С-III замедляет пристеночный катаболизм ХМ для более полного гидролиза триглицеридов, входящих в состав ХМ. Под действием липопротеидлипазы эндотелия происходит гидролиз триглицеридов до свободных жирных кислот и моно- и диглицеридов. Часть свободных жирных кислот

поступает как непосредственно в эндотелиальные клетки, так и в подлежащие ткани, где немедленно используется для получения энергии. Поскольку в ХМ уменьшается содержание триглицеридов, то эти частицы уменьшаются в размерах (превращаются в ремнанты ХМ) и меняется их конформация, в результате чего происходит диссоциация комплекса апо-С и липопротеидлипазы. В таком состоянии частицы, сохраняющие на своей поверхности апобелки В-48 и Е, способны эффективно взаимодействовать с апо-Е-рецепторами и В/Е-рецепторами гепатоцитов. Поэтому ремнанты ХМ захватываются печенью и в результате быстро исчезают из кровотока [334]. Липиды, поступающие в печень в составе ремнантов ХМ, используются для эндогенного синтеза холестерина и триглицеридов. Таким образом, физиологическая роль хиломикронного цикла заключается в доставке экзогенных липидов в печень, а также в немедленном удовлетворении потребностей органов и тканей в энергетическом субстрате. В хиломикронном цикле поступление экзогенного холестерина в сосудистую стенку не происходит, поскольку крупные частицы ХМ не способны проникать в сосудистую стенку [313]; весь экзогенный холестерин в свободной или этерифицированной форме попадает в гепатоциты, которые аккумулируют экзогенный холестерин.

Механизм постоянной доставки липидов к органам и тканям, не связанный с приемом пищи, характеризуется как цикл апо-В-содержащих липопротеидов (ЛОНП, ЛПП, ЛНП) [363]. Апобелок В-100 является неотъемлемым атрибутом этих частиц и необходим для нормальной секреции ЛОНП. Апо-В-100 синтезируется в шероховатой эндоплазматической сети гепатоцитов, ассоциируется с триглицеридно-фосфолипидными каплями в гладкой эндоплазматической сети, и в аппарате Гольджи подвергается гликозилированию. Частицы ЛОНП, секретируемые гепатоцитами в кровоток, замещают ХМ в качестве основного средства транспорта триглицеридов. Частицы ЛОНП содержат около 50% триглицеридов и до 25% холестерина, несут апобелки В-100 и Е, а также некоторое количество апобелков С. В кровотоке эти частицы взаимодействуют с ЛВП, и обогащаются дополнительными апобелками класса С, что значительно повышает их способность взаимодействовать с протеогликанам и липопротеидлипазой на поверхности эндотелия сосудов. При активации липопротеидлипазы происходит гидролиз триглицеридов, высвободившиеся жирные кислоты немедленно используется клетками или продолжают некоторое

время циркулировать в крови в свободном или связанном с альбуминами состоянии. Кроме того, липопропротеидлипаза способна осуществлять гидролиз фосфолипидов в ЛОНП. Поскольку в ЛОНП уменьшается содержание триглицеридов и фосфолипидов, а удельное содержание холестерина в них возрастает, то эти частицы уменьшаются в размерах (последовательно превращаются в ремнанты ЛОНП, или ЛПП), и меняется их конформация, в результате чего происходит диссоциация комплекса апо-С и липопропротеидлипазы. ЛПП обладают достаточно малыми размерами (25-30 нм) и, в отличие от ХМ и ЛОНП, способны проникать в субэндотелиальное пространство [313], то есть теоретически могут являться источником липидов, накапливающихся в артериальной стенке при атерогенезе [397]. Циркулирующие в кровотоке ЛПП обогащаются эфирами холестерина из ЛВП в обмен на триглицериды с участием белка-переносчика эфиров холестерина и на фосфолипиды с участием белка-переносчика фосфолипидов, при этом на ЛВП переходит часть апобелков С. В конечном счете, ЛПП связываются с В/Е-рецепторами гепатоцитов. Под действием печеночной липазы, способной гидролизовать триглицериды и обладающей выраженной фосфолипазной-А₂ активностью, в ЛПП существенно уменьшается количество триглицеридов и фосфолипидов, и частицы лишаются апобелков Е и С [439]. Часть ЛПП интернализируется гепатоцитами путем эндоцитоза и подвергается полной внутриклеточной деградации. Другая часть ЛПП превращается в ЛНП – относительно мелкие частицы (20-25 нм), содержащие большое количество эфиров холестерина (свыше 30%), свободного холестерина (около 13%), фосфолипидов (свыше 20%), некоторое количество триглицеридов (10%) и несущие на поверхности единственный апобелок – апо-В-100. В подавляющем большинстве случаев каждая частица ЛНП возникает в результате соответствующих превращений одной частицы ЛПП [318]. Тем не менее, описан путь прямого синтеза и секреции ЛНП гепатоцитами [157].

ЛНП – главный из классов липопротеидов плазмы, переносящих холестерин. Эта частица, обладающая достаточно малыми размерами, способна проходить через эндотелий сосудов путем трансцитоза, проникать через базальную мембрану эндотелия в субэндотелиальное пространство и достигать клеток периферических тканей путем диффузии [313]. Большинство клеток периферических тканей имеют рецептор к апо-В-100, сходный с В/Е-рецептором гепатоцитов по строению и свойствам, который обеспечивает связывание ЛНП с

клеточной мембраной [138, 187]. Содержание внутриклеточного холестерина регулирует скорость синтеза апо-В-рецепторов по принципу обратной связи. Избыточные количества свободного холестерина подвергаются реэтерификации ферментом АХАТ для последующего удаления из клетки с помощью ЛВП-опосредованных механизмов обратного транспорта холестерина. На этом его цикл апо-В-содержащих липопротеидов полностью заканчивается. Избыточные количества циркулирующих ЛНП, не попавших в периферические ткани, устраняются из кровотока печенью за счет В/Е-рецептор-опосредованных механизмов.

Избыток холестерина удаляется из клетки с помощью механизма обратного транспорта, сущность которого описывает цикл липопротеидов высокой плотности. Эти частицы синтезируются гепатоцитами, а также клетками эпителия тонкого кишечника и в незрелом состоянии секретируются в кровоток. В кровотоке под действием фермента ЛХАТ происходит этерификация большей части свободного холестерина, а также происходит взаимодействие этих частиц с ХМ, ЛОНП и ЛПП, в результате чего они обогащаются апобелками А в обмен на апо-Е и апо-С и приобретают функциональность. Такие частицы описывают как ЛВП-3. Они имеют апобелки апо-А-I и апо-А-II, обеспечивающие акцепторные свойства ЛВП. В силу своих малых размеров и высокого поверхностного отрицательного заряда эти частицы свободно проникают через эндотелиальную выстилку сосудов и достигают клеток периферических тканей, где взаимодействуют с рецептором к ЛВП, что сопровождается выходом свободного холестерина из клеток [316]. Механизм акцепции липидов из клеток изучен недостаточно, но известно, что ЛВП-3 насыщаются свободным холестерином и его эфирами, а также фосфолипидами, увеличиваются в размерах и превращаются в ЛВП-2, которые способны свободно проходить через эндотелиальную выстилку из периферических тканей в кровоток. В конечном итоге ЛВП-2 связываются с ЛВП-рецепторами гепатоцитов, происходит интернализация и внутриклеточная деградация этих частиц, чем и завершается цикл обратного транспорта липидов.

При рассмотрении вопроса о патологии метаболизма липопротеидов целесообразно представить краткое описание генетически обусловленных дефектов, поскольку в основе их клинических проявлений лежит выключение целого метаболического звена, и данные заболевания наиболее иллюстративны для понимания механизмов патологии липидного обмена.

Патологические нарушения хиломикронного цикла связаны, главным образом, с генетически обусловленными дефектами в структуре липопропротеинлипазы (описано более 20 мутаций гена липопропротеинлипазы) или апобелка С-II (описано также более 15 мутаций гена апо-С-II) [335]. Хиломикронемия, возникающая при этих нарушениях, клинически проявляется выраженной гипертриглицеридемией, эруптивными ксантомами, гепатоспленомегалией, панкреатитом, но не связана с более высоким риском развития атеросклероза [355].

Патологические нарушения в метаболизме богатых триглицеридами апо-В-содержащих липопропротеидов, в основном связаны с генетически обусловленными дефектами в структуре апо-Е или их комбинациями с другими дефектами метаболизма липопропротеидов. Апо-Е является ключевым сигнальным белком для связывания ремнантов ЛОНП с В/Е-рецепторами гепатоцитов. Изолированные дефекты апо-Е проявляются дисбеталипопротеидемией (гипертриглицеридемией с высоким содержанием ремнантов ЛОНП и ЛПП в крови в отсутствие других нарушений липидного обмена) [412]. Комбинированные дефекты приводят к развитию гиперлипопротеидемии III типа, которая проявляется высоким содержанием ремнантов ХМ и ЛОНП в плазме крови, гипертриглицеридемией, гиперхолестеринемией, туберо-эруптивным ксантоматозом и генерализованным атеросклерозом [396].

Патологические нарушения в метаболизме ЛНП проявляются наличием выраженной гиперхолестеринемии, которая характеризуется накоплением ЛНП в плазме крови, а клинически проявляется генерализованным ксантоматозом и ранним тяжелым атеросклерозом. Молекулярные дефекты, ответственные за развитие данного типа патологии, включают многочисленные дискретные мутации рецептора к ЛНП [214], а также мутации лиганда для рецептора к ЛНП, то есть, самого апо-В-100 [226]. Мутации гена, кодирующего рецептор ЛНП, клинически проявляются как семейная гиперхолестеринемия. Наследственно обусловленные дефекты апо-В-100 проявляются умеренной гиперхолестеринемией без каких-либо существенных признаков заболевания, кроме повышенного уровня ЛНП. По-видимому, существуют разнообразные мутации, затрагивающие рецептор-связывающий домен апо-В-100 и представляющие собой нераспознанные до сих пор причины некоторых форм моногенной гиперхолестеринемии [402]. Наконец, описана группа состояний,

относящихся к полигенным гиперхолестеринемиям. Поскольку уровень холестерина плазмы крови находится под контролем множества различных генов и факторов окружающей среды, то кластеризация нескольких генов, продукты которых способствуют весьма умеренному повышению содержания ЛНП в крови, приводит к развитию полигенной гиперхолестеринемии [399]. Данное заболевание не имеет классических клинических особенностей, за исключением ускоренного развития атеросклероза.

Довольно редкая причина первичной гиперхолестеринемии – наследуемый дефицит внутриклеточной гидролазы эфиров холестерина (холестеринэстеразы), вызывающий болезнь запасания эфиров холестерина. Клиническими проявлениями данного заболевания являются гепато- и спленомегалия, гиперхолестеринемия, отсутствие ксантоматоза и ускоренное развитие атеросклероза [402].

Наконец, существует ряд наследственно обусловленных патологий, затрагивающих механизмы обратного транспорта холестерина. Так, болезнь Танжера, аутомно-рецессивное заболевание, вызвано дефектом гена апо-А-I, и отчасти связано с генетически обусловленными дефектами ABC-транспортера (комплекса трансмембранных белков, способствующих переносу холестерина на цитоплазматическую мембрану для последующей акцепции). Оно характеризуется тонзилломегалией, спленомегалией, периферической нейропатией, ничтожными уровнями ЛВП и апо-А-I в крови и прочно ассоциируется с развитием раннего атеросклероза [290]. В метаболическом плане этот дефект проявляется чрезвычайно высоким клиренсом ЛВП и апо-А-I из плазмы крови, что приводит к накоплению эфиров холестерина в клетках ретикуло-эндотелиальной системы и других тканей [351]. Другие причины гипоальфапопротеинемии включают разнообразные генетические дефекты апо-А-I (256) или ЛХАТ [315]. Первые проявляются полным отсутствием или существенным снижением синтеза апо-А-I или синтезом дефектных молекул, катаболизм которых ускорен. Наблюдается низкое содержание ЛВП в плазме крови, неэффективный обратный транспорт холестерина и в большинстве случаев – ускоренное развитие атеросклероза. Генетически обусловленные дефекты ЛХАТ приводят к очень низкой скорости этерификации холестерина в плазме крови и, соответственно, к низкому содержанию функциональных ЛВП. Дефекты ЛХАТ не ассоциируются с повышенным риском атеросклероза.

Начальной стадией атерогенеза является клеточный липоидоз. Липоидоз заключается в накоплении внутриклеточных липидов, главным образом, эфиров холестерина, в клетках интимального слоя крупных артерий. С точки зрения нормального метаболизма липопротеидов, описанного в предыдущем разделе, клеточный липоидоз, в отсутствие генетически обусловленной патологии липидного обмена, невозможен, поскольку все процессы метаболизма липидов и липопротеидов в организме уравновешены и подвержены строгой регуляции с использованием механизма обратной связи. Генетически обусловленные дефекты липидного обмена имеют невысокую распространенность в популяции. Так, семейная гиперхолестеринемия, обусловленная мутациями гена, кодирующего рецептор к ЛНП, обнаруживается примерно у 0,2% населения земного шара [402]. При этом частота гомозиготных форм составляет около 1:1000000, а гетерозиготных форм около 1:500 (от 1:450 до 1:600 в различных популяциях). С учетом всех возможных генетических дефектов липидного обмена, частота полигенных дислипидемий не превышает 1:250 – 1:300. Таким образом, генетически обусловленные аномалии надо рассматривать как весьма иллюстративные, но пограничные описания механизмов атерогенеза на молекулярно-клеточном уровне. При этом реальные причины развития клеточного липоидоза и сопряженных с ним атеросклеротических процессов необходимо искать в широко распространенных дефектах липидного обмена. Клеточно-морфологическая характеристика атеросклеротических поражений и описание путей метаболизма липопротеидов указывают на то, что механизмы развития клеточного липоидоза следует рассматривать именно на этапе липидного метаболизма в субэндотелиальных клетках артерий эластического и мышечно-эластического типа. В норме эфиры холестерина поступают в клетки с липопротеидными частицами, способными проникать в интиму артерий через эндотелий сосудов и базальную мембрану и взаимодействовать со специфическими рецепторами на поверхности клеток. Этими частицами являются апо-В-содержащие ЛНП, и отчасти – ЛПП и ремнанты ЛОНП. В клетке происходит гидролиз эфиров холестерина на свободный холестерин и жирные кислоты. Свободный холестерин используется для построения клеточных мембран, в некоторых специализированных клетках – для синтеза стероидных гормонов и некоторых других целей. Жирные кислоты используются для

получения энергии. Избыток холестерина подвергается реэтерификации и удаляется из клетки с помощью ЛВП, осуществляющих обратный транспорт холестерина в печень. Активность внутриклеточных ферментов, осуществляющих гидролиз и ресинтез эфиров холестерина, строго сбалансирована по механизму обратной связи и регулируется соотношением холестерина и фосфолипидов в цитоплазматической мембране. Механизмы поддержания гомеостаза внутриклеточного холестерина были описаны выше, и они указывают на невозможность развития клеточного липоидоза при сохраненном балансе метаболизма липопротеидов на уровне клеток артериальной стенки.

Каковы могут быть механизмы клеточного липоидоза? Этот вопрос крайне важен, поскольку ответы на него позволяют определить принципиальные способы воздействия на клеточно-молекулярные механизмы атерогенеза и, следовательно, пути профилактики атеросклероза на его ранних стадиях.

Теоретически имеются четыре основных варианта дисбаланса липидного обмена на уровне клетки, которые, в отсутствие явных генетических аномалий, могут привести к накоплению избыточных количеств холестерина. Первый – это нарушение обратного транспорта холестерина. Данный механизм еще не вполне изучен, поскольку тонкие процессы акцепции холестерина до сих пор остаются неясными. Тем не менее, низкое содержание ЛВП в плазме крови прочно ассоциируется с повышенным риском развития атеросклероза, в особенности, его клинических проявлений [100, 173]. Соответственно, любое терапевтическое воздействие, результатом которого является нормализация уровня ЛВП в крови и/или повышение их акцептирующей способности, следует рассматривать как антиатеросклеротическое [48, 104, 265], несмотря на недостаток знаний о механизмах обратного транспорта холестерина.

Второй вариант – нарушение внутриклеточного метаболизма холестерина, что может быть связано с патологией внутриклеточных ферментов. Так, при нарушении баланса процессов гидролиза и реэтерификации холестерина нарушается его выведение и в клетке могут накапливаться эфиры холестерина [142]. Антиатеросклеротическим может считаться любое воздействие, повышающее активность внутриклеточной холестеринэстеразы или, возможно, ингибирующее активность АХАТ [142].

Третий механизм, проявляющийся нарушением захвата ЛНП клеткой, обусловлен врожденной или приобретенной патологией на уровне клеточных апо-

В-рецепторов. При недостаточной эффективности рецептор-опосредованного пути поступления холестерина в клетку активизируются обходные пути захвата ЛНП. Так, включается нерегулируемый путь захвата липопротеидов через скэвенджер-рецепторы, имеющие высокую степень сродства к отрицательно заряженным белкам [156, 413]. Вне зависимости от функционального состояния апо-В-рецепторов скэвенджер-рецепторы способны взаимодействовать с модифицированными ЛНП. Интернализованные через скэвенджер-рецептор липопротеиды подвергаются частичному протеолизу в лизосомах первого порядка, и полной деградации частицы не происходит. Это ведет к массивному накоплению эфиров холестерина, что в условиях клеточной культуры выражается в формировании пенистых клеток, характерных для атеросклеротических поражений [72, 426].

Четвертый и наиболее вероятный механизм развития клеточного липоидоза, способный объяснить глобальную распространенность атеросклероза, связан с существованием модифицированных ЛНП. Эта патология определяется существенным изменением физико-химических свойств самих липопротеидов низкой плотности. Данный молекулярно-клеточный аспект атерогенеза настолько важен, что заслуживает отдельного рассмотрения.

Итак, модифицированные атерогенные липопротеиды низкой плотности – что это за частицы? Из описания путей метаболизма липидов в организме человека [111, 355, 363, 397] следует, что основным источником поступления холестерина в клетки являются ЛНП. Определенную роль в транспорте холестерина в клетки периферических тканей могут играть и ремнанты ЛОНП (ЛПП), поскольку эти частицы содержат апо-В-100 и способны проникать в субэндотелиальный слой сосудов [246]. Однако содержание холестерина в ремнантах ЛОНП невелико, и эти липопротеиды являются основной транспортной формой триглицеридов. На основе этих знаний в конце 70-х годов XX века сложилось устойчивое представление о том, что источником липидов, накапливающихся в клетках сосудов, являются апо-В-содержащие липопротеиды (в первую очередь это относится к ЛНП и отчасти к ремнантам ЛОНП) [280]. Современные знания о метаболизме липопротеидов и положения липидной теории атеросклероза полностью соответствуют этому представлению [197, 397]. Были предприняты многочисленные попытки воспроизведения ранних стадий

атерогенеза на клеточном уровне *in vitro* с использованием разнообразных клеточных и животных моделей. Так, было установлено, что сыворотки крови животных с гиперхолестеринемией способны повышать содержание липидов в культивируемых клетках артериальных сосудов животных и макрофагах; при этом ЛНП и в меньшей степени ЛОНП, выделенные из таких сывороток крови, также вызвали накопление липидов в клетках [106, 143, 321, 384]. Также было установлено, что сыворотки крови больных ИБС вызывают накопление холестерина и его эфиров в культивируемых гладкомышечных клетках интимы аорты человека и макрофагах, то есть проявляют атерогенные свойства [34, 75]. Атерогенность сыворотки крови обусловлена, главным образом, липопротеидами низкой плотности, поскольку ЛНП, выделенные из атерогенных сывороток крови, также вызывают интенсивное накопление холестерина в культивируемых клетках [56, 65, 74]. В отдельных случаях ЛОНП, выделенные из крови больных коронарным атеросклерозом, также способны вызывать умеренное повышение содержания внутриклеточных эфиров холестерина [74]. Апо-В-содержащие липопротеиды, в том числе, ЛПП или ремнанты ЛОНП, выделенные из крови больных с определенными формами дислипидопроteinемий, способны увеличивать содержание этерифицированного холестерина в культивируемых перитонеальных макрофагах мышей и моноцитах-макрофагах крови человека [112, 404]. Атерогенные свойства сыворотки крови и ЛНП были выявлены и при заболеваниях, сочетающихся с высоким риском ускоренного развития атеросклероза, таких как сахарный диабет [18, 26, 64, 65, 276] и системная красная волчанка [35].

Обращает на себя внимание тот факт, что ни в одном из проведенных исследований ЛНП, выделенные из крови здоровых лиц, как правило, не вызвали накопления липидов в культивируемых клетках и не оказывали влияния на внутриклеточный метаболизм холестерина. Как отмечалось выше, отсутствие атерогенных эффектов нативных ЛНП здоровых лиц объясняется существованием рецептор-зависимой системы регуляции внутриклеточного липидного гомеостаза [126]. Таким образом, многочисленные попытки вызвать внутриклеточное накопление эфиров холестерина с помощью нативных ЛНП в модельных клеточных системах не увенчались успехом. Поэтому возникла и была разработана концепция о существовании ЛНП с измененными свойствами, или модифицированных липопротеидов низкой плотности, метаболизм которых на

клеточном уровне нарушен, и в силу этого они приобретают способность вызывать накопление липидов в клетках [125, 188, 198].

Долгое время считалось, что высокое содержание ЛНП в плазме крови напрямую обуславливает ускоренное развитие атеросклероза, поскольку в эпидемиологических исследованиях гиперхолестеринемия была идентифицирована как наиболее частый фактор риска атеросклеротических заболеваний [95, 140, 242]. В то же время, нормальный метаболизм липопротеидов не предполагает никаких патогенетических возможностей для возникновения и прогрессирования атеросклероза, даже при высоком содержании ЛНП в крови. Возникло предположение о существовании альтернативного механизма поступления холестерина в клетки сосудистой стенки, отличного от апо-В-рецептора. Гипотетический альтернативный путь получил название скэвенджер-рецептора (Scavenger cell receptor). Именно такой плохо регулируемый или нерегулируемый механизм, не зависящий от содержания внутриклеточного холестерина, мог обусловить массивное отложение эфиров холестерина в макрофагах и гладкомышечных клетках интимы аорты с образованием пенистых клеток, характерных для атеросклероза. Функционирование скэвенджер-рецептора было впервые описано в 1979 году. Изучалось взаимодействие ацетилированных *in vitro* ЛНП с мышинными линейными макрофагами. Скэвенджер-рецептор опосредовал эндоцитоз ацетилированных ЛНП, захват и интернализация которых приводила к массивному отложению эфиров холестерина в культивируемых клетках. Этот путь характеризовался достаточно высокой аффинностью и крайне низкой насыщаемостью. Нативные ЛНП не узнавались скэвенджер-рецептором и не конкурировали с ацетилированными ЛНП за места связывания [188]. Такая рецепторная активность была впоследствии обнаружена у моноцитов крови человека и макрофагов [148, 170], в том числе и у больных гомозиготной семейной гиперхолестеринемией [248], у гладкомышечных клеток интимы аорты человека [11, 72], у базофилов и тучных клеток человека [419], у эндотелиальных клеток быка [103], у альвеолярных макрофагов быка [303], у мезангиальных клеток крыс [228], у эндотелиальных клеток печени и Купферовских клеток человека [156], у овариальных клеток хомячков [175], у пенистых клеток, выделенных из эксплантов аорты кроликов с холестерин-индуцированным атеросклерозом [326], и т.п. Такая высокая распространенность скэвенджер-

рецептора в разных типах клеток у разных биологических объектов заставляет предполагать, что он играет важную физиологическую роль, до сих пор не изученную.

Многочисленные исследования, пик которых пришелся на 80-е годы XX века, были посвящены механизмам, преобразующим нативные ЛНП в лиганд, узнаваемый скэвенджер-рецептором. Было установлено, что любое нарушение структуры и физико-химических свойств ЛНП может приводить как к поступлению ЛНП в клетку через альтернативные пути, так и к последующему интенсивному накоплению эфиров холестерина в клетке [125]. В многочисленных исследованиях было доказано, что химически модифицированные в условиях *in vitro* ЛНП приобретают способность вызывать отложение липидов в клетках, т.е. становятся атерогенными.

Активность скэвенджер-рецептора, в отличие от ЛНП-рецептора, не регулируется содержанием внутриклеточного холестерина [170, 189]. Поэтому постоянный эндоцитоз модифицированных анионных ЛНП через скэвенджер-рецептор на макрофагах с последующим лизосомальным гидролизом приводит к образованию больших отложений внутриклеточного холестерина, часть которого может реэтерифицироваться в цитоплазме клетки, или секретироваться в культуральную среду [127]. При инкубации модифицированных *in vitro* ЛНП с клетками происходит массивная аккумуляция эфиров холестерина в макрофагах в виде липидных капель в цитоплазме. При отсутствии внеклеточных акцепторов холестерина этерифицированный холестерин включается в бессмысленный цикл гидролиза и АТФ-зависимой реэтерификации [128]. Насыщенные липидами клетки, наблюдаемые *in vitro*, в определенной степени похожи на пенистые клетки в атеросклеротических поражениях [127].

Анионные ЛНП, метаболизм которых опосредован через скэвенджер-рецептор, можно получить *in vitro* различными способами. Так, химическая модификация лизиновых остатков апо-В приводит к образованию модифицированных анионных ЛНП, неспособных взаимодействовать с апоВ-рецепторами [425]. В исследованиях *in vivo* на животных было показано, что синусоидальные клетки ретикулоэндотелиальной системы быстро выводят модифицированные ЛНП из кровотока [281]. Различные исследования показали, что химическая дериватизация *in vitro* лизиновых остатков апо-В [199], а также металло-зависимое или клеточно-зависимое окисление [208, 210] приводит к

образованию ЛНП, узнаваемых скэвенджер-рецептором макрофагов. Данные о том, что богатые эфирами холестерина частицы, выделенные из пораженной атеросклерозом аорты, частично узнаются скэвенджер-рецептором, также указывают на то, что модификация липопротеидов – событие, связанное с патогенезом атеросклероза [190].

Следует отметить, что разнообразный спектр химических модификаций ЛНП *in vitro* приводит к одному и тому же эффекту: ЛНП приобретают способность вызывать интенсивное накопление липидов в клетках. Помимо ацетилирования, модификация липопротеидов происходит также при ацетоацетилировании, карбамаилировании, сукцинировании и метилировании [387], малеилировании [188], гликозилировании [274], десиалировании [56, 174], а также при обработке ЛНП малоновым или глутаровым альдегидом [354]. Некоторые типы химически модифицированных ЛНП, например, метилированные, не конкурируют с ацетилированными ЛНП за скэвенджер-рецептор, что позволяет предполагать о существовании путей захвата модифицированных ЛНП, отличающихся как от апоВ-рецептора, так и от скэвенджер-рецептора [388].

Несмотря на обилие продемонстрированных способов химической проатерогенной модификации ЛНП, усиленный поиск в крови человека липопротеидов, сходных с *in vitro* модифицированными ЛНП, не дал результата. Таким образом, в начале-середине 80-х годов XX века сложилась парадоксальная ситуация. Было установлено следующее: во-первых, именно апо-В-содержащие липопротеиды (главным образом, ЛНП) являются источником липидов, накапливающихся в клетках сосудов. Во-вторых, нативные ЛНП не обладают способностью вызывать накопление внутриклеточного жира. В-третьих, химическая модификация нативных ЛНП *in vitro* приводит к появлению у них атерогенных свойств. В-четвертых, атерогенные ЛНП, подобные модифицированным *in vitro* липопротеидам, не обнаруживаются в кровотоке. И, наконец, в-пятых, ЛНП больных коронарным атеросклерозом все же способны вызывать накопление внутриклеточных липидов. Такая ситуация предполагала поиск *in vivo* модифицированных ЛНП, способных вызывать внутриклеточное накопление холестерина [20].

С учетом вышеизложенных замечаний было высказано предположение, что поиск неизвестного типа модифицированных ЛНП, способных вызвать накопление липидов в клетках сосудистой стенки, следует осуществлять в крови пациентов, сосуды которых уже подверглись атеросклеротическому поражению. Для подтверждения этого предположения были получены ЛНП из плазмы крови практически здоровых лиц и пациентов с ангиографически документированным атеросклерозом. Для оценки способности выделенных ЛНП вызывать внутриклеточное отложение липидов была использована первичная культура гладкомышечных клеток интимы аорты человека, т.е. тех клеток, которые являются морфологическим субстратом ранних атеросклеротических поражений [57]. Было обнаружено, что большинство препаратов ЛНП, выделенных из плазмы крови больных коронарным атеросклерозом, вызывали увеличение содержания свободного и этерифицированного холестерина и триглицеридов, то есть обладали атерогенностью. При сравнительном изучении химического состава препаратов ЛНП здоровых лиц и пациентов не было выявлено различий в содержании апобелка, фосфолипидов, триглицеридов, свободного и этерифицированного холестерина. С другой стороны, было показано, что общее содержание сиаловой кислоты (N-ацетилнейраминовой кислоты) в ЛНП больных коронарным атеросклерозом было в 2-3 раза меньше, чем в ЛНП здоровых лиц. ЛНП с низким уровнем сиаловой кислоты были первоначально названы десиалированными липопропротеидами [53, 56].

Сиаловая кислота является одним из углеводов, входящих в состав нативных ЛНП [393] и играет существенную роль в метаболизме и функции липопропротеидов [174]. Потеря сиаловой кислоты (десиалирование) является одним из видов химической модификации ЛНП, приводящей к появлению у них атерогенных свойств. Так, было установлено, что обработка нативных ЛНП нейраминидазой приводила к существенному снижению содержания в них сиаловой кислоты. При этом связывание и захват десиалированных ЛНП культивируемыми фибробластами и гладкомышечными клетками был значительно повышен по сравнению с нативными липопропротеидами [168]. Важным моментом является то, что десиалированные *in vitro* ЛНП приобретают способность вызывать интенсивное накопление липидов в культивируемых гладкомышечных клетках интимы аорты человека [56]. Сопоставление данных об атерогенности десиалированных ЛНП и низким содержанием сиаловой кислоты в

ЛНП больных атеросклерозом позволило предположить, что именно десалирование может быть тем типом атерогенной модификации ЛНП, происходящим *in vivo* в организме человека.

С помощью аффинной хроматографии из ЛНП здоровых лиц и больных коронарным атеросклерозом были выделены десалированные липопротеиды, при этом было установлено, что не все ЛНП являются десалированными, но лишь их некоторая часть [83]. С помощью аффинной лектин-хроматографии, а также твердофазного лектиноферментного анализа было показано, что доля десалированных ЛНП в крови больных атеросклерозом обычно варьирует в пределах 20-60%, а в крови здоровых лиц не превышает 15% [81]. Это открытие имело принципиальное значение для всего хода дальнейшего изучения роли модифицированных ЛНП в атерогенезе. Стало ясно, что изучение клеточно-молекулярных механизмов атеросклероза с использованием цельной фракции ЛНП является, с точки зрения патофизиологии, лишенным всякого смысла, поскольку ЛНП представляют собой крайне неоднородную популяцию липопротеидных частиц, имеющую весьма индивидуальную характеристику. Напротив, отдельное изучение физико-химических свойств и клеточного метаболизма нативных и модифицированных ЛНП оказалось полностью оправданным. Был сделан вывод, что только десалированная подфракция ЛНП человека является атерогенной. Эта фракция получила название «циркулирующие модифицированные ЛНП» (цмЛНП) [20, 21]. Салированные ЛНП не обладают атерогенными свойствами и могут рассматриваться как нативные немодифицированные ЛНП.

Было изучено влияние цмЛНП на пролиферативную активность, а также на синтез секретируемого белка, коллагена и гликозаминогликанов клетками, культивируемыми из непораженной атеросклерозом интимы аорты человека. Было установлено, что цмЛНП, в отличие от нативных ЛНП, способны вызывать все известные проявления атеросклероза на клеточном уровне [72].

Методом квазиэластического рассеивания лазерного излучения в суспензии липопротеидов, а также с помощью градиентного электрофореза ЛНП с последующей сканирующей денситометрией было установлено, что частицы цмЛНП имеют меньшие размеры, по сравнению с нативными липопротеидами [78]. При ультрацентрифугировании ЛНП в линейном градиенте плотности было показано, что распределение цмЛНП резко сдвинуто в сторону больших

плотностей, по сравнению с нативными липопротеидами. С помощью электрофореза в агарозе было установлено, что цмЛНП здоровых лиц и особенно больных атеросклерозом обладают большей электрофоретической подвижностью по сравнению с нативными ЛНП, что свидетельствует об увеличенном электроотрицательном заряде цмЛНП [66].

В настоящее время существуют широко распространенные представления о том, что окисление ЛНП *in vivo* приводит к появлению у липопротеидов атерогенных свойств и инициирует развитие атеросклероза [278, 320]. Традиционно о степени окисленности липопротеидов судят по уровню гидроперекисей или ТБК-реактивных продуктов – соединений, образующихся в ходе перекисного окисления липидов. Поскольку химическая нестабильность и гидрофильность этих соединений предполагает их удаление из липопротеидной частицы в ходе выделения и очистки ЛНП, был использован принципиально новый методологический подход, основанный на предположении, что образующиеся во время перекисного окисления химически активные производные липидов могут ковалентно связываться с апобелком и являться, таким образом, маркером протекания окислительных процессов в липопротеидной частице [67]. ЛНП здоровых лиц не содержали аддуктов липидов с апобелком. Содержание апо-В-связанного холестерина в нативных ЛНП больных коронарным атеросклерозом не отличалось значимо от его уровня в нативных липопротеидах здоровых лиц. Напротив, содержание апо-В-связанного холестерина в цмЛНП пациентов было в 7 раз выше, чем в нативных ЛНП. Таким образом, было установлено, что цмЛНП пациентов с коронарным атеросклерозом являются окисленными липопротеидами [67, 68].

Итак, подфракция атерогенных цмЛНП представляет собой мелкие, плотные, более отрицательно заряженные частицы, имеющие изменения в липидной, белковой и углеводной составляющих. Все это позволило определить их как множественно-модифицированные ЛНП [20].

Помимо множественно-модифицированных ЛНП, в качестве *in vivo* модифицированных липопротеидов описаны более электроотрицательные ЛНП [102] и мелкие плотные ЛНП [250]. Было установлено, что более электроотрицательные ЛНП, выделенные с помощью ионообменной хроматографией, являются также и десалированными липопротеидами [66]. Как указывалось выше, цмЛНП являются более электроотрицательными

липопротеидами. Эти и другие характеристики позволяют предполагать, что цмЛНП и более электроотрицательные ЛНП сходны, если не полностью идентичны. Известно, что частицы цмЛНП имеют меньшие размеры и большую плотность, т.е. являются мелкими плотными липопротеидами [229]. С другой стороны, было показано, что мелкие плотные ЛНП имеют сниженное содержание сиаловой кислоты, т.е. являются десиалированными ЛНП [255]. Эти данные свидетельствуют о сходстве двух типов модифицированных ЛНП [77]. В этой связи следует предположить, что все описанные к настоящему времени типы *in vivo* модифицированных ЛНП, выделяемые различными методами, представлены одними и теми же липопротеидными частицами, подвергшимися множественной модификации [20, 82].

Было установлено, что модификация ЛНП происходит в плазме крови [70]. Десиалирующая активность плазмы крови обусловлена существованием недавно открытого фермента транс-сиалидазы, физиологическая роль которого еще не установлена. Транс-сиалидаза обладает весьма высокой субстратной специфичностью в отношении апо-В-100. Нативные ЛНП, обработанные транс-сиалидазой, теряют часть сиаловой кислоты и приобретают способность вызывать накопление эфиров холестерина в культивируемых клетках интимы аорты человека, то есть становятся атерогенными [69-71].

Было установлено, что накопление липидов в клетках под действием модифицированных ЛНП обусловлено их увеличенным связыванием и захватом благодаря взаимодействию со скэвенджер-рецептором, асиалогликопротеид-рецептором, а также клеточными протеогликанами [23, 61]. Как в нормальных, так и в атеросклеротических клетках скорость деградации захваченных цмЛНП ниже, чем скорость деградации нативных липопротеидов. Усиленный захват и низкая скорость внутриклеточной деградации приводят к тому, что цмЛНП накапливаются в гладкомышечных клетках интимы аорты человека. Накопление липопротеидных частиц с недеградированным или частично деградированным апобелком ведет к появлению в клетке значительного пула липидов, в первую очередь, свободного и этерифицированного холестерина, которые могут служить основой формирования липидных включений.

Теоретические расчеты, основанные на экспериментально измеренных скоростях захвата и деградации цмЛНП, показывают, что для формирования пенистых клеток, то есть для накопления соответствующего избыточного

количества внутриклеточных липидов, требуется около 15 лет. Эти расчеты были произведены при условии, что весь захваченный холестерин остается внутри клеток. Данные ангиографических и ультразвуковых исследований свидетельствуют, что время образования атеросклеротической бляшки, обтурирующей 50% просвета магистральной артерии, может составлять от нескольких месяцев до нескольких лет. Следовательно, есть основания предполагать, что скорость образования пенистых клеток, формирующих атеросклеротические поражения, должна быть много больше, чем следует из теоретических расчетов. Поэтому возникло предположение о том, что могут существовать дополнительные механизмы усиления атерогенности цмЛНП. В настоящее время выявлено, по крайней мере, три таких механизма: формирование ЛНП-содержащих иммунных комплексов [37, 73], образование комплексов ЛНП с компонентами соединительно-тканного матрикса [54, 55, 232, 417] и, наконец, образование агрегатов ЛНП [22, 77].

Итак, современные представления о модифицированных атерогенных ЛНП можно вкратце изложить следующим образом. В крови людей существует подфракция ЛНП, способная вызывать накопление липидов и, в первую очередь, эфиров холестерина в субэндотелиальных клетках непораженной интимы аорты человека. Атерогенные ЛНП характеризуются многочисленными изменениями в углеводной, белковой и липидной составляющих и могут быть названы множественно-модифицированными ЛНП. Множественная модификация ЛНП происходит в плазме крови человека и, возможно, в интерстициальной жидкости. Циркулирующие множественно-модифицированные ЛНП теряют сродство к В/Е-рецептору, но приобретают способность взаимодействовать с рядом других мембранных рецепторов и компонентов. Усиленный захват клетками модифицированных ЛНП, низкая скорость деградации липопротеидных частиц и гидролиза эфиров холестерина, а также стимуляция этерификации свободного холестерина являются причинами внутриклеточного накопления эфиров холестерина, образующих липидные включения, характерные для атеросклеротических клеток. Этот процесс многократно усиливается при формировании множественно-модифицированными ЛНП крупных комплексов (агрегатов, иммунных комплексов, комплексов с компонентами матрикса и т.д.), захватываемых клетками путем фагоцитоза. Помимо накопления эфиров

холестерина, множественно-модифицированные ЛНП стимулируют клеточную пролиферацию и синтез компонентов соединительно-тканного матрикса, то есть вызывают все проявления атеросклероза на клеточном уровне. Результаты исследований роли модифицированных ЛНП в атерогенезе существенно обогатили липидную теорию атеросклероза, наполнив ее пониманием патологии на молекулярно-клеточном уровне.

1.4. Современные подходы к профилактике и лечению атеросклероза.

Первый (и до сих пор основной) подход к профилактике и лечению атеросклероза заключается в снижении воздействия факторов риска; он имеет свои достоинства и недостатки. Напомним, что в развитие атеросклероза вносят вклад различные нарушения липидного обмена, регуляции артериального давления, свертывающей системы крови, а также другие факторы риска. В настоящее время на основании результатов серьезных эпидемиологических исследований выявлена целая группа состояний и клинико-биохимических синдромов (факторов риска), способствующих развитию атеросклероза и его клинических проявлений. Воздействие на факторы риска с целью их устранения является традиционной стратегией при первичной профилактике сердечно-сосудистых заболеваний. В последнее время для оценки сердечно-сосудистого риска широко используются специальные алгоритмы, разработанные на основе многолетних проспективных эпидемиологических исследований и учитывающие комплексное воздействие различных факторов риска [99]. Имеющиеся рекомендации по профилактике атеросклероза касаются главным образом воздействия на отдельные факторы риска. В то же время, полиэтиологический характер заболевания позволяет предполагать, что одновременное комплексное воздействие на целый ряд факторов риска явится наиболее обоснованным и клинически эффективным способом первичной профилактики. Возможно, такой подход позволит существенно снизить суммарный (интегральный) риск сердечно-сосудистых заболеваний.

Вероятность возникновения сердечно-сосудистых заболеваний определяется множественным воздействием различных факторов риска. Как говорилось выше, факторы риска в целом можно разделить на фиксированные (немодифицируемые) - пол, возраст, семейный анамнез, наличие сахарного диабета, и модифицируемые - дислипидемия, артериальная гипертензия, курение,

абдоминальное ожирение и др. Кроме того, выявлена связь других факторов риска с развитием ИБС, таких, как повышенный уровень фибриногена, липопротеида (а) и гомоцистеина плазмы крови; при сахарном диабете или инсулинорезистентности приобретает значение наличие микроальбуминурии. Возможно, факторами риска являются также малоподвижный образ жизни, алкоголизм, гипергликемия, гиперинсулинемия, инсулинорезистентность, психоэмоциональные перегрузки, различные тромбогенные факторы и др. [192]. Роль ряда факторов риска окончательно не установлена; выявление и диагностика многих из них не получили широкого распространения. Основой первичной профилактики сердечно-сосудистых заболеваний по праву считается воздействие на независимые (мажорные) факторы риска. Так, во Фрамингемском исследовании было показано, что снижение сердечно-сосудистой смертности на 44%, происшедшее в период с 1950 до 1989 года, по крайней мере, на треть обусловлено снижением воздействия факторов риска [394]. Снижение сердечно-сосудистой смертности в США за период с 1980 по 1990 годы на 50% было обусловлено борьбой с факторами риска и только на 43% - совершенствованием медикаментозных воздействий [221]. В Нидерландах снижение смертности от ИБС в период с 1978 по 1985 год было на 44% обусловлено мерами первичной профилактики [122]. В Северной Карелии (Финляндия) снижение уровня холестерина крови и артериального давления в популяции, наряду с резким сокращением числа курильщиков, на 48% обусловило снижение сердечно-сосудистой смертности за 20 лет наблюдения [184].

Стратегические подходы к снижению риска ИБС в течение многих лет традиционно подразделялись на меры первичной и вторичной профилактики. Первичная профилактика подразумевала вмешательства, проводимые в массовом масштабе и направленные на предупреждение возникновения сердечно-сосудистых заболеваний. Вторичная профилактика включала активные воздействия по предупреждению сердечно-сосудистых катастроф у больных ИБС. В последние годы это подразделение не стало выглядеть настолько явным. Проспективные эпидемиологические исследования показали, что у лиц с высоким сердечно-сосудистым риском, но без клинических признаков ИБС, вероятность острого инфаркта миокарда может быть даже выше, чем у больных ИБС [421]. Поэтому при планировании профилактических вмешательств стала преобладать концепция оценки абсолютного риска, выражающегося в актуальной вероятности

наступления сердечно-сосудистой катастрофы. Кроме того, ключевые мероприятия, проводимые при первичной или вторичной профилактике атеросклеротических заболеваний, качественно не различаются и предусматривают, прежде всего, коррекцию липидного обмена, контроль артериального давления и отказ от курения. Естественно, что при наличии ИБС в значительной степени увеличивается объем проводимых нелекарственных и терапевтических вмешательств, и в настоящее время вторичная профилактика отличается от первичной главным образом количественно.

Основным методом профилактики сердечно-сосудистых заболеваний традиционно считались воздействия, направленные на снижение уровня холестерина в крови. Действительно, среди отдельных факторов риска наибольшей прогностической значимостью обладает повышенный уровень холестерина липопротеидов низкой плотности (ЛНП); этот показатель по своей чувствительности и специфичности превосходит все остальные изолированные факторы риска. Однако, алгоритмы определения сердечно-сосудистого риска, использующие оценку множественных факторов риска, дают лучшие результаты [421]. Дело в том, что при наличии нескольких факторов риска происходит их кластеризация и проявляется синергическое действие на вероятность сердечно-сосудистых заболеваний [241]. При наличии трех мажорных факторов риска вероятность сердечно-сосудистой катастрофы в течение последующих 20 лет возрастает в 3 раза, а общая смертность – почти в 2 раза; при наличии четырех-пяти факторов риска эти показатели возрастают, соответственно, в 5 и 3 раза [437]. Поэтому ни один из известных факторов риска не должен рассматриваться в отдельности; напротив, если у больного выявлен какой-либо фактор риска, необходимо оценить наличие других факторов, и, что более важно, начать активное воздействие на все выявленные факторы риска [192]. В настоящее время доступна мультивариантная оценка сердечно-сосудистого риска, основанная на результатах двух известных эпидемиологических исследований – Фрамингемского и Мюнстерского. Этот подход в значительной степени отражает мультифакторный патогенез атеросклеротических заболеваний, хотя и не включает оценку всех известных факторов риска. Естественно, что алгоритмы оценки риска, разработанные для одной популяции, могут неточно отражать эпидемиологическую ситуацию, существующую в других странах [165, 211]. Идеальное решение этой проблемы заключается в проведении аналогичных

проспективных исследований в различных странах и регионах, но более прагматичным подходом является калибровка существующих алгоритмов, основанная на данных перекрестных эпидемиологических наблюдений, которые более легко осуществимы. Так, на основе данных исследования ВОЗ разработаны поправочные коэффициенты для расчетных сердечно-сосудистых рисков [227].

За последние два десятилетия было проведено несколько клинических исследований, использовавших липидснижающую стратегию для предотвращения ИБС. Изначально стратегия была направлена на диетотерапию, но в ряде случаев воздействия оказались неэффективными, и относительно редко наблюдалось снижение холестерина более чем на 10% от исходного уровня [260]. Затем последовали клинические исследования с использованием секвестрантов желчных кислот (смол), никотиновой кислоты и фибратов, в целом с благоприятными результатами, но при этом возникали проблемы с переносимостью данных препаратов [135]. Часто степень снижения холестерина и холестерина ЛНП была пропорциональна снижению частоты ИБС, наблюдаемому в ходе исследования.

Пришествие ингибиторов гидроксиметилглутарил – коэнзим А (ГМГ-КоА) редуктазы в конце 1980-х привело к лучшим возможностям снижения холестерина ЛНП. Было проведено громадное количество исследований по диетотерапии и липидснижающей терапии, и было выявлено благоприятное действие на коронарные и сонные артерии, на частоту возникновения ИБС, на частоту повторных проявлений ИБС и на частоту инсультов при самых разнообразных режимах воздействия [124, 344, 350, 360, 364, 365]. В целом, в этих исследованиях большее снижение уровня холестерина приводило к большему снижению риска возникновения и рецидива ИБС. Но главным образом, предпосылкой эффективности холестеринснижающей терапии в этих исследованиях был сам факт лекарственного воздействия («intention-to-treat»), но отнюдь не степень снижения холестерина и не способность снизить общий холестерин или холестерин ЛНП до заранее намеченного уровня.

Было проведено большое количество клинических исследований по снижению артериального давления, в которых было показано, что риск ИБС снижается в тех случаях, когда с помощью диеты или различных лекарственных средств снижается систолическое или диастолическое артериальное давление; при этом спорным моментом оставалась безопасность проводимой терапии [176, 319]. Недавние исследования были ориентированы на лечение специальных групп

пациентов, главным образом, пожилых лиц и больных с повышенным систолическим давлением. Эффективное снижение риска ССЗ было продемонстрировано в ряде подобных исследований: «Systolic Hypertension in the Elderly Program» (SHEP), «Systolic Hypertension in Europe Trial» (Syst-Eur), «Systolic Hypertension in China Trial» (SYSt-China) [362, 378, 423]. В исследовании «Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial» (ALLHAT) у 40000 американцев изучали эффективность различных режимов лечения повышенного артериального давления у лиц старшего возраста. Было показано, что в качестве начальной терапии тиазидные диуретики эффективны в такой же степени, как и кальциевые антагонисты или ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) для снижения риска ССЗ [91]. Дополнительное назначение статинов не улучшало благоприятный эффект, но следует отметить, что разница в уровнях холестерина между пациентами, получавшими активное лечение или плацебо, составляла около 10% в течение исследования [91]. Другие результаты были получены в исследовании «Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial» (ASCOT) у пациентов, получавших, наряду с препаратами для снижения артериального давления, более мощную статиную терапию, приведшую к различиям в уровнях холестерина свыше 40 мг/дл. В исследовании ASCOT более низкий риск ССЗ был связан как с воздействием на липиды, так и с воздействием на артериальное давление [360].

Различные компоненты диеты, влияющие на уровень липидов в крови, интенсивно изучались в течение второй половины прошлого века. Одним из наиболее ранних было долгосрочное исследование, проведенное у мужчин разных стран Европы, Северной Америки и Азии («Seven Countries Study») [245]. В исследовании было показано, что потребление с пищей холестерина и насыщенных жиров связано с повышенным уровнем холестерина в популяции, и длительное последующее наблюдение за данной когортой подтверждает этот вывод [416]. В Финляндии, стране с наивысшим средним уровнем холестерина в 1970-х, была проведена национальная программа по улучшению диеты, и распространенность уровня холестерина свыше 250 мг/дл в популяции снизилась с 16% до 3% в 1990-х [235].

Уровень холестерина у жителей США умеренно снизился за последние два десятилетия, и в среднем у взрослых лиц составляет около 204 мг/дл [268]. Это изменение обусловлено, главным образом, снижением потребления жира и

переходом с типичной американской диеты на режим питания, рекомендованный Американской ассоциацией по изучению болезней сердца (American Heart Association Step I diet). Содержание жиров в диете должно составлять менее 30% по калорийности, что должно привести к снижению уровня холестерина в крови на 15% от исходного уровня [352]. Руководства по диетической коррекции уровня холестерина, разработанные различными экспертными организациями [251], рекомендуют потребление разнообразной пищи, включающей фрукты, овощи, продукты из цельных зерен; при этом важным аспектом является достижение и поддержание нормальной массы тела, желательного уровня холестерина и желательного артериального давления. У взрослых лиц целью является достижение уровня холестерина менее 200 мг/дл, но приблизительно половина населения не соответствует этому критерию. В качестве целевого значения при агрессивной липидснижающей терапии у больных ССЗ установлен уровень холестерина ЛНП менее 100 мг/дл, но только 18% пациентов соответствуют этому критерию [322].

