

Терапия атеросклероза на основе препаратов природного происхождения

Монография посвящена современным представлениям о молекулярно-клеточных механизмах атеросклероза, новым данным о роли модифицированных липопротеидов низкой плотности, процессах воспаления в сосудистой стенке, половых гормонах и липопротеидах высокой плотности в атерогенезе. Предлагается алгоритм поиска антиатеросклеротических природных препаратов с помощью биотестирования. Монография представляет интерес как для специалистов широкого профиля, занимающихся проблемами сердечно-сосудистой патологии, так и для студентов и аспирантов медицинских университетов.

Атеросклероз, Терапия



Василий Петрович Карагодин · Александр Николаевич Орехов

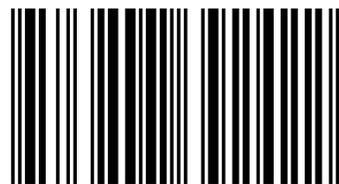
Терапия атеросклероза на основе препаратов природного происхождения

Разработка препаратов с использованием клеточных и ферментативных моделей



Василий Петрович Карагодин

Карагодин Василий Петрович, выпускник биологического факультета МГУ, сотрудник Научно-исследовательского института атеросклероза Инновационного центра Сколково (Москва, Россия), доктор биологических наук, доцент Российского Экономического Университета им. Г. В. Плеханова (Москва, Россия).



978-3-8473-9242-2

Карагодин, Орехов


Palmarium
academic publishing

**Василий Петрович Карагодин
Александр Николаевич Орехов**

**Терапия атеросклероза на основе препаратов природного
происхождения**

**Василий Петрович Карагодин
Александр Николаевич Орехов**

**Терапия атеросклероза на основе
препаратов природного
происхождения**

**Разработка препаратов с использованием
клеточных и ферментативных моделей**

Palmarium Academic Publishing

Impressum / Выходные данные

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

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

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

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

Coverbild / Изображение на обложке предоставлено: www.ingimage.com

Verlag / Издатель:

Palmarium Academic Publishing

ist ein Imprint der / является торговой маркой

OmniScriptum GmbH & Co. KG

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

Email / электронная почта: info@palmarium-publishing.ru

Herstellung: siehe letzte Seite /

Напечатано: см. последнюю страницу

ISBN: 978-3-8473-9242-2

Zugl. / Утверд.: Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии Российской Академии медицинских наук, 2013

Copyright / АВТОРСКОЕ ПРАВО © 2013 OmniScriptum GmbH & Co. KG

Alle Rechte vorbehalten. / Все права защищены. Saarbrücken 2013

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
1 МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АТЕРОГЕНЕЗА И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ПРЕПАРАТОВ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ.....	11
1.1 Механизмы атерогенности липопротеидов низкой плотности.....	11
1.2 Эстрогены, фитоэстрогены и их влияние на стенки сосудов... 25	
1.3 Липопротеиды высокой плотности – роль в обратном транспорте холестерина.....	38
1.4 Локальные реакции воспалительного типа и развитие атеросклеротического поражения.....	49
1.5 Перспективы применения препаратов природного происхожде- ния (ППП) в оздоровительных программах.....	65
1.5.1 Здоровье населения РФ и потребность в ППП.....	65
1.5.2 Причины стагнации российского рынка ППП.....	75
1.5.3 Поиск и изучение механизмов действия ППП с помощью клеточных моделей.....	89
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	97
2.1. Объекты исследования.....	97
2.2 Биохимические методы исследования.....	101
2.3 Морфологические методы исследования.....	105
2.4 Клеточные культуры.....	106
2.5. Экспериментальные модели.....	110
2.5.1 Ферментативная модель для определения сиалидазной активности.....	110
2.5.2 Клеточная модель интимы аорты для оценки накопления холестерина, оттока холестерина и образования цитокинов.....	114
2.5.3 Клеточная модель моноцитов-макрофагов для оценки накопления и оттока холестерина.....	119
2.6 Статистическая обработка результатов.....	122