Поскольку существовало предположение о том, что усиление окислительных процессов способствует развитию атеросклероза [386], то наблюдался повышенный интерес к продуктам, обладающим антиоксидантными свойствами. Наиболее были изучены витамины С, В и Е. Результаты ряда обсервационных исследований говорят о том, что большее потребление этих витаминов с пищей или в качестве биологически активных добавок оказывает благоприятное влияние на сердечно-сосудистый риск [338, 379]. Однако, данные контролируемых клинических исследований, в том числе, проведенных в сравнении с другими антиатеросклеротическими воздействиями, в целом не подтвердили снижение риска [206, 438].

Повышенное потребление алкоголя постоянно связывают со сниженным риском ИБС. Принято считать, что ежедневный прием алкоголя в дозе 20 мл у мужчин и 10 мл у женщин способствует снижению этого риска [240]. Возможно, в основе этого эффекта лежит изменение уровня холестерина ЛВП в крови, а также противовоспалительное и антиагрегационное действие.

У больных сахарным диабетом 2 типа попытки снижения сердечно-сосудистого риска стали предприниматься лишь недавно. В настоящее время рекомендуется ориентироваться на более низкие пороговые значения холестерина ЛНП и артериального давления [309, 375]. Основания для разработки этих

агрессивных подходов были получены при анализе данных рандомизированных клинических исследований эффектов гипотензивных и гиполипидемических препаратов в подгруппах больных сахарным диабетом 2 типа. Эффективность такого подхода была подтверждена в датском исследовании, где использовали агрессивную терапию гипергликемии, гипертонии, дислипидемии и микроальбуминурии у больных сахарным диабетом 2 типа [177]. Данные о необходимости поддержания допустимого уровня глюкозы в крови как части стратегии по профилактике ССЗ получили подтверждение в обсервационных исследованиях. В клинических исследованиях было показано, что уровни глюкозы крови и гликозилированного гемоглобина (HbA1c) важны для предупреждения микрососудистых осложнений глазного дна и почек, но при этом жесткий контроль глюкозы крови не дает каких-либо значимых преимуществ для снижения риска ССЗ [400, 409]. Последнее наблюдение было получено в широкомасштабных исследованиях по мультифакторному воздействию у больных сахарным диабетом 2 типа [410].

Относительно новым и модным направлением в профилактике атеросклеротических заболеваний стало снижение уровня гомоцистеина в крови. В конце 1990-х годов в США было введено обогащение ряда зерновых продуктов фолиевой кислотой, что привело к снижению частоты случаев повышенного уровня гомоцистеина в свободноживущей популяции [230]. Считают, что дополнительный прием фолиевой кислоты с поливитаминными комплексами может снизить важность гомоцистеина как фактора риска ССЗ. Возможно, гомоцистеин может оказывать влияние на риск ССЗ в ряде специфических ситуаций. Чрезвычайно высокое содержание гомоцистеина в крови, несмотря на дополнительный прием фолиевой кислоты, отмечается при нарушенной функции почек, что может оказывать влияние на ускоренное развитие атеросклероза у таких больных [120]. В настоящее время проводятся клинические исследования по влиянию приема препаратов фолиевой кислоты на снижение риска атеросклероза у больных с почечной недостаточностью [121].

Современные подходы к профилактике и лечению атеросклероза, основанные на коррекции факторов риска, имеют свои достоинства и недостатки. К числу несомненных достоинств следует отнести высокую степень клинической эффективности воздействий, что проявляется в существенном снижении частоты клинических проявлений атеросклероза на популяционном уровне, таких как

инфаркт миокарда (фатальный и нефатальный), инсульт и внезапная коронарная смерть.

К числу недостатков, свойственных данному подходу, следует отнести следующее. Благоприятные эффекты проявляются лишь на популяционном уровне, а при индивидуальном подходе к профилактике и терапии атеросклеротических заболеваний эти эффекты имеют гораздо более слабую степень выраженности [238, 239]. В целом этот подход сводится к выполнению рекомендаций о ведении здорового образа жизни, в котором существенное место занимает регуляция питания и физической активности. При этом специфическая лекарственная терапия уместна лишь для относительно небольшой доли популяции, имеющей показания для назначения лекарственных средств. Наконец, критика этого подхода с позиции патофизиологии и современных клеточно-молекулярных концепций атерогенеза заключается в отсутствии элемента патогенетического воздействия. Действительно, учитывая изложенные выше данные о сложной и неоднозначной роли клеточных элементов артериальной стенки и модифицированных ЛНП в атерогенезе, представления о коррекции уровня холестерина в крови или регуляции артериального давления можно считать максимально упрощенными (если не сказать, вульгарными). Они крайне неточно соответствуют подходам к прямой антиатеросклеротической терапии, которая должна задействовать ключевые моменты атерогенеза на клеточно-молекулярном уровне.

Для атеросклероза характерно сочетание множественных морфологических, гистологических и гемореологических изменений в артериях эластического или мышечно-эластического типа [357]. Понятие прямой антиатеросклеротической терапии должно подразумевать, по меньшей мере, предотвращение дальнейшего прогрессирования атеросклеротических поражений, уменьшение размеров липидно-некротического ядра и стабилизацию фиброзной покрышки атеросклеротической бляшки. Такой подход теоретически должен привести к регрессии имеющихся поражений. Несомненно, такой подход должен иметь и существенное патогенетическое обоснование – эффективность профилактики и терапии должна быть обусловлена воздействием на клеточно-молекулярные механизмы атерогенеза.

Современное состояние прямой антиатеросклеротической терапии можно охарактеризовать как находящееся на начальном этапе своего развития. Существуют лишь два класса лекарственных средств, обладающих подтвержденной в клинических исследованиях антиатеросклеротической эффективностью. Речь идет об ингибиторах ГМГ-КоА редуктазы (статины) и антагонистах кальция. При этом достижения клинической науки значительно опережают фундаментальные изыскания.

Статины являются самыми эффективными гиполипидемическими препаратами, стабильно снижающими уровень холестерина в крови. В то же время, убедительно показано, что эти соединения оказывают также эффекты, не связанные непосредственно с влиянием на обмен холестерина. Данные преимущественно экспериментальных работ указывают на возможность прямого действия статинов на процессы, играющие роль в атерогенезе на клеточно-молекулярном уровне. Плейотропное (многонаправленное) действие статинов включает подавление образования молекул адгезии, торможение миграции моноцитов, снижение секреторной активности и пролиферации клеток в очагах атеросклеротического поражения, подавление внутриклеточного накопления липидов и другие процессы [27]. Однако до конца неясно, насколько эти эффекты проявляются в клинических условиях.

Статины представляют собой гетерогенную группу. Одни из них (ловастатин, правастатин, симвастатин) являются полусинтетическими производными грибов, другие (флувастатин, аторвастатин, церивастатин, розувастатин) относятся к синтетическим соединениям. Несмотря на различия в химическом строении, все статины оказывают сходное фармакологическое действие – обратимо ингибируют ГМГ-КоА редуктазу, что приводит к снижению скорости синтеза холестерина в гепатоцитах. Уменьшение образования внутриклеточного холестерина приводит к снижению уровня холестерина в крови, а также стимулирует синтез и экспрессию рецепторов к аполипопротеидам В и Е. Увеличивается захват апо-В- и апо-Е-содержащих липопротеидов из крови, возрастает их клиренс. Липидными эффектами статинов являются уменьшение количества частиц ЛНП и ЛОНП в кровотоке, снижение уровня холестерина ЛНП и триглицеридов, а также повышение количества частиц ЛВП; механизм последнего эффекта пока не установлен.

Крупные клинические исследования продемонстрировали, что статины достоверно снижают заболеваемость и смертность от ССЗ у больных с повышенным содержанием холестерина в крови. Положительное влияние статинов на отдаленный прогноз отмечалось при их использовании в целях как вторичной, так и первичной профилактики [97, 159, 350, 365]. Выраженное действие статинов на заболеваемость и смертность у лиц с широкой вариабельностью уровней холестерина в крови не может быть объяснено исключительно гиполипидемическим действием. Это позволило предположить наличие дополнительных эффектов статинов, не связанных с их влиянием на содержание холестерина в крови [196, 265]. В последние годы накопилось большое количество данных, свидетельствующих о нелипидных эффектах статинов. Многие из них являются следствием ингибирования синтеза изопреновых производных в цепи обмена мевалоната, в частности, фарнезилпирофосфата и геранилгеранилпирофосфата. Эти соединения участвуют в посттрансляционной модификации внутриклеточных сигнальных белков, в том числе, ГТФ-связывающих белков. Таким образом, изменяется регуляция клеточного роста и дифференцировки, экспрессии генов, поддержания цитоскелета, двигательных функций клеток, транспорта белков и липидов, защитных реакций [264, 395]. Другой путь реализации плеiotропных эффектов статинов – подавление активности транспортного белка эфиров холестерина [88, 129]. Наконец, статины способны связываться со специфическим сайтом антигена LFA-1, регулирующего функции адгезии и активации лимфоцитов [427], оказывая в результате противовоспалительное действие.

Наиболее широко известны клинические эффекты статинов. На протяжении последних десятилетий было проведено большое количество многоцентровых контролируемых клинических исследований по оценке влияния статинов на сердечно-сосудистый прогноз, в которых участвовали в общей сложности более 100000 человек. Во всех исследованиях была выявлена связь между снижением содержания холестерина ЛНП и улучшением прогноза как у больных ССЗ, так и у условно здоровых лиц с выраженными факторами риска. Однако эта зависимость не носила прямолинейный характер, что еще раз подчеркивает важность нелипидных антиатеросклеротических механизмов действия статинов.

Первым крупным многоцентровым плацебо-контролируемым исследованием было исследование «Scandinavian Simvastatin Survival Study» (4S), в котором 4444 больных ИБС наблюдалось более 5 лет. Прием симвастатина привел к снижению абсолютного риска на 30% и относительного риска на 4%. В ходе этого исследования было также выявлено, что прием статинов может замедлить прогрессирование атеросклеротических бляшек в коронарных артериях [350], что позволило говорить о прямом антиатеросклеротическом действии статинов.

В исследовании «Cholesterol and Recurrent Events» (CARE) участвовало 3583 мужчин и 576 женщин с нормохолестеринемией, перенесших инфаркт миокарда. Прием правастатина привел к снижению сердечно-сосудистой смертности на 20%, снижению риска инфаркта миокарда на 25, снижению риска инсульта на 31% [345].

Исследование «Long-term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease» (LIPID) включало 9014 больных ИБС и продолжалось более 6 лет. Снижение общей смертности составило 22%, а риска смерти от ССЗ – 24% [401].

Исследование «West of Scotland Coronary Primary Prevention Study» (WOSCOPS) было нацелено на первичную профилактику ИБС у лиц с повышенным сердечнососудистым риском. Под наблюдением находилось 6596 мужчин на протяжении 5 лет. На фоне приема правастатина общая смертность снизилась на 22%, а сердечно-сосудистая смертность – на 33% [365].

Исследование «Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study» (AFCAPS/TexCAPS) проводилось у 6605 добровольцев с низким риском ИБС на протяжении 5 лет. На фоне приема ловастатина вероятность развития нестабильной стенокардии снизилась на 32%, риск фатального или нефатального инфаркта миокарда – на 40% [159].

Самое крупное исследование клинической эффективности статинов – «Heart Protection Study» (HPS). В нем участвовало более 20000 добровольцев с повышенным риском ИБС и незначительно повышенным уровнем холестерина в крови. Наблюдение продолжалось более 5 лет. Прием симвастатина привел к снижению риска острого инфаркта миокарда и инсульта по меньшей мере на треть [206].

Исследования клинической эффективности статинов продолжаются. Их главной целью является внедрение идеи о назначении статинов в качестве

антиатеросклеротических профилактических средств среди широкого круга лиц, у которых ранее считалось, что необходимости в приеме статинов нет. К ним, в частности, относятся женщины, лица старше 70 лет, а также лица с абсолютно нормальными показателями липидограммы крови [27]. Результаты этих исследований вполне предсказуемы, поскольку уже описанные клинические эффекты статинов присущи, скорее всего, статинам как классу лекарственных средств, и положительный клинический эффект зависит не только и не столько от снижения уровня липидов в крови.

Нас же в аспекте клинической эффективности статинов интересует их прямое антиатеросклеротическое действие, проявляющееся в остановке развития атеросклеротических поражений сосудов и индукции их регрессии, основанное на ингибировании молекулярно-клеточных механизмов атерогенеза. В этом отношении можно снова сказать, что клинические успехи значительно опережают фундаментальные исследования по изучению механизмов антиатеросклеротического действия статинов.

С целью мониторинга атеросклероза в клинических исследованиях по индуцированной регрессии атеросклеротических поражений артерий широко используются ультразвуковые методы диагностики. Это объясняется их относительной простотой, доступностью, достаточной воспроизводимостью и неинвазивностью. Наиболее распространено ультразвуковое мониторирование состояния сонных артерий, а именно, измерение толщины интимо-медиального слоя. Недавно опубликованный мета-анализ проведенных к настоящему времени исследований позволяет говорить о наличии прямого антиатеросклеротического действия у статинов как класса лекарственных препаратов [361].

В ряде эпидемиологических исследований было установлено, что атеросклеротические поражения в абдоминальном отделе аорты, коронарных артериях и сонных артериях развиваются параллельно и четко связаны с возрастом [110, 374]. Прогрессирование атеросклероза, оцениваемое как увеличение толщины интимо-медиального слоя (ИМС) сонных артерий, идет со скоростью 6,5-10,1 мкм в год [140]. Обсервационные исследования говорят о том, что прогрессирование каротидного атеросклероза является независимым фактором риска ИБС и инсульта [123, 139].

Ультразвуковое исследование в В-режиме считается валидным и надежным методом исследования для выявления, количественной оценки и

мониторирования изменений артериальной стенки в периферических сосудах (сонных и бедренных артериях) [325]. Кроме того, эти методы позволяют выявить атеросклероз на очень ранних бессимптомных стадиях [118]. Увеличение толщины ИМС сонных артерий со скоростью более 30 мкм в год является клинически значимым, поскольку повышает риск сердечно-сосудистых катастроф [94].

В ряде исследований было показано, что агрессивная липидснижающая терапия, в том числе, с использованием статинов, не только замедляет прогрессирование атеросклероза, но вызывает его обратное развитие [254, 348]. Тем не менее, разнообразные исследования по регрессии атеросклероза существенно различались между собой по дизайну, длительности терапии, способам медикаментозного воздействия и итоговой эффективности; многие из них имели недостаточный размер выборки. Поэтому только мета-анализ сходных между собой исследований продемонстрировал эффективность антиатеросклеротической терапии с помощью статинов [361].

Всего за период с 1980 по 2004 год было опубликовано 196 работ, так или иначе связанных с проведенными и завершенными исследованиями по регрессии атеросклероза. При проведении мета-анализа из этого списка было исключено 160 исследований, в которых не использовалось ультразвуковая диагностика, или не проводилось лечение статинами, или исследования были выполнены на животных моделях. Из оставшихся 39 публикаций были исключены: 12 обзоров литературы, одно исследование с использованием трехмерной ультразвуковой диагностики, 7 нерандомизированных исследований, а также 2 исследования по терапии статинами в сочетании с аферезом. Четыре исследования были проведены в одной и той же популяции, поэтому в анализ была включена лишь одна публикация. Два исследования были исключены по причине неполного представления данных. Таким образом, в конечном итоге осталось 10 полноценных рандомизированных контролируемых исследований [361]. Восемь проанализированных исследований [130, 154, 207, 216, 277, 298, 329, 348] использовали плацебо-контроль; два исследования проводились в сравнительном дизайне с активным контролем [373, 398]. В общей сложности в этих исследованиях наблюдались 3443 человека в возрасте от 30 до 70 лет. Длительность наблюдения составляла от 1 до 4 лет. В плацебо-контролируемых исследованиях было показано, что изменение толщины ИМС при стандартной терапии статинами по сравнению с контрольной группой

составило 22,4 мкм в год (95% доверительный интервал составил от 16,1 до 26,6 мкм в год). В исследованиях с активным контролем изменение толщины ИМС при агрессивной терапии статинами по сравнению с контрольной группой составило 63,3 мкм в год (95% доверительный интервал составил от 55,4 до 71,1 мкм в год). Таким образом, долговременная стандартная терапия статинами оказалась эффективной и безопасной в отношении замедления прогрессирования каротидного атеросклероза. Агрессивная терапия статинами оказалась чрезвычайно эффективной в отношении индукции регрессии каротидного атеросклероза [361].

Информация об антиатеросклеротическом действии другой группы препаратов, а именно, антагонистов кальция, гораздо менее обширна. Известны всего 4 исследования по антиатеросклеротической эффективности этой группы препаратов, в которых использовали ультразвуковое мониторирование атеросклероза в сонных артериях. Одно из них было проведено в плацебо-контролируемом дизайне [284], остальные – с использованием активного контроля [340, 440, 441]. В исследовании «Prospective Randomized Evaluation of the Vascular Effects of Norvasc Trial» (PREVENT) изучали антиатеросклеротическое действие амлодипина. Было показано, что амлодипин вызывает уменьшение толщины ИМС сонных артерий со средней скоростью 15 мкм в год, в то время как в контрольной группе толщина ИМС увеличивается со скоростью 11 мкм в год [327]. В сравнительных исследованиях «Multicenter Isradipine/Diuretic Atherosclerosis Study» (MIDAS), «European Lacidipine Study on Atherosclerosis» (ELSA) и «Verapamil in Hypertension and Atherosclerosis Study» (VHAS) также было продемонстрировано прямое антиатеросклеротическое действие антагонистов кальция, которое проявлялось в уменьшении толщины ИМС сонных артерий со скоростью 20-28 мкм в год.

Помимо статинов и антагонистов кальция в качестве потенциальных средств прямого антиатеросклеротического действия можно упомянуть гиполипидемическую комбинацию холестилола и ниацина, витамины-антиоксиданты, а также эстрогены. Однако количество исследований, подтверждающее антиатеросклеротическую эффективность данных препаратов крайне мало.

В плацебо-контролируемом исследовании «Cholesterol Lowering Atherosclerosis Regression Study» (CLAS) было показано, что комбинация

холестипола и ниаина вызывает регрессию каротидного атеросклероза со скоростью 20 мкм в год, а разница в динамике показателей между основной и контрольной группой составляет 30 мкм в год [115, 215].

Плацебо-контролируемые исследования по влиянию заместительной гормональной терапии на толщину ИМС сонных артерий указывают на некоторое замедление прогрессирования атеросклероза у женщин в постменопаузе [155, 218]. Однако эти данные сложно комментировать, поскольку в данных исследованиях женщины с выраженной гиперлипидемией получали статины наряду с эстрогенами. Обсервационные исследования также говорят о том, что у женщин, получающих заместительную гормональную терапию, толщина ИМС сонных артерий меньше [428].

Скудные и неоднозначные данные имеются об антиатеросклеротическом действии витаминов-антиоксидантов [346]. В данном плацебо-контролируемом исследовании Salonen et al. среднее увеличение толщины ИМС в контрольной группе составило 20 мкм в год, при назначении витамина Е – 18 мкм в год, витамина С – 17 мкм в год, и только при назначении комбинации витаминов С и Е удалось добиться некоторого замедления атеросклеротического роста до 11 мкм в год.

Таким образом, в настоящее время можно говорить о достоверных антиатеросклеротических эффектах только двух групп лекарственных средств – статинов и антагонистов кальция. Фундаментальная проблема заключается в отсутствии представлений о механизмах антиатеросклеротического действия этих препаратов. В отношении статинов исследователи уже достаточно давно ушли от примитивных объяснений антиатеросклеротического действия, основанных на торможении инфильтрации сосудистой стенки холестерином, и пытаются связать выявленные клинические эффекты с плеiotропными (нелипидными) механизмами действия. В отношении антагонистов кальция ситуация далека от понимания. Современное объяснение, основанное на снижении стрессорного давления на стенку сосуда и создании благоприятных условий для восстановления эндотелиальной функции [284, 327] выглядит весьма наивным. В то же время, в работах А.Н. Орехова и соавт. имеются четкие указания на клеточно-молекулярные механизмы антиатеросклеротического действия этих препаратов. Несмотря на различие в химическом строении и фармакодинамических характеристиках, они обладают

антиатеросклеротическими свойствами: препятствуют накоплению холестерина в клетках и способствуют удалению избыточных количеств уже накопившихся внутриклеточных липидов [51]. Именно с их влиянием на процессы накопления внутриклеточного холестерина, инициирующего акта в атерогенезе, и следует связывать проявляющееся в клинических исследованиях прямое антиатеросклеротическое действие – замедление роста атеросклеротических поражений и их регрессию.

Как говорилось выше, в настоящее время линейка лекарственных средств, обладающих прямым антиатеросклеротическим действием, ограничена фактически двумя фармакологическими группами. Регулярный многолетний прием статинов или антагонистов кальция сказывается на процессах накопления холестерина в клетках артериальной стенки и в клиническом аспекте приводит к остановке развития и регрессии имеющихся атеросклеротических поражений. Клеточный культуральный тест представляется наиболее оптимальным и адекватным способом моделирования ранних процессов атерогенеза на клеточном уровне [51]. С использованием клеточного теста представляется возможным проведение серийных испытаний, необходимых для потокового скрининга лекарственных средств, обладающих антиатеросклеротическим эффектом *in vitro*. Широкое использование лекарственных препаратов с целью профилактики атеросклероза на ранних его стадиях представляется маловероятным в силу наличия узких показаний для назначения, выраженных побочных эффектов и высокой стоимости лечения. Для ранней профилактики атеросклероза более целесообразно использование нелекарственных и лекарственных средств натурального происхождения, поскольку они практически не обладают побочными эффектами, оказывают регулирующее воздействие в физиологических границах, обладают ценовой доступностью и, как следствие, позволяют осуществлять длительный, практически пожизненный прием. Кроме того, средства натурального происхождения могут обладать более широким спектром эффектов, чем лекарственные препараты, оказывая влияние на ряд факторов риска атеросклероза, то есть, осуществляя не прямое антиатеросклеротическое воздействие. Основопологающими принципами использования лекарственных и нелекарственных препаратов с целью профилактики атеросклероза являются патогенетический механизм действия и подтвержденная в клинических

исследованиях эффективность. В основе использования натуральных продуктов для профилактики атеросклероза, по аналогии с известными лекарственными препаратами антиатеросклеротического действия, должна лежать их способность предотвращать накопление холестерина в клетках артериальной стенки, то есть блокировать начальный этап атерогенеза на молекулярно-клеточном уровне.

В настоящее время нелекарственные препараты на основе компонентов растительного происхождения и других натуральных продуктов привлекают все большее внимание исследователей. Тем не менее, активное изучение их кардиопротективных эффектов по-прежнему ограничивается воздействием на факторы риска ССЗ, причем главное внимание привлекает снижение уровня холестерина в крови и регуляция артериального давления [137, 286, 302, 422]. Понятно, что при такой методике оценки терапевтического потенциала нелекарственных натуральных препаратов они явно проигрывают современным лекарственным средствам. До настоящего времени не существовало методологических подходов к оценке антиатеросклеротического потенциала натуральных веществ. Впрочем, такая ситуация характерна и для лекарственных средств. Главная проблема разработки патогенетической терапии атеросклероза, особенно на ранних субклинических стадиях его развития, заключается в отсутствии адекватных патофизиологических моделей, а также в отсутствии цельного алгоритма разработки лекарственных и нелекарственных средств прямого антиатеросклеротического действия.

В многочисленных исследованиях, проведенных в 1970-90-х годах, было показано, что эксперименты с использованием клеточных культур могут дать важную информацию о патогенетических механизмах атерогенеза. Так, были охарактеризованы свойства первичных культур клеток, выделенных из интимальной или медиальной оболочки различных артерий животных [169, 341]. Относительно недавно была детально описана первичная культура гладкомышечных клеток интимы аорты человека и обоснована целесообразность ее использования для изучения процессов атерогенеза *in vitro* [59]. Основными проявлениями ранних атеросклеротических изменений являются накопление внутриклеточных липидов с образованием пенистых клеток, а также усиление пролиферативных процессов, сопровождающееся синтезом элементов соединительнотканного матрикса [47, 59, 233, 282, 342]. При определенным

образом смоделированных условиях в первичной культуре интимальных клеток происходят аналогичные изменения, что позволяет изучать механизмы атерогенеза на данной модели [59, 76].

Многие исследователи для изучения процессов накопления внутриклеточных липидов и синтеза эфиров холестерина в настоящее время используют первичные культуры макрофагов - производных моноцитов крови человека [171, 276, 354, 420]. Для этой цели можно также использовать первичные культуры перитонеальных макрофагов мышей [75]. В ранних исследованиях достаточно широко применяли культивируемые фибробласты кожи человека [225, 425], но в настоящее время данный тип клеток не используется для изучения процессов атерогенеза как недостаточно релевантный.

Наиболее адекватной моделью для изучения процессов атерогенеза на клеточном уровне является первичная культура клеток из субэндотелиальной интимы аорты человека, поскольку, как отмечалось выше, именно эти элементы являются клеточным субстратом для развития атеросклероза. Кроме того, эта модель предполагает возможность изучения активных воздействий на атерогенез на клеточном уровне, например, с помощью лекарственных средств или биологически активных веществ натурального происхождения. Этот аспект использования клеточных моделей к настоящему времени не получил должного развития, и единственным примером подобного использования фундаментальных знаний в прикладных целях являются наши собственные ранние исследования *in vitro* [51].

Многие исследователи отмечают, что сыворотки крови животных с гиперхолестеринемией вызывают увеличение содержания липидов в культивируемых гладкомышечных клетках сосудов кроликов, свиней и обезьян [106, 143, 321, 384]. Кроме того, липопротеиды низкой плотности (ЛНП) и очень низкой плотности (ЛОНП), выделенные из таких сывороток крови, оказывают аналогичное действие. Напротив, сыворотки крови контрольных животных не вызывают накопления липидов в клетках.

Недавно было установлено, что сыворотки крови больных ИБС с ангиографически документированным коронарным атеросклерозом вызывают аккумуляцию липидов в культивируемых интимальных клетках аорты человека [34, 58]. Способность сыворотки крови увеличивать содержание липидов в культивируемых клетках была названа атерогенностью, или атерогенным

потенциалом. Как было показано, содержание внутриклеточных липидов возрастало за счет свободного и этерифицированного холестерина и в значительно меньшей степени - за счет триглицеридов. Содержание фосфолипидов в клетках при этом не изменялось. Поэтому для оценки атерогенного эффекта сыворотки крови было предложено использовать определение изменений содержания внутриклеточного холестерина (или его эфиров), как наиболее информативного и чувствительного показателя. Параллельно с накоплением холестерина при инкубации клеток с атерогенными сыворотками крови больных ИБС отмечалось увеличение включения меченого [^3H]-тимидина в клетки. Таким образом, увеличение содержания внутриклеточных липидов сопровождалось усилением пролиферативной активности клеток [76]. Следует отметить, что атерогенный потенциал сывороток крови обнаруживали у большинства больных коронарным атеросклерозом (до 80-90%), в то время как в контрольных исследованиях у здоровых лиц атерогенность сыворотки крови, как правило, отсутствовала. Тем не менее, распространенность феномена атерогенности при ИБС недостаточно изучена, и отсутствуют данные о распространенности при субклиническом атеросклерозе. Это делает невозможным оценку диагностической и прогностической значимости данного показателя при атеросклерозе и, тем более, затрудняет оценку патогенетической роли атерогенности в формировании и прогрессировании атеросклеротических поражений.

Патогенетический подход к профилактике и лечению атеросклероза определяется возможностью устранения физической причины патологии, а именно, предотвращению накопления внутриклеточных липидов. Существует ряд теоретических 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, а методом оценки эффекта – снижение атерогенности сыворотки крови. Клеточный культуральный тест представляется наиболее оптимальным и адекватным способом моделирования ранних процессов атерогенеза на клеточном

уровне. Тем не менее, в научной литературе не имеется данных (помимо собственных), полученных при использовании предлагаемой методологии.

В заключение необходимо отметить, что использование клеточных моделей, основанных на первичной культуре клеток интимы аорты человека, является адекватным и перспективным способом изучения возможностей воздействия на молекулярно-клеточные механизмы атерогенеза. Настоящая монография описывает результаты фундаментальных и прикладных исследований, позволивших определить новые принципы патогенетической профилактики и терапии атеросклероза.

Глава 2.

Разработка подходов к антиатеросклеротической терапии: материалы и методы

2.1. 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 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 [42]. 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 [382, 383]. 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 часа. 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 антибиотиков 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 см^2 культуральной поверхности. Клетки культивировали при 37°C в насыщенной водяными парами атмосфере, содержащей 95% воздуха и 5% углекислого газа в увлажняемом 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 [2, 57]. 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.

2.2. Иммуноцитохимические методы.

Иммуноцитохимическое типирование клеток в первичной культуре проводили под руководством и при ведущем участии к.б.н. Е.Р. Андреевой (РК НПК МЗиСР РФ, Москва). В работе были использованы методы одинарного и двойного иммуноцитохимического выявления различных антигенов [32, 270]. В культурах клеток оценивали долю клеток, имеющих антигены определенного типа клеток. Иммуноцитохимическую идентификацию клеток в первичных

культурах из непораженных и атеросклеротических участков интимы аорты человека с помощью антител против различных клеточных типов (гладкомышечных, макрофагов, перицитов) проводили на 7-й день культивирования. Количество гематогенных клеток определяли, используя коктейль антител против CD14 и CDLC антигенов. Оседлые клетки определяли как количество неокрашенных клеток на препаратах, где были выявлены гематогенные клетки. Гладкомышечные клетки идентифицировали по экспрессии гладкомышечного α -актина. Перицитоподобные клетки идентифицировали по положительному окрашиванию антителами 3G5 против антигена о-сиалоганглиозида и антителами 2A7 против высокомолекулярного меланомо-ассоциированного антигена. Фагоцитирующие клетки идентифицировали по экспрессии антигена CD68.

2.3. Культура моноцитов-макрофагов крови человека

Моноциты крови человека выделяли из крови здоровых добровольцев и культивировали до их созревания в макрофаги [86]. Из локтевой вены здорового донора утром натощак брали 50 мл крови в стерильную пластиковую пробирку объемом 50 мл, содержащую 5 мл стерильного 3,8% цитрата натрия в 0,15 М изотоническом фосфатном буфере (ФИБ) (pH=7,35). Кровь центрифугировали в течение 20 мин при 1800 g на центрифуге Beckman TJ-6. Плазму крови удаляли, а клеточный осадок, содержащий форменные элементы крови, доводили до первоначального объема стерильным ФИБ. В стерильную пластиковую пробирку вносили фикол (Flow Laboratories, США) из расчета 0,5 мл на 1 мл полученной суспензии форменных элементов крови. На фикол наслаивали суспензию форменных элементов крови и центрифугировали в течение 30 мин. при 1800 g. В стерильных условиях пипеткой с границы раздела плотности отбирали фракцию лейкоцитов. Полученные клетки ресуспендировали в 1 мл стерильного ИФБ, доводили стерильным ИФБ до 50 мл и центрифугировали в течение 15 мин при 1800 g. Последнюю процедуру отмывки клеток проводили трижды. Затем осадок лейкоцитов ресуспендировали в 1 мл среды 199 (GIBCO Europe, UK), содержащей 2 мМ L-глутамин, 100 Ед/мл пенициллина, 2,5 мкг/мл фунгизона и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Serva, USA). Количество полученных клеток подсчитывали под микроскопом Amplival (Carl Zeiss, Германия) в гемоцитометре. Клетки рассаживали в стерильные 48-луночные планшеты для клеточных культур

(Nunc, Denmark) с плотностью 10^5 клеток на 1 см^2 культуральной поверхности. Клетки инкубировали в CO_2 -инкубаторе (5% CO_2 и 95% атмосферного воздуха) при 100% влажности и 37°C в течение 1 часа, после чего неадгезировавшие клетки (гранулоциты) удаляли путем трехкратного промывания средой 199. К прикрепившимся клеткам (агранулоцитам) добавляли по 250 мкл среды 199, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, антибиотики (пенициллин, стрептомицин и фунгизон), а также глютамин. Полученную чистую культуру моноцитов культивировали в CO_2 -инкубаторе (5% CO_2 и 95% атмосферного воздуха) при 100% влажности и 37°C в течение 14 суток до превращения их в макрофаги. 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).

2.4. 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 $+4^\circ\text{C}$ 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 атерогенности и других биохимических параметров.

2.5. Выделение липопротеидов низкой плотности

Липопротеиды низкой плотности выделяли из сыворотки крови по методу Lindgren [269]. В центрифужную пробирку вносили 8 мл плазмы или сыворотки крови и аккуратно наслаивали 2 мл раствора NaBr в ФИБ плотностью 1.019 г/мл. Первое центрифугирование проводили в течение 18 часов при 12°C в роторе 50Ti

со скоростью 40000 об/мин («Beckman Division», Beckman L8-55 Centrifuge). Пастеровской пипеткой с поверхности отбирали 2 мл; в этом объеме флотировали липопроотеиды очень низкой и промежуточной плотности (ЛПОНП и ЛППП). Оставшийся объем доводили до плотности 1.070 г/мл, используя твердую соль NaBr, и аккуратно наслаивали 2 мл раствора NaBr в ФИБ плотностью 1.065 г/мл. Второе ультрацентрифугирование осуществляли в течение 24 часов при 12°C со скоростью 40000 об/мин. Пастеровской пипеткой с поверхности отбирали 2.5 мл; в этом объеме флотировали липопроотеиды низкой плотности (ЛНП). Сразу после выделения фракцию ЛНП диализовали в течение 24 часов против 2000 объемов ИФБ, стерилизовали путем фильтрации, размер пор фильтра 0.45 мкм («Nalgene», Nalge Company, США) и хранили в пластиковых пробирках при 4°C.

2.6. Культивирование клеток с исследуемыми сыворотками крови человека или липопроотеидами низкой плотности

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). 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 часов (при использовании первичной культуры субэндотелиальных клеток непораженной интимы аорты человека) или 3 часов (при использовании культуры моноцитов-макрофагов крови человека). По окончании инкубации культуры

тщательно отмывали от культуральной среды дважды 0,15 М изотоническим фосфатным буфером (ФИБ) (рН=7,35), затем дважды ФИБ, содержащим 0,2% бычий сывороточный альбумин (БСА) (Sigma Chemical Company, США), и еще трижды ФИБ.

2.7. Определение содержания внутриклеточного холестерина

По окончании инкубации липиды из клеток экстрагировали трижды смесью *n*-гексана и изопропанола в объемном отношении 3:2 по методу Nara и Radin [202], 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 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 изопропаноле, 1 мг/мл (Boehringer Mannheim, Германия). Смесь инкубировали при 37°C в течение 30 минут, 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.

2.8. Определение внутриклеточных липидов методом тонкослойной хроматографии

Липиды из клеток экстрагировали трижды смесью *n*-гексана и изопропанола в объемном отношении 3:2 по методу Nara и Radin [202], 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. В качестве стандартов использовали холестерилолеат, триолеин и холестерин. Фосфолипиды хроматографировали в системе метилацетат – n-пропанол – хлороформ – метанол – 0,25% KCl в объемном соотношении 25:25:25:10:9 [372]. Сканирование хроматограммы проводили при длине волны 200 нм на сканнере Shimadzu CS-930 (Shimadzu Corporation, Япония).

2.9. 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. [275]. 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).

2.10. Расчет атерогенного эффекта (оценка атерогенности сыворотки крови)

Термином «атерогенность», или «атерогенный потенциал», обозначали способность сыворотки крови вызывать статистически достоверное накопление холестерина в культивируемых клетках. 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, обычно колебалось в пределах 20-50 мкг/мг клеточного белка. Удельное содержание общего холестерина в моноцитах-макрофагах крови человека обычно составляло 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. В клинических исследованиях все образцы сыворотки крови, полученные от отдельного пациента в течение всего периода наблюдения, оценивали в одном эксперименте, чтобы обеспечить валидность мониторингирования изменений атерогенности. Кроме того, в таких экспериментах использовали стандартную сыворотку крови с известным атерогенным потенциалом для оценки воспроизводимости измерений.

2.11. Оценка антиатерогенного эффекта в модели *in vitro*

Накопление внутриклеточного холестерина в первичной культуре субэндотелиальных клеток из непораженной интимы аорты человека индуцировали с помощью атерогенной сыворотки крови, как описано выше. Одновременно с атерогенной сывороткой крови человека 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 расчет атерогенного эффекта проводили, как описано выше. Базовый атерогенный эффект сыворотки крови рассчитывали как разницу между содержанием внутриклеточного холестерина в контроле и в клетках, инкубированных в присутствии атерогенной сыворотки без добавления исследуемого вещества, и принимали за 100%. Антиатерогенный эффект исследуемых веществ определяли как их способность статистически достоверно препятствовать накоплению внутриклеточного холестерина, индуцированному атерогенной сывороткой крови.

2.12. 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.

2.13. 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 человек, преимущественно мужчины), не имеющие признаков клинических проявлений атеросклероза или системных воспалительных заболеваний, у которых, тем не менее, при первичном обследовании была выявлена атерогенность сыворотки крови – 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. Существенной особенностью данной модели является возможность оценки антиатерогенного потенциала различных веществ (а также их активных метаболитов) после усвоения, распределения и биотрансформации в организме человека, то есть получение специфических фармакодинамических характеристик.

2.14. 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 часов. После растворения радиоактивность измеряли на сцинтилляционном счетчике 1215 Rackbeta II (LKB, Швеция).

2.15. Определение синтеза клеточного белка

Клетки, выделенные из нормальных или пораженных атеросклерозом участков интимы аорты человека, инкубировали в течение 24 ч в присутствии 10 мкКи/мл [^{14}C]-лейцина. 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).

2.16. 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 [324]. 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 mM

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

2.17. Изучение внутриклеточного метаболизма эфиров холестерина

Клетки, выделенные из нормальных или пораженных атеросклерозом участков интимы аорты человека, инкубировали в течение 24 ч в присутствии ЛНП, меченых [³H]-холестериллинолеатом. После инкубации липиды из клеток экстрагировали по методу Hara и Radin, как описано выше, а из культуральной среды – по методу Bligh и Dyer смесью хлороформ – метанол в объемном соотношении 1:2 [50]. Нейтральные липиды хроматографировали на силикагеле в системе *n*-гексан – диэтиловый эфир – уксусная кислота в объемном соотношении 75:23:2. Сканирование хроматограммы проводили при длине волны 200 нм на сканнере Shimadzu CS-930 (Shimadzu Corporation, Япония). Участки силикагеля, соответствующие свободному холестерину и эфирам холестерина соскребали и измеряли радиоактивность на сцинтилляционном счетчике 1215 Rackbeta II (LKB, Швеция).

2.18. Изучение внутриклеточного синтеза липидов

Клетки, выделенные из нормальных или пораженных атеросклерозом участков интимы аорты человека, инкубировали в течение 24 ч в присутствии 10 мкКи/мл меченого [¹⁴C]-олеата [186]. После инкубации липиды из клеток экстрагировали по методу Hara и Radin, как описано выше. Хроматографию и денситометрию липидов проводили, как описано выше. Участки силикагеля, соответствующие фосфолипидам, триглицеридам и эфирам холестерина соскребали и измеряли радиоактивность на сцинтилляционном счетчике 1215 Rackbeta II (LKB, Швеция).

2.19. Определение активности внутриклеточных ферментов

Для определения ферментативной активности АХАТ и холестеринэстеразы использовали свежевыделенные клетки из непораженных или атеросклеротических участков интимы аорты. Клетки разрушали с помощью сонификации в течение 5 сек в 10 мМ Трис-буфере (рН=7,0). Полученную суспензию очищали от взвешенных частиц путем центрифугирования при 2000 g.

Для определения активности АХАТ гомогенаты клеток инкубировали в течение 20 мин в реакционной смеси, содержащей 0,1 мКи [1-¹⁴C]-олеил-КоА (Amersham, США) в присутствии или без добавления исследуемого вещества. Реакцию останавливали добавлением смеси хлороформа и метанола (объемное соотношение 1:2). Смесь хроматографировали на силикагеле в системе *n*-гексан – диэтиловый эфир – уксусная кислота в объемном соотношении 75:23:2. Сканирование хроматограммы проводили при длине волны 200 нм на сканнере Shimadzu CS-930 (Shimadzu Corporation, Япония). Участки силикагеля, соответствующие эфирам холестерина соскребали и измеряли радиоактивность на сцинтилляционном счетчике 1215 Rackbeta II (LKB, Швеция).

Активность холестеринэстеразы измеряли аналогичным образом, используя в качестве субстрата холестерил-[1-¹⁴C]-олеат (Amersham, США) по методу Haley et al. [200].

2.20. Определение содержания липидов в крови

Содержание общего холестерина, триглицеридов и холестерина липопротеидов высокой плотности (ЛВП) в сыворотке крови определяли с помощью ферментативных наборов (Boehringer Mannheim GmbH, Германия). Измерение оптической плотности проб проводили на 8-канальном спектрофотометре “Multiscan Bichromatic”. В качестве стандартов использовали пулированную сыворотку крови, калиброванную по протоколу Федеральной системы внешней оценки качества лабораторных исследований МЗ РФ. Содержание холестерина ЛНП рассчитывали по формуле Фридевальда [192] как разницу между содержанием общего холестерина и суммой холестерина липопротеидов высокой плотности и 1/5 триглицеридов (при представлении показателей в мг/дл).

2.21. Окисляемость липопротеидов низкой плотности

Окисляемость липопротеидов низкой плотности оценивали по методике Esterbauer et al. [166]. В стеклянные пробирки, содержащие 600 мкл свежевыделенного препарата ЛНП (100 мкг/мл по белку), вносили по 60 мкл раствора исследуемого вещества и по 6 мкл 0,0001М раствора сульфата меди. Немедленно начинали измерять оптическую плотность образцов на спектрофотометре Уанаса (Уанаса, Япония) при длине волны 234 нм. Образцы инкубировали при комнатной температуре и проводили измерения оптической плотности через 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360 минут инкубации. Измерения в испытуемом образце прекращали преждевременно, если оптическая плотность начинала снижаться более чем на 10% по сравнению с предыдущим измерением, и это снижение было зафиксировано в двух последовательных измерениях. По графику изменения оптической плотности определяли время задержки индукции окисления (лаг-фазу) и скорость окисления как функцию угла наклона прямолинейного участка кривой.

2.22. Получение экстрактов исследуемых натуральных компонентов

Водные экстракты исследуемых натуральных компонентов получали с помощью ИФБ по методу Gebhardt [179]. Очистку экстракта от неполярных соединений проводили трижды равным объемом хлороформа. Анализ полученных водорастворимых и хлороформ-растворимых фракций проводили раздельно.

2.23. Тонкослойная хроматография натуральных компонентов

Фракционирование исследуемых компонентов проводили методом тонкослойной хроматографии на силикагеле Kieselgel 60 (E. Merck, Германия). Водорастворимые компоненты наносили на пластину (обычно 10 мг в пересчете на сухую массу исходного сырья) и хроматографировали дважды в системе бутанол – уксусная кислота – вода в объемном соотношении 12:3:5. Сканирование хроматограммы проводили при длине волны 290 нм на сканнере Shimadzu CS-930 (Shimadzu Corporation, Япония). Участки силикагеля, соответствующие выявленным фракциям, переносили в стеклянные пробирки, после чего фракции экстрагировали в жидкую фазу 500 мкл ИФБ. Жирорастворимые компоненты наносили на пластину (обычно 10 мг в пересчете на сухую массу исходного

сырья) и хроматографировали последовательно в двух системах: (а) хлороформ – ацетон в объемном соотношении 9:1 и (б) n-гексан – этиловый эфир – уксусная кислота в объемном соотношении 90:10:1. Сканирование проводили, как описано выше. Полученные фракции экстрагировали в жидкую фазу 500 мкл 96% этанола.

2.24. Идентификация биологически активных компонентов

Идентификацию натуральных веществ, изолированных методом тонкослойной хроматографии, проводили под руководством и при ведущем участии к.х.н. А.В. Соснова (ГосНИИОХТ, Москва) с помощью методов высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии.

2.25. Экспериментальная модель атеросклероза

Данная часть исследования с использованием экспериментальной модели атеросклероза проводилась под руководством и при ведущем участии к.м.н. И.В. Андриановой (РК НПК МЗиСР РФ, Москва). Эксперименты проводили на кроликах породы Шиншилла весом 3,0-3,5 кг в возрасте 12-15 недель, содержащихся на стандартной диете. Кроликам под нембуталовым наркозом производили криоповреждение инфраренального сегмента брюшной аорты [283]. Стенку аорты замораживали в течение 1 мин медным аппликатором, охлажденным в жидком азоте. Через 12 недель после операции животные были разделены на 3 группы. У кроликов 1-й (интактной) группы (n=5) под нембуталовым наркозом канюлировали подвздошную артерию и вскрывали нижнюю полую вену. Затем брюшную аорту промывали средой 199 с гепарином и фиксировали 2,5% глутаровым альдегидом в 0,1М какодилатном буфере (pH=7,4). Сегмент аорты, содержащий область повреждения, иссекали и использовали для морфологического исследования. Животные второй (контрольной) группы (n=12) в дополнение к стандартной диете получали 2 г холестерина (Fluca, Швейцария). Кролики третьей (опытной) группы (n=12) на фоне стандартной диеты получали 2 г холестерина и 1 таблетку «Алликор» (ИНАТ-Фарма, Россия), содержащую 300 мг чесночного порошка. Холестерин и Алликор растворяли в растительном масле и давали 1 раз в день в течение 5 недель. У животных 2 и 3 группы в начале эксперимента, а также через 12, 13 и 17 недель после операции отбирали образцы сыворотки крови для определения уровня липидов и атерогенного потенциала. Через 17 недель после криодеструкции под нембуталовым наркозом (40 мг/кг)

иссекали аорту. Участок аорты из центральной части повреждения фиксировали 2,5% раствором глутаральдегида в течение суток. Затем готовили полутонкие срезы и окрашивали их метиленовым синим. Толщину меди и интимы измеряли на полутонких срезах с помощью окуляр-микрометра в световом микроскопе Opton-3 (Karl Zeiss, Германия). Нефиксированную часть интимального утолщения использовали для биохимических исследований. Интиме механически отделяли от меди. Липиды экстрагировали смесью хлороформ:метанол (2:1) и последовательно разделяли методом тонкослойной хроматографии в двух системах растворителей: (а): бензол – диэтиловый эфир – этанол – уксусная кислота в объемном соотношении 50:40:2:0.2 и (б) петролейный эфир – диэтиловый эфир – уксусная кислота в объемном соотношении 90:10:1. Фосфолипиды, триглицериды, свободный и этерифицированный холестерин измеряли денситометрически при длине волны 290 нм на сканнере Shimadzu CS-930 (Shimadzu Corporation, Япония). Коллаген в неоинтима определяли по содержанию оксипролина [31]. Клетки из фиксированной интимы для подсчета выделяли методом спиртово-щелочной диссоциации [45].

2.26. Клинико-лабораторное исследование по оценке прямого антиатерогенного действия «Алликор» в модели ex vivo

Оценку прямого антиатерогенного действия препарата пролонгированного действия на основе чеснока «Алликор» (ИНАТ-Фарма, Россия) проводили в экспериментах ex vivo у добровольцев, не имеющих явных клинических проявлений атеросклероза, у которых при скрининговом исследовании была выявлена атерогенность сыворотки крови, то есть способность сыворотки крови вызывать достоверное накопление холестерина в культуре нормальных клеток аорты человека за 24 часа инкубации. В общей сложности в исследованиях принимало участие 46 добровольцев, преимущественно мужчин. Добровольцам за день до начала и в день исследования разрешалось принимать обезжиренную пищу, безалкогольное питье. Кровь в количестве 5 мл забирали из локтевой вены в сухую пластиковую пробирку непосредственно перед приемом препарата, а также через соответствующее время после приема препарата. Атерогенность сыворотки крови определяли одновременно во всех образцах сыворотки, полученной от одного человека. Антиатерогенный эффект препаратов в экспериментах ex vivo оценивали на клеточной модели с использованием

первичной культуры моноцит-макрофагов крови человека, как описано в разделе «Материалы и методы». Атерогенность сыворотки крови оценивалась по ее способности вызывать достоверное, по сравнению с контролем, накопление внутриклеточного холестерина.

2.27. Клиническое исследование по влиянию препарата «Kwai» на биохимические факторы сердечно-сосудистого риска и атерогенность сыворотки крови

Двойное слепое рандомизированное плацебо-контролируемое исследование по влиянию препарата «Kwai» на основные биохимические факторы сердечно-сосудистого риска и показатели атерогенности сыворотки крови было проведено на 23 добровольцах, не имеющих явных клинических проявлений атеросклероза (мужчины в возрасте от 40 до 64 лет), у которых при скрининговом обследовании был выявлен повышенный риск сердечно-сосудистых заболеваний и высокий атерогенный потенциал сыворотки крови. 12 человек получали плацебо, 11 человек получали препарат «Kwai» (Lichtwer Pharma GmbH, Германия) в дозе 900 мг в сутки). Исследование соответствовало требованиям, предъявляемым стандартом качественных клинических испытаний (Good Clinical Practice, GCP) к исследованиям фазы I и II. Длительность исследования составила 4 недели. Взятие крови для биохимического анализа проводили еженедельно. Липопротеиды низкой плотности (ЛНП) (1,019-1,063 г/мл) выделяли из сыворотки крови с помощью препаративного ультрацентрифугирования, как описано выше. Время задержки индукции окисления ЛНП определяли по методу Esterbauer et al. [166]. Содержание липидов в сыворотке крови определяли ферментативным колориметрическим методом с использованием наборов Boehringer Mannheim, как описано выше.

2.28. 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 [349]. Обследование

проводили в положении лежа после 15-минутного отдыха. Все измерения проводили последовательно в течение одной сессии. Процедуру сканирования записывали на видеоманитофон 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, противолежащем 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.

2.29. Пилотное клиническое исследование по оценке прямого антиатеросклеротического действия препарата «Алликор»

В проспективном открытом исследовании по влиянию длительного приема препарата «Алликор» на толщину интимо-медиального слоя сонных артерий приняли участие 28 мужчин в возрасте от 46 до 58 лет (средний возраст 52 ± 3 года) с нормолипидемией или умеренной гиперлипидемией, без клинических признаков ИБС. При ультразвуковом исследовании сонных артерий в В-режиме, проводимого по вышеописанной методике, у них было выявлено диффузное интимальное утолщение (без возвышающихся поражений), которое определяли по толщине интимо-медиального слоя задней стенки дистального отрезка общей сонной артерии свыше 0,70 мм хотя бы в одной артерии. Участники исследования не имели хронических заболеваний, требующих постоянного приема вазоактивных, мочегонных, липидснижающих или антидиабетических препаратов. 16 участников исследования получали Алликор по 1 таблетке 2 раза в день с интервалом между приемами около 12 часов (600 мг/сут). 12 участников исследования составили контрольную группу. Ультразвуковое сканирование сонных артерий проводили ежеквартально. Длительность наблюдения составила 12 месяцев. Данное исследование проводили в сотрудничестве с НИИ хирургии им. А.В. Вишневского.

2.30. 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 человек. 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 общих сонных артерий, то есть 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) приема 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 атерогенности сыворотки крови 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 ультразвуграфию 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 недель до включения в исследование, один раз в три месяца в течение первого года наблюдения, один раз в 6 месяцев в течение второго года наблюдения, и трижды в течение 1-3 недель 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.

2.31. Методология проведения заочного эпидемиологического обследования.

В заочном эпидемиологическом исследовании по определению влияния приема Алликора на показатели заболеваемости и смертности принимало участие 3429 человек, жителей Москвы в возрасте старше 50 лет, которые самостоятельно принимали Алликор и дали согласие на регулярное интервью. Среди них было 1257 мужчин, средний возраст составил $65,6 \pm 0,3$ года (от 50 до 91 года), и 2172 женщины, средний возраст составил $65,3 \pm 0,2$ года (от 50 до 97 лет). Интервьюирование проводили по телефону 1 раз в 3 месяца с использованием специально разработанной анкеты опроса. Учитывали переносимость препарата, отмеченные побочные реакции и явления, субъективную оценку оздоровительного эффекта, перенесенные за предшествующие 3 месяца заболевания, а также смертность. По этическим причинам в случае наступления смерти не пытались выяснить причину смерти у родственников. Заочное наблюдение вели в течение 1 года после включения в исследование.

2.32. Методология проведения массовой оздоровительной программы по профилактике сердечно-сосудистых и острых респираторных вирусных заболеваний.

В марте-июне 2002 г. силами участковых врачей и медицинских сестер центральной районной больницы г. Путивля (Сумская обл., Украина) был проведен опрос жителей города о согласии на добровольное участие в оздоровительной программе по профилактике сердечно-сосудистых и респираторно-вирусных заболеваний. Было опрошено более 10000 жителей. Внедрение и проведение программы проводилось при поддержке районной администрации и местных средств массовой информации. С июня 2002 г. началось включение жителей в программу, которое продолжалось до конца 2002 г. Жители города, давшие согласие на участие в программе, получили на руки препарат «Алликор» (таблетки пролонгированного действия, содержащие 150 мг чесночного порошка) и принимали его по 1 таблетке 2 раза в день не менее 12 месяцев. Жители города, отказавшиеся от участия в программе, составили контрольную группу. В период с 1 июня 2002 г. по 31 декабря 2003 г. в рамках оздоровительной программы под наблюдением находилось 9574 человека, из них 4413 человек (46,1%) дали согласие на прием Алликора, и остальные 5161 человек (53,9%) составили контрольную группу. В течение периода наблюдения с момента включения до 31 декабря 2003 г. из основной группы выбыли 232 человека, что составило 5,3% от основной группы.

Для учета заболеваемости использовали данные амбулаторных поликлинических карт, а также данные, полученные методом опроса. Сбор сведений о заболеваемости проводили 1 раз в 3 месяца. Для учета использовали специально разработанные формы. Учитывали следующие показатели: факт заболевания, дату заболевания, диагноз, длительность заболевания (временной нетрудоспособности), необходимость обращения за врачебной помощью, необходимость госпитализации. Полученные данные были сведены в единую электронную базу данных. Дополнительные данные о заболеваемости и смертности в Путивльском районе были получены из официальных годовых статистических отчетов 2001-2003 гг.

2.33. 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 или парный t -тест. Для сравнения распределений номинальных показателей и категориальных величин использовали показатель хи-квадрат 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. Данные для непрерывных величин представляли в виде среднего арифметического значения с указанием стандартной ошибки.

Глава 3.

Разработка подходов к антиатеросклеротической терапии: результаты собственных исследований

3.1. Лабораторные исследования

3.1.1. Клеточные модели атерогенеза

3.1.1.1. Модель in vitro

Выделение и культивирование клеток из субэндотелиального слоя интимы аорты человека проводили, как описано в разделе «Материалы и методы». Полученную первичную культуру клеток различали по источнику выделения: клетки, выделенные из непораженных участков интимы, и клетки, выделенные из участков, пораженных атеросклерозом (жировые полосы, липофиброзные бляшки). Иммуноцитохимическая и биохимическая характеристика первичных культур клеток интимы аорты человека подробно изложена ниже в разделе «Адекватность клеточных моделей».

Культуру клеток, выделенных из непораженных атеросклерозом участков интимы аорты, использовали для определения атерогенности сыворотки крови (ее способности вызывать накопление внутриклеточного холестерина), для воспроизведения основных проявлений атеросклероза (липоидоза, пролиферации и фиброза) на клеточном уровне, для оценки антиатерогенного действия исследуемых веществ *in vitro* (прямое подавление клеточных проявлений атеросклероза), а также для мониторинга изменений атерогенного потенциала сыворотки крови при терапевтических воздействиях.

3.1.1.2. Модель ex vivo

Выделение и культивирование клеток из субэндотелиального слоя интимы аорты человека проводили, как описано в разделе «Материалы и методы». В модели *ex vivo* использовали первичную культуру клеток, выделенных из непораженных атеросклерозом участков интимы аорты.

Данную модель использовали для оценки антиатерогенного потенциала различных веществ (а также их активных метаболитов) после усвоения, распределения и биотрансформации в организме человека, то есть для получения

специфических фармакодинамических характеристик. В скрининговых и пилотных исследованиях с использованием модели *ex vivo* принимали участие здоровые добровольцы, не имеющие признаков клинических проявлений атеросклероза или системных воспалительных заболеваний, у которых, тем не менее, при первичном обследовании в модели *in vitro* была выявлена атерогенность сыворотки крови – способность сыворотки крови вызывать накопление липидов в культивируемых клетках. У участников исследования брали кровь непосредственно перед приемом исследуемого вещества, а также через различные интервалы времени после его приема внутрь. Получение сыворотки крови и определение ее атерогенного потенциала проводили, как описано в разделе «Материалы и методы».

3.1.2. Адекватность клеточных моделей

Для решения вопроса об адекватности используемых в работе клеточных моделей было проведено иммуноцитохимическое типирование клеток и определение содержания внутриклеточных липидов.

Иммуноцитохимическую идентификацию клеток в первичных культурах из непораженных и атеросклеротических участков интимы аорты человека с помощью антител против различных клеточных типов (гладкомышечных, макрофагов, перицитов) проводили на 7-й день культивирования.

Во всех исследованных культурах большая часть клеток экспрессировала гладкомышечный α -актин. По долевого содержанию гладкомышечных клеток культуры, полученные из пораженных и непораженных атеросклерозом участков субэндотелиального слоя интимы, существенно не различались. Так, в культуре из непораженных участков количество таких клеток составляло $90 \pm 7\%$, в клетках, выделенных из жировой полосы – $78 \pm 16\%$, в клетках, выделенных из липофиброзной бляшки – $78 \pm 12\%$. Во всех типах первичных культур были выявлены клетки, положительно окрашенные антителами 3G5 против антигена *о*-сиалоганглиозида, свойственного перицитам. Морфологически эти клетки представляли собой крупные, хорошо распластанные клетки полигональной формы. Доля клеток, экспрессирующих этот антиген, достигала 50% в культурах из непораженных участков (среднее значение $46 \pm 11\%$) и значительно уменьшалась в клетках, выделенных из атеросклеротических поражений – до $17 \pm 3\%$ в жировой полосе ($p < 0,05$) и $8 \pm 2\%$ в липофиброзной бляшке ($p < 0,05$).

Двойное иммуноцитохимическое окрашивание с помощью антител к 3G5 антигену и к гладкомышечному α -актину позволило установить, что часть 3G5-положительных клеток экспрессирует также и антиген гладкомышечных клеток. Также в культурах клеток был идентифицирован и другой антиген перицитов - 2A7. Доля таких клеток в культурах, полученных из нормальных участков интимы аорты, составляла $24 \pm 10\%$, а в липофиброзной бляшке была ниже и составляла $9 \pm 2\%$ ($p < 0,05$). Первичные культуры интимоцитов содержали также клетки, сходные с моноцитами периферической крови и положительно окрашиваемые антителами CD14 (антиген клеток моноцитарно-макрофагальной дифференцировки) и CDLC (общий антиген лейкоцитов). Соответственно, эти элементы были идентифицированы как гематогенные клетки. Их доля в культурах из нормальных участков интимы аорты составляла в среднем $4 \pm 1\%$, а в культурах из атеросклеротических поражений возрастала до $7 \pm 1\%$ в жировых полосах ($p < 0,05$) и $13 \pm 3\%$ в липофиброзных бляшках ($p < 0,05$). В первичных культурах из нормальных и атеросклеротических участков интимы аорты человека были выявлены также клетки, экспрессирующие антиген макрофагов CD68. В норме их содержание составляло $5 \pm 1\%$, а в поражениях возрастало до $15 \pm 2\%$ в жировой полосе ($p < 0,05$) и $14 \pm 3\%$ в липофиброзной бляшке ($p < 0,05$). Соответственно, по содержанию CD68-положительных клеток культуры из разных типов атеросклеротических поражений между собой достоверно не различались. С помощью двойного иммуноцитохимического окрашивания было установлено, что часть клеток, содержащих CD68-положительные гранулы, экспрессируют также гладкомышечный α -актин.

Содержание липидов в первичных культурах клеток, выделенных из различающихся по степени поражения участков интимы аорты человека, было охарактеризовано следующим образом.

В культуре из нормальных участков интимы аорты содержание свободного холестерина составляло 10 ± 3 мкг/мг клеточного белка, эфиров холестерина – 10 ± 4 мкг/мг, триглицеридов – 8 ± 3 мкг/мг, фосфолипидов – 85 ± 7 мкг/мг. Общее содержание липидов составляло от 80 до 130 мкг/мг клеточного белка, в среднем 115 ± 17 мкг/мг. Весовое содержание общего холестерина, триглицеридов и фосфолипидов составляло приблизительно 17%, 7% и 76%.

В культуре из жировой полосы содержание свободного холестерина составляло 15 ± 2 мкг/мг клеточного белка, эфиров холестерина – 40 ± 7 мкг/мг,

триглицеридов – 12 ± 4 мкг/мг, фосфолипидов – 95 ± 17 мкг/мг. Общее содержание липидов составляло от 120 до 200 мкг/мг клеточного белка, в среднем 160 ± 20 мкг/мг. Весовое содержание общего холестерина, триглицеридов и фосфолипидов составляло приблизительно 35%, 5% и 60%.

В культуре из липофиброзной бляшки содержание свободного холестерина составляло 25 ± 4 мкг/мг клеточного белка, эфиров холестерина – 55 ± 10 мкг/мг, триглицеридов – 15 ± 4 мкг/мг, фосфолипидов – 135 ± 24 мкг/мг. Общее содержание липидов составляло свыше 180 мкг/мг клеточного белка, в среднем 230 ± 35 мкг/мг. Весовое содержание общего холестерина, триглицеридов и фосфолипидов составляло, как и в жировой полосе, приблизительно 35%, 5% и 60%.

Нами было проведено дополнительное исследование возможности использования другой клеточной модели, а именно, первичной культуры моноцитов-макрофагов крови человека, для оценки некоторых клеточных параметров атерогенеза. Мы измерили атерогенный потенциал сыворотки крови (индуцированное накопление внутриклеточного холестерина), полученной от 18 пациентов, в первичной культуре клеток, выделенных из нормальных участков интимы аорты человека, и в культуре моноцит-макрофагов крови человека. Были получены сравнимые показатели, и коэффициент корреляции между двумя способами измерений составил 0,92 ($p=0,011$). Таким образом, мы установили, что культуру моноцитов-макрофагов крови человека допустимо использовать при серийных измерениях атерогенных свойств сыворотки крови, как более доступную и достаточно информативную.

3.1.3. 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.

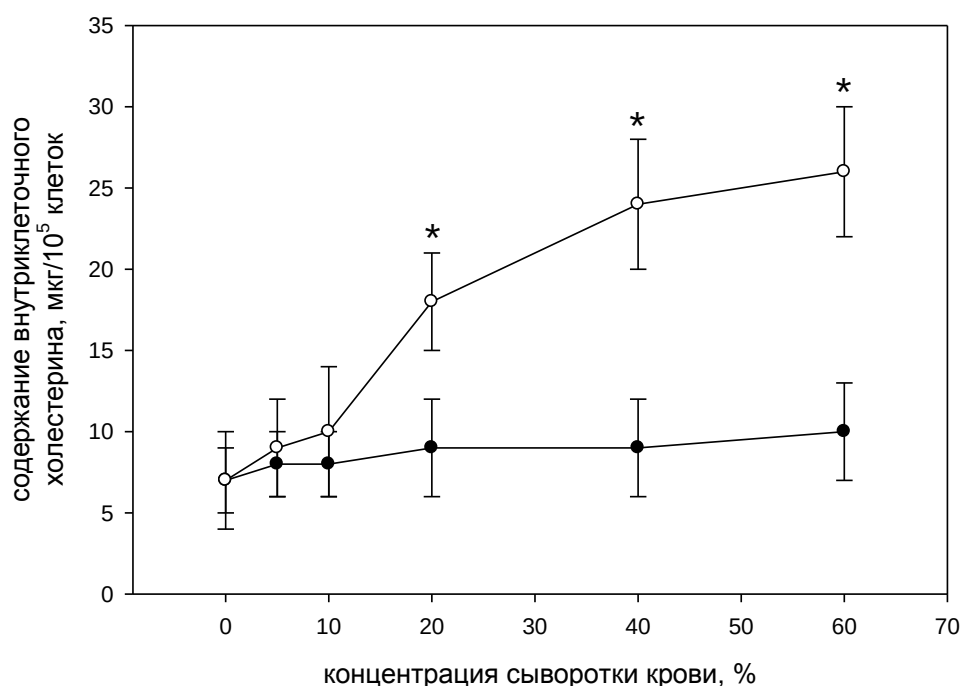


Рис. 1. Накопление внутриклеточного холестерина, индуцированного сывороткой крови человека.

● – сыворотка крови здорового человека; ○ – сыворотка крови больного атеросклерозом. * - достоверное увеличение содержания внутриклеточного холестерина, $p < 0,05$.

На рисунке 1 представлена зависимость содержания общего холестерина в культивируемых клетках после 24 часов 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.

Свойство сыворотки крови человека (или ее компонентов) вызывать накопление внутриклеточного холестерина было названо «атерогенностью», или «атерогенным потенциалом». 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. В качестве иллюстрации этого комплексного атерогенного воздействия сывороток крови больных атеросклерозом мы приводим данные ограниченного клинко-биохимического исследования.

Была взята кровь у 6 больных ИБС с ангиографически документированным коронарным атеросклерозом и 6 здоровых доноров (лиц, не имевших признаков ИБС). Атерогенность сыворотки крови оценивали по ее способности вызывать накопление холестерина в культивируемых интимальных клетках. В таблице 1 приведены основные клинко-биохимические характеристики участников исследования.

При подборе лиц для участия в данном исследовании были исключены больные с исходно неатерогенными сыворотками больных и здоровые лица с исходно атерогенными сыворотками. Таким образом, для изучения были оставлены наиболее типичные случаи. Средний возраст больных несколько превосходил средний возраст здоровых доноров, но это различие не было достоверным. Среднее содержание холестерина в сыворотках больных и здоровых доноров было одинаковым, в то время как среднее содержание триглицеридов в сыворотках больных было на 16% выше чем содержание триглицеридов в сыворотках здоровых доноров (статистически незначимое различие, $p > 0,05$). По липидным показателям участники исследования могут быть охарактеризованы как нормолипидемики.

Сыворотки крови больных ИБС за 24 часа инкубации с клетками вызывали в среднем 2,5-кратное увеличение внутриклеточного общего холестерина. Сыворотки от различных больных различались по способности вызывать накопление холестерина - увеличение содержания холестерина в клетках колебалось от 1,8- до 3,6-кратного. В то же время, ни у кого из здоровых доноров сыворотка крови не вызывала статистически значимого накопления внутриклеточного холестерина.

В следующих экспериментах было оценено влияние сывороток крови на комбинацию атеросклеротических параметров, а именно, на содержание внутриклеточного холестерина, пролиферативную активность и синтез белка.

Таблица 1

Клинико-биохимические характеристики участников исследования по комплексной оценке атерогенных свойств сыворотки крови

Клиническая характеристика				Биохимическая характеристика		
Пол	Воз- раст	ИБС	Количе- ство пора- женных сосудов	Холесте- рин, мг/дл	Триглице- риды, мг/дл	Атероген- ность, % от контроля
М	51	+	3	195	139	232±17*
М	39	+	3	222	103	331±15*
М	38	+	1	234	66	175±12*
М	33	+	2	220	112	191±11*
М	55	+	2	201	75	205±13*
М	48	+	3	231	125	362±28*
	44±4			217±6	103±11	249±32*
М	35	-	н.д.	207	95	107±8
Ж	39	-	н.д.	235	78	112±10
М	41	-	н.д.	231	105	103±6
Ж	44	-	н.д.	189	73	115±11
М	32	-	н.д.	231	91	98±11
М	28	-	н.д.	219	89	117±9
	37±2			219±7	89±5	109±32

Участники 1-6 – больные ИБС с ангиографически документированным атеросклерозом коронарных артерий, участники 7-12 – добровольцы без клинических признаков ИБС. Данные по атерогенности сыворотки крови представлены как содержание внутриклеточного холестерина после 24-часовой инкубации с сыворотками крови, уровень холестерина в контрольных клетках принят за 100%. н.д. – нет данных коронароангиографии; * - достоверное накопление холестерина в клетках, $p < 0,05$.

Культивирование интимальных клеток с атерогенными сыворотками от больных ИБС во всех исследованных случаях усиливало синтез общего белка (в среднем в 2,5 раза) и повышало пролиферативную активность (в среднем в 3 раза) (Таблица 2). Культивирование интимальных клеток с неатерогенными сыворотками от здоровых доноров умеренно (в среднем в 1,3 раза) повышало

пролиферативную активность (только в одном случае это увеличение было достоверным) и незначительно влияло на синтез общего белка (увеличение синтеза было достоверным также только в одном случае). Таким образом, по сравнению с клетками, культивируемыми в присутствии фетальной телячьей сыворотки, перечисленные показатели при культивировании клеток с атерогенными сыворотками были несколько выше. Атерогенные и неатерогенные сыворотки отличались по способности увеличивать синтез общего белка и повышать 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.

3.1.4. 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 клиничко-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 атерогенность сыворотки крови, среднее накопление холестерина в клетках составило $170 \pm 6\%$ от контроля. Остальные 56 сывороток (41%) были неатерогенны. Среднее значение атерогенности сыворотки крови 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 атерогенность сыворотки крови, среднее накопление холестерина в клетках составило $184 \pm 9\%$ от контроля. Остальные 20 сывороток (44%) были неатерогенны. Среднее значение атерогенности сыворотки крови во всей группе составило $158 \pm 11\%$.

В собственном скрининговом исследовании мы оценили атерогенный потенциал сыворотки крови у 173 мужчин, имевших бессимптомный каротидный атеросклероз, выявленный при ультразвуковом исследовании, характеризовавшихся нормальным или умеренно повышенным содержанием холестерина в крови (до 6,0 ммоль/л). У 132 человек (76%) была выявлена атерогенность, индуцированное сывороткой крови накопление холестерина в клетках из непораженной интимы аорты человека составило в среднем $175 \pm 8\%$ от контроля. Остальные сыворотки (41 образец, или 34% случаев) были неатерогенны. Среднее значение атерогенности сыворотки крови во всей группе составило $158 \pm 6\%$.

Таблица 2

Влияние сывороток крови на атеросклеротические параметры субэндотелиальных клеток, культивируемых из непораженной интимы аорты человека

	Содержание внутриклеточного холестерина, мкг/мг клеточного белка	Включение [^3H]- тимидина, dpm/мг клеточного белка	Включение [^{14}C]- лейцина, dpm/мг клеточного белка
Контроль	55±6	96±11	363±13
1.	208±15*	452±42*	1422±94*
2.	172±13*	234±19*	606±52*
3.	161±14*	240±18*	705±32*
Атерогенные сыворотки	180±14*	308±72*	911±257*
7.	64±13	165±13*	337±11
8.	55±7	107±9	423±28*
9.	58±1	125±12	405±22
Неатерогенные сыворотки	59±3#	132±17#	388±26#

Участники 1-3 – больные ИБС с ангиографически документированным атеросклерозом коронарных артерий, участники 7-9 – добровольцы без клинических признаков ИБС. Номера участников соответствуют приведенным в таблице 1. Данные по атерогенности сыворотки крови представлены как абсолютное содержание внутриклеточного холестерина после 24-часовой инкубации с сыворотками крови.

* - достоверное изменение показателя по сравнению с контролем, $p < 0,05$;

- достоверное отличие средних показателей между атерогенными и неатерогенными сыворотками, $p < 0,05$.

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 мета-анализа частоты выявления атерогенности сыворотки крови представлены в таблице 3.

У здоровых лиц, не имеющих факторов риска ИБС, атерогенность сыворотки крови 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.

Анализ сопряженности атерогенности сыворотки крови 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 атерогенности сыворотки крови 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; $p<0,05$), 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%), прогностичность 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 атерогенности сыворотки крови и атеросклероза с клиническими проявлениями дает еще более высокую сопряженность этих параметров ($\chi^2=92,35$; $p<0,0005$). При выявлении атерогенности сыворотки крови 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.

Таблица 3

Мета-анализ 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
Пациенты с гиперлипидемией (факторы риска ИБС, субклинический атеросклероз) (США)	138	82 (59%)	143±8
Пациенты без факторов риска с подтвержденным субклиническим атеросклерозом	58	38 (66%)	158±11

(Финляндия)			
Пациенты с подтвержденным субклиническим атеросклерозом (Россия)	178	132 (76%)	158±6
Больные сахарным диабетом 2 типа (фактор риска ИБС, предположительно имеется субклинический атеросклероз) [65]	77	68 (88%)	227±9
Итоговые результаты по группе «субклинический атеросклероз»	451	320 (71%)	165±4
Больные ИБС с сонографически подтвержденным атеросклерозом (Россия)	46	36 (78%)	144±8
Больные ИБС с ангиографически подтвержденным атеросклерозом [34]	68	63 (92%)	297±34
Итоговые результаты по группе «атеросклероз с клиническими проявлениями»	112	99 (88%)	227±14

Тем не менее, при сравнении частоты выявления атерогенности сыворотки крови 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%), прогностичность 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 атерогенности сыворотки крови у здоровых лиц и больных субклиническим и клиническим атеросклерозом, они говорят о том, что атерогенность сыворотки крови 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.

3.1.5. Изучение лекарственных и нелекарственных средств в отношении антиатеросклеротической и антиатерогенной активности

Первичная культура клеток аорты человека была использована в качестве модели для выявления прямого антиатеросклеротического и антиатерогенного действия холестеринснижающих 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 Roger GmbH, Германия) внутривенно ежедневно в течение 14 дней, а затем липостабил-форте по 6 капсул ежедневно в течение 6 месяцев. 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.

Таблица 4

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*

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, $p < 0,05$.

Семь больных ИБС с гиперхолестеринемией (на фоне соблюдения гиполипидемической 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 месяцев. Кровь для анализа атерогенности брали при включении пациентов в исследование и по окончании исследования.

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 таблице 4.

Ловастатин и ингибиторы АХАТ не влияли на содержание холестерина в клетках, выделенных из атеросклеротической бляшки. Липостабил достоверно

снижал содержание холестерина в таких клетках, то есть 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. Результаты представлены в таблице 5.

Все исследованные вещества обладали антиатерогенным действием *in vitro*, то есть при совместном культивировании с атерогенной сывороткой, достоверно снижали индуцированное накопление холестерина. При этом липостабил полностью устранял атерогенный эффект сыворотки крови больных ИБС,

Для выявления антиатерогенного эффекта *ex vivo* были использованы клетки, культивируемые из непораженной интимы и сыворотка крови больных, принимавших липостабил или плацебо. Атерогенность сыворотки крови оценивалась как прирост холестерина в клетках сверх контрольного уровня. Изначальная атерогенность сыворотки крови, взятой до лечения, была принята за 100%.

Спустя 2 недели внутривенного введения липостабила атерогенность сыворотки крови в среднем была сравнима с атерогенностью сыворотки крови больных, которым вводили плацебо и не отличалась значимо от исходной атерогенности. Значимых различий не было выявлено и между средними значениями исходной атерогенности сыворотки, а также сыворотки крови больных по окончании 6-месячной терапии липостабила или приема плацебо. Наблюдалась лишь некоторая тенденция к снижению атерогенности сыворотки крови 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 месяцев 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*.

Таблица 5

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

Препарат	Содержание внутриклеточного холестерина, мкг/мг клеточного белка
Контроль	32 ± 3
Атерогенная сыворотка (АС)	$64 \pm 4^*$
АС + Ловастатин	$50 \pm 4^{* \#}$
АС + CI-976	$48 \pm 2^{* \#}$
АС + CL-277082	$46 \pm 3^{* \#}$
АС + DuP-128	$51 \pm 3^{* \#}$
АС + Липостабил	$37 \pm 3^{\#}$

Клетки из непораженных 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 накопление внутриклеточного холестерина под действием атерогенной сыворотки крови, $p < 0,05$;

- достоверное подавление индуцированного накопления внутриклеточного холестерина, $p < 0,05$.

В отличие от липостабила, антиатерогенный эффект *ex vivo* был выявлен у больных, которые в течение 6 месяцев принимали ловастатин. Сыворотка крови всех больных изначально была атерогенной и вызывала существенное увеличение содержания внутриклеточного холестерина при инкубации с клетками

непораженной интимы. Спустя 6 месяцев лечения ловастатином атерогенность сыворотки резко упала у всех больных. Это означает, что ловастатин обладает прямым антиатерогенным действием, проявляемым *ex vivo*.

Антиатерогенный и антиатеросклеротический эффекты синтетических ингибиторов АХАТ в модели *ex vivo* в клинических исследованиях не изучали.

Предотвращение перегрузки клеток холестерином или стимуляция оттока избыточного холестерина из клеток представляются важными для торможения развития атеросклеротического 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 этерификации холестерина, попавшего в клетку в виде богатых эфирами холестерина липопротеидов низкой плотности. 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 пенистую. 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 липостабилем 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 [114]. 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.

Следующими классами препаратов, изученными на предмет выявления антиатеросклеротических и антиатерогенных свойств, стали антагонисты кальция, бета-блокаторы и нитраты, как наиболее часто использующиеся в терапии больных ИБС.

Прямое антиатеросклеротическое действие одного из представителей класса антагонистов кальция – верапамила было исследовано в первичной культуре клеток, выделенных из липофиброзной бляшки интимы аорты человека. Результаты исследования представлены в таблице 6.

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.

Таблица 6

Антиатеросклеротические эффекты верапамила в модели *in vitro*

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

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.

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. Результаты представлены в таблице 7.

Все антагонисты кальция *in vitro* снижали содержание холестерина в клетках из атеросклеротической бляшки и снижали пролиферативную активность, то есть обладали антиатеросклеротическими свойствами.

Эти эффекты свойственны антагонистам кальция как классу лекарственных препаратов. Бета-блокаторы, напротив, обладали проатеросклеротическим действием, то есть 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. Последние две группы препаратов не представляли интереса для дальнейшего изучения.

Таблица 7

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 [³ H]- 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
* - достоверное снижение показателей по сравнению с контролем, p<0,05;			
# - достоверное повышение по сравнению с контролем, p<0,05.			

Далее антиатеросклеротические эффекты верапамила были изучены в модели *ex vivo*. Здоровые добровольцы (8 человек), мужчины в возрасте 40-46 лет, нормолипидемики, 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. Результаты представлены в таблице 8.

Таблица 8

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 *
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, $p < 0,05$.	

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 таблице 9.

Таблица 9

Антиатерогенное действие верапамила <i>ex vivo</i> 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 #
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, $p < 0,05$.	

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 исследование были включены 20 больных ИБС в сочетании с гипертонической болезнью. На основании измерений исходной атерогенности сыворотки крови были сформированы 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 выше 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 атерогенности сыворотки крови 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, то есть 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).

Таблица 10

Антиатеросклеротические эффекты биологически активных веществ
растительного происхождения в первичной культуре клеток из пораженной
атеросклерозом интимы аорты человека

Вещество	Содержание внутриклеточного			Включение [¹⁴ C]-лейцина,		
	холестерина, % от контроля			% от контроля		
	Концентрация, М					
	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴
Биоханин А	128±14	131±10	51±9 *	н.д.	н.д.	н.д.
Циннарозид	87±5	48±6 *	35±6 *	н.д.	н.д.	н.д.
Формононетин	97±8	101±11	104±9	н.д.	н.д.	н.д.
Оробол	123±15	105±12	96±8	н.д.	н.д.	н.д.
Ононин	94±3	104±4	105±5	96±2	101±4	114±3
Гиспидулин	90±6	98±3	токс.	94±7	70±2 *	токс.
Хризозериол	98±2	90±5	70±3 *	101±4	102±5	97±4
Хапложид С	101±4	86±8	88±8	102±5	103±6	96±4
Трицитен	94±4	86±4 *	85±3 *	98±8	94±8	85±3 *
Генисин	102±3	95±5	84±3 *	94±8	93±10	97±4
Лютеолин	97±7	98±8	токс.	100±7	94±7	токс.
Термопсозид	102±6	99±7	токс.	95±4	87±10	токс.
Кемпферол	143±4 #	153±5 #	токс.	156±8 #	98±5	токс.
Вексибидин	140±5 #	160±10 #	токс.	171±9 #	82±7 *	токс.
Вексбинол	107±	150±8 #	токс.	117±14	120±11	токс.
Пиноцембрин	137±10 #	197±12 #	228±16 #	143±6 #	117±7 #	67±6 *
Кверцетин	92±7	76±2 *	56±4 *	80±5 *	42±2 *	19±4 *
Мирицетин	102±5	100±7	86±2 *	105±6	92±8	90±2
Галангин	96±7	98±5	токс.	94±8	88±6 *	токс.
Морин	126±8 #	134±4 #	124±5 #	131±5 #	127±7 #	50±6 *
Глабранин	107±9	104±8	токс.	95±8	82±3 *	токс.
Изооринтин	96±8	92±5	82±3 *	91±2 *	86±3 *	66±6 *

Таблица 10 (окончание)

Сверцизин	95±3	86±3 *	72±5 *	93±6	88±6 *	74±8 *
Лемонин	89±9	71±7 *	72±5 *	72±5 *	57±5 *	49±2 *
Аллицин	78±5 *	76±6 *	79±6 *	88±3 *	74±3 *	68±5 *
Бетаин	93±2	90±3	56±5 *	94±7	82±3 *	34±4 *
Глицирризин	95±3	97±6	65±5 *	92±7	81±2 *	55±5 *
Карвакрол	91±4	90±8	57±5 *	88±5	68±4 *	24±2 *
Лютеин	90±6	87±5	68±2 *	78±3 *	76±5 *	47±5 *
Генистеин	92±5	83±2 *	60±4 *	78±8 *	73±5 *	55±2 *
Пеонол	103±4	101±8	99±3	90±4	99±3	88±4 *

Данные представлены в виде средних результатов трех независимых экспериментов. Содержание холестерина в контроле составляло от 85±5 до 153±10 мкг/мг, включение меченого лейцина – от 602±38 до 1028±69 dpm/мг клеточного белка.

н.д. – нет данных

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

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

Следующим этапом исследования явился скрининг биологически активных веществ из натуральных растительных источников на предмет выявления антиатеросклеротических и/или антиатерогенных свойств с использованием клеточных моделей.

Было изучено влияние 31 биологически активных веществ растительного происхождения (главным образом, флавоноидов) на атеросклеротические индексы в первичной культуре клеток, выделенных из атеросклеротических участков интимы аорты человека. Оценивали влияние субстанций на содержание внутриклеточного холестерина и синтетическую активность клеток в модели *in vitro*. Результаты исследования представлены в таблице 10.

Эффекты веществ изучали в концентрациях 10^{-6} - 10^{-4} М. Большинство веществ не проявляли цитотоксического действия в условиях культуры клеток, о чем судили по морфологии культивируемых клеток, включению трипанового синего и абсолютному содержанию клеточного белка. Восемь веществ оказались цитотоксичными при использовании в наивысшей концентрации.

Из всех исследованных биологически активных веществ 8 оказались

цитотоксичными в концентрации 10^{-4} М, из которых 3 (кемпферол, вексидин и вексибинол) были проатерогенны, то есть вызывали дополнительное накопление холестерина в клетках и усиливали пролиферативную активность. Из оставшихся 23 веществ проатерогенным действием обладали морин и пиноцембрин. Четыре вещества во всех исследованных концентрациях не влияли на атеросклеротические индексы.

Для дальнейших исследований определенный интерес представляли следующие биологически активные вещества: биоханин А, циннарозид, хризозеиол, трицитен (трицитен-3-*о*-бета-D-глюкозид), генисин, кверцетин, мирицетин (мирицетин-3-глюкозид), изооринтин, сверцизин, лемонин, аллицин, бетаин, глицирризин, карвакрол, лютеин, генистеин, пеонол. Критерием отбора служило проявление антиатеросклеротического эффекта (снижение содержания внутриклеточного холестерина и/или снижение пролиферативной активности клеток) хотя бы в одной из испытанных концентраций.

Был проведен поиск по фитохимической и этноботанической базе данных [160, 161] с целью идентификации растений, содержащих данные биологически активные вещества в достаточном количестве. Для дальнейшего скрининга были выбраны следующие растения и натуральные компоненты (из доступных для исследования): спирулина (*Spirulina platensis*), лук (*Allium cepa*), свекла (*Beta vulgaris*), проростки пшеницы (*Triticum vulgaris*), солянка холмовая (*Salsola collina*), солодка гладкая (*Glycyrrhiza glabra*), чеснок (*Allium sativum*) и экстракт из хвои сосны (*Pinus sylvestris*).

Все растения и натуральные компоненты были изучены в отношении антиатерогенной активности в модели *ex vivo*, как описано в разделе «Материалы и методы». В скрининговых исследованиях принимали участие добровольцы (группы из 4-8 человек, мужчин и женщин в возрасте 45-60 лет), у которых имелась атерогенность сыворотки крови. Оценивали влияние однократного приема исследуемого натурального продукта на атерогенность сыворотки крови.

Результаты оценки антиатерогенного эффекта спирулины в модели *ex vivo* после однократного приема порошка из сушеной водоросли в капсулах (300 мг) представлены на рисунке 2. В исследовании принимали участие 6 добровольцев (3 мужчины, 3 женщины, средний возраст 54 ± 3 года), у которых сыворотка крови вызывала 1,3-1,8-кратное повышение содержания холестерина в клетках, культивированных из непораженной интимы аорты человека (средний уровень

атерогенности сыворотки крови составил $159 \pm 7\%$).

Спирулина обладала антиатерогенным действием в модели *ex vivo*, что проявлялось в устойчивом снижении атерогенности сыворотки крови через 2, 4 и 6 часов после однократного приема 300 мг препарата на 48%, 62% и 42% от исходного уровня, соответственно.

Результаты оценки антиатерогенного эффекта лука в модели *ex vivo* после однократного приема порошка луковицы в капсулах (300 мг) представлены на рисунке 3.

В исследовании принимали участие 4 добровольца (3 мужчины, 1 женщина, средний возраст 57 ± 5 лет), у которых сыворотка крови вызывала 1,3-1,5-кратное повышение содержания холестерина в клетках, культивированных из непораженной интимы аорты человека (средний уровень атерогенности сыворотки крови составил $141 \pm 4\%$).

Порошок лука обладал антиатерогенным действием в модели *ex vivo*, что проявлялось в умеренном снижении атерогенности сыворотки крови через 2, 4 и 6 часов после однократного приема 300 мг препарата на 12%, 28% и 24% от исходного уровня, соответственно.

Результаты оценки антиатерогенного эффекта солодки гладкой в модели *ex vivo* после однократного приема порошка корня солодки в капсулах (300 мг) представлены на рисунке 4. В исследовании принимали участие 6 добровольцев (4 мужчины, 2 женщины, средний возраст 54 ± 3 года), у которых сыворотка крови вызывала 1,6-2,0-кратное повышение содержания холестерина в клетках, культивированных из непораженной интимы аорты человека (средний уровень атерогенности сыворотки крови составил $187 \pm 7\%$).

Порошок корня солодки обладал антиатерогенным действием в модели *ex vivo*, что проявлялось в длительном снижении атерогенности сыворотки крови через 2, 4 и 6 часов после однократного приема 300 мг препарата на 68%, 44% и 51% от исходного уровня.

Результаты оценки антиатерогенного эффекта солянки холмовой в модели *ex vivo* после однократного приема порошка листьев солянки в капсулах (300 мг) представлены на рисунке 5. В исследовании принимали участие 5 добровольцев (3 мужчин, 2 женщины, средний возраст 49 ± 4 года), у которых сыворотка крови вызывала 1,3-1,5-кратное повышение содержания холестерина в клетках (средний уровень атерогенности сыворотки крови составил $140 \pm 5\%$).

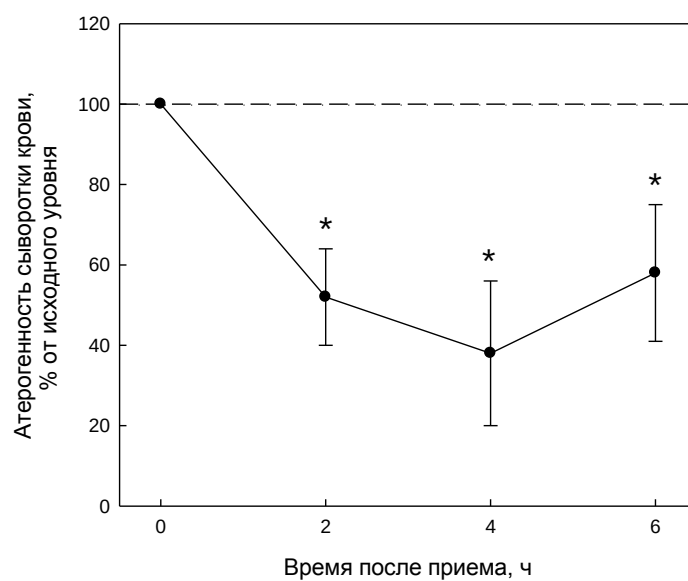


Рис. 2. Антиатерогенное действие спирулины в модели *ex vivo*.

Содержание холестерина в контрольных культурах клеток составляло $23,0 \pm 1,1$ мкг/мг клеточного белка. Исходная атерогенность принята за 100%.

* - достоверное снижение атерогенности сыворотки крови, $p < 0,05$.

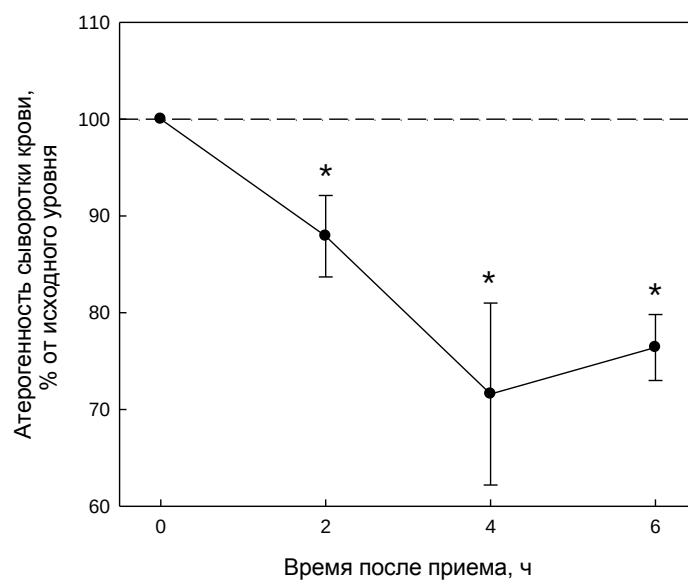


Рис. 3. Антиатерогенное действие лука в модели *ex vivo*.

Содержание холестерина в контрольных культурах клеток составляло $38,4 \pm 1,1$ мкг/мг клеточного белка. Исходная атерогенность принята за 100%.

* - достоверное снижение атерогенности сыворотки крови, $p < 0,05$.

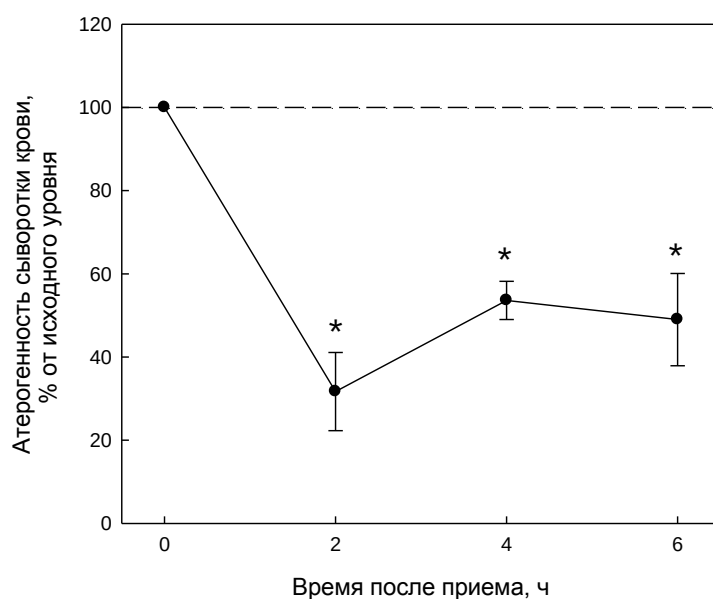


Рис. 4. Антиатерогенное действие солодки гладкой в модели *ex vivo*.

Содержание холестерина в контрольных культурах клеток составляло $24,4 \pm 1,7$ мкг/мг клеточного белка. Исходная атерогенность принята за 100%.

* - достоверное снижение атерогенности сыворотки крови, $p < 0,05$.

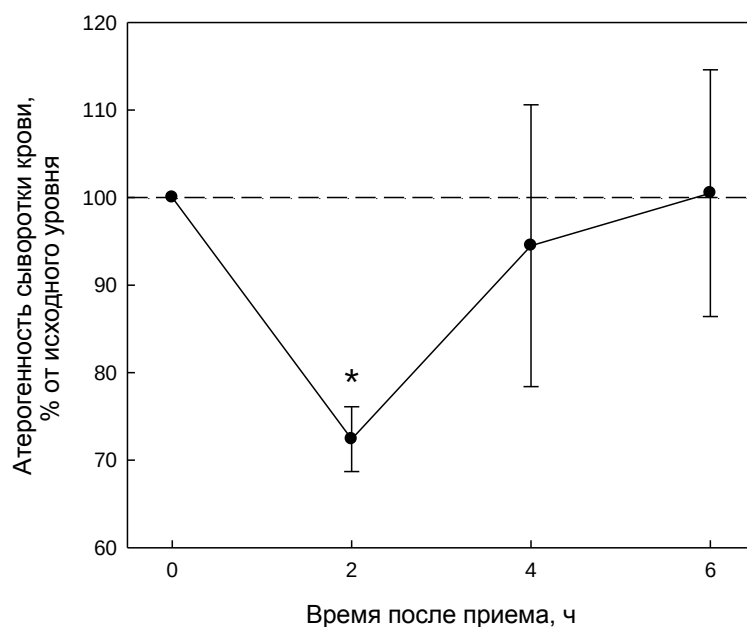


Рис. 5. Антиатерогенное действие солянки холмовой в модели *ex vivo*.

Содержание холестерина в контрольных культурах клеток составляло $29,6 \pm 1,8$ мкг/мг клеточного белка. Исходная атерогенность принята за 100%.

* - достоверное снижение атерогенности сыворотки крови, $p < 0,05$.

Порошок листа солянки обладал умеренным кратковременным антиатерогенным действием в модели *ex vivo*, что проявлялось в снижении атерогенности сыворотки крови через 2 часа после однократного приема 300 мг препарата на 28% от исходного уровня.

Результаты оценки антиатерогенного эффекта проростков пшеницы в модели *ex vivo* после однократного приема препарата в капсулах (300 мг) представлены на рисунке 6.

В исследовании принимали участие 8 добровольцев (5 мужчин, 3 женщины, средний возраст 51 ± 2 года), у которых сыворотка крови вызывала 1,7-2,3-кратное повышение содержания холестерина в клетках, культивированных из непораженной интимы аорты человека (средний уровень атерогенности сыворотки крови составил $199 \pm 6\%$).

Проростки пшеницы обладали выраженным продолжительным антиатерогенным действием в модели *ex vivo*, что проявлялось в снижении атерогенности сыворотки крови через 2, 4 и 6 часов после однократного приема 300 мг препарата на 50%, 92% и 67% от исходного уровня, соответственно. Следует отметить, что через 4 часа после приема препарата атерогенность была полностью устранена.

Результаты оценки антиатерогенного эффекта сухого сока свеклы в модели *ex vivo* после однократного приема препарата в капсулах (300 мг) представлены на рисунке 7. В исследовании принимали участие 8 добровольцев (6 мужчин, 2 женщины, средний возраст 53 ± 5 лет), у которых сыворотка крови вызывала 1,3-2,2-кратное повышение содержания холестерина в клетках, культивированных из непораженной интимы аорты человека (средний уровень атерогенности сыворотки крови составил $161 \pm 8\%$).

Сухой сок свеклы обладал средневывраженным продолжительным антиатерогенным действием в модели *ex vivo*, что проявлялось в снижении атерогенности сыворотки крови через 2, 4 и 6 часов после однократного приема 300 мг препарата на 16%, 40% и 36% от исходного уровня, соответственно.

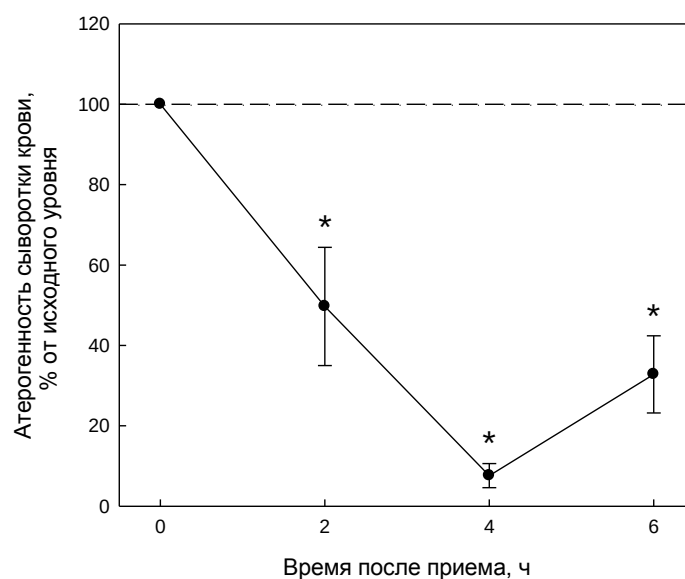


Рис. 6. Антиатерогенное действие проростков пшеницы в модели *ex vivo*.

Содержание холестерина в контрольных культурах клеток составляло $28,0 \pm 1,2$ мкг/мг клеточного белка. Исходная атерогенность сыворотки крови принята за 100%.

* - достоверное снижение атерогенности сыворотки крови, $p < 0,05$.

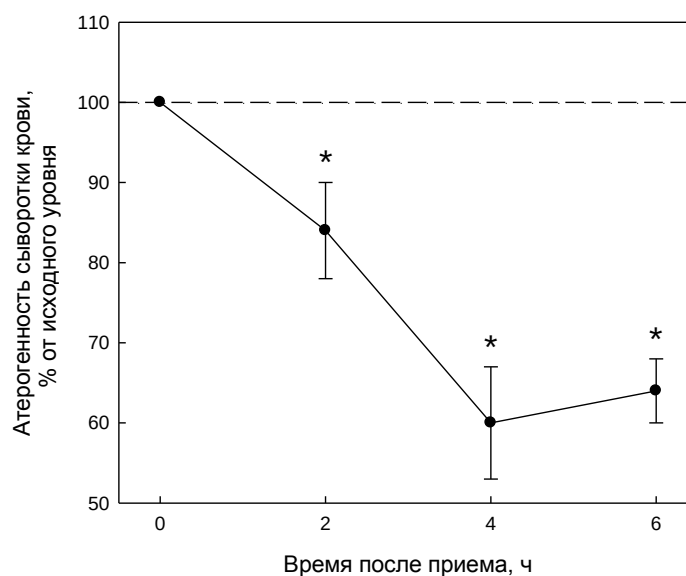


Рис. 7. Антиатерогенное действие сока свеклы в модели *ex vivo*.

Содержание холестерина в контрольных культурах клеток составляло $37,0 \pm 3,6$ мкг/мг клеточного белка. Исходная атерогенность сыворотки крови принята за 100%.

* - достоверное снижение атерогенности сыворотки крови, $p < 0,05$.

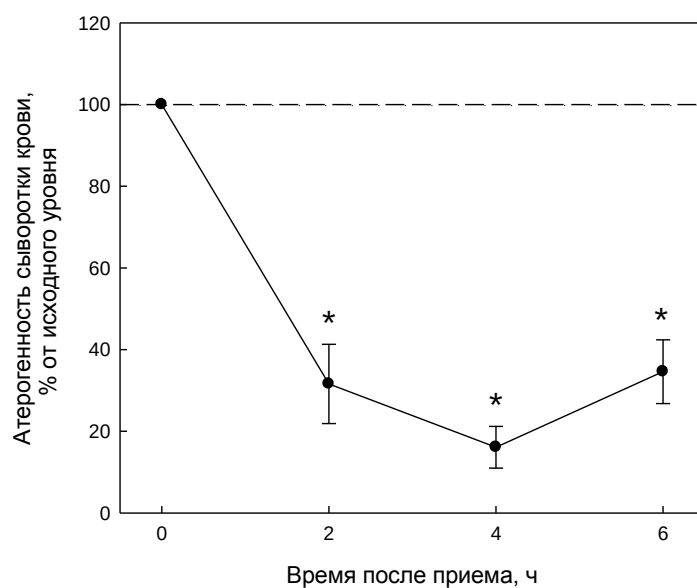


Рис. 8. Антиатерогенное действие порошка чеснока в модели ex vivo.