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	123
3.1 Десалирующая модификация липопротеидов низкой плотности как фактор атерогенности и поиск эффективных антиатерогенных ППП.....	123
3.1.1 Влияние транс-сиалидазы на атерогенность липопротеидов низкой плотности.....	123
3.1.2 Исследование донорной специфичности транс-сиалидазы плазмы крови.....	125
3.1.3 Исследование акцепторной специфичности транс-сиалидаз плазмы крови.....	131
3.1.4 Разработка модели на основе транс-сиалидазы для исследования антиатеросклеротической активности фармакологических веществ.....	138
3.1.5 Проведение скрининга растительных объектов с помощью модели, создание ПП.....	141
3.1.6 Обсуждение полученных данных.....	149
3.2 Влияние половых гормонов на атерогенез, ППП как альтернатива заместительной гормональной терапии.....	153
3.2.1 Исследования влияния половых гормонов на внутриклеточное накопление холестерина.....	153
3.2.2 Создание клеточных моделей для определения атерогенности сыворотки крови.....	160
3.2.3 Поиск богатого фитострогенами растительного сырья, обладающего антиатеросклеротической активностью, разработка ППП.....	165
3.2.4 Обсуждение полученных данных.....	170
3.3 Действие липопротеидов высокой плотности на обратный транспорт холестерина и разработка эффективных ППП.....	176
3.3.1 Исследование влияния белков, потенциально вовлеченных в отток холестерина, на экспорт холестерина из макрофагов.....	176
3.3.2 Разработка клеточных моделей <i>in vitro</i> и <i>ex vivo</i> для поиска источников фармакологических веществ, потенциально пригодных для ЛВП-терапии.....	179
3.3.3 Испытания препаратов, способствующих оттоку холестерина из клеток сосудистой стенки.....	189
3.3.4 Обсуждение полученных данных.....	194

3.4 Роль иммунокомпетентных клеток в атерогенезе и поиск эффективных иммунокорректирующих ППП.....	199
3.4.1 Количественный анализ ассоциации между накоплением липидов, числом иммунно-воспалительных клеток и экспрессией HLA-DR.....	200
3.4.2 Исследование связи между содержанием липидов в клетках и представлением антигенов.....	208
3.4.3 Разработка клеточных моделей для исследования антицитокиновой активности фармакологических веществ.....	210
3.4.4 Проведение испытаний для поиска растений, обладающих противовоспалительным антицитокиновым действием, создание ППП.....	213
3.4.5 Обсуждение полученных данных.....	220
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	228
ВЫВОДЫ.....	231
4. БИБЛИОГРАФИЯ.....	233
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	285

СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- АПК – антиген-представляющие клетки
- Апо-В – аполипопротеин В
- АХАТ – ацилкоэнзим А : холестерин ацилтрансфераза
- ГМГ-КоА – гидроксиметилглутарил-коэнзим А
- ГМК – гладкомышечные клетки
- ИБС – ишемическая болезнь сердца
- ИФБ – изотонический фосфатный буфер
- ЛВП – липопротеиды высокой плотности
- ЛНП – липопротеиды низкой плотности
- ЛОНП – липопротеиды очень низкой плотности
- ЛПП – липопротеиды промежуточной плотности
- ЛХАТ – лецитин-холестерин ацилтрансфераза
- ОТХ – обратный транспорт холестерина
- ППП – препараты природного происхождения
- ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания
- ССС – сердечно-сосудистая система
- цмЛНП – циркулирующие модифицированные ЛНП
- ЭР – эстрадиол
- HLA-DR – молекула гистосовместимости класса II
- TNF- α – фактор некроза опухоли- α
- ICAM-1 – межклеточная молекула адгезии-1
- АВС транспортеры: ABCA1, ABCG1
- apoA-I – белковый компонент ЛВП
- AR – рецептор андрогенов
- СЕТР – белок-переносчик эфиров холестерина
- IL-1 – интерлейкин-1
- VALT – сосудисто-лимфоидная ткань

ВВЕДЕНИЕ

Атеросклероз и его клинические проявления занимают ведущее место в структуре заболеваемости и смертности в России. На основании эпидемиологических исследований выявлена группа факторов риска атеросклероза. Уровень холестерина в крови, артериальное давление, курение, образ жизни – модифицируемые факторы риска. Возраст, пол и семейный анамнез относятся к немодифицируемым факторам риска ИБС и атеросклероза. Воздействие на факторы риска является как способом первичной профилактики атеросклероза, так и непрямым лечением [20].