Содержание холестерина в контрольных культурах клеток составляло $39,0 \pm 4,2$ мкг/мг клеточного белка. Исходная атерогенность принята за 100%.

* - достоверное снижение атерогенности сыворотки крови, $p < 0,05$.

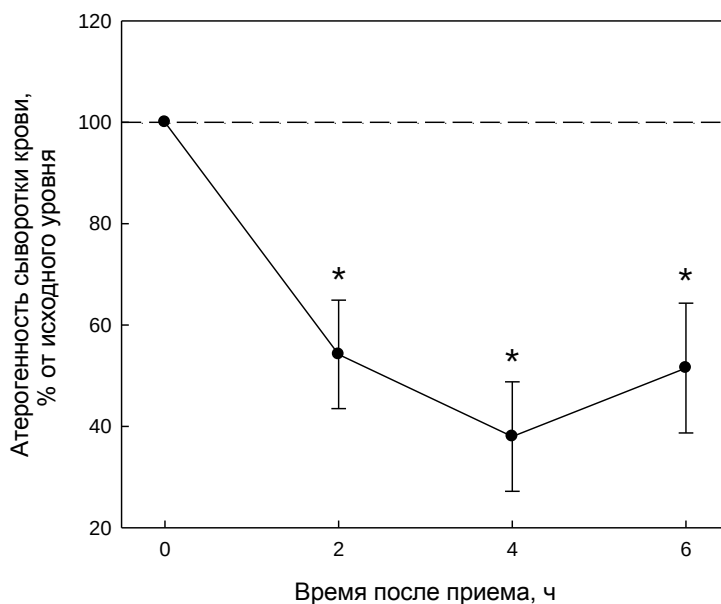


Рис. 9. Антиатерогенное действие экстракта сосновой хвои в модели ex vivo.

Содержание холестерина в контрольных культурах клеток составляло $56,0 \pm 5,1$ мкг/мг клеточного белка. Исходная атерогенность принята за 100%.

* - достоверное снижение атерогенности сыворотки крови, $p < 0,05$.

Порошок чеснока обладал выраженным продолжительным антиатерогенным действием в модели *ex vivo*, что проявлялось в снижении атерогенности сыворотки крови через 2, 4 и 6 часов после однократного приема 300 мг препарата на 68%, 83% и 65% от исходного уровня, соответственно, при этом через 4 часа после приема препарата атерогенность была полностью устранена.

Результаты оценки антиатерогенного эффекта экстракта сосновой хвои в модели *ex vivo* после однократного приема препарата в каплях (2 мг) представлены на рисунке 9. В исследовании принимали участие 4 добровольца (2 мужчин, 2 женщины, средний возраст 50 ± 4 года), у которых сыворотка крови вызывала 1,7-2,5-кратное повышение содержания холестерина в клетках, культивированных из непораженной интимы аорты человека (средний уровень атерогенности сыворотки крови составил $227 \pm 11\%$).

Экстракт сосновой хвои обладал выраженным продолжительным антиатерогенным действием в модели *ex vivo*, что проявлялось в снижении атерогенности сыворотки крови через 2, 4 и 6 часов после однократного приема 2 мг препарата на 46%, 62% и 48% от исходного уровня, соответственно.

Интегральная оценка антиатерогенного эффекта исследованных натуральных препаратов представлена в таблице 11. Наиболее выраженным интегральным антиатерогенным действием в модели *ex vivo* обладали проростки пшеницы и порошок чеснока. Они снижали атерогенность сыворотки крови в среднем в 3 раза, и биологическое действие наблюдалось в течение 6 часов после однократного приема 300 мг препарата.

Однако, как показано на рисунках 6 и 8, динамика снижения атерогенности была наиболее выраженной у чесночного порошка.

В научной литературе было опубликовано большое количество результатов исследования кардиопротективного действия чеснока и препаратов на его основе. Было известно, что чеснок оказывает влияние на ряд факторов риска ССЗ: снижает уровень холестерина в плазме крови, снижает артериальное давление, подавляет агрегационную способность тромбоцитов и повышает фибринолитическую активность плазмы крови [85, 87]. Кроме того, наличие достаточной сырьевой базы позволяло планировать разработку отечественного препарата на основе чеснока, предназначенного для патогенетической профилактики и терапии атеросклероза на ранних стадиях процесса. Эти

причины, вместе взятые, привели к тому, что именно чеснок привлек особое внимание. Было принято решение провести углубленное изучение антиатеросклеротических и антиатерогенных свойств чеснока.

Таблица 11

Интегральная оценка антиатерогенного действия натуральных препаратов	
Растительный препарат и его источник	Эффективность снижения атерогенности, %
Порошок спирулины (<i>Spirulina platensis</i>)	50,7%
Порошок луковичи лука (<i>Allium cepa</i>)	21,4%
Порошок сока свеклы (<i>Beta vulgaris</i>)	30,7%
Порошок из проростков пшеницы (<i>Triticum vulgare</i>)	70,0%
Порошок корня солодки (<i>Glycyrrhiza glabra</i>)	54,6%
Порошок листьев солянки холмовой (<i>Salsola collina</i>)	10,9%
Порошок луковичи чеснока (<i>Allium sativum</i>)	76,6%
Экстракт хвои сосны (<i>Pinus sylvestris</i>)	52,1%
Интегральный эффект рассчитывали как среднее снижение атерогенности сыворотки крови в течение 6 часов после однократного перорального приема, принимая исходную атерогенность за 100%.	

3.1.6. 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».

Таблица 12

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 *

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, $p < 0,05$.

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 таблице 12. 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.

Таблица 13

Влияние экстракта чеснока на липидный состав клеток из атеросклеротических поражений

	Содержание липидов, мкг/мг клеточного белка			
	Фосфолипиды	Свободный холестерин	Триглицериды	Эфиры холестерина
Контроль	136,1±8,3	24,6±1,2	16,0±0,6	56,0±3,3
Экстракт чеснока, 1 мг/мл	131,8±8,0	17,0±1,0 *	12,0±0,7 *	34,2±1,5 *
* - достоверное снижение показателей по сравнению с контролем, p<0,05.				

Было изучено также действие экстракта чеснока в концентрации 1 мкг/мл на содержание основных классов липидов в клетках, выделенных из атеросклеротической бляшки. Результаты представлены в таблице 13. Были подтверждены данные о снижении содержания свободного и этерифицированного холестерина в клетках из атеросклеротической бляшки, а также показано, что антиатеросклеротическое действие экстракта чеснока сопровождается достоверным снижением содержания внутриклеточных триглицеридов. При этом, несмотря на высокую концентрацию экстракта чеснока, не происходит достоверного изменения содержания фосфолипидов в клетках.

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

(Таблица 14). Эти результаты говорят о прямом антиатерогенном (профилактическом) действии биологически активных компонентов чеснока, реализуемом на клеточном уровне.

Таблица 14

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, $p < 0,05$.

Было изучено также действие экстракта чеснока в концентрации 1 мкг/мл на содержание основных классов липидов в клетках, выделенных из непораженной интимы аорты человека, в которых накопление внутриклеточных липидов было индуцировано атерогенной сывороткой крови. Результаты представлены в таблице 15.

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.

Таблица 15

Влияние экстракта чеснока на липидный состав клеток из непораженной интимы аорты человека при индуцированном накоплении липидов

	Содержание липидов, мкг/мг клеточного белка			
	Фосфолипиды	Свободный холестерин	Триглицериды	Эфиры холестерина
Контроль	85,8±3,9	10,5±0,5	7,8±0,7	10,4±0,3
Атерогенная сыворотка	92,3±6,4	17,5±0,7 *	12,9±0,7 *	33,1±1,2 *
Атерогенная сыворотка + экстракт чеснока (1 мг/мл)	84,4±3,0	12,8±0,4 *#	8,3±0,3 #	18,4±0,7 *#
* - достоверное накопление внутриклеточных липидов по сравнению с контролем, p<0,05;				
# - достоверное снижение атерогенного эффекта сыворотки крови, p<0,05.				

Добавление в культуру клеток экстракта чесночного порошка устраняло накопление свободного холестерина и триглицеридов и снижало в 2,8 раза накопление эфиров холестерина, вызванное атерогенной сывороткой (Таблица 15). Кроме того, экстракт чесночного порошка, добавленный в культуру клеток из бляшки, снижал содержание триглицеридов, свободного холестерина и эфиров холестерина на 21%, 31% и 35%, соответственно (Таблица 13). Кроме того, содержание индивидуальных фосфолипидов (сфингомиелина, фосфатидилхолина, фосфатидилинозитола, фосфатидилсерина и фосфатидилэтаноламина) не изменялось под воздействием экстракта чесночного порошка, как в нормальных,

так и в атеросклеротических клетках (Таблица 16).

Таблица 16

Влияние экстракта чесночного порошка на содержание фосфолипидов в культивируемых клетках интимы аорты человека

	Фосфолипиды, мкг/мг клеточного белка				
	СфМ	ФХ	ФИ	ФС	ФЭ
Нормальные клетки					
Контроль	21,3±2,0	27,8±1,9	1,7±0,1	6,1±0,7	15,9±2,3
Атерогенная сыворотка (АС)	22,7±1,9	28,5±2,7	2,0±0,2	6,8±0,5	16,7±1,1
АС + экстракт чеснока (1 мг/мл)	20,4±1,4	27,3±1,3	1,8±0,2	6,0±0,7	16,0±0,9
Атеросклеротические клетки					
Контроль	42,0±2,3	48,1±2,2	3,4±0,3	9,5±0,9	18,5±1,2
+ экстракт чеснока (1 мг/мл)	38,3±2,4	43,3±3,2	3,0±0,2	8,1±0,8	17,4±0,7
СфМ – сфингомиелин, ФХ – фосфатидилхолин, ФИ – фосфатидилинозитол, ФС – фосфатидилсерин, ФЭ – фосфатидилэтаноламин. В таблице представлены данные одного из двух однотипных экспериментов. В обоих экспериментах получены сходные результаты.					

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±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 Kwaі 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 атерогенности сыворотки крови, 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.

3.1.7. Механизмы антиатеросклеротической активности чеснока

Было проведено изучение механизмов антиатеросклеротической активности чеснока в модели *in vitro*, в частности, его влияние на синтез липидов, метаболизм липопротеидов низкой плотности и активность внутриклеточных ферментов, ответственных за метаболизм эфиров холестерина.

Включение меченого [^{14}C]-олеата в липиды клеток, культивируемых из бляшки, было значительно более высоким, в нормальных клетках, что может свидетельствовать о более высокой скорости синтеза фосфолипидов, триглицеридов и эфиров холестерина в атеросклеротических клетках (Таблица 17). Экстракт чесночного порошка снижал включение [^{14}C]-олеата как в липиды клеток бляшки, так и в липиды нормальных клеток, причем влияние экстракта на включение [^{14}C]-олеата в фосфолипиды и эфиры холестерина нормальных клеток было более выраженным, чем в атеросклеротических клетках. Так, под влиянием экстракта чесночного порошка включение [^{14}C]-олеата в фосфолипиды нормальных клеток уменьшалось на 33%, а в фосфолипиды клеток бляшки – только на 11%; включение [^{14}C]-олеата в эфиры холестерина нормальных клеток подавлялось в 2 раза, а в эфиры холестерина атеросклеротических клеток – только на 27% (Таблица 17). Включение [^{14}C]-олеата в триглицериды клеток,

Таблица 17

Влияние экстракта чесночного порошка на синтез внутриклеточных липидов

				Включение [^{14}C]-олеата, dpm/мг клеточного белка		
				Фосфолипиды	Триглицериды	Эфиры холестерина
Нормальные клетки						
Контроль				1922±52	649±22	127±5
Экстракт	чеснока	(1	мг/мл)	1794±66 *	570±18 *	75±5 *
Атеросклеротические клетки						
Контроль				6887±324	1226±51	274±7
Экстракт	чеснока	(1	мг/мл)	6145±112 *	795±38 *	201±12 *
Клетки инкубировали в присутствии меченого [^{14}C]-олеата (1 мкКи/мл) в течение 24 ч. Данные представляют средние величины из трех независимых экспериментов.						
* - достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$.						

культивируемых как из непораженной интимы, так и из бляшки, под воздействием экстракта чесночного порошка уменьшалось в равной степени – приблизительно на 35% (Таблица 17).

Основным источником свободного и этерифицированного холестерина, накапливаемого в артериальных клетках, являются липопротеиды низкой плотности (ЛНП) крови. Клетки интимы аорты человека способны связывать, захватывать и метаболизировать ЛНП. Для изучения внутриклеточного метаболизма эфиров холестерина, поступающих в клетку в составе ЛНП, были использованы липопротеиды, меченные [^3P]-холестериллинолеатом.

Основная часть эфиров холестерина, интернализуемых клетками в составе ЛНП, деградировала в клетке до свободного холестерина и возвращалась во внеклеточную среду. ЛНП, циркулирующие в крови больных с коронарным атеросклерозом, являются модифицированными липопротеидами, которые, в отличие от нативных ЛНП здоровых доноров, способны вызывать накопление внутриклеточных эфиров холестерина. Скорость захвата и деградации эфиров

холестерина, поступающих в клетку в составе модифицированных ЛНП, была значительно выше, чем в случае нативных ЛНП. Экстракт чесночного порошка снижал захват эфиров холестерина, поступающих в клетку в составе нативных ЛНП, на 32%, а в составе модифицированных ЛНП - на 56%. При этом внутриклеточное накопление эфиров холестерина, вызванное нативными ЛНП, снижалось почти в 2 раза, а модифицированными - почти в 4 раза (Таблица 18).

Таблица 18

Влияние экстракта чесночного порошка на метаболизм эфиров холестерина из ЛНП, захваченных культивируемыми клетками интимы аорты человека

Исследуемый агент	Внутриклеточное содержание, dpm/мг клеточного белка		Внеклеточное содержание, dpm/мг клеточного белка
	Эфиры холестерина	Свободный холестерин	Свободный холестерин
Нативные ЛНП	92±4	62±3	4872±119
Нативные ЛНП + экстракт чеснока (1 мг/мл)	49±3 *	47±2 *	3344±203 *
Модифицированные ЛНП	194±14	83±5	7400±503
Модифицированные ЛНП + экстракт чеснока (1 мг/мл)	55±6	60±4 *	3295±289 *

Клетки из неповрежденной атеросклерозом интимы аорты человека выделяли и культивировали, как описано в разделе «Материалы и методы». Клетки инкубировали в течение 24 ч в присутствии нативных или модифицированных ЛНП, меченых [³H]-холестериллинолеатом (100 мкг/мл по содержанию апо-В).

* - достоверное отличие от контроля (клеток, инкубированных без добавления экстракта порошка чеснока), p<0,05.

Таким образом, было установлено, что экстракт чесночного порошка способен подавлять синтез липидов, как в нормальных, так и в атеросклеротических клетках. Кроме того, этот агент подавляет захват липопротеидов и внутриклеточную деградацию эфиров холестерина,

содержащихся в липопротеидах, что ведет к снижению накопления эфиров холестерина в культивируемых клетках, индуцированному ЛНП.

Было исследовано влияние экстракта чесночного порошка на ферменты, ответственные за внутриклеточный метаболизм эфиров холестерина – ацилкоэнзим А : холестерин О-ацилтрансферазу (АХАТ), способствующую образованию эфиров холестерина в артериальных клетках, и холестеринэстеразу (гидролазу эфиров холестерина) (ХЭ), осуществляющую гидролиз эфиров холестерина. Активность ферментов определяли в лизатах нормальных и атеросклеротических клеток.

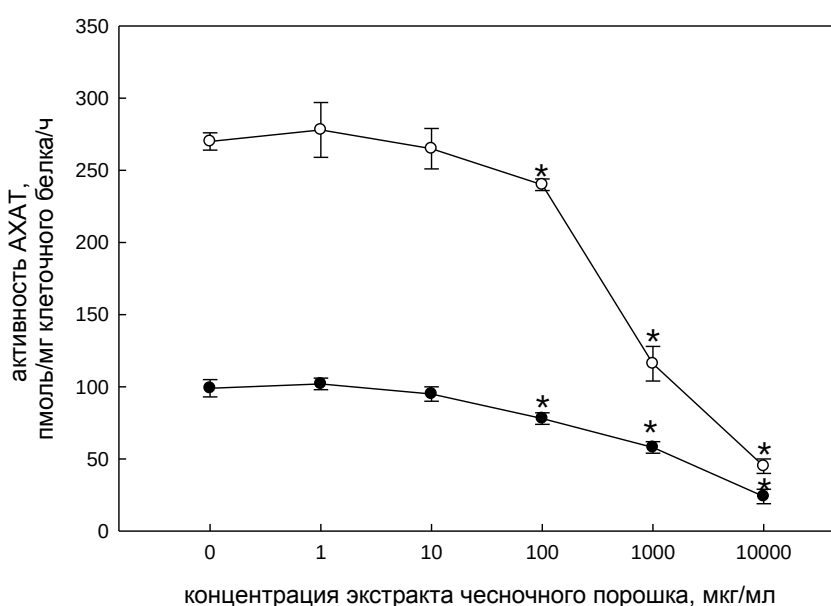


Рис. 10. Влияние экстракта чесночного порошка на активность ацилкоэнзим А : холестерин ацилтрансферазы (АХАТ) в клетках из непораженных (●) и атеросклеротических (○) участков интимы аорты человека. Представлены средние данные трех независимых измерений с указанием стандартной ошибки.

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

Активность АХАТ в атеросклеротических клетках была в 3 раза выше, чем в клетках непораженной интимы (Рисунок 10). Экстракт чесночного порошка в концентрации 100 мкг/мл и выше значимо снижал активность фермента, полученного из тех и других клеток. Эффективные концентрации экстракта чесночного порошка были несколько выше расчетной терапевтической концентрации, принятой за 10 мкг/мл.

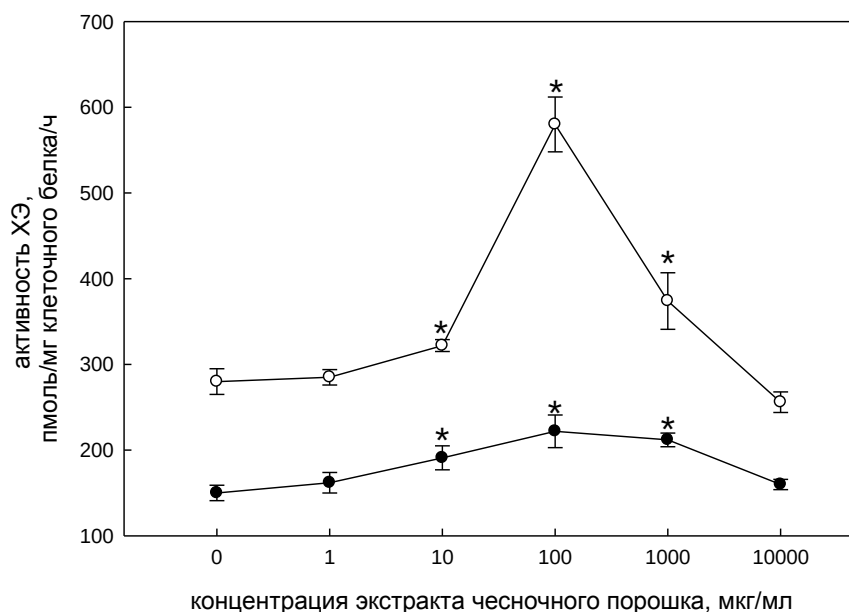


Рисунок 11. Влияние экстракта чесночного порошка на активность холинэстеразы (ХЭ) в клетках из непораженных (●) и атеросклеротических (○) участков интимы аорты человека. Представлены средние данные трех независимых измерений с указанием стандартной ошибки.

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

Активность холинэстеразы, полученной из клеток бляшки, почти в 2 раза превосходила активность фермента в клетках из непораженной интимы (Рисунок 11). Экстракт чесночного порошка в диапазоне концентраций 10-1000 мкг/мл значимо увеличивал активность фермента, полученного как из атеросклеротических, так и из нормальных клеток. Следует отметить, что минимальная эффективная концентрация приблизительно соответствовала расчетной терапевтической концентрации. Концентрационная зависимость эффекта имела колоколообразный характер. При концентрации экстракта чесночного порошка 100 мкг/мл имел место максимальный эффект, а в концентрациях выше и ниже оптимальной экстракт чесночного порошка был менее эффективным.

Таким образом, экстракт чесночного порошка способен ингибировать АХАТ (фермент внутриклеточного синтеза эфиров холестерина) и стимулировать ХЭ (фермент внутриклеточной деградации эфиров холестерина).

3.1.8. Биологически активные компоненты чеснока

Водные и хлороформные экстракты порошка чеснока были приготовлены и фракционированы с помощью тонкослойной хроматографии, как описано в разделе «Материалы и методы». Было проведено 8 независимых процедур фракционирования, в которых были получены идентичные профили разделения. Использовали порядковую нумерацию пиков от старта к фронту с указанием метода экстракции (W – вода, С – хлороформ). Таким образом, номер фракции характеризовал ее хроматографическую подвижность. В водных экстрактах было идентифицировано 6 мажорных пиков (обозначенных как W1, W2, W4, W5, W6, W8) и 2 малых (обозначенных как W3 и W7). В хлороформных фракциях было идентифицировано 5 мажорных пиков (C1, C2, C5, C6, C7) и 2 минорных (C3 и C4).

Таблица 19

Антиатеросклеротическое действие водорастворимых компонентов экстракта
чесночного порошка *in vitro*

Фракция	Содержание внутриклеточного холестерина		
	Эксперимент 1, мкг/мг клеточного белка	Эксперимент 2, мкг/мг клеточного белка	Среднее значение, % от контроля
Контроль	314,3±12,9	194.3±13.5	100±5
W1 (мажор)	257.2±13.5 *	156.4±7.2 *	81±3 *
W2 (мажор)	242.5±14.8 *	152.4±12.4 *	78±4 *
W3	308.6±12.4	198.6±19.3	100±6
W4 (мажор)	321.4±17.5	207.5±16.5	105±6
W5 (мажор)	263.7±12.5*	162.8±5.0 *	84±3 *
W6 (мажор)	324.0±7.5	206.3±17.2	105±4
W7	275.4±7.6 *	158.6±9.4 *	85±3 *
W8 (мажор)	325.6±17.8	199.5±17.4	104±6

Данные представлены в виде среднего значения трех измерений с указанием стандартной ошибки.

* - достоверное снижение содержания внутриклеточного холестерина, $p < 0,05$.

Антиатеросклеротические и антиатерогенные свойства водорастворимых и

хлороформрастворимых компонентов чеснока были исследованы *in vitro* в первичных культурах клеток, выделенных из атеросклеротических и непораженных участков интимы аорты человека, соответственно. Использовали концентрации фракций, соответствующие исходной концентрации водного экстракта порошка чеснока 1 мг/мл.

Таблица 20

Антиатерогенное действие водорастворимых компонентов экстракта чесночного порошка *in vitro*

Фракция	Содержание внутриклеточного холестерина		
	Эксперимент 1, мкг/мг клеточного белка	Эксперимент 2, мкг/мг клеточного белка	Среднее значение, % от атерогенного эффекта сыворотки
Контроль	42,0±3,7	27,1±1,9	-
АС	74,5±3,7 *	76,0±4,6 *	100±5
W1 (мажор)	52,7±1,9 *&	52,3±3,8 *&	70±5 &
W2 (мажор)	55,0±1,6 *&	55,9±4,6 *&	74±3 &
W3	129,7±13,2 *#	121,3±12,6 *#	167±14 #
W4 (мажор)	126,5±14,1 *#	130,4±13,7 *#	171±15 #
W5 (мажор)	80,0±3,5 *	80,4±2,3 *	107±3
W6 (мажор)	106,4±5,4 *#	84,3±8,0 *	127±7 #
W7	79,1±8,1 *	81,8±8,6 *	107±9
W8 (мажор)	129,5±12,5 *#	121,2±12,7 *#	167±14 #

АС – атерогенная сыворотка.

Данные представлены в виде среднего значения трех измерений с указанием стандартной ошибки.

* - достоверное накопление внутриклеточного холестерина, $p < 0,05$;

& - достоверное снижение атерогенности сыворотки крови, $p < 0,05$;

- достоверное увеличение атерогенности сыворотки крови, $p < 0,05$.

Из 8 водорастворимых компонентов 4 (W1, W2, W5, W7) достоверно

снижали содержание холестерина в клетках, культивированных из атеросклеротических поражений, то есть обладали антиатеросклеротическим действием *in vitro* (Таблица 19). Остальные 4 компонента (W3, W4, W6, W8) не влияли на содержание внутриклеточного холестерина.

Для индукции накопления внутриклеточного холестерина в клетках, культивируемых из непораженных участков интимы аорты, использовали пулированную атерогенную сыворотку от 6 больных ИБС с документированным коронарным атеросклерозом. Из 8 водорастворимых компонентов 2 (W1 и W2) достоверно препятствовали индуцированному накоплению холестерина в клетках, то есть обладали антиатерогенным действием *in vitro* (Таблица 20). Два компонента (W5 и W7) не влияли на накопление внутриклеточного холестерина. Компоненты W3, W4 и W8 усиливали атерогенное действие сыворотки крови. Компонент W6 проявил проатерогенное действие в одном эксперименте из двух.

Таблица 21

Антиатеросклеротическое действие хлороформрастворимых компонентов
экстракта чесночного порошка *in vitro*

Фракция	Содержание внутриклеточного холестерина		
	Эксперимент 1,	Эксперимент 2,	Среднее
	мкг/мг клеточного белка	мкг/мг клеточного белка	значение, % от контроля
Контроль	314.3±12.9	194.3±13.5	100±5
C1 (мажор)	256.3±14.5 *	146.7±13.2 *	79±5 *
C2 (мажор)	269.4±7.8 *	170.0±3.6 *	87±2 *
C3	292.6±18.6	199.4±17.6	98±6
C4	208.6±13.4 *	127.5±8.6 *	66±3 *
C5 (мажор)	269.4±7.6 *	168.6±11.4 *	87±3 *
C6 (мажор)	252.4±10.7 *	148.4±7.8 *	79±3 *
C7 (мажор)	243.5±18.6 *	165.4±12.9 *	81±5 *

Данные представлены в виде среднего значения четырех измерений с указанием стандартной ошибки.

* - достоверное снижение содержания внутриклеточного холестерина, $p < 0,05$.

Из 7 хлороформрастворимых компонентов экстракта чесночного порошка

6 (C1, C2, C4, C5, C6, C7) достоверно снижали содержание холестерина в клетках, культивированных из атеросклеротических поражений, то есть обладали антиатеросклеротическим действием *in vitro* (Таблица 21). Одна фракция (C3) не влияла на содержание холестерина в атеросклеротических клетках.

Таблица 22

Антиатерогенное действие хлороформрастворимых компонентов экстракта
чесночного порошка *in vitro*

Фракция	Содержание внутриклеточного холестерина		
	Эксперимент 1, мкг/мг клеточного белка	Эксперимент 2, мкг/мг клеточного белка	Среднее значение, % от атерогенного эффекта сыворотки
Контроль	42.0±3.7	27.1±1.9	-
АС	74.5±6.7*	76.0±4.6 *	100±5
C1 (мажор)	47.3±4.4 &	42.4±3.0 *&	60±4 &
C2 (мажор)	53.4±2.7 *&	41.8±1.1 *&	64±2 &
C3	70.7±7.7*	73.7±4.0 *	96±6
C4	48.7±1.4 &	35.1±0.8 *&	56±1 &
C5 (мажор)	47.7±4.2 &	49.4±1.8 *&	65±3 &
C6 (мажор)	45.1±5.4 &	32.4±2.0 &	52±4 &
C7 (мажор)	54.4±3.2 *&	57.3±3.7 *&	74±4 &

АС – атерогенная сыворотка.

Данные представлены в виде среднего значения четырех измерений с указанием стандартной ошибки.

* - достоверное накопление внутриклеточного холестерина, $p < 0,05$;

& - достоверное снижение атерогенности сыворотки крови, $p < 0,05$.

Для индукции накопления внутриклеточного холестерина в клетках, культивируемых из непораженных участков интимы аорты, также использовали пулированную атерогенную сыворотку от 6 больных ИБС с документированным коронарным атеросклерозом.

Из 7 хлороформрастворимых компонентов 6 (C1, C2, C4, C5, C6 и C7) достоверно препятствовали индуцированному накоплению холестерина в клетках, то есть обладали антиатерогенным действием *in vitro* (Таблица 22). При этом

мажорный компонент С6 полностью устранял атерогенный эффект сыворотки в обоих проведенных экспериментах, а мажорный компонент С5 – в одном из двух экспериментов. Один компонент (С3) не влиял на накопление внутриклеточного холестерина, индуцированное сывороткой.

Таблица 23

Влияние аджоена, аллицина и S-аллилцистеина на атеросклеротические индексы клеток из пораженной атеросклерозом интимы аорты человека

Концентрация	Содержание внутриклеточного холестерина, мкг/мг клеточного белка	Включение [³ H]- тимидина, dpm/мг клеточного белка
Контроль	130,7±4,2	186±16
Аджоин, 10 ⁻¹⁰ М	136,1±3,8	153±14 *
Аджоин, 10 ⁻⁹ М	109,0±9,0*	136±14 *
Аджоин, 10 ⁻⁸ М	97,2±7,8 *	127±14 *
Аджоин, 10 ⁻⁷ М	112,1±5,2 *	136±24 *
Аджоин, 10 ⁻⁶ М	119,3±7,2	156±24
Аджоин, 10 ⁻⁵ М	127,2±6,4	175±26
Контроль	146,7±2,9	227±12
Аллицин, 10 ⁻⁹ М	149,2±4,3	232±11
Аллицин, 10 ⁻⁸ М	139,2±2,8 *	185±12 *
Аллицин, 10 ⁻⁷ М	129,0±3,3 *	177±11 *
Аллицин, 10 ⁻⁶ М	133,2±2,1 *	142±14 *
Аллицин, 10 ⁻⁵ М	143,6±2,5	111±18 *
S-аллилцистеин, 10 ⁻⁹ М	140,7±2,9	-
S-аллилцистеин, 10 ⁻⁸ М	136,9±2,2 *	-
S-аллилцистеин, 10 ⁻⁷ М	122,9±2,5 *	-
S-аллилцистеин, 10 ⁻⁶ М	123,3±1,8 *	-
S-аллилцистеин, 10 ⁻⁵ М	133,0±3,0 *	-

Данные представлены в виде среднего значения трех определений с указанием стандартной ошибки.

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

Таким образом, два водорастворимых компонента экстракта чесночного порошка обладают антиатеросклеротической и антиатерогенной активностью в условиях клеточной модели *in vitro*. Фракции W5 и W7 проявляют антиатеросклеротическое, но не антиатерогенное действие. Фракции W3, W4 и W8 усиливают атерогенное действие сыворотки крови. Практически все хлороформрастворимые компоненты экстракта чесночного порошка обладают одновременно антиатеросклеротической и антиатерогенной активностью.

В лаборатории А.В. Соснова (в.н.с. ГосНИИОХТ) с помощью методов высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии гидрофильные и гидрофобные фракции экстракта порошка чеснока, характеризующиеся наивысшей антиатеросклеротической и антиатерогенной активностью, были идентифицированы как серосодержащие аминокислоты и сульфоксиды, в том числе, как аллиин, аллицин, аджоин и S-аллилцистеин.

Было проведено исследование антиатеросклеротической активности аджоина и аллицина (мажорных фракций экстракта порошка чеснока) в первичной культуре клеток, выделенных из пораженных атеросклерозом участков интимы аорты человека. Результаты представлены в таблице 23.

Таким образом, экстракт порошка чеснока содержит ряд биологически активных компонентов, способных оказывать антиатеросклеротическое и антиатерогенное действие в условиях клеточной модели *in vitro*, при этом положительно действующие компоненты по интегральной биологической активности преобладают над потенциально проатерогенными компонентами. Основные антиатерогенные и антиатеросклеротические компоненты чеснока являются серосодержащими аминокислотами и сульфоксидами. Выявляемое в условиях клеточной модели *ex vivo* прямое антиатерогенное действие чеснока, по всей видимости, обусловлено действием присутствующих в крови биологически активных компонентов чеснока и их активных метаболитов.

Был разработан и внедрен в производство натуральный препарат на основе чеснока «Алликор» пролонгированного действия, направленный на профилактику и вспомогательное лечение атеросклероза [13, 14]. Препарат представляет собой таблетки светло-кремового цвета, содержащий 150 или 300 мг чесночного порошка (ИНАТ-Фарма, Россия). В дальнейших исследованиях по антиатерогенной и антиатеросклеротической профилактике и терапии

Таблица 24

Изменение содержания аджоина в таблетках «Алликор» при длительном хранении (% от исходного уровня)

Условия хранения	Время хранения, мес.						
	0	1	3	6	12	18	24
При 4°C	100	99	98	92	90	78	72
При 20°C	100	97	96	93	87	72	56

использовали, главным образом, эту лекарственную форму. Таблетки стандартизовали по содержанию аджоина, определяемому методом тонкослойной хроматографии. Среднее содержание аджоина составляло 141 ± 13 мкг на 1 мг массы таблеток в пересчете на порошок чеснока. Оценка стабильности содержания биологически активных компонентов при хранении по содержанию аджоина представлена в таблице 24.

С учетом представленных в таблице 24 данных, в экспериментальных и клинических исследованиях использовали таблетки «Алликор» со сроком хранения, не превышающим 12 месяцев.

3.2. Исследования *in vivo*

3.2.1. Изучение антиатеросклеротической активности препарата на основе чеснока «Алликор» при экспериментальном атеросклерозе

На данном этапе исследования было изучено влияние перорального применения препарата на основе чеснока «Алликор» на атерогенные свойства сыворотки крови и процессы формирования неинтимального утолщения у кроликов. Формирование и прогрессирование атеросклеротических поражений в аорте животных было индуцировано криотравмой с последующим содержанием в условиях диеты с высоким содержанием холестерина, как описано в разделе «Материалы и методы».

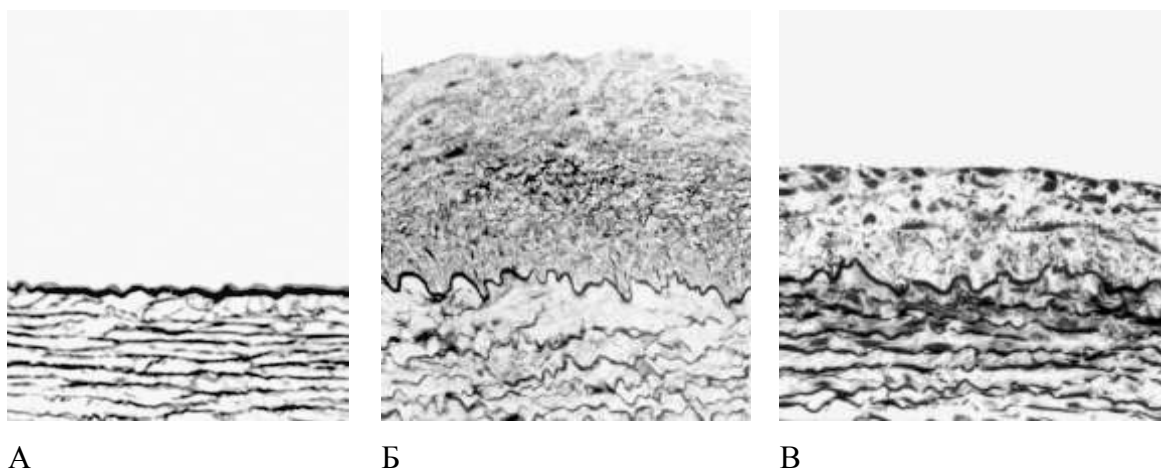


Рис.12. Полутонкие срезы аорты кролика.

Снимки сопоставлены по вертикали по границе между интимой и медией. А - аорта intactного кролика, Б - аорта кролика, получавшего холестерин, через 17 недель после криоповреждения, В - аорта кролика, получавшего одновременно холестерин и Алликор, через 17 недель после криоповреждения. Окраска: метиленовый синий, х380.

У intactных животных интимальный слой аорты с микроскопически не определялся (Рисунок 12А). Криотравма с последующим содержанием на гиперхолестериновой диете приводила к формированию выраженного неоинтимального слоя. Локальное неоинтимальное утолщение наблюдалось через 17 недель после операции у всех животных, как в контрольной, так и в опытной группах. Тем не менее, у кроликов, получавших Алликор, толщина образовавшейся неоинтимы была в 1,5 раза меньше, чем у животных контрольной группы (Рисунок 12Б, 12В).

Количество клеток в неоинтимае в опытной группе было в 2 раза ниже, чем в контроле. Кроме того, содержание свободного и этерифицированного холестерина, триглицеридов и коллагена в неоинтимальном слое аорты также было существенно ниже у животных, получавших Алликор (Таблица 25).

Атерогенная диета у всех животных вызывала гиперлипидемию. Содержание общего холестерина в сыворотке у контрольных животных увеличивалось от 141 ± 10 мг/дл до 1533 ± 94 мг/дл ($p < 0,0001$), содержание триглицеридов - от 129 ± 9 мг/дл до 270 ± 67 мг/дл ($p = 0,05$). Однако регулярный прием Алликора на фоне атерогенной диеты препятствовал повышению уровня липидов в сыворотке крови.

Влияние Алликора на атерогенные показатели аорты кролика

Параметр	Контрольная группа	Опытная группа	Изменение, % от контроля
Толщина интимы, мкм	180±30	113±9 *	63
Индекс интима:медия	0.84±0.07	0.64±0.05 *	76
Число клеток на 1 см ²	(7.9±0.1) x 10 ⁶	(3.6±0.1) x 10 ⁶ *	46
Эфиры холестерина, мг/см ²	5.9±1.1	1.7±0.4 *	29
Свободный холестерин, мг/см ²	1.9±0.4	0.6±0.1 *	32
Триглицериды, мг/см ²	9.9±2.3	2.4±0.7 *	24
Фосфолипиды, мг/см ²	0.9±0.1	0.6±0.1 *	67
Коллаген, мг/см ²	10.5±1.5	6.1±0.6	58
* - достоверное снижение показателей по сравнению с контролем (p<0.05).			

Так, содержание холестерина в сыворотке крови кроликов, леченных Алликором было в 1,2 раза ниже, чем у кроликов не получавших препарат и составляло 1256±85 мг/дл (p<0,0001 по сравнению с интактными животными, и p=0,040 по сравнению с контролем). Содержание триглицеридов у кроликов, получавших Алликор, было несколько ниже (в 1,7 раза) и составляло 161±24 мг/дл (p>0,2 по сравнению с интактными животными и p=0,14 по сравнению с контролем). Таким образом, в отличие от уровня холестерина в крови, достоверных различий по уровню триглицеридов сыворотки крови у опытных животных по сравнению с интактными или контрольными животными не было выявлено, и мы можем говорить лишь о благоприятной тенденции.

Сыворотка крови кроликов, получавших атерогенную диету, достоверно повышала уровень общего холестерина в культивируемых клетках, то есть обладала атерогенностью. Атерогенность сыворотки крови оценивали в культуре клеток в модели ex vivo непосредственно перед переводом животных на гиперхолестериновую диету, а также через 1 и 5 недель. Атерогенность сыворотки крови сохранялась на высоком уровне в течение всего периода исследования, как в контрольной группе, так и у животных, получавших Алликор. Однако регулярный прием Алликора достоверно снижал атерогенный потенциал сыворотки крови, стимулированной холестеринной диетой. Так, уже через

неделю атерогенность сыворотки крови кроликов, леченных Алликором, была в 1,2 раза ниже, а через 5 недель в 1,5 раза ниже, чем у контрольных животных.

3.3. Лабораторно-клинические исследования

3.3.1. Изучение антиатерогенного действия препарата «Алликор»

Целью данного этапа исследования являлась оценка антиатерогенного действия биологически активной добавки к пище на основе чеснока «Алликор». Главными задачами этапа были изучение прямое антиатерогенное действие препарата «Алликор» в модели *ex vivo* с оценкой антиатерогенного эффекта в клеточной культуре, а также разработка адекватного режима антиатерогенной терапии.

Было выполнено 12 экспериментов с участием добровольцев, у которых кровь забирали непосредственно перед приемом 1 таблетки препарата «Алликор» (300 мг), а также через 4 и 8 часов после приема. Атерогенность сыворотки крови оценивали по накоплению суммарного холестерина в первичной культуре моноцит-макрофагов крови человека. У 7 добровольцев (59%) наблюдалось достоверное снижение исходной атерогенности сыворотки крови на всем протяжении исследования, у 4 добровольцев (33%) наблюдалось достоверное снижение исходной атерогенности сыворотки крови через 4 часа после приема препарата, в ряде случаев (5 человек) с тенденцией к восстановлению атерогенности через 8 часов после приема препарата. Только у 1 добровольца (8%) не было выявлено антиатерогенного эффекта после приема препарата «Алликор».

В таблице 26 представлены средние значения атерогенного потенциала сыворотки крови, нормированные по исходному значению. В среднем, однократный прием препарата «Алликор» приводит к достоверному снижению атерогенности сыворотки крови на 60% от исходного уровня ($p < 0,05$), и достоверное антиатерогенное действие препарата наблюдается также через 8 часов ($p < 0,05$).

Таким образом, было установлено, что препарат «Алликор» обладает выраженным антиатерогенным действием, что в модели *ex vivo* проявляется в снижении накопления холестерина в культивируемых клетках, индуцированное атерогенной сывороткой крови.

Таблица 26

Влияние однократного приема препарата «Алликор» (300 мг) на атерогенность сыворотки крови (нормированные значения)

Атерогенность сыворотки крови (%)		
Исходная	Через 4 часа	Через 8 часов
100	40±6 *	60±5 *

*, достоверное снижение атерогенности сыворотки крови (p<0,05).

Было проведено сравнительное исследование антиатерогенного эффекта препаратов на основе чеснока «Алликор» (ИНАТ-Фарма, Россия) и «Kwai» (Lichtwer Pharma GmbH, Германия) в модели ex vivo в клеточной культуре.

Было выполнено 4 эксперимента с участием добровольцев, у которых кровь забирали непосредственно перед приемом 1 таблетки препарата «Алликор» (300 мг) или «Kwai» (300 мг), а также через 4, 8 и 12 часов после приема. Атерогенность сыворотки крови оценивали по накоплению суммарного холестерина в первичной культуре моноцит-макрофагов крови человека.

Таблица 27

Средние значения антиатерогенного эффекта препаратов на основе чеснока «Алликор» и «Kwai» по оценке в модели ex vivo

Препарат	Атерогенность сыворотки крови, % от исходного уровня			
	0 ч	4 ч	8 ч	12 ч
Алликор	100	17±7 *	46±11 *	67±8 *
Kwai	100	24±4 *	63±12 *	87±6

* - достоверное снижение атерогенности сыворотки крови, p<0,05.

Средние значения атерогенного потенциала сыворотки крови, нормированные по исходному значению, представлены в таблице 27.

Таким образом, было установлено, что препарат «Алликор» обладает пролонгированным (вплоть до 12 часов) выраженным антиатерогенным действием и по биологическому эффекту несколько превосходит препарат «Kwai» через 4 и 8 часов после однократного приема. Через 12 часов после однократного приема антиатерогенный эффект препарата «Алликор» сохраняется, в то время как препарат «Kwai» через 12 часов после приема не проявляет достоверного антиатерогенного действия. Полученные результаты позволили предположить,

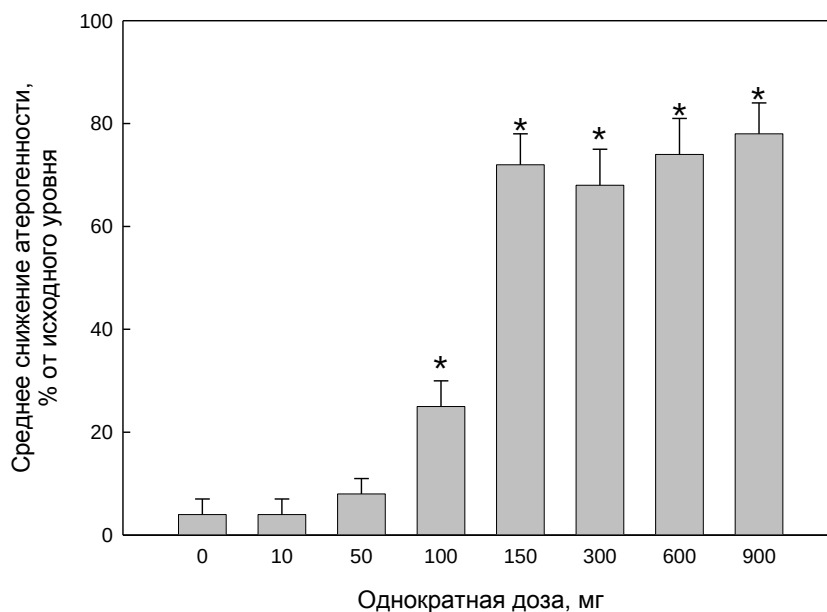


Рис. 12. Дозовая зависимость антиатерогенного эффекта препарата «Алликор».

0 – эффект после приема капсул плацебо.

* - достоверное снижение атерогенности сыворотки крови по среднему значению через 4 и 8 часов после однократного приема препарата, $p < 0,05$.

что для устойчивого снижения атерогенности сыворотки крови целесообразно принимать препарат «Алликор» с интервалом около 12 часов, а препарат «Kwai» - с интервалом около 8 часов.

Было проведено исследование дозовой зависимости антиатерогенного эффекта препарата «Алликор». В этом исследовании принимали участие 5 добровольцев (3 мужчин, 2 женщины, средний возраст 56 ± 5 лет), у которых имелась умеренная гиперхолестеринемия (холестерин сыворотки крови от 5,6 до 6,2 ммоль/л), и сыворотка крови вызывала 1,75-2,2-кратное накопление холестерина в культивируемых клетках из непораженной интимы аорты человека. Добровольцы принимали измельченные таблетки препарата «Алликор» в капсулах из расчета на содержание чесночного порошка 10, 50, 100, 150, 300, 600 и 900 мг. Интервал между исследованиями эффекта разных доз составлял от 7 до 10 дней. Сыворотку крови для исследования атерогенных свойств в первичной культуре клеток из непораженной интимы аорты человека брали через 4 и 8 часов после однократного приема препарата. Среднее снижение атерогенного потенциала считали интегральной оценкой антиатерогенного эффекта препарата. Результаты представлены на рисунке 12.

Как следует из данных, представленных на рисунке 12, в дозе 10 и 50 мг Алликор не вызывал достоверного снижения атерогенности сыворотки крови по сравнению с плацебо. Практически линейная зависимость антиатерогенного эффекта от дозы наблюдалась в узком диапазоне от 50 до 150 мг. Наконец, антиатерогенный эффект доз свыше 150 мг между собой достоверно не различался. Был сделан вывод, что минимально эффективная разовая доза препарата «Алликор» для достижения антиатерогенного эффекта составляет 150 мг, а заведомо эффективная – 300 мг.

С учетом полученных данных о рациональном режиме приема препарата «Алликор» и эффективной однократной дозировке, было предпринято проспективное исследование у 17 работающих мужчин в возрасте от 40 до 58 лет (средний возраст 51 ± 3 года) с нормолипидемией или умеренной гиперлипидемией, без клинических признаков ИБС, у которых при первичном обследовании была выявлена атерогенность сыворотки крови. Накопление холестерина в клетках из непораженной интимы аорты составляло от 142% до 212% от контрольного уровня, средняя атерогенность была $164 \pm 11\%$. До включения в исследование все участники в течение 2 месяцев 3 раза сдавали кровь для проведения анализа на атерогенность. После этого всем был назначен Алликор по 300 мг 2 раза в сутки с интервалом между приемами около 12 часов. Собеседование с врачом-исследователем и взятие крови утром натощак для определения атерогенности сыворотки крови проводили ежемесячно (допускались отклонения от назначенной даты очередного собеседования до 7 дней). Результаты наблюдения представлены на рисунке 13.

Из представленных данных следует, что постоянный прием Алликора привел к устойчивому снижению атерогенности сыворотки крови уже через 2 месяца антиатерогенной терапии. Этот эффект сохранялся на протяжении всего периода наблюдения. В среднем атерогенность сыворотки крови была снижена на 81% от исходного уровня. Таким образом, на данном этапе исследования была разработана методология снижения атерогенности сыворотки крови. Встала задача выявления и характеристики клинических последствий снижения атерогенности сыворотки крови, то есть оценки антиатеросклеротической эффективности подхода, основанного на подавлении накопления холестерина в клетках сосудистой стенки. Для решения этой задачи были организованы и проведены соответствующие клинические исследования.

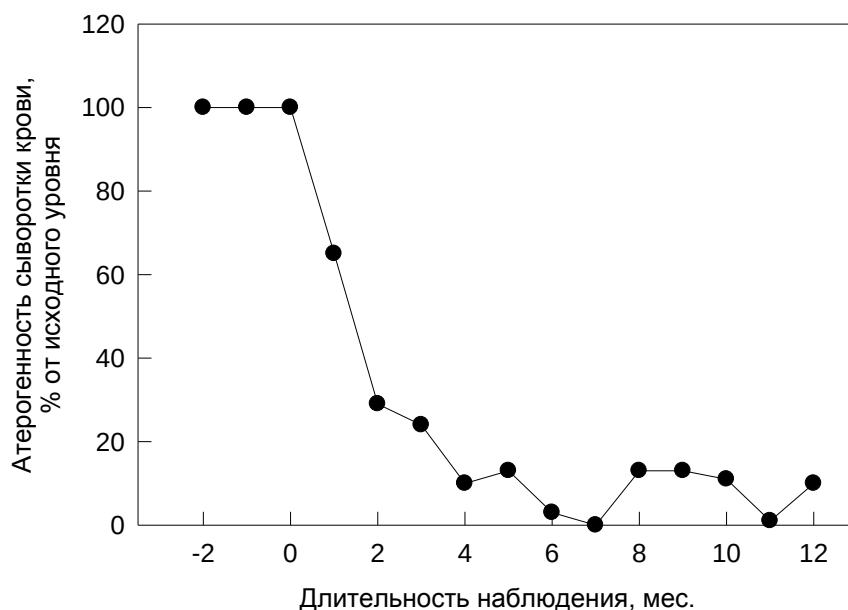


Рис. 13. Динамика изменений атерогенности сыворотки крови на фоне постоянного длительного приема Алликаора (600 мг/сут).
Исходная атерогенность сыворотки крови принята за 100%.

3.4. Клинические исследования

3.4.1. Изучение влияния препарата на основе чеснока «Kwai» на биохимические факторы сердечно-сосудистого риска и атерогенность сыворотки крови

Данное исследование проводили как двойное слепое рандомизированное плацебо-контролируемое исследование. Дизайн исследования изложен в разделе «Материалы и методы».

Как следует из данных, представленных в таблице 28, прием препарата на основе чеснока «Kwai» в течение 4 недель не приводил к существенным изменениям содержания общего холестерина и триглицеридов в сыворотке крови, но способствовал достоверному повышению содержания холестерина липопротеидов высокой плотности с первой недели приема препарата, которое к концу исследования возросло в среднем на 17% от исходного уровня ($p < 0,05$).

Содержание липидов в сыворотке крови

Показатель	Длительность приема	Kwai	Плацебо
Холестерин, мг/дл	0 недель	218±14	219±16
	1 неделя	210±15	209±15
	2 недели	216±16	213±16
	3 недели	212±17	215±17
	4 недели	216±18	222±16
Холестерин ЛВП, мг/дл	0 недель	42±4	39±4
	1 неделя	53±6 *	42±5
	2 недели	56±7 *	44±5
	3 недели	50±6 *	42±5
	4 недели	49±4 *	42±5
Триглицериды, мг/дл	0 недель	115±17	136±14
	1 неделя	110±13	132±17
	2 недели	105±10	151±16
	3 недели	103±17	129±21
	4 недели	119±18	133±17
* - достоверное отличие от исходного уровня, $p < 0,05$.			

Более выраженный эффект препарата «Kwai» был отмечен в отношении атерогенности сыворотки крови. Так, уже через 3 недели приема препарата уровень атерогенности сыворотки крови натошак был снижен в среднем на 19% от исходного уровня, а к концу исследования - на 27% (таблица 29). В то же время, в группе пациентов, принимавших плацебо, достоверных изменений атерогенности сыворотки крови не наблюдалось в течение всего исследования.

Таблица 29

Динамика атерогенности сыворотки крови

Длительность приема	Kwai	Плацебо
Накопление холестерина в клетках, % от контроля		
0 недель	209±16	182±6
1 неделя	190±14	193±8
2 недели	187±12	197±8
3 недели	170±10 *	193±9
4 недели	153±7 *	188±11

* - достоверное отличие от исходного уровня, $p < 0,05$.

Таблица 30

Окисляемость липопротеидов низкой плотности

Длительность приема	Kwai	Плацебо
Время задержки индукции окисления, мин		
0 недель	133±23	171±22
1 неделя	173±22 *	175±19
4 недели	176±21 *	187±20

*, достоверное отличие от исходного уровня, $p < 0,05$.

Прием препарата «Kwai» способствовал снижению окисляемости липопротеидов низкой плотности, что проявилось в достоверном увеличении времени задержки индукции окисления ионами меди уже после первой недели лечения (таблица 30). В то же время, в группе пациентов, принимавших плацебо, достоверных изменений окисляемости липопротеидов низкой плотности не наблюдалось в течение всего исследования.

Прием препарата «Kwai» привел к достоверному снижению способности липопротеидов низкой плотности стимулировать синтез ДНК в культивируемых клетках интимы аорты человека (таблица 31). В то же время, в группе пациентов, принимавших плацебо, достоверных изменений данного параметра не наблюдалось в течение всего исследования.

Таблица 31

Стимуляция пролиферативной активности культивируемых клеток,
индуцированная липопротеидами низкой плотности

Длительность приема	Kwai	Плацебо
Включение меченого тимидина, % от контроля		
0 недель	139±9	146±16
1 неделя	138±9	132±9
4 недели	114±4 *	123±6
* - достоверное отличие от исходного уровня, $p < 0,05$.		

Таким образом, в двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании было установлено, что прием препарата «Kwai» в течение 4 недель способствует достоверному повышению уровня холестерина липопротеидов высокой плотности, снижению атерогенности сыворотки крови, оказывает антиоксидантное и антипролиферативное действие.

3.4.2. Пилотное клиническое исследование по оценке прямого антиатеросклеротического действия препарата «Алликор»

В проспективном открытом пилотном исследовании по влиянию длительного приема препарата «Алликор» на толщину интимо-медиального слоя сонных артерий приняли участие 28 добровольцев, мужчин в возрасте от 46 до 58 лет (средний возраст 52 ± 3 года) с нормолипидемией или умеренной гиперлипидемией, без клинических признаков ИБС. При ультразвуковом исследовании сонных артерий в В-режиме у них было выявлено диффузное интимальное утолщение (без возвышающихся поражений), которое определяли по толщине интимо-медиального слоя задней стенки дистального отрезка общей сонной артерии свыше 0,70 мм хотя бы в одной артерии. Участники исследования не имели хронических заболеваний, требующих постоянного приема вазоактивных, мочегонных, липидснижающих или антидиабетических препаратов. Средняя толщина интимо-медиального слоя сонных артерий при включении в исследование составила $0,832 \pm 0,024$ мм. Участники исследования были разделены на 2 группы: 16 человек получали Алликор по 600 мг в сутки, 12

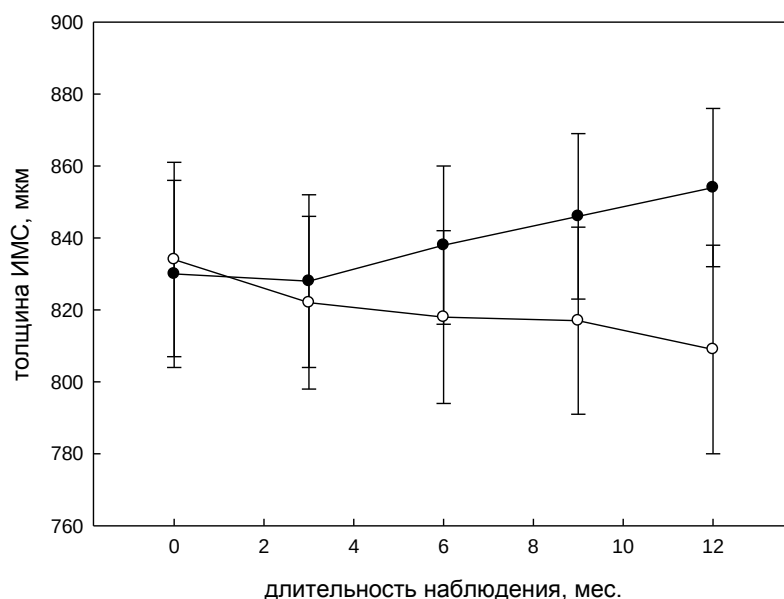


Рис. 14. Динамика изменений толщины интимо-медиального слоя сонных артерий в пилотном исследовании антиатеросклеротического действия препарата «Алликор».

человек составили контрольную группу. Собеседование с врачом-исследователем и повторное ультразвуковое обследование сонных артерий проводили каждые 3 месяца; общая длительность наблюдения составила 12 месяцев.

В течение всего периода наблюдения каких-либо изменений в состоянии наблюдаемых лиц не отмечалось; переносимость препарата «Алликор» была хорошей. Динамика изменений толщины интимо-медиального слоя сонных артерий в ходе исследования представлена на рисунке 14. Как следует из рисунка, достоверных изменений толщины ИМС сонных артерий за время наблюдения в обеих группах не произошло. Через 12 месяцев наблюдения группы достоверно не различались по средней толщине ИМС. Тем не менее, регрессионный анализ выявил достоверное различие между углом наклона кривых динамики изменений толщины ИМС ($p < 0,05$). В контрольной группе наблюдалась тенденция к увеличению толщины ИМС, достоверно отличающаяся от положения нуль-гипотезы об отсутствии изменений (F-тест 31,72; $p = 0,011$). В группе пациентов, получавших Алликор, наблюдалась тенденция к уменьшению толщины ИМС, также достоверно отличающаяся от положения нуль-гипотезы об отсутствии изменений (F-тест 28,81; $p = 0,013$).

Полученные результаты явились указанием на то, что антиатерогенная

терапия все же способствует остановке развития и регрессии субклинического атеросклероза. Для подтверждения этого предположения необходимо было провести длительное проспективное клиническое исследование с оценкой ряда клинико-биохимических параметров, связанных с атерогенезом и риском развития атеросклероза, в том числе, с оценкой динамики атерогенности сыворотки крови. Необходимо было также увеличить количество наблюдаемых пациентов, стандартизовать критерии включения и исключения, ввести плацебо-контроль, а также увеличить длительность наблюдения.

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

На предыдущих этапах было установлено, что сыворотка крови больных субклиническим и манифестировавшим атеросклерозом обладает атерогенными свойствами, то есть вызывает накопление внутриклеточного холестерина в условиях культуры клеток. Возникло 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. В качестве препарата, способствующего снижению атерогенности сыворотки крови, было предложено использовать Алликор – препарат пролонгированного действия на основе чеснока. На предыдущих этапах исследования было установлено, что прием Алликора приводит к существенному снижению атерогенности сыворотки крови 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 человек. 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 человек (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 человек (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. Вторым этапом включал оценку динамики клиничко-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.

Для выявления эпидемиологических и биохимических показателей, связанных со степенью поражения интимо-медиального слоя (ИМС) сонных артерий, был проведен бивариантный корреляционный анализ, включающий следующие показатели: возраст, систолическое артериальное давление, диастолическое артериальное давление, курение, инфаркт миокарда в анамнезе, отягощенный семейный анамнез, общий холестерин, триглицериды, холестерин ЛВП, холестерин ЛНП, холестерин ЦИК, атерогенность сыворотки крови, исходная средняя толщина ИМС, исходная максимальная толщина ИМС. Анализ был проведен на всей группе больных, включенных в исследование (260 пациентов). Полученные данные представлены в таблице 32. Было установлено, что средняя толщина ИМС достоверно коррелирует со следующими показателями: возраст, систолическое артериальное давление и уровень холестерина ЛНП. Возможно, толщина ИМС также связана с такими показателями, как диастолическое артериальное давление, курение и уровень общего холестерина, но коэффициенты корреляции не достигли значимости. Максимальная толщина ИМС коррелирует со следующими показателями: возраст, систолическое артериальное давление, уровень общего холестерина в крови, уровень холестерина ЛНП. Возможно, максимальная толщина ИМС также связана с таким показателем, как диастолическое артериальное давление, но коэффициент корреляции не достиг значимости. Были выявлены дополнительные корреляции эпидемиологических и биохимических показателей между собой. Возраст был положительно связан с систолическим артериальным давлением и холестерином ЛНП и отрицательно связан с курением и отягощенным семейным анамнезом. Систолическое артериальное давление тесно коррелировало с диастолическим давлением. Уровень общего холестерина в крови был тесно связан с холестерином ЛНП, триглицеридами, и атерогенностью сыворотки крови. Соответственно, холестерин ЛНП также был связан с атерогенностью сыворотки крови. Для триглицеридов была выявлена обратная корреляция с холестерином ЛВП.

Таблица 32

Корреляционный анализ связи толщины ИМС с эпидемиологическими и биохимическими показателями

	ИМС макс	Возраст	САД	ДАД	Курение	Анамнез	Хол	Тг	Хол ЛВП	Хол ЛНП	АТГ
ИМС ср.	0,687 p<0,001	0,166 p<0,001	0,088 p=0,006	NS (0,058) p=0,082	NS (0,062) p=0,084	NS	NS	NS	NS	0,068 p=0,028	NS
	ИМС макс.	0,140 p<0,001	0,070 p=0,028	NS (0,057) p=0,088	NS	NS	0,063 p=0,043	NS	NS	0,086 p=0,005	NS
		Возраст	0,155 p=0,012	NS	-0,358 p<0,001	-0,195 p=0,002	NS	-0,230 p<0,001	0,174 p=0,007	NS	NS
			САД	0,679 p<0,001	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
				ДАД	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
					Курение	0,170 p=0,006	NS	NS	NS	NS	NS
						Анамнез	NS	NS	NS	NS	NS
							Хол	0,401 p<0,001	NS	0,890 p<0,001	0,151 p=0,024
								Тг	-0,457 p<0,001	NS	NS
									Хол ЛВП	NS	NS
										Хол ЛНП	0,150 p=0,026

ИМС ср. – средняя толщина ИМС по данным измерений из трех позиций; ИМС макс – максимальная толщина ИМС по данным измерений из трех позиций; САД – систолическое артериальное давление; ДАД – диастолическое артериальное давление; Хол – общий холестерин; Тг – триглицериды; Хол ЛВП – холестерин ЛВП; Холл ЛНП – холестерин ЛНП; АТГ – атерогенность сыворотки крови, оцененная по накоплению холестерина в клетках из непораженной интимы аорты человека. В таблице указаны значения коэффициентов корреляции и их значимость. NS – недостоверная корреляция.

Был проведен графический поквартильный анализ связи толщины ИМС в начале исследования с основными эпидемиологическими и биохимическими показателями. Квартильное распределение толщины ИМС при включении в исследование выглядело следующим образом. В 1-ю квартиль попали пациенты, у которых толщина ИМС не превышала 0,829 мм. Граница между 2-й и 3-ей квартилью равнялась 0,911 мм. К 4-й квартили были отнесены пациенты с толщиной ИМС более 1,019 мм. Таким образом, мы рассматривали принадлежность к 1-й квартили как минимальные проявления субклинического атеросклероза, а 2-ю, 3-ю и 4-ю квартили – как сонографически явный субклинический атеросклероз. Полученные результаты представлены на рисунках 15-18.

Таким образом, графический поквартильный анализ также подтвердил наличие связи толщины ИМС с возрастом, систолическим АД, уровнем общего холестерина и холестерина ЛНП. Обращает на себя внимание нелинейная зависимость этих показателей. Так, уже нормально-высокое систолическое АД и умеренное повышение общего холестерина и холестерина ЛНП было сопряжено с наличием сонографически явного каротидного субклинического атеросклероза.

Учитывая высокую степень корреляции систолического АД с диастолическим АД, с одной стороны, и наличие корреляционной связи между систолическим АД и толщиной ИМС, с другой стороны, был проведен графический поквартильный анализ связи между толщиной ИМС и диастолическим АД (Рисунок 19).

Таким образом, тенденция к существованию связи между толщиной ИМС и диастолическим АД все же существует, что потребовало включения показателя диастолического АД в множественный регрессионный анализ.

Учитывая высокую степень корреляции атерогенности сыворотки крови с холестерином ЛНП и наличие корреляционной связи между холестерином ЛНП и толщиной ИМС был проведен графический анализ связи между толщиной ИМС и атерогенностью сыворотки крови (Рисунок 20).

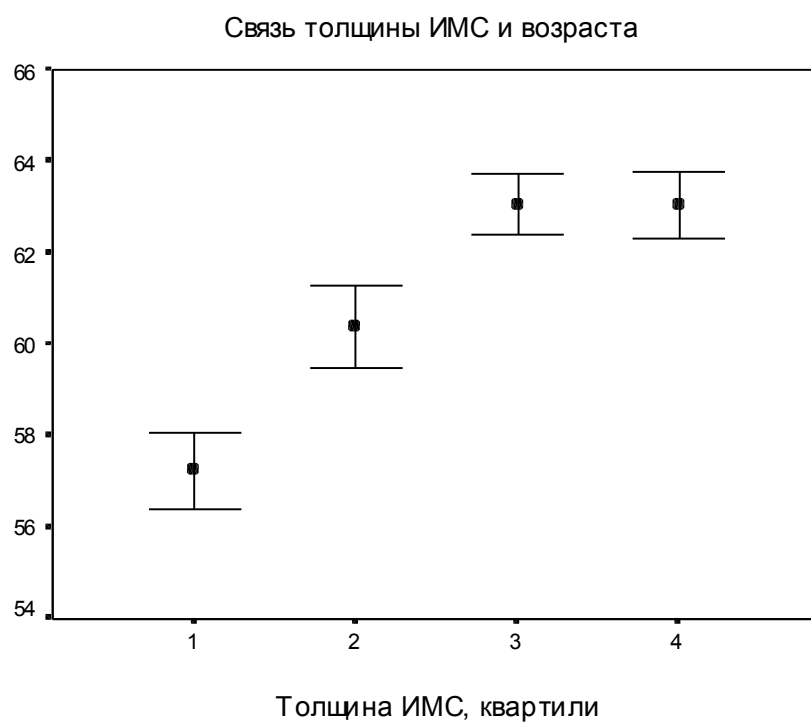


Рис. 15. Взаимосвязь возрастных показателей и средней толщины ИМС

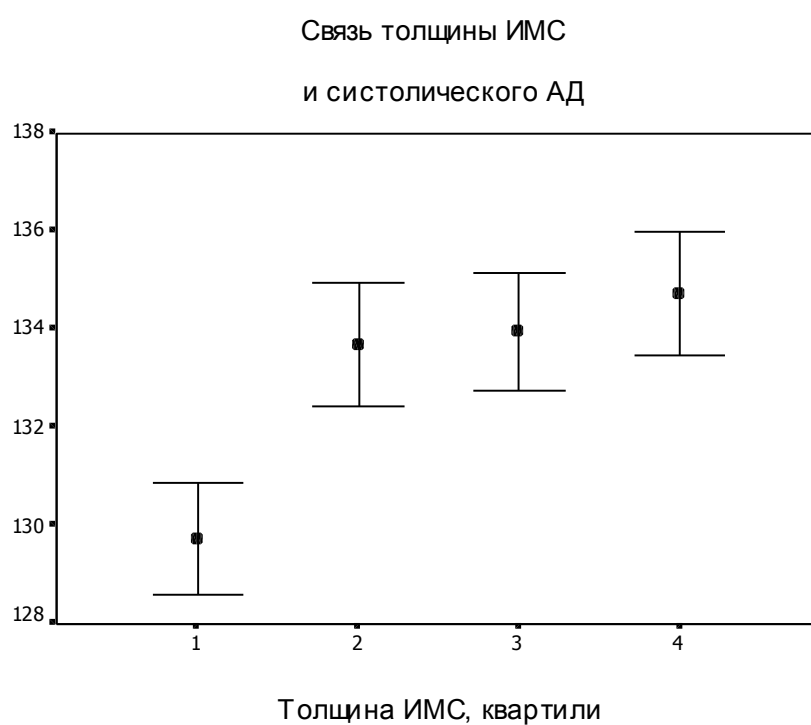


Рис. 16. Взаимосвязь показателей систолического АД и средней толщины ИМС

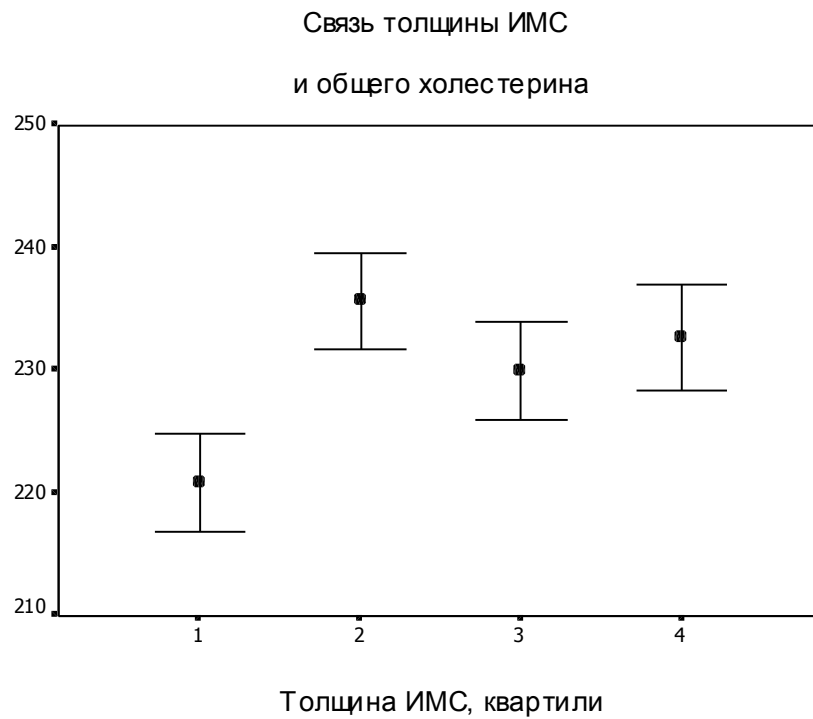


Рис. 17. Взаимосвязь уровня общего холестерина и средней толщины ИМС

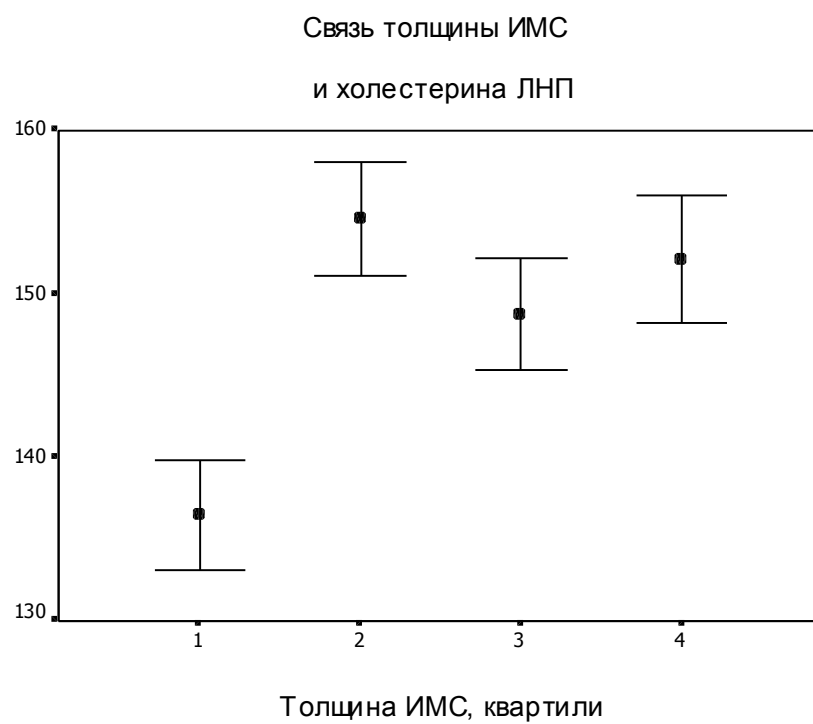


Рис. 18. Взаимосвязь уровня холестерина ЛНП и средней толщины ИМС

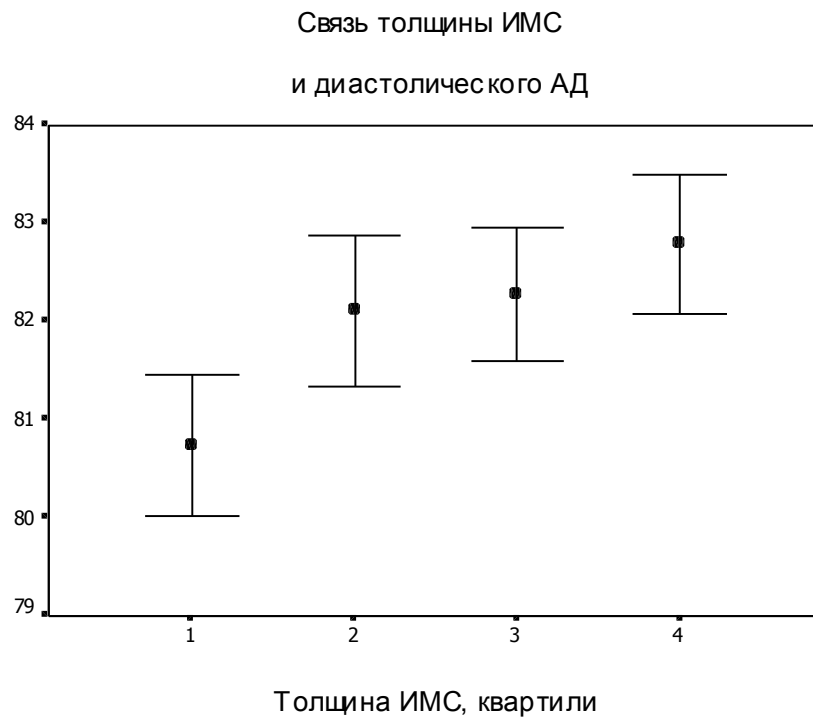


Рис. 19. Взаимосвязь показателей диастолического АД и средней толщины ИМС

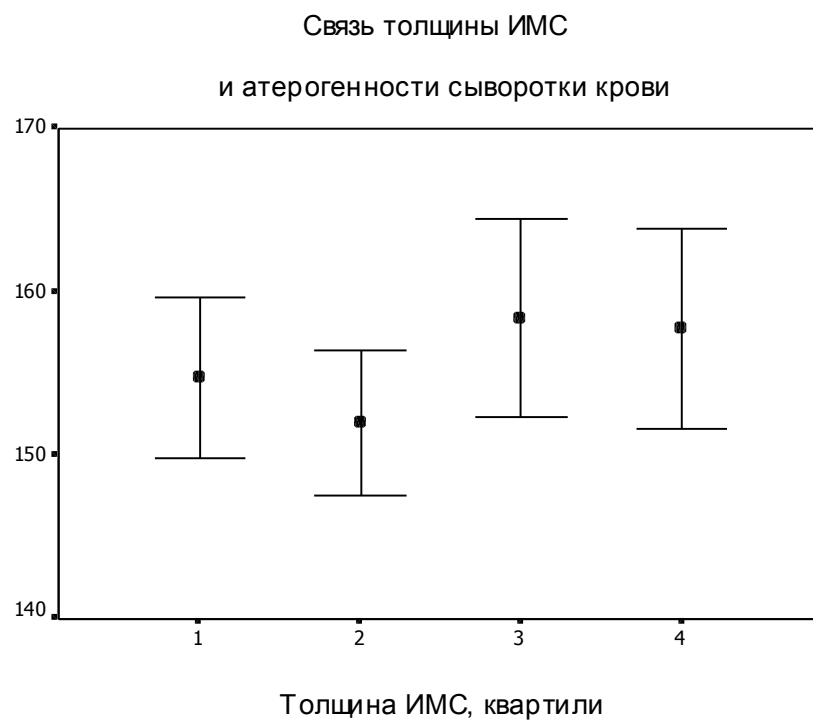


Рис. 20. Взаимосвязь показателей атерогенности сыворотки крови и средней толщины ИМС

Таблица 33

Модель регрессии $IMT=f(age;sys;cho)$

Показатель	Значение	Достоверность
F-критерий	8,939	$p<0,001$
Постоянная	0,467	$p<0,001$
Коэффициент переменной (<i>age</i>)	0,178	$p<0,001$
Коэффициент переменной (<i>sys</i>)	0,110	$p=0,015$
Коэффициент переменной (<i>cho</i>)	0,089	$p=0,049$

Таблица 34

Модель регрессии $IMT=f(age;sys;ldl)$

Показатель	Значение	Достоверность
F-критерий	9,619	$p<0,001$
Постоянная	0,482	$p<0,001$
Коэффициент переменной (<i>age</i>)	0,174	$p<0,001$
Коэффициент переменной (<i>sys</i>)	0,109	$p=0,016$
Коэффициент переменной (<i>ldl</i>)	0,108	$p=0,016$

Таким образом, связь между толщиной ИМС и атерогенностью сыворотки крови в поквартильном анализе не была выявлена. Этот факт объясняется тем, что в данное исследование были исходно включены лица, имеющие субклинический атеросклероз по сонографическим диагностическим критериям, которые, по данным наших обсервационных исследований, характеризуются высокой распространенностью атерогенности сыворотки крови.

Был проведен множественный регрессионный анализ с пошаговым исключением незначимых факторов, который подтвердил зависимость исходной толщины ИМС от возраста, систолического АД и общего холестерина или холестерина ЛНП. Достоверность модели определялась с помощью F-критерия. Для оценки достоверности коэффициентов переменных использовался метод β -коррекции. Получены следующие модели регрессии (Таблицы 33 и 34).

Установлено, что среди параметров, связанных со степенью поражения ИМС сонных артерий, определяющим является возраст, в меньшей степени – систолическое АД и холестерин ЛНП, и наименьшей значимостью обладает

уровень общего холестерина в сыворотке крови.

Такие показатели, как диастолическое АД, курение, наличие инфаркта в анамнезе, отягощенный семейный анамнез, триглицериды, холестерин ЛНП и атерогенность сыворотки крови были исключены из моделей регрессии из-за недостоверности коэффициентов переменных.

Для определения диагностической ценности эпидемиологических и биохимических показателей потребовалось проведение подробной статистической характеристики показателей с последующим кластерным анализом и перекодированием переменных величин в номинальные. Были исследованы как показатели, достоверно связанные с толщиной ИМС (возраст, систолическое АД, общий холестерин и холестерин ЛНП), так и показатели, представляющие научный интерес, но не вошедшие в регрессионную модель (атерогенность сыворотки крови, холестерин ЛВП).

Для средней толщины ИМС в начале исследования методами описательной статистики получены следующие характеристики параметра: среднее значение $0,930 \pm 0,008$ мм, 95% доверительный интервал 0,914-0,945 мм, медиана 0,900 мм, М-оценка средней по Tukey 0,897 мм, тест Колмогорова-Смирнова на нормальность распределения с коррекцией по Lilliefors 0,100 ($p < 0,001$).

Распределение по исходной толщине ИМС несколько смещено влево и не совпадает по амплитуде с нормальным распределением, что позволяет предполагать неоднородность массива данных (Рисунок 21). Действительно, кластерный анализ позволил определить, что массив состоит из четырех групп данных (кластеров). Характеристика кластеров приведена в таблице 35.

Таблица 35

Кластерный анализ показателя «Толщина ИМС»		
Кластер	Центр кластера, мм	Количество наблюдений
1	0,788	210
2	0,951	223
3	1,159	71
4	1,602	13

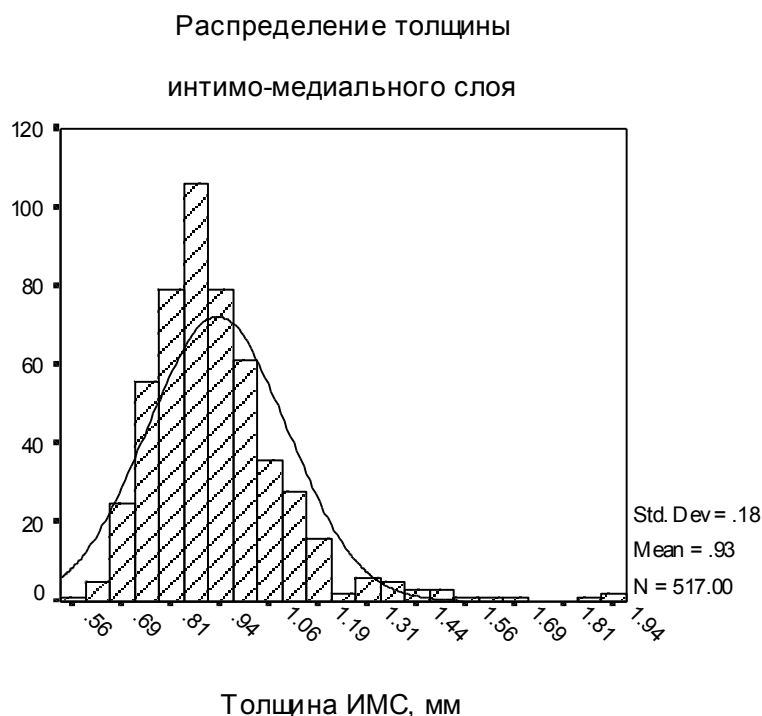


Рис. 21. Гистограмма распределения средней толщины ИМС.

Для последующего определения диагностической ценности эпидемиологических и биохимических показателей была проведена перекодировка данных о толщине ИМС по принадлежности к кластерам: кластер 1 – «минимальное утолщение ИМС», кластеры 2-4 – «явное утолщение ИМС». При распределении по принадлежности к кластерам получены следующие характеристики групп (Таблица 36).

Кластерный анализ подтвердил наличие связи толщины ИМС с возрастом, систолическим АД и холестерином ЛНП. Кроме того, обнаружена тенденция к существованию связи толщины ИМС с диастолическим АД, курением и общим холестерином.

Методами описательной статистики получены следующие характеристики параметра «Возраст пациентов»: среднее значение $60,9 \pm 0,4$ лет; 95% доверительный интервал 60,1-61,7 лет, медиана 62,0 года; М-оценка средней по Tukey 61,6 лет; тест Колмогорова-Смирнова на нормальность распределения с коррекцией по Lilliefors 0,095 ($p < 0,001$).

Таблица 36

Характеристика пациентов в зависимости от толщины ИМС

Показатель	Минимальное утолщение ИМС	Явное утолщение ИМС	Достоверность различий
Возраст, лет	58,6±0,7	62,5±0,5	p<0,001
САД, мм рт.ст.	130,7±0,9	134,6±0,8	p=0,001
ДАД, мм рт.ст.	81,1±0,6	82,6±0,5	p=0,033
Курение, %	27	34	NS (p=0,082)
Анамнез, %	18	15	NS
Холестерин, мг/дл	225,1±3,2	232,9±2,7	NS (p=0,061)
Триглицериды, мг/дл	202,3±9,1	198,2±6,2	NS
Холестерин ЛВП, мг/дл	42,2±0,8	41,6±0,7	NS
Холестерин ЛНП, мг/дл	142,4±2,7	151,7±2,3	p=0,011
Атерогенность сыворотки крови, % от контроля	152,5±3,8	157,8±3,7	NS
Средняя толщина ИМС, мм	0,788±0,004	1,027±0,009	p<0,001
Максимальная толщина ИМС, мм	1,063±0,007	1,362±0,013	p<0,001

Анализ гистограммы распределения по возрасту показал, что распределение смещено вправо и не совпадает по амплитуде с нормальным распределением, что позволяет предполагать неоднородность массива данных. Действительно, кластерный анализ позволил определить, что массив состоит из трех групп данных (кластеров). Характеристика кластеров приведена в таблице 37.

Кластерный анализ показателя «Возраст»

Кластер	Центр кластера, лет	Количество наблюдений
1	48	64
2	60	98
3	70	98

Для последующего определения диагностической ценности показателя была проведена перекодировка данных о возрасте по принадлежности к кластерам: кластер 1 – «пациенты среднего возраста», кластеры 2-3 – «пожилые пациенты». При распределении по принадлежности к кластерам получены следующие характеристики групп (таблица 38).

Кластерный анализ подтвердил наличие связи возраста с толщиной ИМС, систолическим АД, курением, семейным анамнезом, общим холестерином, триглицеридами и холестерином ЛВП. Кроме того, обнаружена тенденция к существованию связи возраста с общим холестерином.

Для систолического АД методами описательной статистики получены следующие характеристики параметра: среднее значение $133,0 \pm 0,6$ мм рт.ст.; 95% доверительный интервал 131,8-134,2 мм рт.ст.; медиана 130 мм рт.ст.; М-оценка средней по Tukey 131,6 мм рт.ст.; тест Колмогорова-Смирнова на нормальность распределения с коррекцией по Lilliefors 0,170 ($p < 0,001$).

Анализ гистограммы показал, что распределение по систолическому АД несколько смещено влево, хотя и совпадает по амплитуде с нормальным распределением, что позволяет предполагать неоднородность массива данных. Действительно, кластерный анализ позволил определить, что массив состоит из двух групп данных (кластеров). Характеристика кластеров приведена в таблице 39.

Таблица 38

Характеристика пациентов в зависимости от возраста

Показатель	Пациенты среднего возраста	Пожилые пациенты	Достоверность различий
Возраст, лет	47,7±0,4	65,3±0,3	p<0,001
САД, мм рт.ст.	129,5±1,1	134,1±0,7	p<0,001
ДАД, мм рт.ст.	81,9±0,7	82,0±0,4	NS
Курение, %	55	23	p<0,001
Анамнез, %	27	13	p<0,001
Холестерин, мг/дл	236,3±4,2	227,6±2,3	NS (p=0,060)
Триглицериды, мг/дл	249,9±13,7	183,2±4,9	p<0,001
Холестерин ЛВП, мг/дл	38,7±0,9	42,9±0,6	p<0,001
Холестерин ЛНП, мг/дл	147,7±3,4	148,0±2,1	NS
Атерогенность сыворотки крови, % от контроля	161,6±5,6	153,6±3,1	NS
Средняя толщина ИМС, мм	0,890±0,018	0,943±0,009	p=0,004
Максимальная толщина ИМС, мм	1,202±0,024	1,253±0,016	p=0,036

Для последующего определения диагностической ценности показателя была проведена перекодировка данных о САД по принадлежности к кластерам: кластер 1 – «нормальное АД», кластер 2 – «повышенное АД». При распределении по принадлежности к кластерам получены следующие характеристики групп (Таблица 40).

Кластерный анализ подтвердил наличие связи систолического АД с толщиной ИМС и диастолическим АД. Кроме того, обнаружена связь с общим холестерином и тенденция к существованию связи с холестерином ЛВП, холестерином ЛНП и триглицеридами.

Таблица 39

Кластерный анализ показателя «Систолическое АД»

Кластер	Центр кластера, мм рт.ст.	Количество наблюдений
1	124	160
2	147	100

Таблица 40

Характеристика пациентов в зависимости от систолического АД

Показатель	Нормальное САД	Повышенное САД	Достоверность различий
Возраст, лет	60,0±0,5	62,4±0,6	p=0,004
САД, мм рт.ст.	124,2±0,4	147,1±0,7	p<0,001
ДАД, мм рт.ст.	78,5±0,4	87,6±0,6	p<0,001
Курение, %	31	32	NS
Анамнез, %	15	19	NS
Холестерин, мг/дл	226,6±2,6	235,3±3,2	p=0,038
Триглицериды, мг/дл	193,2±6,5	212,4±8,8	NS (p=0,075)
Холестерин ЛВП, мг/дл	42,5±0,7	40,7±0,8	NS (p=0,080)
Холестерин ЛНП, мг/дл	145,4±2,2	152,2±3,0	NS (p=0,066)
Атерогенность сыворотки крови, % от контроля	156,2±3,7	154,7±3,9	NS
Средняя толщина ИМС, мм	0,916±0,010	0,951±0,013	p=0,029
Максимальная толщина ИМС, мм	1,223±0,014	1,269±0,016	p=0,036

По уровню общего холестерина методами описательной статистики получены следующие характеристики параметра: среднее значение 229,8±2,0 мг/дл; 95% доверительный интервал 225,8-233,9 мг/дл; медиана 226 мг/дл; М-оценка средней по Tukey 227,0 мг/дл; тест Колмогорова-Смирнова на нормальность распределения с коррекцией по Lilliefors 0,049 (p=0,009). Графический анализ показал, что распределение по холестерину несколько смещено влево и не совпадает по амплитуде с нормальным распределением, что позволяет предполагать неоднородность массива данных. Кластерный анализ

позволил определить, что массив состоит из трех групп данных (кластеров). Характеристика кластеров приведена в таблице 41.

Таблица 41

Кластерный анализ показателя «Холестерин»		
Кластер	Центр кластера, мг/дл	Количество наблюдений
1	183	81
2	235	107
3	293	52

Для последующего определения диагностической ценности показателя была проведена перекодировка данных о холестерине по принадлежности к кластерам: кластер 1 – «нормальный холестерин», кластеры 2-3 – «повышенный холестерин». При распределении по принадлежности к кластерам получены следующие характеристики групп (таблица 42).

Кластерный анализ подтвердил наличие связи общего холестерина с триглицеридами, холестерином ЛНП и атерогенностью сыворотки крови. Кроме того, обнаружена связь с систолическим АД; обнаружена тенденция к существованию связи с отягощенным семейным анамнезом. Напротив, выявленная ранее в корреляционном анализе связь между холестерином и максимальной толщиной ИМС в кластерном анализе не подтверждена.

Для холестерина ЛНП методами описательной статистики получены следующие характеристики параметра: среднее значение $147,9 \pm 1,8$ мг/дл; 95% доверительный интервал 144,4-151,4 мг/дл; медиана 145,6 мг/дл; М-оценка средней по Tukey 146,0 мг/дл; тест Колмогорова-Смирнова на нормальность распределения с коррекцией по Lilliefors 0,172 ($p=0,036$). Распределение по холестерину ЛНП было несколько смещено влево, хотя и совпадало по амплитуде с нормальным распределением, что позволило предположить неоднородность массива данных. Кластерный анализ определил, что массив состоит из двух групп данных (кластеров). Характеристика кластеров приведена в таблице 43.

Таблица 42

Характеристика пациентов в зависимости от уровня холестерина

Показатель	Нормальный холестерин	Повышенный холестерин	Достоверность различий
Возраст, лет	61,5±0,8	60,6±0,5	NS
САД, мм рт.ст.	130,9±1,0	133,7±0,8	p=0,042
ДАД, мм рт.ст.	81,7±0,7	82,2±0,5	NS
Курение, %	30	34	NS
Анамнез, %	14	19	NS (p=0,107)
Холестерин, мг/дл	183,0±1,7	253,7±1,9	p<0,001
Триглицериды, мг/дл	153,0±6,7	224,6±6,7	p<0,001
Холестерин ЛВП, мг/дл	41,5±0,8	42,0±0,7	NS
Холестерин ЛНП, мг/дл	111,0±1,7	166,8±1,8	p<0,001
Атерогенность сыворотки крови, % от контроля	146,6±3,3	161,9±3,8	p=0,008
Средняя толщина ИМС, мм	0,914±0,014	0,935±0,010	NS
Максимальная толщина ИМС, мм	1,215±0,019	1,251±0,013	NS

Для последующего определения диагностической ценности показателя была проведена перекодировка данных о холестерине ЛНП по принадлежности к кластерам: кластер 1 – «нормальный холестерин ЛНП», кластер 2 – «повышенный холестерин ЛНП». При распределении по принадлежности к кластерам получены следующие характеристики групп (Таблица 44).

Таблица 43

Кластерный анализ показателя «Холестерин ЛНП»

Кластер	Центр кластера, мг/дл	Количество наблюдений
1	120,7	134
2	182,3	106

Таблица 44

Характеристика пациентов в зависимости от холестерина ЛНП

Показатель	Нормальный холестерин ЛНП	Повышенный холестерин ЛНП	Достоверность различий
Возраст, лет	61,2±0,6	60,5±0,6	NS
САД, мм рт.ст.	132,2±0,8	133,4±1,0	NS
ДАД, мм рт.ст.	81,5±0,5	82,7±0,6	NS
Курение, %	31	34	NS
Анамнез, %	14	22	p=0,031
Холестерин, мг/дл	200,5±1,8	266,9±2,2	p<0,001
Триглицериды, мг/дл	191,8±7,3	211,3±7,3	NS (p=0,064)
Холестерин ЛВП, мг/дл	41,5±0,7	42,3±0,8	NS
Холестерин ЛНП, мг/дл	120,7±1,4	182,3±1,8	p<0,001
Атерогенность сыворотки крови, % от контроля	153,0±3,1	161,2±4,9	NS
Средняя толщина ИМС, мм	0,922±0,011	0,935±0,012	NS
Максимальная толщина ИМС, мм	1,227±0,015	1,255±0,017	NS

Кластерный анализ подтвердил наличие связи холестерина ЛНП с общим холестерином. Кроме того, обнаружена связь с отягощенным семейным анамнезом; обнаружена тенденция к существованию связи с триглицеридами. Напротив, выявленная ранее в корреляционном анализе связь между холестерином ЛНП, с одной стороны, и толщиной ИМС (средней и максимальной), а также с атерогенностью сыворотки крови, с другой стороны, в кластерном анализе не подтверждена.

Для холестерина ЛВП методами описательной статистики получены следующие характеристики параметра: среднее значение 41,8±0,5 мг/дл; 95% доверительный интервал 40,8-42,8 мг/дл; медиана 41,5 мг/дл; М-оценка средней по Tukey 40,6 мг/дл; тест Колмогорова-Смирнова на нормальность распределения с коррекцией по Lilliefors 0,067 (p<0,001). Распределение по холестерину ЛВП было смещено влево и не совпадало по амплитуде с нормальным распределением,

что позволило предположить неоднородность массива данных. Кластерный анализ позволил определить, что массив состоит из двух групп данных (кластеров). Характеристика кластеров приведена в таблице 45.

Таблица 45

Кластерный анализ показателя «Холестерин ЛВП»		
Кластер	Центр кластера, мг/дл	Количество наблюдений
1	34,9	150
2	53,4	90

Для последующего определения диагностической ценности показателя была проведена перекодировка данных о холестерине ЛВП по принадлежности к кластерам: кластер 1 – «низкий холестерин ЛВП», кластер 2 – «нормальный холестерин ЛВП». При распределении по принадлежности к кластерам полученные группы по характеристикам существенно не различались.

Таблица 46

Характеристика пациентов в зависимости от курения			
Показатель	Некурящие	Курящие	Достоверность различий
Возраст, лет	63,2±0,5	56,0±0,7	p<0,001
САД, мм рт.ст.	133,0±0,7	132,9±1,1	NS
ДАД, мм рт.ст.	82,3±0,4	81,4±0,7	NS
Анамнез, %	12	26	p<0,001
Холестерин, мг/дл	227,4±2,5	235,0±3,6	NS (p=0,082)
Триглицериды, мг/дл	196,2±6,0	209,2±10,1	NS
Холестерин ЛВП, мг/дл	41,8±0,6	41,9±0,9	NS
Холестерин ЛНП, мг/дл	146,3±2,2	151,2±3,1	NS
Атерогенность сыворотки крови, % от контроля	152,6±3,0	161,5±5,4	NS
Средняя толщина ИМС, мм	0,925±0,010	0,940±0,013	NS
Максимальная толщина ИМС, мм	1,233±0,013	1,256±0,018	NS

При распределении по курению получены следующие характеристики групп (таблица 46).

Кластерный анализ подтвердил наличие связи курения с возрастом иотягощенным семейным анамнезом; также обнаружена тенденция к существованию связи с уровнем общего холестерина.

Методами описательной статистики получены следующие характеристики параметра «Атерогенность сыворотки крови». Среднее значение $155,6 \pm 2,7$ %; 95% доверительный интервал 150,3-161,0 %; Медиана 142,0 %; М-оценка средней по Tukey 139,6 %; тест Колмогорова-Смирнова на нормальность распределения с коррекцией по Lilliefors 0,169 ($p < 0,001$).



Рис. 22. Гистограмма распределения показателя «Атерогенность сыворотки крови»

Распределение пациентов по атерогенности сыворотки крови было значительно смещено влево и не совпадало по амплитуде с нормальным распределением, что свидетельствовало о неоднородности массива данных (Рисунок 22). Действительно, кластерный анализ позволил определить, что массив состоит из четырех групп данных (кластеров). Характеристика кластеров приведена в таблице 47.

Таблица 47

Кластерный анализ показателя «Атерогенность сыворотки крови»

Кластер	Центр кластера, %	Количество наблюдений
1	122	131
2	172	75
3	250	17
4	386	7

Для последующего определения диагностической ценности показателя была проведена перекодировка данных об атерогенности сыворотки крови по принадлежности к кластерам: кластер 1 – «минимальная атерогенность», кластер 2 – «выраженная атерогенность». При распределении по принадлежности к кластерам получены следующие характеристики групп (таблица 48).

Таблица 48

Характеристика пациентов в зависимости от атерогенности сыворотки крови

Показатель	Минимальная атерогенность	Выраженная атерогенность	Достоверность различий
Возраст, лет	60,7±0,6	60,6±0,7	NS
САД, мм рт.ст.	133.5±0.9	132.5±1.0	NS
ДАД, мм рт.ст.	82.4±0.6	81.5±0.5	NS
Курение, %	34	33	NS
Анамнез, %	17	18	NS
Холестерин, мг/дл	228.7±2.8	229.3±3.3	NS
Триглицериды, мг/дл	199.7±7.4	206.4±8.5	NS
Холестерин ЛВП, мг/дл	42.4±0.8	40.5±0.7	NS (p=0,065)
Холестерин ЛНП, мг/дл	146.3±2.5	147.6±2.9	NS
Атерогенность сыворотки крови, % от контроля	121.9±1.1	200.3±4.5	p<0,001
Средняя толщина ИМС, мм	0.943±0.011	0.924±0.013	NS
Максимальная толщина ИМС, мм	1.257±0.015	1.238±0.017	NS

Таким образом, кластерный анализ выявил наличие связи атерогенности сыворотки крови с наличием инфаркта в анамнезе. Напротив, выявленная ранее в корреляционном анализе связь с общим холестерином и холестерином ЛНП не подтвердилась в кластерном анализе. Кроме того, обнаружена тенденция к существованию связи с уровнем холестерина ЛВП.

Для определения диагностической ценности клинических и биохимических показателей была проведена оценка их связи с толщиной ИМС с использованием таблицы анализа сопряженности 2x2 с поправкой по Yates. С учетом ранее полученных данных, в анализе сопряженности были исследованы следующие показатели: возраст, систолическое АД, общий холестерин, холестерин ЛНП, холестерин ЛВП и атерогенность сыворотки крови.

Достоверность сопряженности параметров с толщиной ИМС оценивалась по критерию χ^2 . Также был определен относительный риск (relative risk) параметров и отношение шансов (odds ratio). Полученные данные представлены в таблице 49 в порядке убывания степени сопряженности.

Таблица 49

Сопряженность клинических и биохимических параметров с толщиной ИМС

Параметр	χ^2	p	Относительный риск	Отношение шансов
Возраст	17,16	0,0006	1,25	2,39
Систолическое АД	9,03	0,0036	1,44	1,79
Холестерин	2,05	0,1530	1,11	1,35
Холестерин ЛВП	1,99	0,1594	1,12	1,33
Холестерин ЛНП	0,80	0,3730	1,11	1,20
Атерогенность	0,05	0,8166	0,97	0,94

Таким образом, при одномоментной оценке данной группы пациентов только возраст и систолическое АД были достоверно сопряжены с толщиной ИМС.

Чувствительность параметров для определения диагностической ценности оценивалась по доле истинно положительных результатов с использованием данных о кластерной принадлежности, полученных в кластерном анализе.

Таблица 50

Чувствительность эпидемиологических и биохимических параметров для
диагностики увеличенной толщины ИМС

Параметр	Чувствительность, %	95% доверительный интервал
Систолическое АД	67,9	62,3-73,2
Возраст	64,7	62,1-67,1
Холестерин ЛВП	61,8	58,2-65,4
Холестерин ЛНП	61,7	56,5-66,8
Холестерин	61,6	58,3-65,0
Атерогенность	60,5	55,1-65,8

Полученные данные представлены в таблице 50 в порядке убывания степени чувствительности.

Было установлено, что все изученные показатели обладают чувствительностью в плане диагностической ценности для определения субклинического атеросклероза сонных артерий. Наилучшей чувствительностью обладают такие параметры, как систолическое АД и возраст. Тем не менее, чувствительность всех параметров является крайне низкой (не превышает 80%), что делает невозможным их использование для диагностики наличия атеросклеротических поражений сонных артерий.

Таблица 51

Специфичность эпидемиологических и биохимических параметров для
диагностики увеличенной толщины ИМС

Параметр	Специфичность, %	95% доверительный интервал
Возраст	56,7	48,9-64,3
Систолическое АД	46,0	42,5-49,3
Холестерин	45,7	39,3-52,2
Холестерин ЛВП	45,3	39,3-51,3
Холестерин ЛНП	42,9	38,8-47,0
Атерогенность	38,1	34,1-42,2

Специфичность параметров для определения диагностической ценности оценивалась по доле истинно отрицательных результатов с использованием

данных о кластерной принадлежности, полученных в кластерном анализе. Полученные данные представлены в таблице 51 в порядке убывания степени специфичности.

Таким образом, ни один из изученных параметров не обладает специфичностью в плане диагностической ценности для определения бессимптомного атеросклероза сонных артерий.

Таблица 52

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
Таблица 52 (продолжение).		
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

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

В таблице 52 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 (32,2%) человек, а существенное уменьшение – у 44 (47,3%) человек. У 8 пациентов (8,6%) наблюдалось стабильное состояние, и у остальных 11 человек (11,8%) были отмечены разнонаправленные изменения, то есть прогрессирование атеросклеротического процесса в одной артерии и регрессия поражений – в другой. В группе плацебо прогрессирование атеросклероза было отмечено в 50 (48,5%) случаев, спонтанная регрессия – в 31 (30,1%) случае, стабильное состояние наблюдалось у 11 (10,7%) больных, и разнонаправленные изменения – у остальных 7 (6,8%) пациентов. 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 рисунке 23. Тенденция к уменьшению толщины ИМС в основной группе была отмечена уже после первых 3 месяцев исследования, но существенное отличие, как от исходного значения, так и от показателей в группе плацебо, было зарегистрировано только после 12 месяцев 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

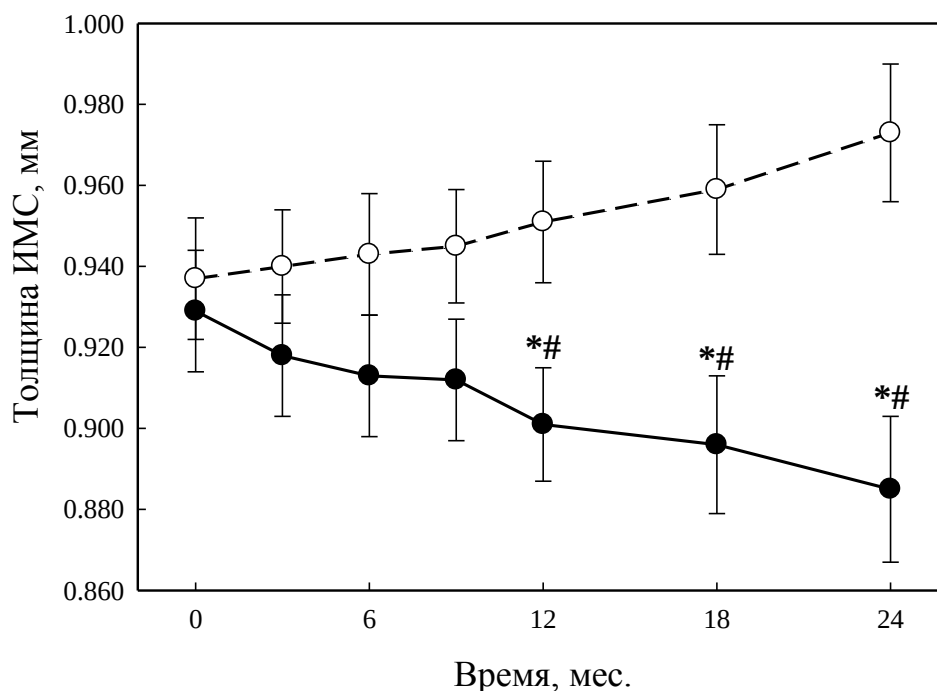


Рис. 23. Динамика изменений толщины интимо-медиального слоя.

○ – Плацебо, ● – Алликор

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

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

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 два 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 два года наблюдения ($p = 0,049$).

Атерогенность сыворотки крови при включении в исследование

отсутствовала у 17 пациентов в группе плацебо (16,5%), а у остальных 86 человек сыворотка крови была атерогенной, то есть вызывала статистически достоверное накопление холестерина в культивируемых клетках (в 1,21-3,91 раз). В среднем атерогенность сыворотки крови у больных в группе плацебо составила $166,3 \pm 5,5\%$ от контроля. У пациентов основной группы атерогенность сыворотки крови исходно отсутствовала у 23 человек (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 атерогенность сыворотки крови 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 человек; в основной группе ($n=23$) - у 9 человек, у остальных 14 пациентов сыворотка крови оставалась неатерогенной. Различия между группами пациентов, принимавших Алликор или плацебо, были статистически достоверными ($\chi^2=11,023$, $p<0,001$), то есть применение Алликора предотвращало возникновение атерогенности сыворотки крови.

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

Общая динамика изменений показателей атерогенности сыворотки крови представлена на рисунке 24. 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 месяцев лечения, и достигнутый эффект сохранялся в течение всего дальнейшего наблюдения. Анализ общей линейной модели выявил статистически достоверное отличие в динамике изменений атерогенности сыворотки крови

между пациентами, принимавшими Алликор или плацебо ($p=0,008$).

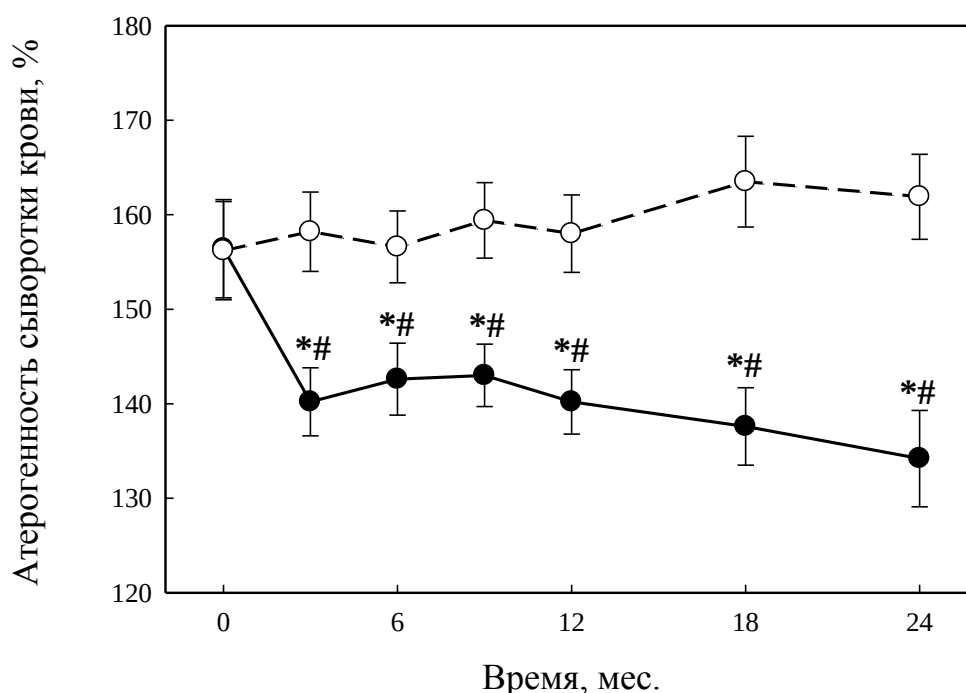


Рисунок 24. Динамика изменений атерогенного потенциала сыворотки крови.

○ – Плацебо, ● – Алликор

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

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

Наличие или отсутствие атерогенности сыворотки крови 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 атерогенности сыворотки крови 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 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 атерогенности сыворотки крови и изменениями 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.

Изменения липидных показателей сыворотки крови представлены в таблице 53. В основной группе уровень общего холестерина оставался стабильным в течение всего исследования, в то время как в группе плацебо произошло умеренное его повышение на 4,4% от исходного уровня (95% ДИ от 2,2% до 8,8%). Уровень триглицеридов сыворотки крови достоверно снизился в обеих группах: в основной – на 13,4% (95% ДИ от 4,8% до 22,4%) и в группе плацебо – на 15,2% от исходного уровня (95% ДИ от 4,9% до 26,9%). Уровень холестерина ЛВП повысился в обеих группах: в основной – на 0,27 ммоль/л (95% ДИ от 0,07 до 0,33 ммоль/л) и в группе плацебо – на 0,13 ммоль/л (95% ДИ от 0,05 до 0,30 ммоль/л). Уровень холестерина ЛНП достоверно снизился у пациентов, получавших Алликор, после 12 месяцев лечения, и к концу исследования это снижение составило 5,2% от исходного значения (95% ДИ от 2,8% до 8,9%).

Напротив, в группе плацебо произошло умеренное повышение уровня холестерина ЛНП на 9,3% за два года наблюдения (95% ДИ от 4,4% до 14,2%). По последнему показателю группы пациентов существенно различались через 3, 18 и 24 месяца исследования ($p<0,05$).

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 атерогенность сыворотки крови не изменилась за время исследования, была выявлена корреляция между изменениями толщины ИМС и уровня холестерина ЛНП ($r=0,295$, $p=0,018$).

Таблица 53

Изменение липидных параметров сыворотки крови

Группы	Продолжительность исследования, мес.						
	0	3	6	9	12	18	24
Общий холестерин, ммоль/л							
Алликор	6,14±0,12	6,01±0,13	6,01±0,13	6,09±0,13	6,05±0,13	6,03±0,12	6,01±0,14
Плацебо	6,02±0,10	6,20±0,11*	6,20±0,12*	6,35±0,12*	6,34±0,13*	6,32±0,12*	6,29±0,13*
Холестерин ЛПВП, ммоль/л							
Алликор	1,07±0,03	1,15±0,04*	1,15±0,03*	1,24±0,04*	1,29±0,04*	1,32±0,03*	1,34±0,04*
Плацебо	1,10±0,03	1,18±0,03*	1,24±0,04*	1,25±0,03*	1,34±0,04*	1,29±0,04*	1,23±0,04*
Холестерин ЛПНП, ммоль/л							
Алликор	4,06±0,10	3,85±0,11*#	3,94±0,11	3,96±0,11	3,87±0,11*	3,89±0,11*#	3,85±0,12*#
Плацебо	3,88±0,09	4,16±0,10*	4,09±0,11*	4,23±0,11*	4,11±0,11*	4,19±0,10*	4,24±0,12*
Триглицериды, ммоль/л							
Алликор	2,17±0,14	2,18±0,13#	1,99±0,12	1,91±0,11*	1,91±0,12*	1,87±0,13*	1,88±0,12*
Плацебо	2,23±0,12	1,86±0,08*	1,87±0,10*	1,87±0,09*	1,95±0,12*	1,92±0,12*	1,89±0,10*

* - статистически значимое отличие ($p<0,05$) от данных на начало исследования, # - статистически значимое отличие ($p<0,05$) от плацебо

3.5. Клинико-эпидемиологические исследования и апробации

3.5.1. Изучение кардиопротекторного действия препарата «Алликор» в популяционных исследованиях

В заочном эпидемиологическом исследовании по определению влияния приема Алликора на показатели заболеваемости и смертности принимало участие 3429 человек, жителей Москвы в возрасте старше 50 лет, которые самостоятельно принимали Алликор и дали согласие на регулярное интервью. Среди них было 1257 мужчин, средний возраст составил $65,6 \pm 0,3$ года (от 50 до 91 года), и 2172 женщины, средний возраст составил $65,3 \pm 0,2$ года (от 50 до 97 лет). Максимальный срок наблюдения составил 12 месяцев.

За время наблюдения было отмечено 59 случаев смерти (17,2 случаев на 1000 населения), из них 7 смертей произошло по причине острого инфаркта миокарда, 8 смертей по причине острого нарушения мозгового кровообращения, 1 случай – из-за осложнений облитерирующего атеросклероза нижних конечностей, 1 случай по причине пневмонии, 3 случая по причине онкологических заболеваний. В остальных случаях причину смерти не идентифицировали по морально-этическим соображениям. Поэтому в анализе изменений частоты смертей использовали показатель общей смертности, за вычетом известных 4 случаев, явно не связанных с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Наибольшее количество случаев смерти отмечалось в период, когда лица, находившиеся под наблюдением, начинали прием Алликора. В первые 3 месяца после начала приема было 32 случая смерти. В последующие кварталы количество смертных случаев резко снизилось и составляло во 2-й квартал 8 случаев, в 3-й квартал – 7 случаев и в 4-й квартал – 8 случаев. Нормированные показатели смертности представлены на рисунке 25. К сожалению, в данном заочном исследовании не была использована контрольная группа, но по статистическим данным общая смертность в России в возрастной группе от 68 до 74 лет составляет 17,8 случаев на 1000 населения. Этот показатель близок к уровню смертности, наблюдавшемуся в нашем заочном исследовании.

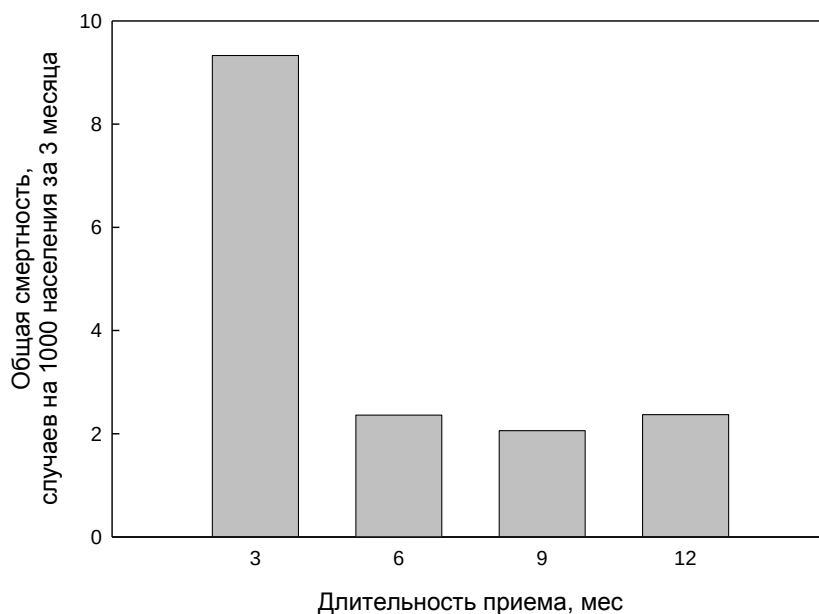


Рисунок 25. Динамика показателей общей смертности на фоне приема Алликора

Результаты данного исследования говорят о том, что длительный прием препарата антиатерогенного действия может способствовать снижению смертности.

В 2002-2003 г.г. в г. Путивле Сумской области (Украина) проводилась оздоровительная программа по массовой профилактике сердечно-сосудистых и респираторно-вирусных заболеваний. Жители города, добровольные участники оздоровительной программы, получали на руки препарат «Алликор» (таблетки пролонгированного действия, содержащие 150 мг чесночного порошка) по 1 таблетке 2 раза в день не менее 12 месяцев. Жители города, отказавшиеся от участия в программе, составили контрольную группу.

В рамках оздоровительной программы под наблюдение было включено 9574 человека, из них 4413 человек (46,1%) дали согласие на прием Алликора, и остальные 5161 человек (53,9%) составили контрольную группу. В течение периода наблюдения с момента включения до 31 декабря 2003 г. из основной группы выбыли 232 человека, что составило 5,3% от основной группы. Анализ причин выбытия представлен в таблице 54.

Таблица 54

Выбытие из основной группы с указанием причины

Причина выбытия	Всего, человек	Доля от общего количества человек в группе, %	Доля от выбывших по причине побочных явлений, %
Отказ от участия в программе	145	3,3	-
Смена места жительства	6	0,1	-
Итого:	151	3,4	-
Побочные явления			
Со стороны ЖКТ	55	1,2	67,0
в том числе:			
болевые ощущения	38	0,9	46,3
диспепсические явления (изжога, отрыжка, горечь во рту)	16	0,4	19,5
геморрой	1	<0,1	1,2
Со стороны ССС	9	0,2	11,0
Со стороны почек	2	<0,1	2,4
Индивидуальная непереносимость	11	0,2	13,4
Другие причины	5	0,1	6,2
Итого:	82	1,9	100,0

Причиной выбытия из-под наблюдения большей части лиц (145 человек, или 62,5% от всех выбывших) явился отказ от дальнейшего участия в программе и прекращение приема Алликора. У 82 человек (35,3% от всех выбывших) были отмечены побочные явления при приеме Алликора, что послужило причиной отказа от дальнейшего приема препарата. Основным типом побочных явлений были отрицательные симптомы со стороны желудочно-кишечного тракта (67% всех побочных явлений) – болевые ощущения в эпигастральной области и правом подреберье, изжога, отрыжка, чувство горечи в ротовой полости, что может быть

связано с желчегонным и раздражающим действием компонентов чеснока. Таким образом, частота побочных явлений при приеме Алликора составила 1,86%, что является низким показателем и свидетельствует о хорошей переносимости препарата.

С учетом выбывших из-под наблюдения жителей, 4181 человек в основной группе принимали Алликор по 1 таблетке 2 раза в день с момента включения до конца декабря 2003 г., то есть не менее 12 месяцев. Регулярность приема препарата по данным опроса составила не менее 90%.

Основная группа несколько отличалась от контрольной по количеству человек, находящихся на диспансерном учете в связи с наличием хронических заболеваний сердечно-сосудистой системы, а именно, ишемической болезни сердца и сочетания ИБС с гипертонической болезнью.

Количество больных ИБС среди участников оздоровительной программы составило 643 человека (15,4% от группы), а в контрольной группе – 610 человек (11,8%). При этом количество больных ИБС+ГБ среди участников оздоровительной программы составило 286 человек (6,8% от группы), и в контрольной группе – 280 человек (5,4%). Количество больных гипертонической болезнью среди участников оздоровительной программы составило 587 человек (14,0% от группы), и в контрольной группе – 689 человек (13,4%), то есть по данному показателю группы не различались.

Частота случаев проявлений ишемической болезни сердца (приступы стенокардии, проявления нестабильной стенокардии, ухудшение общего состояния, другие проявления недостаточности коронарного кровообращения), потребовавших обращения за медицинской помощью, в основной группе была ниже в 4,8 раза, чем в контрольной группе. Среди участников оздоровительной программы было зарегистрировано 168 случаев обращения к врачу по причине ИБС (0,26 обращений на больного в год), а в контрольной группе – 756 случаев (1,24 случая обращений на больного в год).

Таблица 55

Показатели общей и сердечно-сосудистой смертности

Показатель	Алликор		Официальные данные по району	
	Число случаев	на 1000 населения	Число случаев	На 1000 населения
Общая смертность	35	8,4 *	694	20,7
В том числе:				
Смертность от сердечно-сосудистых заболеваний	26	6,2 *	451	13,4
* - достоверное различие частоты случаев, $p < 0,05$.				

Частота обострений гипертонической болезни (гипертонические кризы, ухудшение общего состояния), потребовавших обращения за медицинской помощью, в основной группе была в 4,3 раза ниже, чем в контрольной группе. Среди участников оздоровительной программы был зарегистрирован 141 случай обращения к врачу по причине гипертонической болезни (0,24 обращений на больного в год), а в контрольной группе – 712 случаев (1,03 случаев обращений на больного в год).

Проведение оздоровительной программы благоприятно сказалось и на показателях общей и сердечно-сосудистой смертности (таблица 55). В группе жителей, участвовавших в оздоровительной программе и принимавших Алликор в течение 12 и более месяцев, общая смертность была в 2,5 раз ниже, чем в районе, а сердечно-сосудистая смертность – в 2,2 раза ниже.

Массовая оздоровительная программа по профилактике сердечно-сосудистых и респираторно-вирусных заболеваний выявила чрезвычайно высокую эффективность в отношении снижения заболеваемости респираторно-вирусными и сердечно-сосудистыми заболеваниями, а также в отношении снижения смертности от сердечно-сосудистых заболеваний. Эффективность программы по ряду показателей оказалась выше ожидаемых результатов, прогнозируемых на основании данных ранее проведенных клинических исследований. Высокая эффективность оздоровительной программы была обусловлена рациональным применением Алликора в качестве нелекарственного

оздоровительного препарата, внедрением массового подхода, использованием сил территориально-участковой медицинской службы, административной поддержкой программы.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной монографии описаны клеточные модели, разработанные на основе первичной культуры клеток из интимы аорты человека. Используемые первичные культуры интимоцитов представляли собой смешанную популяцию клеток, состоящую из типичных гладкомышечных клеток, экспрессирующих α -актин и модифицированных гладкомышечных клеток, дополнительно экспрессирующих антигены перититов, а также гематогенных клеток. Часть клеточных элементов одновременно экспрессировала макрофагальный антиген CD68 и гладкомышечный α -актин. В первичной культуре клеток, выделенных из непораженных атеросклерозом участков интимы аорты человека, в среднем содержалось 75% гладкомышечных клеток, 15% клеток, одновременно экспрессирующих гладкомышечный α -актин и антиген макрофагов, 5% макрофагов, и 5% клеток не удалось идентифицировать с помощью иммуноцитохимических методов. В первичной культуре клеток, выделенных из жировой полосы, в среднем содержалось около 50% гладкомышечных клеток, 25% клеток, одновременно экспрессирующих гладкомышечный α -актин и антиген макрофагов, 15% макрофагов, и 10% неидентифицированных клеток. В первичной культуре клеток, выделенных из липофиброзной бляшки, в среднем содержалось около 60% гладкомышечных клеток, 15% клеток, одновременно экспрессирующих гладкомышечный α -актин и антиген макрофагов, 15% макрофагов, и 10% неидентифицированных клеток. Эти характеристики в целом соответствуют долевого содержанию гематогенных клеток в интиме аорты человека, как было показано в многочисленных исследованиях *in situ* [33, 45, 194, 243, 407, 408]. Так, в нормальных участках интимы аорты человека доля гематогенных клеток составляет около 5%, в липидных полосах - около 10%, а в липофиброзных бляшках – около 15%.

Данные по содержанию липидов в культивируемых клетках хорошо сочетаются с результатами исследований липидного состава протеогликанового слоя интимы аорты человека в норме и при атеросклерозе [2, 12, 57]. Так, содержание общих липидов (без подразделения на внутриклеточные и внеклеточные) в липидных полосах возрастает в 3 раза, а в липофиброзных бляшках – в 6,5 раз по сравнению с нормой. Этот рост происходит, главным образом, за счет накопления холестерина, прежде всего, в этерифицированной

форме.

Таким образом, используемые первичные культуры клеток могут считаться адекватными моделями для воспроизведения ключевых проявлений атеросклероза *in vitro*. Они имеют аналогичные иммуноцитохимические и биохимические показатели, что и исходная ткань, и сохраняют эти свойства в течение первых 1-2 недель культивирования. Источник получения клеток – протеогликановый (эластико-гиперпластический) слой интимы аорты человека, в свою очередь, является морфологическим субстратом для возникновения и прогрессирования атеросклероза.

Первичную культуру клеток, выделенных из непораженных атеросклерозом участков интимы аорты, использовали для воспроизведения процессов атерогенеза на клеточном уровне и оценки антиатерогенных свойств исследуемых веществ, в том числе, для оценки атерогенного потенциала сыворотки крови. 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. На основе первичной культуры клеток, культивируемых 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, то есть получение специфических фармакодинамических характеристик.

С помощью данных моделей была оценена распространенность такого явления, как атерогенность сыворотки крови, то есть ее способности вызывать накопление холестерина в культивируемых клетках и, таким образом, воспроизводить первичный акт атерогенеза на клеточном уровне. Была оценена антиатерогенная и антиатеросклеротическая активность различных

лекарственных средств и компонентов натурального происхождения в экспериментах *in vitro* и в модели *ex vivo*. Было продемонстрировано, что антиатеросклеротическое и антиатерогенное действие свойственны таким классам лекарственных средств, как ингибиторы ГМГ-КоА редуктазы (статины) и антагонисты кальция. Тем не менее, возможность их широкого применения в качестве средств антиатеросклеротической терапии является весьма ограниченной из-за наличия строгих показаний к назначению, противопоказаний и возможности развития побочных эффектов и явлений. С учетом массовой распространенности субклинического атеросклероза, стояла задача разработки нелекарственных подходов к антиатерогенной и антиатеросклеротической терапии, основанной на подавлении процессов внутриклеточного накопления холестерина в сосудистой стенке. В клеточных моделях *in vitro* и *ex vivo* был проведен скрининг биологически активных веществ натурального происхождения и растительных препаратов. В результате была идентифицирована группа натуральных продуктов, обладающая выраженным антиатерогенным действием в модели *ex vivo*. Из выявленных растений, обладающих антиатерогенным действием, внимание привлек чеснок (*Allium sativum*). В научной литературе было опубликовано большое количество результатов исследования кардиопротективного действия чеснока и препаратов на его основе. Известно, что чеснок оказывает влияние на ряд факторов риска ССЗ: снижает уровень холестерина в плазме крови, снижает артериальное давление, подавляет агрегационную способность тромбоцитов и повышает фибринолитическую активность плазмы крови [85, 87]. Кроме того, наличие достаточной сырьевой базы позволяло планировать разработку отечественного препарата на основе чеснока, предназначенного для патогенетической профилактики и терапии атеросклероза на ранних стадиях процесса. Эти причины, вместе взятые, привели к тому, что было принято решение провести углубленное изучение антиатеросклеротических и антиатерогенных свойств чеснока. Было установлено, что экстракт чесночного порошка способен подавлять синтез липидов, как в нормальных, так и в атеросклеротических клетках. Кроме того, этот агент подавляет захват липопротеидов и внутриклеточную деградацию эфиров холестерина, содержащихся в липопротеидах, что вело к снижению накопления эфиров холестерина в культивируемых клетках, индуцированному ЛНП. Предположение о наличии у препаратов чеснока прямого

антиатеросклеротического действия было подтверждено в экспериментах на животной модели атеросклероза, а также в клинических исследованиях соответствующего дизайна. Было установлено, что подавление атерогенного потенциала сыворотки крови приводит к остановке прогрессирования атеросклероза, а в ряде случаев и к регрессии имеющихся поражений. Наконец, в эпидемиологических исследованиях, проводившихся в рамках оздоровительных программ, было установлено, что антиатерогенная терапия способствует улучшению таких демографических показателей, как заболеваемость и смертность. Патологическая сущность полученных результатов заключается в том, что доказана роль атерогенного потенциала сыворотки крови в развитии и прогрессировании субклинического атеросклероза, предложен и апробирован подход к антиатеросклеротической терапии, основанный на подавлении процессов накопления холестерина в клетках из артериальной стенки, а также разработаны клеточные модели для разработки методов патогенетической терапии атеросклероза.

Для атеросклероза характерно сочетание множественных морфологических, гистологических и гемореологических изменений в артериях эластического или мышечно-эластического типа [357]. 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 теоретически 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, то есть обладает атерогенным потенциалом [34, 74]. Атерогенность сыворотки крови связана, прежде всего, с присутствием в ней модифицированных ЛНП [74, 78, 80], и в некоторой степени – атерогенных факторов нелипидной природы [36, 50, 58]. Атерогенность сыворотки крови, выявляемая в исследованиях с использованием культуры клеток, может служить интегральной характеристикой процесса накопления внутриклеточных липидов, ключевого звена атерогенеза. Существенное снижение атерогенности сыворотки крови 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: липоидоз, пролиферацию и фиброз. В работах В.В. Тертова и сотр., А.Н. Орехова и сотр. было продемонстрировано, что накопление внутриклеточного холестерина является запускающим фактором для стимуляции пролиферативной активности клеток, синтеза белка и компонентов внеклеточного матрикса [52, 76, 79], и инициирующим событием в атерогенезе считают именно избыточное отложение холестерина в клетках артериальной стенки.

Распространенность атерогенности сыворотки крови была изучена в ряде работ. Ранее было установлено, что 92% образцов сыворотки крови у больных с ангиографически документированным коронарным атеросклерозом вызывают накопление холестерина в модели *in vitro*, а у здоровых лиц этот показатель не превышает 20% [34, 58, 76]. У больных сахарным диабетом 2 типа, не имеющих клинических признаков ИБС, атерогенность сыворотки крови была выявлена в 88% случаев, а у больных сахарным диабетом 1 типа – в 55% случаев [18, 25, 26, 65]. Атерогенные свойства сыворотки крови были выявлены более чем в 60% случаев у больных системной красной волчанкой [9, 35]. Тем не менее, данных о распространенности явления атерогенности сыворотки крови у разных категорий лиц, в особенности, при субклиническом атеросклерозе, было недостаточно.

В данном исследовании было установлено, что у здоровых лиц, не имеющих факторов риска ИБС, атерогенность сыворотки крови выявляется приблизительно в 1/5 случаев. При этом не исключалось, что у здоровых лиц с атерогенной сывороткой имеется недиагностированный субклинический атеросклероз. 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, возрастала приблизительно до 70%. Наконец, при явном атеросклерозе, имеющем

клинические проявления в виде ИБС, атерогенность выявлялась почти в 90% случаев.

Анализ сопряженности атерогенности сыворотки крови и явного (или предполагаемого с высокой долей вероятности) субклинического атеросклероза говорит о высокой связи этих параметров. В случае выявления атерогенности сыворотки крови отмечались высокие показатели отношения шансов и относительного риска. При этом атерогенность сыворотки крови обладала высокой диагностической значимостью. Статистические данные, полученные в исследовании, говорят о том, что атерогенность сыворотки крови 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.

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 [114]. 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).

При исследовании антиатеросклеротических свойств биологически активных веществ, выделенных из натуральных источников, оказалось, что ряд из них обладает выраженной активностью *in vitro*. Определенный интерес представляли следующие биологически активные вещества: биоханин А, циннарозид, хризозериол, трицитен (трицитен-3-*о*-бета-D-глюкозид), генисин, кверцетин, мирицетин (мирицетин-3-глюкозид), изооринтин, сверцизин, лемонин, аллицин, бетаин, глицирризин, карвакрол, лютеин, генистеин, пеонол. Критерием отбора служило проявление антиатеросклеротического эффекта (снижение содержания внутриклеточного холестерина и/или снижение пролиферативной активности клеток). Был проведен поиск по фитохимической и этноботанической базе данных [160, 161] с целью идентификации растений, содержащих данные биологически активные вещества в достаточном количестве. Для дальнейшего скрининга были выбраны следующие растения и натуральные компоненты (из доступных для исследования): спирулина (*Spirulina platensis*), лук (*Allium cepa*), свекла (*Beta vulgaris*), проростки пшеницы (*Triticum vulgaris*), солянка холмовая (*Salsola collina*), солодка гладкая (*Glycyrrhiza glabra*), чеснок (*Allium sativum*) и экстракт из хвои сосны (*Pinus sylvestris*).

В результате проведенных исследований оказалось, что наиболее выраженным интегральным антиатерогенным действием в модели *ex vivo* обладали проростки пшеницы и порошок чеснока. Они существенно снижали атерогенность сыворотки крови и обладали достаточно длительным биологическим действием. Однако динамика снижения атерогенности была более

выраженной у чесночного порошка. В научной литературе было опубликовано большое количество результатов исследования кардиопротективного действия чеснока и препаратов на его основе. Было известно, что чеснок оказывает влияние на ряд факторов риска ССЗ: снижает уровень холестерина в плазме крови, снижает артериальное давление, подавляет агрегационную способность тромбоцитов и повышает фибринолитическую активность плазмы крови [85, 87]. Кроме того, наличие достаточной сырьевой базы позволяло планировать разработку отечественного препарата на основе чеснока, предназначенного для патогенетической профилактики и терапии атеросклероза на ранних стадиях процесса. Эти причины, вместе взятые, привели к тому, что именно чеснок привлек особое внимание. Было принято решение провести углубленное изучение антиатеросклеротических и антиатерогенных свойств чеснока.

Прямое влияние чеснока и препаратов на его основе на развитие и прогрессирование атеросклероза является объектом постоянной дискуссии [213, 223, 224, 244, 261-263]. При этом антиатеросклеротический эффект чеснока зачастую связывают с его гиполипидемическим действием. Действительно, лабораторными и клиническими исследованиями было показано, что чеснок способен снижать содержание холестерина и ЛНП в крови [87, 261, 301, 332, 336, 389]. Предполагают, что механизм липидснижающего действия чеснока основан на подавлении ГМГ-КоА редуктазы [179, 180, 358].

В отличие от гиполипидемического 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 непораженной интимы, т.е. вызывал прямой антиатеросклеротический (терапевтический) и антиатерогенный (профилактический) эффекты, соответственно.

Механизмы антиатеросклеротического эффекта экстракта чесночного порошка, т.е. его способности снижать содержание липидов в клетках из бляшки, исходно насыщенных внутриклеточным жиром, заключаются, по-видимому, в

подавлении синтеза триглицеридов и эфиров холестерина клетками интимы артерий. Экстракт чесночного порошка прямо влияет на активность ферментов синтеза и гидролиза эфиров холестерина, подавляя АХАТ и стимулируя холестеринэстеразу. Интересно отметить, что концентрации экстрактов чесночного порошка, вызывающие изменения содержания внутриклеточных липидов, а также влияющие на активность ферментов, близки к расчетным терапевтическим действующим концентрациям.

Концентрационная зависимость стимулирующего действия экстракта чеснока на активность холестеринэстеразы имела колоколообразный характер. Такой характер эффекта может свидетельствовать о наличии в составе экстракта чеснока различных компонентов, стимулирующих и подавляющих активность фермента. С другой стороны, подобная колоколообразная концентрационная зависимость была получена в работах Siegel et al. [366-368], где водный экстракт чеснока и чистый аджоен (один из биологически активных компонентов чеснока) вызывали колоколообразную концентрационно-зависимую гиперполяризацию и релаксацию в клетках артериальной стенки.

Для изучения антиатерогенного (профилактического) эффекта экстракта чесночного порошка *in vitro* были использованы нормальные клетки аорты и атерогенная сыворотка больных коронарным атеросклерозом. Такая сыворотка способна вызывать накопление липидов в клетках аорты, которое сопровождается стимуляцией пролиферации и синтеза внеклеточного матрикса, т.е. всех основных проявлений атеросклероза на клеточном уровне [52, 58]. Фактором сыворотки, ответственным за проявление ее атерогенных свойств, являются модифицированные ЛНП, представляющие подфракцию ЛНП, циркулирующую в крови больных наряду с нативными липопротеидами (53). Модификация этих липопротеидов имеет множественный характер и заключается в низком содержании сиаловой кислоты, большей плотности, меньшем размере, более высоком отрицательном заряде, наличии продуктов окисления и других изменениях [66, 77, 78, 80, 82, 229]. Множественно-модифицированные ЛНП были использованы для того, чтобы вызвать накопление липидов в культивируемых клетках аорты. Экстракт чесночного порошка подавлял захват модифицированных ЛНП и деградацию поступивших в клетку эфиров холестерина, в результате чего внутриклеточное накопление эфиров холестерина существенно снижалось. Эти данные позволяют объяснить механизмы развития

антиатеросклеротического и антиатерогенного эффекта чеснока, наблюдаемого в клеточных моделях *in vitro* и *ex vivo*.

Было установлено, что экстракт порошка чеснока содержит ряд биологически активных компонентов, способных оказывать антиатеросклеротическое и антиатерогенное действие в условиях клеточной модели *in vitro*, при этом положительно действующие компоненты по интегральной биологической активности преобладают над потенциально проатерогенными компонентами. Основные антиатерогенные и антиатеросклеротические компоненты чеснока являются серосодержащими аминокислотами и сульфоксидами. Выявляемое в условиях клеточной модели *ex vivo* прямое антиатерогенное действие чеснока, по всей видимости, обусловлено действием присутствующих в крови биологически активных компонентов чеснока и их активных метаболитов.

Химия чеснока весьма сложна. Чеснок содержит большое количество сероорганических соединений, аминокислот, витаминов и микроэлементов (51). Ряд сероорганических соединений (аллицин, аджоин, S-аллилцистеин, S-метилцистеин, диаллилдисульфид и различные сульфоксиды) может способствовать развитию антиатеросклеротического действия чеснока [49, 134, 144, 436]. В настоящее время существует большое количество препаратов на основе чеснока. Они могут быть разделены на 4 группы: эссенциальные масла, мацераты, экстракты и порошки. В процессе производства состав сырья может существенно изменяться, поэтому содержание сероорганических соединений в различных препаратах сильно варьирует.

Итак, было установлено, что экстракт чесночного порошка способен подавлять синтез липидов, как в нормальных, так и в атеросклеротических клетках. Кроме того, этот агент подавляет захват липопротеидов и внутриклеточную деградацию эфиров холестерина, содержащихся в липопротеидах, что ведет к снижению накопления эфиров холестерина в культивируемых клетках, индуцированному ЛНП. Также оказалось, что экстракт чесночного порошка способен ингибировать АХАТ (фермент внутриклеточного синтеза эфиров холестерина) и стимулировать ХЭ (фермент внутриклеточной деградации эфиров холестерина). 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.

Как сопутствующий практический результат данного этапа фундаментальных исследований, был разработан и внедрен в производство натуральный препарат на основе чеснока «Алликор» пролонгированного действия, направленный на профилактику и вспомогательное лечение атеросклероза [13, 14]. В дальнейших исследованиях по антиатерогенной и антиатеросклеротической профилактике и терапии использовали, главным образом, эту лекарственную форму.

В отличие от видов сырья, используемого для производства чесночных препаратов, обезвоженный чесночный порошок сохраняет водо- и жирорастворимые биологически активные вещества в пропорциях и количествах, характерных для исходного сырья [92, 222]. Препарат на основе порошка чеснока, использованный в данной работе, обладает пролонгированным действием, поскольку его антиатерогенный эффект сохраняется в течение 12-16 часов после однократного приема [60]. Таким образом, Алликор выгодно отличается от других чесночных препаратов и может иметь существенные преимущества перед ними при использовании в клинической практике.

В животной модели, используя модель механического повреждения аорты, мы продемонстрировали подавляющий эффект таблеток чесночного порошка пролонгированного действия «Алликор» на развитие экспериментального атеросклероза. Возникает вопрос: почему была выбрана модель криогенного воздействия на сосудистую стенку? Известно, что у людей атеросклероз преимущественно развивается в тех артериях, которые имеют интимальное утолщение, и очень редко встречаются в сосудах, где эндотелий лежит непосредственно на внутренней эластической мембране. Поэтому вполне оправдано использование таких моделей, как деэндотелизация с помощью баллонного катетера или криоповреждение, при которых идет формирование неointимы [38, 283]. Основным достоинством криогенного воздействия на сосудистую стенку является возможность точно определить протяженность повреждения, которая четко соответствует размерам аппликатора; и получить интимальное утолщение, сходное по структуре с внешне непораженной интимой аорты человека. Таким образом, интимальное утолщение аорты после

криодеструкции можно использовать как наиболее информативную модель для изучения влияния различных препаратов на сосудистую стенку. В данном исследовании, проведенном на кроликах, так же как и в работах Malczak et al. [283] и Kolpakov et al. [38], после криодеструкции брюшной аорты над всей областью повреждения формировалось многослойное, полностью эндотелизированное интимальное утолщение.

Было установлено, что Алликор препятствует повышению содержания холестерина и, возможно, триглицеридов в сыворотке крови кроликов, вызванные холестериновой диетой, т.е. обладает выраженным гиполипидемическим действием. Эти данные совпадают с результатами экспериментов на животных, в которых, так же как и в нашем исследовании, гиперлипидемию вызывали холестериновой диетой [89, 163, 209, 285, 299, 328, 436]. В большинстве опубликованных клинических исследований была продемонстрирована способность чеснока и его препаратов снижать уровень холестерина и других липидов в сыворотке крови больных [85, 87, 178, 291, 310, 369, 376, 392, 424, 436]. Во всех цитируемых работах гипохолестеринемический эффект был умеренным (около 10%), но достоверным. Однако до настоящего времени ни в экспериментальных моделях, ни в клинических исследованиях практически не изучалось прямое антиатеросклеротическое действие препаратов на основе чеснока, основанное на подавлении клеточно-молекулярных процессов при атерогенезе.

В экспериментах *ex vivo* было установлено, что сыворотка крови кроликов после длительного приема Алликора вызывала достоверно меньшее накопление холестерина в культивируемых клетках. Эти данные, полученные на животной модели, соответствуют результатам проведенных клинических исследований, в которых сыворотка крови больных, взятая после однократного приема препарата или после продолжительного курса антиатерогенной терапии, была способна вызывать значительно меньшее накопление холестерина в культивируемых клетках по сравнению с исходной сывороткой, взятой до приема.

В то же время на животной модели было показано, что Алликор препятствует развитию атеросклероза в поврежденной аорте кроликов, вызванному холестериновой диетой, т.е. обладает антиатерогенным действием *in vivo*. Антиатерогенные свойства таблеток чесночного порошка пролонгированного действия соответствуют данным большинства исследований

по влиянию чеснока на экспериментальный атеросклероз [162, 209, 231, 252]. Представляется крайне интересным недавнее исследование Campbell et al., в котором изучали протективное действие препарата на основе экстракта чеснока на развитие экспериментального атеросклероза у кроликов в почти аналогичной модели [134]. Несмотря на то, что чесночный препарат не предотвращал повышения уровня холестерина в крови, индуцированного гиперхолестериновой диетой, он уменьшал на 64% площадь атеросклеротических поражений в грудном отделе аорты и уменьшал абсолютное содержание холестерина в стенке аорты. Кроме того, чесночный препарат приблизительно на 50% тормозил формирование неинтимы в сонных артериях, индуцированное способом баллонирования. Исследования *in vitro* показали, что препарат на основе экстракта чеснока полностью предотвращал фенотипическую модификацию гладкомышечных клеток из артериальной стенки и подавлял их пролиферативную активность. Также в исследовании Campbell et al. было показано, что экстракт чеснока подавлял накопление липидов в культивируемых моноцитах-макрофагах [134]. Таким образом, данные, полученные на экспериментальной модели атеросклероза *in vivo*, соответствуют данным, полученным на клеточной модели *ex vivo* и *in vitro*. В связи с этим, можно было предположить, что препарат на основе чеснока Алликор может предотвращать развитие имеющихся атеросклеротических повреждений и препятствовать появлению новых, таким образом, снижая риск атеросклероза и связанных с ним сердечно-сосудистых заболеваний.

Нами был проведен ряд предварительных исследований, в которых было продемонстрировано устойчивое снижение атерогенности сыворотки крови, происходящее на фоне длительного приема препаратов на основе чеснока. Итак, у нас в руках оказался инструмент, с помощью которого можно было осуществлять прямое патогенетическое воздействие на атеросклероз, основанное не подавлении накопления липидов в клетках сосудистой стенки. Тем не менее, оставался нерешенным вопрос о клинической эффективности такого воздействия. Действительно, несмотря на четкую эпидемиологическую связь атерогенности сыворотки крови 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 непораженных атеросклерозом участков артерий, роль атерогенности сыворотки крови в

прогрессировании атеросклероза оставалась неизвестной.

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

Поскольку атеросклероз развивается в большинстве крупных артерий, то неинвазивное обследование поверхностно расположенных крупных артерий с помощью ультразвуковых методов диагностики рассматривается как доступное средство для оценки и мониторингирования системного атеросклероза. Внекоронарные атеросклеротические поражения могут быть быстро и безопасно выявлены в сонных и бедренных артериях, а также в абдоминальном отделе аорты. Степень выраженности атеросклероза во внекоронарном артериальном русле коррелирует с большинством факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний и в целом с абсолютным коронарным риском [371]. При этом степень развития атеросклероза в сонных артериях наилучшим образом сопряжена с коронарным стенозом и ИБС [147, 150, 182, 183]. Ультразвуковое обследование является чувствительным методом диагностики раннего (бессимптомного) атеросклероза и может быть использовано для оценки эффекта терапии. Диффузное утолщение интимального слоя артериальной стенки – это наиболее раннее анатомическое изменение, наблюдаемое при возникновении и прогрессировании атеросклероза. Ультрасонография высокого разрешения, способная определять толщину ИМС, широко используется для неинвазивной оценки наличия субклинического атеросклероза [115]. Считается, что толщина ИМС сонных артерий является маркером генерализованного атеросклероза и предиктором его клинических проявлений [123, 141, 147, 182, 217, 314, 347]. Поэтому в нашем исследовании ультразвуковое мониторирование толщины ИМС сонных артерий было избрано в качестве основного метода оценки прогрессирования атеросклероза.

Главной фундаментальной задачей данного двойного слепого плацебо-контролируемого рандомизированного исследования была проверка гипотезы о влиянии снижения атерогенности сыворотки крови 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 атерогенности сыворотки крови. Статистический анализ полученных данных выявил четкую сопряженность изменений толщины ИМС и изменений атерогенности сыворотки крови в ходе исследования. Снижение атерогенности сыворотки крови вплоть до полного ее устранения было сопряжено с регрессией атеросклероза, а возникновение атерогенности сыворотки крови у пациентов 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 [203, 261, 310, 369], 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 [249].

Были получены экспериментальные данные, позволяющие объяснить механизмы прямого антиатеросклеротического действия Алликора. Биологически активные компоненты чеснока оказывают влияние на активность двух

внутриклеточных ферментов, имеющих ключевое значение в регуляции внутриклеточного метаболизма холестерина. Экстракт чеснока активирует гидролазу эфиров холестерина и ингибирует АХАТ, таким образом, уменьшая содержание эфиров холестерина в клетке [49]. Кроме того, под воздействием экстракта чеснока происходит угнетение пролиферативной активности клеток и синтеза компонентов соединительнотканного матрикса [49, 60]. Чеснок также обладает выраженной антиоксидантной активностью и снижает окисляемость ЛНП [60]. Даже однократный прием Алликора приводит к подавлению способности сыворотки крови вызывать внутриклеточное накопление холестерина в культивируемых клетках, то есть снижает атерогенность сыворотки крови [60]. В исследованиях с применением животных моделей было установлено, что применение препаратов на основе чеснока подавляет процессы формирования неинтимального утолщения у кроликов, находящихся на атерогенной гиперхолестериновой диете [134]. Таким образом, вполне обоснованным является предположение, что антиатеросклеротический эффект Алликора в условиях длительного курса лечения обусловлен предотвращением накопления липидов в сосудистой стенке, а также уменьшением пула накопленных клетками эфиров холестерина.

Мы сравнили результаты проведенного исследования с данными ряда зарубежных исследований, в которых изучали влияние различных лекарственных средств на прогрессирование атеросклероза [114, 116, 149, 215, 327, 349, 373, 441], и главной оценкой эффекта лечения было изменение толщины ИМС сонных артерий (Таблица 56). Из данных, приведенных в таблице, следует, что уменьшение толщины ИМС сонных артерий, полученное в нашем исследовании, вполне сравнимо с результатами наиболее успешных зарубежных исследований.

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

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 соотнесено 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 [236, 253]. Применение Алликора явно предотвращало повышение уровня холестерина ЛВП с возрастом. Следовательно, Алликор обладает умеренным гиполипидемическим действием, что в целом свойственно чесночным препаратам [203, 261, 310, 369, 389, 424, 436]. 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.

Результаты данного исследования говорят о том, что длительный прием Алликора – препарата пролонгированного действия на основе чеснока – приводит к развитию прямого антиатеросклеротического эффекта у лиц с бессимптомным атеросклерозом сонных артерий. Поскольку Алликор является препаратом натурального происхождения, его применение безопасно в плане вероятности побочных эффектов и побочных реакций и позволяет длительный, практически пожизненный прием, что является принципиальным моментом в профилактике и лечении атеросклероза.

Наконец, в эпидемиологических исследованиях и апробациях было установлено, что длительный прием Алликора приводит к существенному снижению сердечно-сосудистой заболеваемости и смертности. Учитывая медленное развитие прямого антиатеросклеротического эффекта антиатерогенной терапии (первые достоверные изменения наблюдаются только через год проводимой терапии), можно предполагать, что в основе таких проявлений клинической эффективности лежат другие механизмы, отличные от подавления накопления холестерина в клетках сосудистой стенки. Так, для препаратов на основе чеснока характерно влияние на показатели артериального давления, а также на агрегационную способность тромбоцитов и фибринолитическую активность плазмы крови [4-6, 85, 87, 90, 119, 289, 323, 330, 333, 370, 390]. Возможно, наряду с отдаленными благоприятными эффектами, реализуемыми на уровне клеток артериальной стенки, препараты на основе чеснока способны быстро снижать риск инфаркта миокарда и внезапной коронарной смерти за счет подавления тромбообразования, а также непрямого антиатеросклеротического действия, реализуемого через снижение факторов риска атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний.

КРАТКИЕ ВЫВОДЫ

1. Клеточные модели на основе первичной культуры клеток из непораженной и пораженной атеросклерозом интимы аорты человека позволяют адекватно воспроизводить все проявления атерогенеза на клеточном уровне - липоидоз, пролиферацию и фиброз.
2. Для оценки антиатеросклеротических свойств различных веществ целесообразно использовать первичную культуру клеток, выделенных из пораженных атеросклерозом участков интимы аорты.
3. Модель *ex vivo* на основе первичной культуры клеток из непораженной атеросклерозом интимы аорты человека позволяет оценивать изменения атерогенных свойств сыворотки крови под воздействием приема различных лекарственных и нелекарственных средств, что отражает их биологическую активность после усвоения, распределения и биотрансформации в организме человека, то есть специфические фармакодинамические характеристики.
4. 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.
5. 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.
6. Возникновение атерогенности сыворотки крови сопряжено с ростом диффузного интимального утолщения в сонных артериях и определяет прогрессирование субклинического атеросклероза.
7. Спонтанное или индуцированное с помощью антиатерогенной терапии снижение атерогенности сыворотки крови вплоть до ее полного устранения вызывает регрессию субклинического атеросклероза.

8. Антиатерогенная терапия (снижение атерогенности сыворотки крови с помощью лекарственных или нелекарственных средств) является патогенетическим способом профилактики и терапии субклинического атеросклероза.
9. Антиатерогенными свойствами в моделях *in vitro* и *ex vivo* обладают ингибиторы ГМГ-КоА редуктазы, антагонисты кальция и эссенциальные фосфолипиды.
10. Для профилактики и лечения субклинического атеросклероза при отсутствии показаний к назначению антиатерогенных лекарственных средств целесообразно использовать нелекарственные средства на основе натуральных компонентов.
11. Наиболее эффективными натуральными средствами, обладающими антиатеросклеротическим и антиатерогенным действием в клеточных моделях *in vitro* и *ex vivo*, являются чеснок (*Allium sativum*) и препараты на его основе.
12. Биологически активными компонентами чеснока, обуславливающими его антиатеросклеротический и антиатерогенный эффекты, являются серосодержащие аминокислоты и сульфоксиды.
13. Антиатеросклеротическое и антиатерогенное действие биологически активных компонентов чеснока проявляется в подавлении накопления внутриклеточного холестерина и его эфиров, уменьшении пула накопленных липидов, подавлении пролиферативной активности клеток, снижении синтеза компонентов соединительнотканного матрикса.
14. Механизм антилипоидозного действия биологически активных компонентов чеснока на клеточном уровне заключается в подавлении синтеза внутриклеточных липидов, ингибировании активности внутриклеточной ацилкоэнзим А:холестерин ацилтрансферазы и активации внутриклеточной эстеразы эфиров холестерина.
15. Длительное применение препарата пролонгированного действия на основе чеснока «Алликор» приводит к устойчивому снижению атерогенности сыворотки крови.
16. Длительный прием Алликора индуцирует регрессию каротидного субклинического атеросклероза, что проявляется в уменьшении

толщины интимо-медиального слоя сонных артерий со средней скоростью $0,022 \pm 0,007$ мм в год; при отсутствии антиатерогенной терапии субклинический атеросклероз прогрессирует со средней скоростью $0,015 \pm 0,008$ мм в год.

17. Алликор, помимо отдаленных благоприятных эффектов, реализуемых на уровне артериальной стенки, обладает ранними благоприятными эффектами, проявляющимися в снижении сердечно-сосудистой заболеваемости и смертности, в основе которых могут лежать другие механизмы, не связанные с подавлением атерогенности сыворотки крови.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Андреева Е.Р., Михайлова И.А., Пугач И.М., Орехов А.Н. Клеточный состав атеросклеротических поражений аорты человека. Ангиол. и сосуд. хир. 1999. Т.5 (прил.). С.6-26.
2. Андреева Е.Р., Тертов В.В., Мухин Д.Н., Орехов А.Н. Клеточный состав и биохимические особенности аорты человека. Бюлл. ВКНЦ АМН СССР. 1985. Т.8. С.63-71.
3. Андреева Е.Р., Тертов В.В., Орехов А.Н. Усиление пролиферативной активности клеток интимы аорты человека при накоплении внутриклеточного холестерина. Цитология. 1989. Т.31. С.1092-1094.
4. Андрианова И.В., Габбасов З.А., Ионова В.Г., Орехов А.Н. Влияние чесночных таблеток Алликор на агрегацию тромбоцитов *in vitro* и *ex vivo*. Бюлл. эксперим. биол. и мед. 1998. Т.124. №7. С.97-100.
5. Андрианова И.В., Ионова В.Г., Демина Е.Г. Шабалина А.А., Карабасова Я.А., Лютова Л.И., Поворинская Т.Э., Орехов А.Н. Использование Алликора для нормализации фибринолиза и гемостаза у больных хроническими цереброваскулярными заболеваниями. Клини. мед. 2001. Т.79. №11. С.55-58.
6. Андрианова И.В., Фомченков И.В., Орехов А.Н. Гипотензивный эффект чесночных таблеток пролонгированного действия Алликор (двойное слепое плацебо-контролируемое исследование). Тер. арх. 2002. №3. С.76-78.
7. Аничков Н.Н. Частная патологическая анатомия. М. Л., Медгиз, 1947.
8. Бодрова О.В. Атеросклероз. М., Крон-пресс, 2000.
9. Герасимова Е.В., Алекберова З.С., Попкова Т.В., Собенин И.А. Атерогенные холестеринсодержащие циркулирующие иммунные комплексы – один из компонентов сыворотки крови больных системной красной волчанкой. Клини. мед. 2003. Т.81. №9. С.39-41.
10. Мясников А.Л. Гипертоническая болезнь и атеросклероз. М., Медицина, 1965.
11. Назарова В.Л., Андреева Е.Р., Тертов В.В., Гильдиева Б.С., Орехов А.Н. Иммуноцитохимическое изучение локализации скевенджер-рецептора в гладкомышечных клетках аорты человека. Бюл. эксперим. биол. и мед. 1995. Т.120. С.195-198.
12. Орехов А.Н., Андреева Е.Р. Клеточные механизмы атеросклероза: роль субэндотелиальных клеток интимы. Ангиол. и сосуд. хир. 1999. Т.5 (прил.). С.96-136.
13. Орехов А.Н. Средство, пролонгирующее эффективность чесночного порошка. Патент на изобретение № 2141828, 1999.
14. Орехов А.Н., Добровотский А.Е. Средство для профилактики атеросклероза. Патент Российской Федерации №2082427, 1997.

15. Остроухова Е.Г., Сергеева М.В. Атеросклероз. М., АСТ, 2001.
16. Пугач И.М., Андреева Е.Р., Орехов А.Н. Идентификация перицитоподобных клеток в субэндотелиальной интиме сосудов человека. Арх. патол. 1999. Т.61. №4. С.18-21.
17. Собенин И.А. Сахарный диабет и атеросклероз. Ангиол. и сосуд. хир. 1999. Т.5 (прил.). С.181-189.
18. Собенин И.А., Тертов В.В., Кошински Т., Славина Е.С., Дедов И.И., Орехов А.Н. Атерогенные свойства сывороток крови и липопротеидов низкой плотности больных сахарным диабетом. Кардиология. 1991. Т.31. №10. С.38-41.
19. Собенин И.А., Тертов В.В., Орехов А.Н. Совместное влияние десиалированных и гликозилированных липопротеидов низкой плотности на накопление липидов в клетках интимы аорты человека *in vitro*. Бюл. эксперим. биол. и мед. 1991. Т.112. №9. С.250-252.
20. Тертов В.В. Множественно-модифицированные липопротеиды низкой плотности, циркулирующие в крови человека. Ангиол. и сосуд. хир. 1999. Т.5 (прил.). С.218-240.
21. Тертов В.В., Каплун В.В., Собенин И.А., Орехов А.Н. Множественно-модифицированные десиалированные липопротеиды низкой плотности: физико-химические свойства. Бюл. эксперим. биол. и мед. 1996. Т.121. №1. С.42-43.
22. Тертов В.В., Собенин И.А., Габбасов З.А., Попов Е.Г., Орехов А.Н. Агрегаты модифицированных липопротеидов низкой плотности вызывают накопление липидов в клетках интимы аорты человека *in vitro*. Бюл. эксперим. биол. и мед. 1990. Т.110. №7. С.34-36.
23. Тертов В.В., Собенин И.А., Назарова В.Л., Гильдиева Б.С., Виа Д.П., Орехов А.Н. Взаимодействие множественно-модифицированных (десиалированных) липопротеинов низкой плотности, выделенных из крови больных атеросклерозом, с клеточными рецепторами. Бюл. эксперим. биол. и мед. 1994. Т.117. №1. С.53-55.
24. Хавкин Т.Н. О развитии атеросклеротических изменений аорты человека. Арх. патол. 1950. Т.12. С.23-33.
25. Шагаева М.М., Славина Е.С., Собенин И.А., Орехов А.Н. Атерогенные свойства сывороток крови детей, больных сахарным диабетом 1 типа. Пробл. эндокринологии. 1993. Т.39. №1. С.14-15.
26. Шагаева М.М., Собенин И.А., Славина Е.С., Орехов А.Н. Атерогенный потенциал сыворотки крови больных сахарным диабетом 1 типа. Пробл. эндокринологии. 1993. Т.39. №6. С.11-14.
27. Шевченко О.П., Шевченко А.О. Статины. Ингибиторы ГМГ-КоА-редуктазы. М., Реафарм, 2003.
28. Щелкунов С.И. Интима малых артерий и вен. Арх. биол. наук. 1935. Т.35. С.609-637.

29. Andreeva E. R., Orekhov A.N., Smirnov V.N. (Андреева Е.Р., Орехов А.Н., Смирнов В.Н.). Quantitative estimation of lipid-laden cells in atherosclerotic lesions of the human aorta. *Acta Anat. (Basel)*. 1991. V.141. №4. P.316-323.
30. Andreeva E.R., Pugach I.M., Gordon D., Orekhov A.N. (Андреева Е.Р., Пугач И.М., Гордон Д., Орехов А.Н.). Continuous subendothelial network formed by pericyte-like cells in human vascular bed. *Tissue Cell*. 1998. V.30. №1. P.127-135.
31. Andreeva E.R., Pugach I.M., Orekhov A.N. (Андреева Е.Р., Пугач И.М., Орехов А.Н.). Collagen-synthesizing cells in initial and advanced atherosclerotic lesions of human aorta. *Atherosclerosis*. 1997. V.130. №1-2. P.133-142.
32. Andreeva E.R., Pugach I.M., Orekhov A.N. (Андреева Е.Р., Пугач И.М., Орехов А.Н.). Subendothelial smooth muscle cells of human aorta express macrophage antigen in situ and in vitro. *Atherosclerosis*. 1997. V.135. №1. P.19-27.
33. Andreeva E.R., Rekhter M.D., Romanov Yu.A., Antonova G.M., Antonov A.S., Mironov A.A., Orekhov A.N. (Андреева Е.Р., Рехтер М.Д., Романов Ю.А., Антонова Г.М., Антонов А.С., Миронов А.А., Орехов А.Н.). Stellate cells of aortic intima: II. Arborization of intimal cells in culture. *Tissue Cell*. 1992. V.24. P.697-704.
34. 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. V.2. P.595-598.
35. Kabakov A.E., Tertov V.V., Saenko V.A., Poverenny A.M., Orekhov A.N. (Кабаков А.Е., Тертов В.В., Саенко В.А., Поверенный А.М., Орехов А.Н.). The atherogenic effect of lupus sera: systemic lupus erythematosus-derived immune complexes stimulate the accumulation of cholesterol in cultured smooth muscle cells from human aorta. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1992. V.63. №3. P.214-220.
36. Kacharava A.G., Tertov V.V., Orekhov A.N. (Качарава А.Г., Тертов В.В., Орехов А.Н.). Autoantibodies against low-density lipoprotein and atherogenic potential of blood. *Ann. Med.* 1993. V.25. №6. P.551-555.
37. Klimov A.N., Denisenko A.D., Vinogradov A.G., Nagornev V.A., Pivovarova Yu.I., Sitnikova O.D., Pleskov V.M. (Климов А.Н., Денисенко А.Д., Виноградов А.Г., Нагорнев В.А., Пивоварова Ю.И., Ситникова О.Д., Плесков В.М.). Accumulation of cholesteryl esters in macrophages incubated with human lipoprotein-antibody autoimmune complex. *Atherosclerosis*. 1988. V.74. P.41-46.
38. Kolpakov V.A., Rekhter M.D., Bauman O., Di Sciallo A., Di Nardo P., Drozdov S.A., Roggi A., Mironov A.A. (Колпаков В.А., Рехтер М.Д., Бауман О., Ди Сциалло А., Ди Нардо П., Дроздов С.А., Погги А., Миронов А.А.). Endotelialized myointimal thickening in the rat aorta as a result of extensive freeze injury. *Atherosclerosis*. 1993. V.102. P.187-193.

39. Krushinsky A.V., Orekhov A.N., Smirnov V.N. (Крушинский А.В., Орехов А.Н., Смирнов В.Н.). Stellate cells in the intima of human aorta. Application of alkaline dissociation method in the analysis of the vessel wall cellular content. *Acta Anat. (Basel)*. 1983. V.117. №3. P.266-269.
40. Maximow A. (Максимов А.). Bindegewebe und blutbildende Gewebe. In: Anonymous *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*. / 1927.
41. 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. V.125. №2. P.402-415.
42. 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. V.62. №4. P.255-259.
43. Orekhov A.N., Andreeva E.R., Mikhailova I.A., Gordon D. (Орехов А.Н., Андреева Е.Р., Михайлова И.А., Гордон Д.). Cell proliferation in normal and atherosclerotic human aorta: proliferative splash in lipid-rich lesions. *Atherosclerosis*. 1998. V.139. №1. P.41-48.
44. 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. V.1. P.75-100.
45. Orekhov A.N., Andreeva E.R., Tertov V.V., Krushinskii A.V. (Орехов А.Н., Андреева Е.Р., Тертов В.В., Крушинский А.В.). Dissociated cells from different layers of adult human aortic wall. *Acta Anat. (Basel)*. 1984. V.119. P.99-105.
46. Orekhov A.N., Karpova I.I., Tertov V.V., Rudchenko S.A., Andreeva E.R., Krushinsky A.V., Smirnov V.N. (Орехов А.Н., Карпова И.И., Тертов В.В., Рудченко С.А., Андреева Е.Р., Крушинский А.В., Смирнов В.Н.). Cellular composition of atherosclerotic and uninvolved human aortic subendothelial intima. Light-microscopic study of dissociated aortic cells. *Am. J. Pathol.* 1984. V.115. №1. P.17-24.
47. 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. V.48. №4. P.395-398.
48. Orekhov A.N., Misharin A.Y., Tertov V.V., Khashimov Kh.A., Pokrovsky S.N., Repin V.S., Smirnov V.N. (Орехов А.Н., Мишарин А.Ю., Тертов В.В., Хашимов Х.А., Покровский С.Н., Репин В.С., Смирнов В.Н.). Artificial HDL as an anti-atherosclerotic drug. *Lancet*. 1984. V.2. №8412. P.1149-1150.

49. Orekhov A.N., Tertov V.V. (Орехов А.Н., Тертов В.В.). In vitro effect of garlic powder extract on lipid content in normal and atherosclerotic human aortic cells. *Lipids*. 1997. V.32. №10. P.1055-1060.
50. 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. V.11. №2. P.316-326.
51. 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. V.60. P.101-110.
52. 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. V.66. №2. P.311-320.
53. Orekhov A.N., Tertov V.V., Mukhin D.N. (Орехов А.Н., Тертов В.В., Мухин Д.Н.). Desialylated low density lipoprotein - naturally occurring modified lipoprotein with atherogenic potency. *Atherosclerosis*. 1991. V.86. P.153-161.
54. Orekhov A.N., Tertov V.V., Mukhin D.N., Koteliansky V.E., Glukhova M.A., Frid M.G., Sukhova G.K., Khashimov Kh.A., Smirnov V.N. (Орехов А.Н., Тертов В.В., Мухин Д.Н., Котелянский В.Е., Глухова М.А., Фрид М.Г., Сухова Г.К., Хашимов Х.А., Смирнов В.Н.). Insolubilization of low density lipoprotein induces cholesterol accumulation in cultured subendothelial cells of human aorta. *Atherosclerosis*. 1989. V.79. P.59-70.
55. Orekhov A.N., Tertov V.V., Mukhin D.N., Koteliansky V.E., Glukhova M.A., Khashimov Kh.A., Smirnov V.N. (Орехов А.Н., Тертов В.В., Мухин Д.Н., Котелянский В.Е., Глухова М.А., Хашимов Х.А., Смирнов В.Н.). Association of low-density lipoprotein with particulate connective tissue matrix components enhances cholesterol accumulation in cultured subendothelial cells of human aorta. *Biochim. Biophys. Acta*. 1987. V.928. №3. P.251-258.
56. Orekhov A.N., Tertov V.V., Mukhin D.N., Mikhailenko I.A. (Орехов А.Н., Тертов В.В., Мухин Д.Н., Михайленко И.А.). Modification of low density lipoprotein by desialylation causes lipid accumulation in cultured cells: discovery of desialylated lipoprotein with altered cellular metabolism in the blood of atherosclerotic patients. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989. V.162. №1. P.206-211.
57. 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. V.42. №1. P.117-137.
58. 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. V.62. №3. P.421-429.
 59. 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. V.43. №2. P.187-195.
 60. Orekhov A.N., Tertov V.V., Sobenin I.A., Pivovarova E.M. (Орехов А.Н., Тертов В.В., Собенин И.А., Пивоварова Е.М.). Direct anti-atherosclerosis-related effects of garlic. *Ann. Med.* 1995. V.27. №1. P.63-65.
 61. Orekhov A.N., Tertov V.V., Sobenin I.A., Smirnov V.N., Via D.P., Guevara J.; Gotto A.M., Morrisett J.D. (Орехов А.Н., Тертов В.В., Собенин И.А., Смирнов В.Н., Виа Д.П., Гевара Х., Готто А.М., Моррисетт Дж.Д.). Sialic acid content of human low density lipoproteins affects their interaction with cell receptors and intracellular lipid accumulation. *J. Lipid Res.* 1992. V.33. №6. P.805-817.
 62. Rekhter M.D., Andreeva E.R., Mironov A.A., Orekhov A.N. (Рехтер М.Д., Андреева Е.Р., Миронов А.А., Орехов А.Н.). Three-dimensional cytoarchitecture of normal and atherosclerotic intima of human aorta. *Am. J. Pathol.* 1991. V.138. №3. P.569-580.
 63. 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., Рукосуев В.С.). Distribution of type I, III, IV and V collagen in normal and atherosclerotic human arterial wall: immunomorphological characteristics. *Coll. Relat. Res.* 1985. V.5. P.355-368.
 64. Slavina E.S., Madanat A.Y., Pankov Yu.A., Syrkin A.L., Tertov V.V., Orekhov A.N. (Славина Е.С., Маданат А.Ю., Панков Ю.А., Сыркин А.Л., Тертов В.В., Орехов А.Н.). Diabetes mellitus and atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* 1987. V.317. №13. P.836.
 65. Sobenin I. A., Tertov V. V., Koschinsky T., Bunting C.E., Slavina E.S., Dedov I.I., Orekhov A.N. (Собенин И.А., Тертов В.В., Кошинский Т., Бюнтинг К.Е., Славина Е.С., Дедов И.И., Орехов А.Н.). Modified low density lipoprotein from diabetic patients causes cholesterol accumulation in human intimal aortic cells. *Atherosclerosis.* 1993. V.100. №1. P.41-54.
 66. Tertov V.V., Bittolo-Bon G., Sobenin I.A. Cazzolato G., Orekhov A.N., Avogaro P. (Тертов В.В., Биттоло-Бон Г., Собенин И.А., Каццолато Дж., Орехов А.Н., Авогаро П.). Naturally occurring modified low density lipoproteins are similar if not identical:

- more electronegative and desialylated lipoprotein subfractions. *Exp. Mol. Pathol.* 1995. V.62. №3. P.166-172.
67. Tertov V.V., Kaplun V.V., Dvoryantsev S.N., Orekhov A.N. (Тертов В.В., Каплун В.В., Дворянцев С.Н., Орехов А.Н.). Apolipoprotein B-bound lipids as a marker for evaluation of low density lipoprotein oxidation in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995. V.214. №2. P.608-613.
68. Tertov V.V., Kaplun V.V., Orekhov A.N. (Тертов В.В., Каплун В.В., Орехов А.Н.). In vivo oxidized low density lipoprotein: degree of lipoprotein oxidation does not correlate with its atherogenic properties. *Mol. Cell. Biochem.* 1998. V.183. №1-2. P.141-146.
69. Tertov V.V., Kaplun V.V., Sobenin I.A., Boytsova E.Yu., Bovin N.V., Orekhov A.N. (Тертов В.В., Каплун В.В., Собенин И.А., Бойцова Е.Ю., Бовин Н.В., Орехов А.Н.). Human plasma trans-sialidase causes atherogenic modification of low density lipoprotein. *Atherosclerosis.* 2001. V.159. №1. P.103-115.
70. Tertov V.V., Kaplun V.V., Sobenin I.A., Orekhov A.N. (Тертов В.В., Каплун В.В., Собенин И.А., Орехов А.Н.). Low-density lipoprotein modification occurring in human plasma: possible mechanism of in vivo lipoprotein desialylation as a primary step of atherogenic modification. *Atherosclerosis.* 1998. V.138. №1. P.183-195.
71. Tertov V.V., Nikonova E.Y., Nifantiev N.E., Bovin N.V., Orekhov A.N. (Тертов В.В., Никонова Е.Ю., Нифантьев Н.Е., Бовин Н.В., Орехов А.Н.). Human plasma trans-sialidase donor and acceptor specificity. *Biochemistry (Mosc.).* 2002. V.67. №8. P.908-913.
72. Tertov V.V., Orekhov A.N. (Тертов В.В., Орехов А.Н.). Metabolism of native and naturally occurring multiple modified low density lipoprotein in smooth muscle cells of human aortic intima. *Exp. Mol. Pathol.* 1997. V.64. №3. P.127-145.
73. Tertov V.V., Orekhov A.N., Kacharava A.G., Sobenin I.A., Perova N.V., Smirnov V.N. (Тертов В.В., Орехов А.Н., Качарава А.Г., Собенин И.А., Перова Н.В., Смирнов В.Н.). Low density lipoprotein-containing circulating immune complexes and coronary atherosclerosis. *Exp. Mol. Pathol.* 1990. V.52. №3. P.300-308.
74. 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. V.50. №3. P.337-347.
75. 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. V.21. №6. P.455-459.
76. 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. V.20. P.849-854.
77. Tertov V.V., Orekhov A.N., Sobenin I.A., Gabbasov Z.A., Popov E.G., Yaroslavov A.A., Smirnov V.N. (Тертов В.В., Орехов А.Н., Собенин И.А., Габбасов З.А., Попов Е.Г., Ярославов А.А., Смирнов В.Н.). Three types of naturally occurring modified lipoproteins induce intracellular lipid accumulation due to lipoprotein aggregation. *Circ. Res.* 1992. V.71. №1. P.218-228.
 78. 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. V.67. №5. P.665-675.
 79. 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. V.163. №1. P.489-494.
 80. 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. V.14. №4. P.155-162.
 81. Tertov V.V., Sobenin I.A., Orekhov A.N. (Тертов В.В., Собенин И.А., Орехов А.Н.). Modified (desialylated) low-density lipoprotein measured in serum by lectin-sorbent assay. *Clin. Chem.* 1995. V.41. №7. P.1018-1021.
 82. Tertov V.V., Sobenin I.A., Orekhov A.N. (Тертов В.В., Собенин И.А., Орехов А.Н.). Similarity between naturally occurring modified desialylated, electronegative and aortic low density lipoprotein. *Free Rad. Res.* 1996. V.25. №4. P.313-319.
 83. Tertov V.V., Sobenin I.A., Tonevitsky A.G., Orekhov A.N., Smirnov V.N. (Тертов В.В., Собенин И.А., Тоневицкий А.Г., Орехов А.Н., Смирнов В.Н.). Isolation of atherogenic modified (desialylated) low density lipoprotein from blood of atherosclerotic patients: separation from native lipoprotein by affinity chromatography. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990. V.167. №3. P.1122-1127.
 - 84.
 85. Abbott R.D., Wilson P.W., Kannel W.B., Castelli W.P. High density lipoprotein cholesterol, total cholesterol screening, and myocardial infarction. The Framingham Study. *Arteriosclerosis*. 1988. V.8. №3. P.207-211.
 86. Ackermann R.T., Mulrow C.D., Ramirez G., Gardner C.D., Morbidoni L.; Lawrence V.A. Garlic shows promise for improving some cardiovascular risk factors. *Arch. Intern. Med.* 2001. V.161. №6. P.813-824.

87. Adams D.O. Macrophages. *Methods Enzymol.* 1979. V.58. P.494-505.
88. Agarwal K.C. Therapeutic actions of garlic constituents. *Med. Res. Rev.* 2003. V.16. P.111-124.
89. Ahnadi C.E., Berthezene F., Ponsin G. Simvastatin-induced decrease in the transfer of cholesterol esters from high density lipoproteins to very low and low density lipoproteins in normolipidemic subjects. *Atherosclerosis.* 1993. V.99. P.219-228.
90. Ali M., Al Qattan K.K., Al Enezi, Khanafer R.M., Mustafa T. Effect of allicin from garlic powder on serum lipids and blood pressure in rats fed with a high cholesterol diet. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 2000. V.62. №4. P.253-259.
91. Ali M., Bordia T., Mustafa T. Effect of raw versus boiled aqueous extract of garlic and onion on platelet aggregation. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 1999. V.60. №1. P.43-47.
92. ALLHAT Officers and Coordinators for the ALLHAT Collaborative Research Group. Major outcomes in moderately hypercholesterolemic, hypertensive patients randomized to pravastatin vs usual care: The Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT-LLT). *J.A.M.A.* 2002. V.288. №23. P.2998-3007.
93. Amagase H., Petesch B.L., Matsuura H., Kasuga S., Itakura Y. Intake of garlic and its bioactive components. *J. Nutr.* 2001. V.131. №3s. P.955S-962S.
94. American Heart Association. Heart disease and stroke statistics - 2003 Update. Dallas, American Heart Association, 2002.
95. Aminbakhsh A., Mancini G.B. Carotid intima-media thickness measurements: what defines an abnormality? A systematic review. *Clin. Invest. Med.* 1999. V.22. №4. P.149-157.
96. Anderson K.M., Odell P.M., Wilson P.W., Kannel W.B. Cardiovascular disease risk profiles. *Am. Heart J.* 1991. V.121. №1 Pt 2. P.293-298.
97. Anderson K.M., Wilson P.W., Odell P.M., Kannel W.B. An updated coronary risk profile. A statement for health professionals. *Circulation.* 1991. V.83. №1. P.356-362.
98. Andrews T.C., Ballantyne C.M., Hsia J.A., Kramer J.H. Achieving and maintaining National Cholesterol Education Program low-density lipoprotein cholesterol goals with five statins. *Am. J. Med.* 2001. V.111. P.185-191.
99. Aqel N.M., Ball R.Y., Waldmann H., Mitchinson M.J. Identification of macrophages and smooth muscle cells in human atherosclerosis using monoclonal antibodies. *J. Pathol.* 1985. V.146. P.197-204.
100. Assmann G., Cullen P., Schulte H. Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Muenster (PROCAM) study. *Circulation.* 2002. V.105. №3. P.310-315.
101. Assmann G., Schulte H., Cullen P. New and classical risk factors - the Muenster heart study (PROCAM). *Eur. J. Med. Res.* 1997. V.2. №6. P.237-242.
102. Austin M.A., King M.C., Vranizan K.M., Krauss R.M. Atherogenic lipoprotein

- phenotype. A proposed genetic marker for coronary heart disease risk. *Circulation*. 1990. V.82. №2. P.495-506.
103. Avogaro P., Bittolo-Bon G., Cazzolato G. Presence of a modified low density lipoprotein in humans. *Arteriosclerosis*. 1988. V.8. P.79-87.
 104. Baker D.P., van Lenten B.J., Fogelman A.M., Edwards P.A., Kean C., Berliner J.A. LDL, scavenger and b-VLDL receptors on aortic endothelial cells. *Arteriosclerosis*. 1984. V.4. P.248-251.
 105. Barter P.J., Brewer H.B., Jr., Chapman M.J., Hennekens C.H., Rader D.J., Tall A.R. Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003. V.23. №2. P.160-167.
 106. Basile J.N. The importance of systolic blood pressure control and cardiovascular disease prevention. *Curr. Treat. Options Cardiovasc. Med.* 2003. V.5. №4. P.271-277.
 107. Bates S.R., Wissler R.W. Effect of hyperlipemic serum on cholesterol accumulation in monkey aortic medial cells. *Biochim. Biophys. Acta*. 1976. V.450. P.78-88.
 108. Baumstark M.W., Kreutz W., Berg A., Frey I., Keul J. Structure of human low-density lipoprotein subfractions, determined by X-ray small-angle scattering. *Biochim. Biophys. Acta*. 1990. V.1037. P.48-57.
 109. Benjamin E.J., Wolf P.A., D'Agostino R.B., Silbershatz H., Kannel W.B., Levy D. Impact of atrial fibrillation on the risk of death: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 1998. V.98. №10. P.946-952.
 110. Berenson G.S., Srinivasan S.R., Bao W. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. *N. Engl. J. Med.* 1998. V.338. P.1650-1656.
 111. Berenson G.S., Wattingey W.A., Tracy R.E. Atherosclerosis of the aorta and coronary arteries and cardiovascular risk factors in persons aged 6 to 30 years and studied at necropsy (The Bogalusa Heart Study). *Am. J. Cardiol.* 1992. V.70. №9. P.851-858.
 112. Berneis K.K., Krauss R.M. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *J. Lipid Res.* 2002. V.43. №9. P.1363-1379.
 113. Bersot T.P., Innerarity T.L., Pitas R.E., Rall S.C., Weisgraber K.H., Mahley R.W. Fat feeding in humans induces lipoproteins of density less than 1.006 that are enriched in apolipoprotein [a] and that cause lipid accumulation in macrophages. *J. Clin. Invest.* 1986. V.77. №2. P.622-630.
 114. Bild D.E., Bluemke D.A., Burke G.L., Detrano R., Diez Roux A.V., Folsom A.R., Greenland P., Jacob D.R., Kronmal R., Liu K., Nelson J.C., O'Leary D., Saad M.F., Shea S., Szklo M., Tracy R.P. Multi-ethnic study of atherosclerosis: objectives and design. *Am. J. Epidemiol.* 2002. V.156. №9. P.871-881.
 115. Blankenhorn D.H., Azen S.P., Kramsch 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. V.119. №10. P.969-976.
116. Blankenhorn D.H., Hodis H.N. George Lyman Duff Memorial Lecture. Arterial imaging and atherosclerosis reversal. *Arterioscler. Thromb.* 1994. V.14. №2. P.177-192.
 117. Blankenhorn D.H., Selzer R.H., Crawford D.W., Barth J.D., Liu C.R., Liu C.H., Mack W.J., Alaupovic P. Beneficial effects of colestipol-niacin therapy on the common carotid artery. Two- and four-year reduction of intima-media thickness measured by ultrasound. *Circulation.* 1993. V.88. №1. P.20-28.
 118. Bobryshev Y., Lord R.S.A. Detection of vascular dendritic cells and extracellular calcium-binding protein S-100 in foci of calcification in human arteries. *Acta Histochem. Cytochem.* 1995. V.4. P.371-380.
 119. Bond M.G., Wilmoth S.K., Enevold G.L., Strickland H.L. Detection and monitoring of asymptomatic atherosclerosis in clinical trials. *Am. J. Med.* 1989. V.86. №4A. P.33-36.
 120. Bordia A., Verma S.K., Srivastava K.C. Effect of garlic on platelet aggregation in humans: a study in healthy subjects and patients with coronary artery disease. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 1996. V.55. №3. P.201-205.
 121. Bostom A.G., Gohh R.Y., Liaugaudas G., Beaulieu A.J., Han H., Jacques P.F., Dworkin L., Rosenberg I.H., Selhub J. Prevalence of mild fasting hyperhomocysteinemia in renal transplant versus coronary artery disease patients after fortification of cereal grain flour with folic acid. *Atherosclerosis.* 1999. V.145. №1. P.221-224.
 122. Bostom A.G., Selhub J., Jacques P.F., Rosenberg I.H. Power Shortage: clinical trials testing the "homocysteine hypothesis" against a background of folic acid-fortified cereal grain flour. *Ann. Intern. Med.* 2001. V.135. №2. P.133-137.
 123. Bots M.L., Grobbee D.E. Decline of coronary heart disease mortality in The Netherlands from 1978 to 1985: contribution of medical care and changes over time in presence of major cardiovascular risk factors. *J. Cardiovasc. Risk.* 1996. V.3. №3. P.271-276.
 124. Bots M.L., Hoes A.W., Koudstaal P.J., Hofman A., Grobbee D.E. Common carotid intima-media thickness and risk of stroke and myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Circulation.* 1997. V.96. №5. P.1432-1437.
 125. Brown B.G., Zhao X.Q., Chait A., Cheung M.C., Morse J.S., Dowdy A.A., Marino E.K., Bolson E.L., Alaupovic P., Frohlich J., Albers J.J. Simvastatin and niacin, antioxidant vitamins, or the combination for the prevention of coronary disease. *N. Engl. J. Med.* 2001. V.345. №22. P.1583-1592.
 126. Brown M.S., Goldstein J.L. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Ann. Rev. Biochem.* 1983. V.52. P.223-229.
 127. Brown M.S., Goldstein J.L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science.* 1986. V.232. P.34-47.
 128. Brown M.S., Goldstein J.L., Krieger M., Ho Y.K., Anderson R.G.W. Reversible accumulation of cholesteryl esters in macrophages incubated with acetylated lipoproteins. *J. Cell Biol.* 1979. V.82. P.597-605.

129. Brown M.S., Ho Y.K., Goldstein J.L. The cholesteryl ester cycle in macrophage foam cell: continual hydrolysis and re-esterification of cytoplasmic cholesteryl esters. *J. Biol. Chem.* 1980. V.255. P.9344-9351.
130. Bruce C., Tall A.R. Cholesteryl ester transfer proteins, reverse cholesterol transport, and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 1995. V.6. P.306-311.
131. Byington R.P., Furberg C.D., Crouse J.R., Espeland M.A., Bond M.G. Pravastatin, Lipids, and Atherosclerosis in the Carotid Arteries (PLAC-II). *Am. J. Cardiol.* 1995. V.76. №9. P.54C-59C.
132. Calles E., Garcia R., Mirza S., Mortensen A. Type 2 diabetes: one disease, multiple cardiovascular risk factors. *Coron. Artery Dis.* 1999. V.10. №1. P.23-30.
133. Cambien F., Poirier O., Lecerf L., Evans A., Cambou J.P., Arveiler D., Luc G., Bard J.M., Bara L., Ricard S. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature.* 1992. V.359. №6396. P.641-644.
134. Campbell J.H., Campbell G.R. Biology of the vessel wall and atherosclerosis. *Clin. Exp. Hypertens.* 1989. V.11. P.901-913.
135. Campbell J.H., Efendy J.L., Smith N.J., Campbell G.R. Molecular basis by which garlic suppresses atherosclerosis. *J. Nutr.* 2001. V.131. №3s. P.1006S-1009S.
136. Canner P.L., Berge K.G., Wenger N.K., Stamler J., Friedman L., Prineas R.J., Friedewald W. Fifteen year mortality in Coronary Drug Project patients: long-term benefit with niacin. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1986. V.8. №6. P.1245-1255.
137. Castelli W.P., Garrison R.J., Dawber T.R., McNamara P.M., Feinleib M., Kannel W.B. The filter cigarette and coronary heart disease: the Framingham study. *Lancet.* 1981. V.2. №8238. P.109-113.
138. Chagan L., Ioselovich A., Asherova L., Cheng J.W. Use of alternative pharmacotherapy in management of cardiovascular diseases. *Am. J. Manag. Care.* 2002. V.8. №3. P.270-285.
139. Chait A. The role of lipoprotein receptors in lipid transport and in the pathogenesis of the hyperlipoproteinemias. *Spec. Top. Endocrinol. Metab.* 1983. V.5. P.1-53.
140. Chambless L.E., Folsom A.R., Clegg L.X., Sharrett A.R., Shahar E., Nieto F.J., Rosamond W.D., Evans G. Carotid wall thickness is predictive of incident clinical stroke: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Am. J. Epidemiol.* 2000. V.151. №5. P.478-487.
141. Chambless L.E., Folsom A.R., Davis V., Sharrett R., Heiss G., Sorlie P., Szklo M., Howard G., Evans G.W. Risk factors for progression of common carotid atherosclerosis: the Atherosclerosis Risk in Communities Study, 1987-1998. *Am. J. Epidemiol.* 2002. V.155. №1. P.38-47.
142. Chambless L.E., Heiss G., Folsom A.R., Rosamond W., Szklo M., Sharrett A.R., Clegg L.X. Association of coronary heart disease incidence with carotid arterial wall thickness

- and major risk factors: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study, 1987-1993. *Am. J. Epidemiol.* 1997. V.146. №6. P.483-494.
143. Chang T.Y., Chang C.C.Y., Cadigan K.M. The structure of acyl coenzyme A-cholesterol acyltransferase and its potential relevance to atherosclerosis. *Trends Cardiovasc. Med.* 1994. V.4. №5. P.223-230.
 144. Chen R.M., Fisher-Dzoga K. Effect of hyperlipemic serum on the lipid accumulation and cholesterol efflux of rabbit aortic medial cells. *Atherosclerosis.* 1977. V.28. P.339-353.
 145. Chi M.S., Koh E.T., Stewart T.J. Effects of garlic on lipid metabolism in rats fed cholesterol or lard. *J. Nutr.* 1982. V.112. №2. P.241-248.
 146. Christen W.G., Ridker P.M. Blood levels of homocysteine and atherosclerotic vascular disease. *Curr. Atheroscler. Rep.* 2000. V.2. №3. P.194-199.
 147. Conroy R.M., Pyorala K., Fitzgerald A.P., SCORE project investigators. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur. Heart J.* 2003. V.24. №11. P.987-1003.
 148. Craven T.E., Ryu J.E., Espeland M.A., Kahl F.R., McKinney W.M., Toole J.F., McMahan M.R., Thompson C.J., Heiss G., Crouse J.R. Evaluation of the associations between carotid artery atherosclerosis and coronary artery stenosis. A case-control study. *Circulation.* 1990. V.82. №4. P.1230-1242.
 149. Ceriche A.G., Stahl A.J.C. Assay for scavenger receptors on human monocyte-derived macrophages. *J. Immunol. Methods.* 1994. V.174. P.103-107.
 150. Crouse J.R., Byington R.P., Bond M.G., Espeland M.A., Craven T.E., Sprinkle J.W., McGovern M.E., Furberg C.D. Pravastatin, Lipids, and Atherosclerosis in the Carotid Arteries (PLAC-II). *Am. J. Cardiol.* 1995. V.75. №7. P.455-459.
 151. Crouse J.R., Craven T.E., Hagaman A.P., Bond M.G. Association of coronary disease with segment-specific intimal-medial thickening of the extracranial carotid artery. *Circulation.* 1995. V.92. №5. P.1141-1147.
 152. D'Agostino R.B., Grundy S., Sullivan L.M., Wilson P.W. Validation of the Framingham coronary heart disease prediction scores: results of a multiple ethnic groups investigation. *J.A.M.A.* 2001. V.286. №2. P.180-187.
 153. Danesh J., Collins R., Appleby P., Peto R. Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: meta-analyses of prospective studies. *J.A.M.A.* 1998. V.279. №18. P.1477-1482.
 154. Davies P.F. Vascular cell interactions with special reference to the pathogenesis of atherosclerosis. *Lab. Invest.* 1986. V.55. P.5-24.
 155. De Groot F., Jukema J.W., Montauban G., van Swijndregt A.D. B-mode ultrasound assessment of pravastatin treatment effect on carotid and femoral artery walls and its correlation with coronary arteriographic findings: a report of the Regression Growth Evaluation Statin Study (REGRESS). *J. Am. Coll. Cardiol.* 1998. V.31. №7. P.1561-

- 1567.
156. De Kleijn M.J., Bots M.L., Bak A.A., Westendorp I.C., Planellas J., Coelingh-Bennink H.J., Witteman J.C., Grobbee D.E. Hormone replacement therapy in perimenopausal women and 2-year change of carotid intima-media thickness. *Maturitas*. 1999. V.32. №3. P.195-204.
 157. De Rijke Y.B., Biessen E.A.L., Vogelesang C.J.M., van Berkel T.J.C. Binding characteristics of scavenger receptors on liver endothelial and Kupffer cells for modified low-density lipoproteins. *Biochem. J.* 1994. V.304. P.69-73.
 158. Demant T., Packard C.J., Demmelmair H., Stewart P., Bedynek A., Bedford D., Seidel D., Shepherd J. Sensitive methods to study human apolipoprotein B metabolism using stable isotope-labeled amino acids. *Am. J. Physiol.* 1996. V.270. P.E1022-E1036.
 159. Despres J.P., Couillard C., Gagnon J., Bergeron J., Leon A.S., Rao D.C., Skinner J.S., Wilmore J.H., Bouchard C. Race, visceral adipose tissue, plasma lipids, and lipoprotein lipase activity in men and women: the Health, Risk Factors, Exercise Training, and Genetics (HERITAGE) family study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000. V.20. №8. P.1932-1938.
 160. Downs J.R., Clearfield M., Weis S. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *J.A.M.A.* 1998. V.279. P.1615-1622.
 161. Duke J.A. Handbook of biologically active phytochemicals and their activities. Boca Raton, CRC Press, 1992. Pp. 1-552.
 162. Duke J.A. The Green Pharmacy Herbal Handbook. Boston, Rodale Press, 2000. Pp. 1-282.
 163. Efendy J.L., Simmons D.L., Campbell G.R., Campbell J.H. The effect of the aged garlic extract, 'Kyolic', on the development of experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1997. V.132. №1. P.37-42.
 164. Elkayam A., Mirelman D., Peleg E., Wilchek M., Miron T., Rabinkov A., Sadetzki S., Rosenthal T. The effects of allicin and enalapril in fructose-induced hyperinsulinemic hyperlipidemic hypertensive rats. *Am. J. Hypertens.* 2001. V.14. №4 Pt 1. P.377-381.
 165. Emeson E.E., Robertson A.L. T-lymphocytes in aortic and coronary intimas. Their potential role in atherogenesis. *Am. J. Pathol.* 1988. V.130. P.369-376.
 166. Empana J.P., Ducimetiere P., Arveiler D., Ferrieres J., Evans A., Ruidavets J.B., Haas B., Yarnell J., Bingham A., Amouyel P., Dallongeville J. Are the Framingham and PROCAM coronary heart disease risk functions applicable to different European populations? The PRIME Study. *Eur. Heart J.* 2003. V.24. №21. P.1903-1911.
 167. Esterbauer H., Striegl G., Puhl H., Rotheneder M. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Rad. Res. Commun.* 1989. V.6. P.65-75.

168. Expert Panel on the Identification Evaluation, and Treatment of Overweight in Adults. Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults: executive summary. *Am. J. Clin. Nutr.* 1998. V.68. №4. P.899-917.
169. Filipovic I., Schwarzmann G., Mraz W., Wiegandt W., Buddecke E. Sialic-acid content of low-density lipoproteins controls their binding and uptake by cultured cells. *Eur. J. Biochem.* 1979. V.93. P.51-56.
170. Fisher-Dzoga K., Jones K., Vesselinovitch D., Wissler R.W. Ultrastructural and immunohistochemical studies of primary cultures of aortic medial cells. *Exp. Mol. Pathol.* 1973. V.18. P.162-176.
171. Fogelman A.M., Haberland M.E., Seager J., Hokom M., Edwards P.A. Factors regulating the activities of the low density lipoprotein receptor and the scavenger receptor on human monocyte-macrophages. *J. Lipid Res.* 1981. V.22. P.1131-1137.
172. 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. V.77. P.2214-2218.
173. Ford E.S., Giles W.H., Dietz W.H. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *J.A.M.A.* 2002. V.287. №3. P.356-359.
174. Frohlich J.J. Clinical significance of serum HDL cholesterol. *Can. J. Cardiol.* 1989. V.5. №5. P.VIII.
175. Fujioka Y., Taniguchi T., Ishikawa Y., Yokoyama M. Significance of acidic sugar chains of apolipoprotein B-100 in cellular metabolism of low-density lipoproteins. *J. Lab. Clin. Med.* 2000. V.136. №5. P.355-362.
176. Fukasawa M., Hirota K., Adachi H., Mimura K., Murakami-Murofushi K., Tsujimoto M., Arai H., Inoue K. Chinese hamster ovary cells expressing a novel type of acetylated low density lipoprotein receptor. Isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* 1995. V.270. №4. P.1921-1927.
177. Furberg C.D., Psaty B.M., Meyer J.V. Nifedipine. Dose-related increase in mortality in patients with coronary heart disease. *Circulation.* 1995. V.92. №5. P.1326-1331.
178. Gaede P., Vedel P., Larsen N., Jensen G.V., Parving H.H., Pedersen O. Multifactorial intervention and cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* 2003. V.348. №5. P.383-393.
179. Gardner C.D., Chatterjee L.M., Carlson J.J. The effect of a garlic preparation on plasma lipid levels in moderately hypercholesterolemic adults. *Atherosclerosis.* 2001. V.154. №1. P.213-220.
180. Gebhardt R. Inhibition of cholesterol biosynthesis by a water garlic extract in primary cultures of rat hepatocytes. *Arzneim-Forsch. / Drug Res.* 1991. V.41. №8. P.800-804.
181. 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. V.1213. P.57-62.
182. Geer J.C., Haust M.D. Smooth muscle cells in atherosclerosis. Basel, Karger, 1972.
 183. Geroulakos G., Gorman D., Nicolaides A., Sheridan D., Elkeles R., Shaper A.G. Carotid intima-media thickness: correlation with the British Regional Heart Study risk score. *J. Intern. Med.* 1994. V.235. №5. P.431-433.
 184. Geroulakos G., Gorman D.J., Kalodiki E., Sheridan D.J., Nicolaides A.N. The carotid intima-media thickness as a marker of the presence of severe symptomatic coronary artery disease. *Eur. Heart J.* 1994. V.15. №6. P.781-785.
 185. Ginter E. Prevention of cardiovascular diseases: the Finnish experience and current situation. *Bratisl. Lek. Listy*. 1997. V.98. №2. P.67-72.
 186. Glagov S., Weisenberg E., Zarins C.K., Stankunavicius R., Kolettis G.J. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N. Engl. J. Med.* 1987. V.316. P.1371-1375.
 187. Goldstein J.L., Basu S.K., Brown M.S. Receptor-mediated endocytosis of low density lipoprotein in cultured cells. *Methods Enzymol.* 1983. V.98. P.241-260.
 188. Goldstein J.L., Brown M.S., Anderson R.G.W., Russel D.W., Schneider W.J. Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1985. V.1. P.1-39.
 189. Goldstein J.L., Ho Y.K., Basu S.K., Brown M.S. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low-density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 1979. V.76. P.333-337.
 190. Goldstein J.L., Ho Y.K., Brown M.S., Innerarity T.L., Mahley R.W. Cholesteryl ester accumulation in macrophages resulting from receptor-mediated lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 1980. V.255. P.1839-1843.
 191. Goldstein J.L., Hoff H.F., Ho Y.K., Brown M.S. Stimulation of cholesteryl ester synthesis in macrophages by extracts of atherosclerotic human aortas and complexes of albumin/cholesteryl esters. *Atherosclerosis*. 1981. V.1. P.210-217.
 192. Goldstein J.L., Schrott H.G., Hazzard W.R., Bierman E.L., Motulsky A.G. Hyperlipidemia in coronary heart disease. II. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. *J. Clin. Invest.* 1973. V.52. P.1544-1568.
 193. Gotto A.M., Jr., Assmann G., Carmena R., Davignon J., Fernandez-Cruz A., Fruchart J.C., Kastelein J.J.P., Paoletti R. The ILIB lipid handbook for clinical practice. Blood lipids and coronary heart disease. New York, International Lipid Information Bureau, 2000.
 194. Gotto A.M., Jr., Pownall H.J., Havel R.J. Introduction to the plasma lipoproteins. In: *Methods in enzymology*. / Segrest J.P., Albers J.J., eds. Academic Press, London. 1986. Pp.3-41.

195. Gown A.M., Tsukada T., Ross R. Human atherosclerosis. II. Immunocytochemical analysis of the cellular composition of human atherosclerotic lesions. *Am. J. Pathol.* 1986. V.125. P.191-207.
196. Grady D., Rubin S.M., Petitti D.B., Fox C.S., Black D., Ettinger B., Ernster V.L., Cummings S.R. Hormone therapy to prevent disease and prolong life in postmenopausal women. *Ann. Intern. Med.* 1992. V.117. №12. P.1016-1037.
197. Grobbee D.E., Bots M.L. Statin treatment and progression of atherosclerotic plaque burden. *Drugs.* 2003. V.63. №9. P.893-911.
198. Grundy S.M. Role of low-density lipoproteins in atherogenesis and development of coronary heart disease. *Clin. Chem.* 1995. V.41. P.139-146.
199. Haberland M.E., Fogelman A.M. The role of altered lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. *Am. Heart J.* 1987. V.113. №2. P.573-577.
200. Haberland M.E., Olch C.L., Fogelman A.M. Role of lysines in mediating interaction of modified low density lipoproteins with the scavenger receptor on human monocyte-macrophages. *J. Biol. Chem.* 1984. V.259. P.11305-11311.
201. Haley N.J., Fowler S., de Duve C. Lysosomal acid cholesteryl esterase activity in normal and lipid-laden aortic cells. *J. Lipid Res.* 1980. V.21. P.961-969.
202. Hansson G.K., Holm J., Jonasson L. Detection of activated T lymphocytes in the human atherosclerotic plaque. *Am. J. Pathol.* 1989. V.135. P.169-175.
203. Hara A., Radin N.S. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal. Biochem.* 1978. V.90. №1. P.420-426.
204. 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. V.74. №3. P.247-249.
205. Harris M.I., Flegal K.M., Cowie C.C., Eberhardt M.S., Goldstein D.E., Little R.R., Wiedmeyer H.M., Byrd-Holt D.D. Prevalence of diabetes, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance in U.S. adults. The Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Diabetes Care.* 1998. V.21. №4. P.518-524.
206. Haust M.D. Recent concepts on the pathogenesis of atherosclerosis. *Can. Med. Assoc. J.* 1989. V.140. P.929-935.
207. Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart Protection Study of antioxidant vitamin supplementation in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2002. V.360. №9326. P.23-33.
208. Hedblad B., Wikstrand J., Janzon L., Wedel H., Berglund G. Low-dose metoprolol CR/XL and fluvastatin slow progression of carotid intima-media thickness: main results from the Beta-Blocker Cholesterol-Lowering Asymptomatic Plaque Study (BCAPS). *Circulation.* 2001. V.103. №13. P.1721-1726.
209. Heinecke J.W., Baker L., Rosen H., Chait A. Superoxide-mediated modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* 1986. V.77. P.757-

764.

210. Heinle H., Betz E. Effects of dietary garlic supplementation in a rat model of atherosclerosis. *Arzneimittelforschung*. 1994. V.44. P.614-617.
211. Henricksen T., Mahoney E.M., Steinberg D. Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 1981. V.78. P.6499-6503.
212. Hense H.W., Schulte H., Lowel H., Assmann G., Keil U. Framingham risk function overestimates risk of coronary heart disease in men and women from Germany - results from the MONICA Augsburg and the PROCAM cohorts. *Eur. Heart J.* 2003. V.24. №10. P.937-945.
213. Hirsch A.T., Criqui M.H., Treat-Jacobson D., Regensteiner J.G., Creager M.A., Olin J.W., Krook S.H., Hunninghake D.B., Comerota A.J., Walsh M.E., McDermott M.M., Hiatt W.R. Peripheral arterial disease detection, awareness, and treatment in primary care. *J.A.M.A.* 2001. V.286. №11. P.1317-1324.
214. Ho S.E., Ide N., Lau B.H. S-allyl cysteine reduces oxidant load in cells involved in the atherogenic process. *Phytomedicine*. 2001. V.8. №1. P.39-46.
215. Hobbs H.H., Brown M.S., Goldstein J.L. Molecular genetics of the LDL-receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Human Mut.* 1992. V.1. P.445-454.
216. Hodis H.N. Reversibility of atherosclerosis - evolving perspectives from two arterial imaging clinical trials: the cholesterol lowering atherosclerosis regression study and the monitored atherosclerosis regression study. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1995. V.25 Suppl 4. P.S25-S31.
217. Hodis H.N., Mack W.J., LaBree L., Selzer R.H., Liu C.R., Liu C.Y., Alaupovic P., Kwong F., Azen S.P. Reduction in carotid arterial wall thickness using lovastatin and dietary therapy: a randomized controlled clinical trial. *Ann. Intern. Med.* 1996. V.124. №6. P.548-556.
218. Hodis H.N., Mack W.J., LaBree L., Selzer R.H., Liu C.R., Liu C.H., Azen S.P. The role of carotid arterial intima-media thickness in predicting clinical coronary events. *Ann. Intern. Med.* 1998. V.128. №4. P.262-269.
219. Hodis H.N., Mack W.J., Lobo R.A., Shoupe D., Sevanian A., Mahrer P.R., Selzer R.H., Liu C.R., Liu C.H., Azen S.P. Estrogen in the prevention of atherosclerosis. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann. Intern. Med.* 2001. V.135. №11. P.939-953.
220. Howard G., Wagenknecht L.E., Burke G.L., Diez-Roux A., Evans G.W., McGovern P., Nieto F.J., Tell G.S. Cigarette smoking and progression of atherosclerosis: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *J.A.M.A.* 1998. V.279. №2. P.119-124.
221. Hulley S., Grady D., Bush T., Furberg C., Herrington D., Riggs B., Vittinghoff E.

- Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *J.A.M.A.* 1998. V.280. №7. P.605-613.
222. Hunink M.G., Goldman L., Tosteson A.N., Mittleman M.A., Goldman P.A., Williams L.W., Tsevat J., Weinstein M.C. The recent decline in mortality from coronary heart disease, 1980-1990. The effect of secular trends in risk factors and treatment. *J.A.M.A.* 1997. V.277. №7. P.535-542.
 223. Iberl B., Winkler G., Muller B., Knobloch K. Quantitative determination of allicin and alliin from garlic by HPLC. *Planta Med.* 1990. V.56. P.320-326.
 224. Ide N., Lau B.H. Garlic compounds protect vascular endothelial cells from oxidized low density lipoprotein-induced injury. *J. Pharm. Pharmacol.* 1997. V.49. №9. P.908-911.
 225. Ide N., Lau B.H. Aged garlic extract attenuates intracellular oxidative stress. *Phytomedicine.* 1999. V.6. №2. P.125-131.
 226. 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. V.17. №8. P.1440-1447.
 227. Innerarity T.L., Mahley R.W., Weisgraber K.H., Bersot T.P., Krauss R.M., Vega G.L., Grundy S.M., Friedl W., Davignon J., McCarthy B.J. Familial defective apolipoprotein B-100: a mutation of apolipoprotein B that causes hypercholesterolemia. *J. Lipid Res.* 1990. V.31. №8. P.1337-1349.
 228. International Task Force for Prevention of Coronary Heart Disease. Pocket guide to prevention of coronary heart disease. Grunwald, Germany, Borm Bruckmeier Verlag GmBH, 2003.
 229. Ito H., Chimata M., Oka M., Suzuki Y., Hamada N., Fujimaki M., Oda K., Fujisawa K., Teramoto T., Nakamura K., Nagase M., Naito C. Immunohistochemical and biochemical detection of low density lipoprotein receptors in cultured rat mesangial cells. *Nephron.* 1995. V.69. P.305-310.
 230. Jaakkola O., Solakivi T., Tertov V.V., Orekhov A.N., Miettinen T.A., Nikkari T. Characteristics of low-density lipoprotein subfractions from patients with coronary artery disease. *Coron. Artery Dis.* 1993. V.4. №4. P.379-385.
 231. Jacques P.F., Selhub J., Bostom A.G., Wilson P.W., Rosenberg I.H. The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. *N. Engl. J. Med.* 1999. V.340. №19. P.1449-1454.
 232. Jain R.C., Konar D.B. Effect of garlic oil in experimental cholesterol atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 1978. V.29. P.125-129.
 233. Ji Z.S., Brecht W.J., Miranda R.D., Hussain M.M., Innerarity T.L., Mahley R.W. Role of heparan sulfate proteoglycans in the binding and uptake of apolipoprotein E-enriched remnant lipoproteins by cultured cells. *J. Biol. Chem.* 1993. V.268. №14. P.10160-10167.

234. 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. V.6. P.131-138.
235. Jores L. Herz und Gefasse. In: *Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie.* / Henke F., Lubarsch F., eds. Springer, Berlin. 1924.
236. Jousilahti P., Vartiainen E., Pekkanen J., Tuomilehto J., Sundvall J., Puska P. Serum cholesterol distribution and coronary heart disease risk: observations and predictions among middle-aged population in eastern Finland. *Circulation*. 1998. V.97. №11. P.1087-1094.
237. Jousilahti P., Vartiainen E., Tuomilehto J., Puska P. Twenty-year dynamics of serum cholesterol levels in the middle-aged population of eastern Finland. *Ann. Intern. Med.* 1996. V.125. №9. P.713-722.
238. Kaartinen M., Penttilä A., Kovanen P.T. Mast cells of two types differing in neutral protease composition in the human aortic intima. *Arterioscler. Thromb.* 1994. V.14. P.966-972.
239. Kannel W.B. The worth of controlling plasma lipids. *Am. J. Cardiol.* 1998. V.81. №8. P.1047-1049.
240. Kannel W.B., D'Agostino R.B., Sullivan L., Wilson P.W. Concept and usefulness of cardiovascular risk profiles. *Am Heart J.* 2004. V.148. №1. P.16-26.
241. Kannel W.B., Ellison R.C. Alcohol and coronary heart disease: the evidence for a protective effect. *Clin. Chim. Acta.* 1996. V.246. №1-2. P.59-76.
242. Kannel W.B., Neaton J.D., Wentworth D., Thomas H.E., Stamler J., Hulley S.B., Kjelsberg M.O. Overall and coronary heart disease mortality rates in relation to major risk factors in 325,348 men screened for the MRFIT. *Multiple Risk Factor Intervention Trial. Am. Heart J.* 1986. V.112. №4. P.825-836.
243. Kannel W.B., Wilson P.W. An update on coronary risk factors. *Med. Clin. North Am.* 1995. V.79. №5. P.951-971.
244. Katsuda S., Boyd H.C., Fluckiger R., Ross R., Gown A.M. Human atherosclerosis. III. Immunocytochemical analysis of the cell composition of lesions of young adults. *Am. J. Pathol.* 1992. V.140. P.907-914.
245. Kendler B.S. Garlic (*Allium sativum*) and onion (*Allium cepa*): a review of their relationship to cardiovascular disease. *Prev. Med.* 1987. V.16. №5. P.670-685.
246. Keys A., Menotti A., Aravanis C., Blackburn H., Djordevic B.S., Buzina R., Dontas A.S., Fidanza F., Karvonen M.J., Kimura N. The seven countries study: 2,289 deaths in 15 years. *Prev. Med.* 1984. V.13. №2. P.141-154.
247. Kissebach A.H., Alfarsi S., Evans D.J., Adams P.W. Integrated regulation of very low density lipoprotein in hyperlipidemia: studies of apolipoprotein-B kinetics in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes*. 1982. V.31. P.217-225.
248. Klerk M., Verhoef P., Clarke R., Blom H.J., Kok F.J., Schouten E.G. MTHFR 677C-->T

- polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *J.A.M.A.* 2002. V.288. №16. P.2023-2031.
249. Knight B.L., Soutar A.K. Changes in the metabolism of modified and unmodified low density lipoproteins during the maturation of cultured blood monocytes from normal and homozygous familial hypercholesterolaemic subjects. *Eur. J. Biochem.* 1982. V.125. P.407-411.
 250. Koscielny J., Klussendorf D., Latza R., Schmitt R., Radtke H., Siegel G., Kiesewetter H. The antiatherosclerotic effect of *Allium sativum*. *Atherosclerosis.* 1999. V.144. №1. P.237-249.
 251. Krauss R.M. Dense low density lipoproteins and coronary artery disease. *J. Cardiol.* 1995. V.75. P.53B-57B.
 252. Krauss R.M., Eckel R.H., Howard B. et al. AHA Dietary Guidelines: revision 2000: A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association. *Stroke.* 2000. V.31. №11. P.2751-2766.
 253. Kritchevsky D. Effect of garlic on experimental atherosclerosis in rabbit. *Artery.* 1975. V.1. P.319-323.
 254. Kronmal R.A., Cain K.C., Ye Z., Omenn G.S. Total serum cholesterol levels and mortality risk as a function of age. A report based on the Framingham data. *Arch. Intern. Med.* 1993. V.153. №9. P.1065-1073.
 255. Kroon A.A., van Asten W.N., Stalenhoef A.F. Effect of apheresis of low-density lipoprotein on peripheral vascular disease in hypercholesterolemic patients with coronary artery disease. *Ann. Intern. Med.* 1996. V.125. №12. P.945-954.
 256. La Belle M., Krauss R.M. Differences in carbohydrate content of low density lipoproteins associated with low density lipoprotein subclass patterns. *J. Lipid Res.* 1990. V.31. P.1577-1588.
 257. Lackner K.J., Dieplinger H., Nowicka G., Schmitz G. High density lipoprotein deficiency with xanthomas - a defect in reverse cholesterol transport caused by a point mutation in apolipoprotein A-I gene. *J. Clin. Invest.* 1993. V.92. P.2262-2268.
 258. Lakka H.M., Laaksonen D.E., Lakka T.A., Niskanen L.K., Kumpusalo E., Tuomilehto J., Salonen J.T. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *J.A.M.A.* 2002. V.288. №21. P.2709-2716.
 259. Lamarche B., St-Pierre A.C., Ruel I.L., Cantin B., Dagenais G.R., Despres J.P. A prospective, population-based study of low density lipoprotein particle size as a risk factor for ischemic heart disease in men. *Can. J. Cardiol.* 2001. V.17. №8. P.859-865.
 260. Langhans T.H. Beitrage zur normalen und pathologischen Anatomie der Arterien. *Virchows Arch. (A).* 1866. V.36. P.187-226.
 261. LaRosa J.C., Hunninghake D., Bush D., Criqui M.H., Getz G.S., Gotto A.M., Grundy S.M., Rakita L., Robertson R.M., Weisfeldt M.L. The cholesterol facts. A summary of the evidence relating dietary fats, serum cholesterol, and coronary heart disease. A joint

- statement by the American Heart Association and the National Heart, Lung, and Blood Institute. The Task Force on Cholesterol Issues, American Heart Association. *Circulation*. 1990. V.81. №5. P.1721-1733.
262. Lau B., Lam F., Wang-Chen R. Effect of odor-modified garlic preparation on blood lipids. *Nutr. Res.* 1987. V.7. P.139-149.
 263. Lau B.H. Suppression of LDL oxidation by garlic. *J. Nutr.* 2001. V.131. №3s. P.985S-988S.
 264. Lau B.H., Adetumbi M.A., Sanches A. *Allium sativum* (garlic) and atherosclerosis: a review. *Nutr. Res.* 1983. V.3. P.119-125.
 265. Laufs U., Liao J.K. Direct vascular effects of HMG-CoA inhibitors. *Trends Cardiovasc. Med.* 2000. V.10. P.143-148.
 266. Le Goff W., Guerin M., Chapman M.J. Pharmacological modulation of cholesteryl ester transfer protein, a new therapeutic target in atherogenic dyslipidemia. *Pharmacol. Ther.* 2004. V.101. №1. P.17-38.
 267. Lerner D.J., Kannel W.B. Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: a 26-year follow-up of the Framingham population. *Am. Heart J.* 1986. V.111. №2. P.383-390.
 268. Lewington S., Clarke R., Qizilbash N., Peto R., Collins R., Prospective Studies Collaboration. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet*. 2002. V.360. №9349. P.1903-1913.
 269. Lichtenstein A.H., Kennedy E., Barrier P., Danford D., Ernst N.D., Grundy S.M., Leveille G.A., van Horn L., Williams C.L., Booth S.L. Dietary fat consumption and health. *Nutr. Rev.* 1998. V.56. №5 Pt 2. P.S3-19.
 270. Lindgren F.T. Preparative ultracentrifugal laboratory procedures and suggestions for lipoprotein analysis. In: *Analysis of lipids and lipoproteins.* / Perkins E.G., ed. American Oil Chemical Society, New York. 1975. Pp.204-224.
 271. Little T.L., Beyer E.C., Duling B.R. Connexin 43 and connexin 40 gap junctional proteins are present in arteriolar smooth muscle and endothelium in vivo. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 1995. V.268. P.H729-H739.
 272. Little W.C., Constantinescu M., Applegate R.J. Can angiography predict the site of a subsequent myocardial infarction in patients with mild-to-moderate coronary artery disease? *Circulation*. 1988. V.78. P.1157-1166.
 273. Lloyd-Jones D.M., Wilson P.W., Larson M.G., Beiser A., Leip E.P., D'Agostino R.B., Levy D. Framingham risk score and prediction of lifetime risk for coronary heart disease. *Am. J. Cardiol.* 2004. V.94. №1. P.20-24.
 274. Loewenstein W.R. Junctional intercellular communication and the control of growth. *Biochim. Biophys. Acta.* 1979. V.560. P.1-65.
 275. Lopes-Virella M.F., Klein R.L., Lyons T.J., Stevenson H.C., Witztum J.L. Glycosylation

- of low-density lipoprotein enhances cholesteryl ester synthesis in human monocyte-derived macrophages. *Diabetes*. 1988. V.37. №5. P.550-557.
276. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall B.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951. V.193. P.265-275.
 277. 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. V.30. P.916-923.
 278. MacMahon S., Sharpe N., Gamble G. Effects of lowering average of below-average cholesterol levels on the progression of carotid atherosclerosis: results of the LIPID Atherosclerosis Substudy. LIPID Trial Research Group. *Circulation*. 1998. V.97. №18. P.1784-1790.
 279. Maggi E., Chiesa R., Melissano G., Castellano R., Astore D., Grossi A., Finardi G., Bellomo G. LDL oxidation in patients with severe carotid atherosclerosis: A study of in vitro and in vivo oxidation markers. *Arterioscler. Thromb.* 1994. V.14. №12. P.1892-1899.
 280. Mahley R.W., Innerarity T.L., Rall S.C., Weisgraber K.H. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res.* 1984. V.25. P.1277-1294.
 281. Mahley R.W., Innerarity T.L., Rall S.C., Weisgraber K.H. Lipoproteins of special significance in atherosclerosis. Insights provided by studies of type III hyperlipoproteinemia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1985. V.454. P.209-221.
 282. Mahley R.W., Weisgraber K.H., Innerarity T.L., Windmueller H.G. Accelerated clearance of low-density and high-density lipoproteins and retarded clearance of E apoprotein-containing lipoproteins from the plasma of rats after modification of lysine residues. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 1979. V.76. №4. P.1746-1750.
 283. Malcolm G.T., Strong J.P., Restrepo C. Atherosclerosis and lipid composition of the abdominal aorta. *Lab. Invest.* 1984. V.50. P.79-86.
 284. Malczak H.T., Buck R.C. Regeneration of endothelium in rat aorta after local freezing. *Am. J. Pathol.* 1977. V.86. P.133-135.
 285. 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. V.89. №12. P.1414-1416.
 286. Mand J.K., Gupta P.P., Soni G.L., Singh R. Effect of garlic on experimental atherosclerosis in rabbits. *Indian Heart J.* 1985. V.37. P.183-188.
 287. Mansoor G.A. Herbs and alternative therapies in the hypertension clinic. *Am. J. Hypertens.* 2001. V.14. №9 Pt 1. P.971-975.
 288. Marcovina S.M., Hegele R.A., Koschinsky M.L. Lipoprotein(a) and coronary heart

- disease risk. *Curr. Cardiol. Rep.* 1999. V.1. №2. P.105-111.
289. Martin M.J., Hulley S.B., Browner W.S., Kuller L.H., Wentworth D. Serum cholesterol, blood pressure, and mortality: implications from a cohort of 361,662 men. *Lancet.* 1986. V.2. №8513. P.933-936.
 290. Maslin D.J., Brown C.A., Das I., Zhang X.H. Nitric oxide - a mediator of the effects of garlic? *Biochem. Soc. Trans.* 1997. V.25. №3. P.408S.
 291. Mautner S.L., Sanchez J.A., Rader D.J., Mautner G.C., Ferrans V.J., Fredrickson D.S., Brewer H.B., Roberts W.C. The heart in Tangier disease. Severe coronary atherosclerosis with near absence of high-density lipoprotein cholesterol. *Am. J. Clin. Pathol.* 1992. V.98. №2. P.191-198.
 292. McCrindle B.W., Helden E., Conner W.T. Garlic extract therapy in children with hypercholesterolemia. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 1998. V.152. №11. P.1089-1094.
 293. 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. V.130. P.45-55.
 294. McGill H.C., Herderick E.E., McMahan C.A., Zieske A.W., Malcolm G.T., Tracy R.E., Strong J.P. Atherosclerosis in youth. *Minerva Pediatr.* 2002. V.54. №5. P.437-447.
 295. McGill H.C., McMahan C.A., Herderick E.E., Tracy R.E., Malcom G.T., Zieske A.W., Strong J.P. Effects of coronary heart disease risk factors on atherosclerosis of selected regions of the aorta and right coronary artery. PDAY Research Group. Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000. V.20. №3. P.836-845.
 296. McGovern P.G., Pankow J.S., Shahar E., Doliszny K.M., Folsom A.R., Blackburn H., Luepker R.V. Recent trends in acute coronary heart disease - mortality, morbidity, medical care, and risk factors. The Minnesota Heart Survey Investigators. *N. Engl. J. Med.* 1996. V.334. №14. P.884-890.
 297. McMahan C.A., Gidding S.S., Fayad Z.A., Zieske A.W., Malcom G.T., Tracy R.E., Strong J.P., McGill H.C. Risk scores predict atherosclerotic lesions in young people. *Arch. Intern. Med.* 2005. V.165. №8. P.883-890.
 298. McNamara J.J., Molot M.A., Strempel J.F., Cutting R.T. Coronary artery disease in combat casualties in Vietnam. *J.A.M.A.* 1971. V.216. P.1185-1187.
 299. Mercuri M., Bond M.G., Sirtori C.R. Pravastatin reduces carotid intima-media thickness progression in an asymptotic hypercholesterolemic mediterranean population: the Carotid Atherosclerosis Italian Ultrasound Study. *Am. J. Med.* 1996. V.101. №6. P.627-634.
 300. Mirhardi S.A., Singh S., Gupta P.P. Effect of garlic supplementation to cholesterol-rich diet on development of atherosclerosis in rabbits. *Indian J. Exp. Biol.* 1991. V.29. P.162-168.
 301. Mokdad A.H., Serdula M.K., Dietz W.H., Bowman B.A., Marks J.S., Koplan J.P. The continuing epidemic of obesity in the United States. *J.A.M.A.* 2000. V.284. №13.

- P.1650-1651.
302. Morcos N.C. Modulation of lipid profile by fish oil and garlic combination. *J. Nat. Med. Assoc.* 1997. V.89. P.673-678.
 303. Morelli V., Zoorob R.J. Alternative therapies: Part I. Depression, diabetes, obesity. *Am. Fam. Physician.* 2000. V.62. №5. P.1051-1060.
 304. Mori T., Takahashi K., Naito M., Kodama T., Hakamata H., Sakai M., Miyazaki A., Horiuchi S., Ando M. Endocytic pathway of scavenger receptors via trans-Golgi system in bovine alveolar macrophages. *Lab. Invest.* 1994. V.71. №3. P.409-416.
 305. Movat H.Z., More R.H., Haust M.D. The diffuse intimal thickening of the human aorta with aging. *Am. J. Pathol.* 1958. V.34. P.1023-1031.
 306. Munro J.M., van der Walt J.D., Munro C.S., Chalmers J.A., Cox E.L. An immunohistochemical analysis of human aortic fatty streaks. *Hum. Pathol.* 1987. V.18. P.375-380.
 307. Murabito J.M., D'Agostino R.B., Silbershatz H., Wilson W.F. Intermittent claudication. A risk profile from The Framingham Heart Study. *Circulation.* 1997. V.96. №1. P.44-49.
 308. Murabito J.M., Evans J.C., Nieto K., Larson M.G., Levy D., Wilson P.W. Prevalence and clinical correlates of peripheral arterial disease in the Framingham Offspring Study. *Am. Heart J.* 2002. V.143. №6. P.961-965.
 309. Naghavi M., Libby P., Falk E. et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II. *Circulation.* 2003. V.108. №15. P.1772-1778.
 310. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation.* 2002. V.106. №25. P.3143-3421.
 311. Neil H.A., Silagy C.A., Lancaster T., Hodgeman J., Vos K., Moore J.W., Jones L., Cahill J., Fowler G.H. Garlic powder in the treatment of moderate hyperlipidaemia: a controlled trial and meta-analysis. *J. R. Coll. Physicians Lond.* 1996. V.30. №4. P.329-334.
 312. Nissen S.E. Who is at risk for atherosclerotic disease? Lessons from intravascular ultrasound. *Am. J. Med.* 2002. V.112 (Suppl. 8A). P.27S-33S.
 313. Nissen S.E., Yock P. Intravascular ultrasound. Novel pathophysiological insights and current clinical applications. *Circulation.* 2001. V.103. P.604-616.
 314. Nordestgaard B.G., Wootton R., Lewis B. Selective retention of VLDL, IDL, and LDL in the arterial intima of genetically hyperlipidemic rabbits in vivo: Molecular size as a determinant of fractional loss from the intima- inner media. *Arterioscler. Thromb.* 1995. V.15. P.534-542.
 315. O'Leary D.H., Polak J.F., Kronmal R.A., Manolio T.A., Burke G.L., Wolfson S.K. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and

- stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. N. Engl. J. Med. 1999. V.340. №1. P.14-22.
316. O K., Hill J.S., Pritchard P.H. Role of N-linked glycosylation of lecithin:cholesterol acyltransferase in lipoprotein substrate specificity. Biochim. Biophys. Acta. 1995. V.1254. P.193-197.
 317. Oram J.F., Brinton E.A., Bierman E.L. Regulation of high density lipoprotein receptor activity in cultured human skin fibroblasts and human arterial smooth muscle cells. J. Clin. Invest. 1983. V.72. P.1611-1621.
 318. Otvos J.D., Jeyarajah E.J., Bennett D.W., Krauss R.M. Development of a proton nuclear magnetic resonance spectroscopic method for determining plasma lipoprotein concentrations and subspecies distributions from a single, rapid measurement. Clin. Chem. 1992. V.38. №9. P.1632-1638.
 319. Packard C.J., Gaw A., Demant T., Shepherd J. Development and application of a multicompartamental model to study very low density lipoprotein subfraction metabolism. J. Lipid Res. 1995. V.36. P.172-187.
 320. Pahor M., Psaty B.M., Alderman M.H., Applegate W.B., Williamson J.D., Furberg C.D. Therapeutic benefits of ACE inhibitors and other antihypertensive drugs in patients with type 2 diabetes. Diabetes Care. 2000. V.23. №7. P.888-892.
 321. Palinski W., Rosenfeld M.E., Yla-Herttuala S., Gurtner G.C., Socher S.S., Butler S.W., Parthasarathy S., Carew T.E., Steinberg D., Witztum J.L. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 1989. V.86. №4. P.1372-1376.
 322. Pearson J.D. Lipid metabolism in cultured aortic smooth muscle cells and comparison with other types. Part I. Composition of cells grown in hyperlipemic serum. Atherosclerosis. 1976. V.24. P.233-242.
 323. Pearson T.A., Laurora I., Chu H., Kafonek S. The lipid treatment assessment project (L-TAP): a multicenter survey to evaluate the percentages of dyslipidemic patients receiving lipid-lowering therapy and achieving low-density lipoprotein cholesterol goals. Arch. Intern. Med. 2000. V.160. №4. P.459-467.
 324. Pedraza-Chaverri J., Tapia E., Medina-Campos O.N., Medina-Campos O.N., Granados M., Franco M. Garlic prevents hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis. Life Sci. 1998. V.62. №6. P.L71-L77.
 325. Peterkofsky B., Diegelmann R. Use of mixture of proteinase free collagenases for specific assay of radioactive collagen in the presence of other protiens. Biochemistry. 1971. V.10. P.988-984.
 326. Pignoli P., Tremoli E., Poli A., Oreste P., Paoletti R. Intimal plus medial thickness of the arterial wall: a direct measurement with ultrasound imaging. Circulation. 1986. V.74. №6. P.1399-1406.
 327. Pitas R.E., Innerarity T.L., Mahley R.W. Foam cells in explants of atherosclerotic rabbit

- aortas have receptors for beta-very low density lipoproteins and modified low density lipoproteins. *Arteriosclerosis*. 1983. V.3. №1. P.2-12.
328. 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. V.102. №13. P.1503-1510.
 329. Preuss H.G., Clouatre D., Mohamadi A., Jarrell S.T. Wild garlic has a greater effect than regular garlic on blood pressure and blood chemistries of rats. *Int. Urol. Nephrol.* 2001. V.32. №4. P.525-530.
 330. Probstfield J.L., Margit E.S., Byington R.P., Espeland M.A., Furberg C.D. Results of the primary outcome measure and clinical events from the Asymptomatic Carotid Artery Progression Study. *Am. J. Cardiol.* 1995. V.76. №9. P.47C-53C.
 331. Qidwai W., Qureshi R., Hasan S.N., Azam S.I. Effect of dietary garlic (*Allium Sativum*) on the blood pressure in humans - a pilot study. *J. Pak. Med. Assoc.* 2000. V.50. №6. P.204-207.
 332. Raggi P., Cooil B., Callister T.Q. Use of electron beam tomography data to develop models for prediction of hard coronary events. *Am. Heart J.* 2001. V.141. №3. P.375-382.
 333. Rahman K. Historical perspective on garlic and cardiovascular disease. *J. Nutr.* 2001. V.131. №3s. P.977S-979S.
 334. Rahman K., Billington D. Dietary supplementation with aged garlic extract inhibits ADP-induced platelet aggregation in humans. *J. Nutr.* 2000. V.130. №11. P.2662-2665.
 335. Redgrave T.G. Chylomicron metabolism. *Biochem. Soc. Trans.* 2004. V.32. №1. P.79-82.
 336. Reina M., Brunzell J.D., Deeb S.S. Molecular basis of familial chylomicronemia: mutations in the lipoprotein lipase and apolipoprotein C-II genes. *J. Lipid Res.* 1992. V.33. №12. P.1823-1832.
 337. Reuter H.D., Koch H.P., Lawson L.D. Therapeutic effects of garlic and its preparations. In: *Garlic*. / Koch H.P., Lawson L.D., eds. Williams and Wilkins, London, UK. 1996. Pp.135-162.
 338. Ridker P.M., Rifai N., Rose L., Buring J.E., Cook N.R. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N. Engl. J. Med.* 2002. V.347. №20. P.1557-1565.
 339. Rimm E.B., Stampfer M.J., Ascherio A., Giovannucci E., Colditz G.A., Willett W.C. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N. Engl. J. Med.* 1993. V.328. №20. P.1450-1456.
 340. Rosamond W.D., Chambless L.E., Folsom A.R. Survival trends, coronary event rates, and the MONICA project. Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease. *Lancet*. 1999. V.354. №9181. P.864-865.

341. Rosei E.A., Dal P., Leonetti G. Magnani B., Pessina A., Zanchetti A. Clinical results of the Verapamil in Hypertension and Atherosclerosis Study. VHAS Investigators. *J. Hypertens.* 1997. V.15. №11. P.1337-1344.
342. Ross R. The smooth muscle cell. II. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. *J. Cell Biol.* 1971. V.50. P.172-186.
343. Ross R. Atherosclerosis: a problem of the biology of the arterial wall cells and their interaction with blood components. *Arteriosclerosis.* 1981. V.1. P.293-311.
344. Rossouw J.E., Anderson G.L., Prentice R.L., Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *J.A.M.A.* 2002. V.288. №3. P.321-333.
345. Rubins H.B., Robins S.J., Collins D., Fye C.L., Anderson J.W., Elam M.B., Faas F.H., Linares E., Schaefer E.J., Schectman G., Wilt T.J., Wittes J. Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group. *N. Engl. J. Med.* 1999. V.341. №6. P.410-418.
346. Sacks F.M., Pfeffer M.A., Moye L.A., Rouleau J.L., Rutherford J.D., Cole T.G., Brown L., Warnica J.W., Arnold J.M., Wun C.C., Davis B.R., Braunwald E. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. *N. Engl. J. Med.* 1994. V.335. P.1001-1009.
347. Salonen J.T., Nyyssönen K., Salonen R., Lakka H.M., Kaikkonen J., Porkkala S., Voutilainen S., Lakka T.A., Rissanen T., Leskinen L., Tuomainen T.P., Valkonen V.P., Ristonmaa U., Poulsen H.E. Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention (ASAP) study: a randomized trial of the effect of vitamins E and C on 3-year progression of carotid atherosclerosis. *J. Intern. Med.* 2000. V.248. №5. P.377-386.
348. Salonen J.T., Salonen R. Ultrasound B-mode imaging in observational studies of atherosclerotic progression. *Circulation.* 1993. V.87. №3 Suppl. P.II56-II65.
349. Salonen R., Nyyssönen K., Porkkala S., Salonen J.T. The Kuopio Atherosclerosis Prevention Study (KAPS): effect of pravastatin treatment on lipids, oxidation resistance of lipoproteins, and atherosclerotic progression. *Am. J. Cardiol.* 1995. V.76. №9. P.34C-39C.
350. Salonen R., Nyyssönen K., Porkkala E., Rummukainen J., Belder R., Park J.S., Salonen J.T. Kuopio Atherosclerosis Prevention Study (KAPS). A population-based primary preventive trial of the effect of LDL lowering on atherosclerotic progression in carotid and femoral arteries. *Circulation.* 1995. V.92. №7. P.1758-1764.
351. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet.* 1994. V.344. №8934. P.1383-1389.
352. Schaefer E.J., Kay L.L., Zech L.A., Brewer H.B. Tangier disease: high density

- lipoprotein deficiency due to defective metabolism of an abnormal apolipoprotein A-I (apo A-Tangier). *J. Clin. Invest.* 1982. V.70. P.934-939.
353. Schaefer E.J., Lamon-Fava S., Ausman L.M., Ordovas J.M., Clevidence B.A., Judd J.T., Goldin B.R., Woods M., Gorbach S., Lichtenstein A.H. Individual variability in lipoprotein cholesterol response to National Cholesterol Education Program Step 2 diets. *Am. J. Clin. Nutr.* 1997. V.65. №3. P.823-830.
 354. Schaefer E.J., Lamon-Fava S., Jenner J.L., McNamara J.R., Ordovas J.M., Davis C.E., Abolafia J.M., Lippel K., Levy R.I. Lipoprotein(a) levels and risk of coronary heart disease in men. The lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial. *J.A.M.A.* 1994. V.271. №13. P.999-1003.
 355. Schechter I., Fogelman A.M., Haberland M.E., Seager J., Hokom M., Edwards P.A. The metabolism of native and malondialdehyde-altered low density lipoproteins by human monocyte-macrophages. *J. Lipid Res.* 1981. V.22. P.63-74.
 356. Schonfeld G. Recent concepts of lipoprotein pathophysiology. *Atherosclerosis*. 1994. V.110 Suppl. P.S3-S9.
 357. Schonfelder M. Ortologie und patologie der Langhans-zellen der aortenintima des menschen. *Patol. Microbiol.* 1969. V.33. P.129-145.
 358. Schwartz C.J., Valente A.J., Sprague E.A. A modern view of atherogenesis. *Am. J. Cardiol.* 1993. V.71. №6. P.9B-14B.
 359. 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. V.94. P.79-85.
 360. Seshadri S., Wolf P.A., Beiser A., Vasan R.S., Wilson P.W., Kase C.S., Kelly H., Kannel W.B., Agostino R.B. Elevated midlife blood pressure increases stroke risk in elderly persons: the Framingham Study. *Arch. Intern. Med.* 2001. V.161. №19. P.2343-2350.
 361. Sever P.S., Dahlof B., Poulter N.R., ASCOT investigators. Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial - Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet*. 2003. V.361. №9364. P.1149-1158.
 362. Sheng K., Yangfeng W., Xian L. Effects of statin therapy on the progression of carotid atherosclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis*. 2004. V.177. P.433-442.
 363. SHEP Cooperative Research Group. Prevention of stroke by antihypertensive drug treatment in older persons with isolated systolic hypertension. Final results of the Systolic Hypertension in the Elderly Program (SHEP). *J.A.M.A.* 1991. V.265. №24. P.3255-3264.
 364. Shepherd J. Lipoprotein metabolism. *Drugs*. 1994. V.47. №Suppl.2. P.1-10.

365. Shepherd J., Blauw G.J., Murphy M.B., PROSPER Study Group. Pravastatin in elderly individuals at risk of vascular disease (PROSPER): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002. V.360. №9346. P.1623-1630.
366. Shepherd J., Cobbe S.M., Ford I., Isles C.G., Lorimer A.R., MacFarlane P.W., McKillop J.H., Packard C.J. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N. Engl. J. Med*. 1995. V.333. №20. P.1301-1307.
367. Siegel G., Emden J., Wenzel K., Mironneau J., Stock G. Potassium channel activation in vascular smooth muscle. *Adv. Exp. Med. Biol*. 1992. V.311. P.53-72.
368. Siegel G., Walter A., Engel S., Walper A., Michel F. Pleiotropic effects of garlic. *Wien. Med. Wochenschr*. 1999. V.149. №8-10. P.217-224.
369. Siegel G., Walter A., Schnalke F., Schmidt A., Buddecke E., Loirand G., Stock G. Potassium channel activation, hyperpolarization, and vascular relaxation. *Z. Kardiol*. 1991. V.80 Suppl 7. P.9-24.
370. Silagy C., Neil A. Garlic as a lipid lowering agent - a meta-analysis. *J. R. Coll. Physicians Lond*. 1994. V.28. №1. P.39-45.
371. Silagy C.A., Neil H.A. A meta-analysis of the effect of garlic on blood pressure. *J. Hypertens*. 1994. V.12. №4. P.463-468.
372. Simon A., Giral P., Levenson J. Extracoronary atherosclerotic plaque at multiple sites and total coronary calcification deposit in asymptomatic men. Association with coronary risk profile. *Circulation*. 1995. V.92. №6. P.1414-1421.
373. 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. V.104. P.340-352.
374. Smilde T.J., van Wissen S., Wollersheim H., Trip M.D., Kastelein J.J., Stalenhoef A.F. Effect of aggressive versus conventional lipid lowering on atherosclerosis progression in familial hypercholesterolaemia (ASAP): a prospective, randomised, double-blind trial. *Lancet*. 2001. V.357. №9256. P.577-581.
375. Smith G.D., Shipley M.J., Rose G. Intermittent claudication, heart disease risk factors, and mortality. *Circulation*. 1990. V.82. №6. P.1925-1931.
376. Sowers J.R., Epstein M., Frohlich E.D. Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease: an update. *Hypertension*. 2001. V.37. №4. P.1053-1059.
377. Spigelski D., Jones P.J. Efficacy of garlic supplementation in lowering serum cholesterol levels. *Nutr. Rev*. 2001. V.59. №7. P.236-241.
378. Stadius M.L., Rowan R., Fleischhauer J.F., Kernoff R., Billingham M., Gown A.M. Time course and cellular characteristics of the iliac artery response to acute balloon injury. An angiographic, morphometric, and immunocytochemical analysis in the cholesterol-fed New Zealand white rabbit. *Arterioscler. Thromb*. 1992. V.12. P.1267-1273.
379. Staessen J.A., Fagard R., Thijs L., Syst-Eur Trial Investigators. Randomised double-

- blind comparison of placebo and active treatment for older patients with isolated systolic hypertension. The Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) Trial Investigators. *Lancet*. 1997. V.350. №9080. P.757-764.
380. Stampfer M.J., Hennekens C.H., Manson J.E., Colditz G.A., Rosner B., Willett W.C. Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *N. Engl. J. Med.* 1993. V.328. №20. P.1444-1449.
 381. Stary H.C. Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. *Atherosclerosis*. 1989. V.9. P.119-132.
 382. Stary H.C. Composition and classification of human atherosclerotic lesions. *Virchows Arch. (A)*. 1992. V.421. P.277-290.
 383. Stary H.C. Natural History and Histological Classification of Atherosclerotic Lesions : An Update. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000. V.20. №5. P.1177-1178.
 384. 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. V.89. P.2462-2478.
 385. StClair R.W., Leight M.A. Differential effects of isolated lipoproteins from normal and hypercholesterolemic rhesus monkeys on cholesterol esterification and accumulation in arterial smooth muscle cells in culture. *Biochim. Biophys. Acta*. 1978. V.530. P.279-291.
 386. Steenland K. Passive smoking and the risk of heart disease. *J.A.M.A.* 1992. V.267. №1. P.94-99.
 387. Steinberg D., Parthasarathy S., Carew T.E., Khoo J., Witztum J.L. Beyond cholesterol: modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.* 1989. V.320. P.915-924.
 388. Steinbrecher U.P., Eiser M., Witztum J.L., Curtiss L.K. Immunogenicity of homologous low density lipoprotein after methylation, ethylation, acetylation or carbamylation: generation of antibodies specific for derivatized lysine. *J. Lipid Res.* 1984. V.25. P.1109-1116.
 389. Steinbrecher U.P., Witztum J.L., Kesaniemi Y.A., Elam R.L. Comparison of glucosylated low density lipoprotein with methylated or cyclohexanedione-treated low density lipoprotein in the measurement of receptor-independent low density lipoprotein catabolism. *J. Clin. Invest.* 1983. V.71. №4. P.960-964.
 390. 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. V.64. №6. P.866-870.
 391. Steiner M., Li W. Aged garlic extract, a modulator of cardiovascular risk factors: a dose-finding study on the effects of AGE on platelet functions. *J. Nutr.* 2001. V.131. №3s.

- P.980S-984S.
392. Stevens R.J., Kothari V., Adler A.I., Stratton I.M. The UKPDS risk engine: a model for the risk of coronary heart disease in Type II diabetes (UKPDS 56). *Clin. Sci. (Lond.)*. 2001. V.101. №6. P.671-679.
 393. Superko H.R., Krauss R.M. Garlic powder, effect on plasma lipids, postprandial lipemia, low-density lipoprotein particle size, high-density lipoprotein subclass distribution and lipoprotein(a). *J. Am. Coll. Cardiol.* 2000. V.35. №2. P.321-326.
 394. Swaminathan N., Aladjem F. The monosaccharide composition and sequence of the carbohydrate moiety of human serum low density lipoprotein. *Biochemistry*. 1976. V.15. P.1516-1522.
 395. Sytkowski P.A., Kannel W.B., Agostino R.B. Changes in risk factors and the decline in mortality from cardiovascular disease. The Framingham Heart Study. *N. Engl. J. Med.* 1990. V.322. №23. P.1635-1641.
 396. Takai Y., Sasaki T., Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiol. Rev.* 2001. V.81. P.153-208.
 397. Takeichi S., Yukawa N., Nakajima Y., Osawa M., Saito T., Seto Y., Nakano T., Saniabadi A.R., Adachi M., Wang T., Nakajima K. Association of plasma triglyceride-rich lipoprotein remnants with coronary atherosclerosis in cases of sudden cardiac death. *Atherosclerosis*. 1999. V.142. №2. P.309-315.
 398. Tanaka A., Al M., Kobayashi Y., Tamura M., Shimokado K., Numano F. Metabolism of triglyceride-rich lipoproteins and their role in atherosclerosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2001. V.947. P.207-212.
 399. Taylor A.J., Kent S.M., Flaherty P.J. ARBITER: Arterial Biology for the Investigation of the Treatment Effects of Reducing Cholesterol. A randomized trial comparing the effects of atorvastatin and pravastatin on carotid intima thickness. *Circulation*. 2002. V.106. №16. P.2055-2060.
 400. Teng B., Thompson G.R., Sinderman A.D., Forte F.M., Krauss R.M., Kwiterovich P.O. Composition and distribution of low density lipoprotein fractions in hyperapobetalipoproteinemia, normolipidemia and familial hypercholesterolemia. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 1983. V.80. P.6662-6666.
 401. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 1993. V.329. №14. P.977-986.
 402. The Long-term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. *N. Engl. J. Med.* 1998. V.339. P.1349-1357.
 403. Thompson G.R. A handbook of hyperlipidemia. London, Current Science, 1990.
 404. Thompson S.G., Kienast J., Pyke S.D., Haverkate F., van de Loo J.C. Hemostatic factors

- and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *N. Engl. J. Med.* 1995. V.332. №10. P.635-641.
405. Tomono S., Kawazu S., Kato N., Ono T., Ishii C., Ito Y., Shimizu M., Shimoyama M., Nakano T., Nakajima K. Uptake of remnant like particles (RLP) in diabetic patients from mouse peritoneal macrophages. *J. Atheroscler. Thromb.* 1994. V.1. №2. P.98-102.
 406. Topol E.J., Nissen S.E. Our preoccupation with coronary luminology. The dissociation between clinical and angiographic findings in ischemic heart disease. *Circulation.* 1995. V.92. P.2333-2342.
 407. Trautmann A. Functions of gap junction channels in the open and closed states. *Biochem. Soc. Trans.* 1988. V.16. P.534-536.
 408. Tsukada T., Rosenfeld M.E., Ross R., Gown A.M. Immunocytochemical analysis of cellular components in atherosclerotic lesions. Use of monoclonal antibodies with the Watanabe and fat-fed rabbit. *Arteriosclerosis.* 1986. V.6. P.601-613.
 409. Tsukada T., Tippens D., Gordon D., Ross R., Gown A.M. HHF35, a muscle-actin-specific monoclonal antibody. I. Immunocytochemical and biochemical characterization. *Am. J. Pathol.* 1987. V.126. P.51-60.
 410. Turner R.C. The UK Prospective Diabetes Study. A review. *Diabetes Care.* 1998. V.21 Suppl 3. P.C35-C38.
 411. Turner R.C., Cull C.A., Frighi V., Holman R.R. Glycemic control with diet, sulfonylurea, metformin, or insulin in patients with type 2 diabetes mellitus: progressive requirement for multiple therapies (UKPDS 49). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *J.A.M.A.* 1999. V.281. №21. P.2005-2012.
 412. Tuzcu E.M., Kapadia S.R., Tutar E. High prevalence of coronary atherosclerosis in asymptomatic teenagers and young adults: evidence from intravascular ultrasound. *Circulation.* 2001. V.103. P.2705-2710.
 413. Utermann G., Pruin N., Steinmetz A. Polymorphism of apolipoprotein E. III. Effect of a single polymorphic gene locus on plasma lipid levels in man. *Clin. Genet.* 1979. V.15. №1. P.63-72.
 414. van Berkel T.J.C., Fluiter K., van Velzen A.G., Vogelezang C.J., Ziere G.J. LDL receptor-independent and -dependent uptake of lipoproteins. *Atherosclerosis.* 1995. V.118 Suppl. P.S43-S50.
 415. Vasan R.S., Larson M.G., Leip E.P., Evans J.C., O'Donnell C.J., Kannel W.B., Levy D. Impact of high-normal blood pressure on the risk of cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* 2001. V.345. №18. P.1291-1297.
 416. Velican D., Velican C. Histochemical study on the glucosaminoglycans (acid mycopolisacharides) of the human coronary arteries. *Acta Histochem. Bd.* 1977. V.59. P.190-200.
 417. Verschuren W.M., Jacobs D.R., Bloemberg B.P., Kromhout D., Menotti A., Aravanis C.,

- Blackburn H., Buzina R., Dontas A.S., Fidanza F. Serum total cholesterol and long-term coronary heart disease mortality in different cultures. Twenty-five-year follow-up of the seven countries study. *J.A.M.A.* 1995. V.274. №2. P.131-136.
418. Vijayagopal P., Srinivasan S.R., Jones K.M. Complexes of low-density lipoproteins and arterial proteoglycan aggregates promote cholesteryl ester accumulation in mouse macrophages. *Biochim. Biophys. Acta.* 1985. V.837. P.251-261.
 419. Virchow R.V. Phlobose und Thrombose im Gefass-system. In: *Gesammelte Abhandlungen zur wissebschaftlichen Medizin.* / Meidinder, Frankfurt. 1856.
 420. Virgolini I., Li S. R., Yang Q., Koller E., Sperr W.R., Leimer M., Angelberger P., Nimpf J., Schneider W., Valent P. Characterization of LDL and VLDL binding sites on human basophils and mast cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1995. V.15. P.17-26.
 421. Vlassara H., Brownlee M., Cerami A. Specific macrophage receptor activity for advanced glycosylation end products inversely correlates with insulin levels in vivo. *Diabetes.* 1988. V.37. №4. P.456-461.
 422. Voss R., Cullen P., Schulte H., Assmann G. Prediction of risk of coronary events in middle-aged men in the Prospective Cardiovascular Muenster Study (PROCAM) using neural networks. *Int. J. Epidemiol.* 2002. V.31. №6. P.1253-1262.
 423. Wang H.X., Ng T.B. Natural products with hypoglycemic, hypotensive, hypocholesterolemic, antiatherosclerotic and antithrombotic activities. *Life Sci.* 1999. V.65. №25. P.2663-2677.
 424. Wang J.G., Staessen J.A., Gong L., Liu L. Chinese trial on isolated systolic hypertension in the elderly. Systolic Hypertension in China (Syst-China) Collaborative Group. *Arch. Intern. Med.* 2000. V.160. №2. P.211-220.
 425. Warshafsky S., Kamer R.S., Sivak S.L. Effect of garlic on total serum cholesterol. A meta-analysis. *Ann. Intern. Med.* 1993. V.119. №7 Pt 1. P.599-605.
 426. 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. V.253. №24. P.9053-9062.
 427. Weisgraber K.H., Innerarity T.L., Rall S.C., Jr., Mahley R.W. Receptor interactions controlling lipoprotein metabolism. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 1985. V.63. №8. P.898-905.
 428. Weitz-Schmidt G., Welzenbach K., Brinkmann V. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nat. Med.* 2001. V.7. P.687-692.
 429. Westendorp I.C., Veld B.A., Bots M.L., Akkerhuis J.M., Hofman A., Grobbee D.E., Witteman J.C. Hormone replacement therapy and intima-media thickness of the common carotid artery: the Rotterdam study. *Stroke.* 1999. V.30. №12. P.2562-2567.
 430. Wilson P.W., Agostino R.B., Levy D., Belanger A.M., Silbershatz H., Kannel W.B. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation.* 1998. V.97.

№18. P.1837-1847.

431. Wilson P.W., Agostino R.B., Sullivan L., Parise H., Kannel W.B. Overweight and obesity as determinants of cardiovascular risk: the Framingham experience. *Arch. Intern. Med.* 2002. V.162. №16. P.1867-1872.
432. Wilson P.W., Hoeg J.M., D'Agostino R.B., Silbershatz H., Belanger A.M., Poehlmann H., O'Leary D., Wolf P.A. Cumulative effects of high cholesterol levels, high blood pressure, and cigarette smoking on carotid stenosis. *N. Engl. J. Med.* 1997. V.337. №8. P.516-522.
433. Wilson P.W., Kannel W.B., Silbershatz H., Agostino R.B. Clustering of metabolic factors and coronary heart disease. *Arch. Intern. Med.* 1999. V.159. №10. P.1104-1109.
434. Wilson P.W., Kauppila L.I., O'Donnell C.J., Kiel D.P., Hannan M., Polak J.M., Cupples L.A. Abdominal aortic calcific deposits are an important predictor of vascular morbidity and mortality. *Circulation.* 2001. V.103. №11. P.1529-1534.
435. Wilson P.W., Myers R.H., Larson M.G., Ordovas J.M., Wolf P.A., Schaefer E.J. Apolipoprotein E alleles, dyslipidemia, and coronary heart disease. The Framingham Offspring Study. *J.A.M.A.* 1994. V.272. №21. P.1666-1671.
436. Wolf P.A., Agostino R.B., Belanger A.J., Kannel W.B. Probability of stroke: a risk profile from the Framingham Study. *Stroke.* 1991. V.22. №3. P.312-318.
437. Yeh Y.Y., Liu L. Cholesterol-lowering effect of garlic extracts and organosulfur compounds: human and animal studies. *J. Nutr.* 2001. V.131. №3s. P.989S-993S.
438. Yusuf H.R., Giles W.H., Croft J.B., Anda R.F., Casper M.L. Impact of multiple risk factor profiles on determining cardiovascular disease risk. *Prev. Med.* 1998. V.27. №1. P.1-9.
439. Yusuf S., Dagenais G., Pogue J., Bosch J., Sleight P. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N. Engl. J. Med.* 2000. V.342. №3. P.154-160.
440. Zambon A., Bertocco S., Vitturi N., Polentarutti V., Vianello D., Crepaldi G. Relevance of hepatic lipase to the metabolism of triacylglycerol-rich lipoproteins. *Biochem. Soc. Trans.* 2003. V.31. №5. P.1070-1074.
441. Zanchetti A. Antiatherosclerotic effects of antihypertensive drugs: recent evidence and ongoing trials. *Clin. Exp. Hypertens.* 1996. V.18. №3-4. P.489-499.
442. Zanchetti A., Rosei E.A., Dal P., Leonetti G., Magnani B., Pessina A. The Verapamil in Hypertension and Atherosclerosis Study (VHAS): results of long-term randomized treatment with either verapamil or chlorthalidone on carotid intima-media thickness. *J. Hypertens.* 1998. V.16. №11. P.1667-1676.
443. Zhong S., Sharp D.S., Grove J.S. Bruce C., Yano K., Curb J.D., Tall A.R. Increased coronary heart disease in Japanese-American men with mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene despite increased HDL levels. *J. Clin. Invest.* 1996. V.97. №12. P.2917-2923.