Существует представление о прямом лечении атеросклероза, то есть таком воздействии на сосудистую стенку, которое предотвращает возникновение и прогрессирование атеросклеротических поражений в артериях человека, а в идеале – вызывает регрессию атеросклероза. Подходы к прямому лечению атеросклероза находятся в стадии разработки, и в настоящее время не существует лекарств, в полной мере обладающих прямым антиатеросклеротическим действием. Кроме того, отсутствует система единых взглядов на патофизиологические процессы формирования атеросклеротических поражений.

Тем не менее, ведущим признаком атеросклероза является накопление липидов, главным образом свободного холестерина и его эфиров, в сосудистой стенке [246, 380]. Источником накапливающихся липидов являются липопротеиды низкой плотности (ЛНП). При этом для проявления атерогенного эффекта необходима химическая модификация липопротеидных частиц, поскольку нативные ЛНП в большинстве случаев не вызывают накопления холестерина в клетках сосудистой стенки.

Патогенетический подход к профилактике и лечению атеросклероза определяется необходимостью устранения основной причины за-

болевания, а именно предотвращением накопления внутриклеточных липидов или удаления их избытка. Вариантов достижения этой цели может быть много. В настоящей работе мы остановились на четырех из них, что объясняется современными представлениями о молекулярно-клеточных механизмах атеросклероза. Согласно этим представлениям, важную роль в возникновении и развитии атеросклеротического поражения играют модифицированные липопротеиды низкой плотности (ЛНП), процессы воспаления в сосудистой стенке, половые гормоны и липопротеиды высокой плотности (ЛВП).

1. Обнаруженная *in vivo* подфракция циркулирующих модифицированных ЛНП (цмЛНП), способная вызывать накопление липидов в клетках интимы аорты человека, формируется за счет десиалирования. Наибольшую атерогенность проявляют мелкие плотные десиалированные цмЛНП [313].

2. Не вызывает сомнения связь между инициирующими событиями атерогенеза и вовлечением в этот процесс воспаления и клеточного иммунитета. Основанием для таких взглядов являются результаты исследований, демонстрирующие присутствие активированных лимфоцитов в ранних и продвинутых атеросклеротических поражениях человека, а также присутствие в крови и сосудистой стенке аутоантител против ЛНП [342].

3. Многочисленные данные позволяют заключить, что женские половые гормоны (эстрогены) являются эффективным естественным фактором защиты сосудов от атерогенеза [102]. Преобладающей формой защитного действия эстрогенов является их влияние непосредственно на стенки сосудов, тогда как влияние эстрогенов на липопротеидный профиль крови обеспечивает лишь 25-40% защиты.

4. Наконец, способность липопротеидов высокой плотности (ЛВП) препятствовать развитию атеросклеротических поражений была убедительно документирована в лабораторных исследованиях

[430]. Данные эпидемиологических исследований указывают на возможность применения ЛВП-терапии для снижения риска сердечно-сосудистых заболеваний [293].

Главная проблема разработки патогенетической терапии атеросклероза, особенно на ранних субклинических стадиях его развития, заключается в отсутствии адекватных патофизиологических моделей и цельного алгоритма поиска и создания лекарственных и нелекарственных средств прямого антиатеросклеротического действия.

Клеточный культуральный тест представляется нам наиболее адекватным способом моделирования ранних процессов атерогенеза на клеточном уровне. С использованием клеточного теста возможна оценка антиатерогенного потенциала лекарственных кандидатов и проведение серийных испытаний, необходимых для потокового скрининга фармакологических веществ.

Тем не менее, широкое использование синтетических лекарственных средств с целью профилактики атеросклероза на ранних его стадиях является проблематичным в силу наличия узких показаний для их назначения, побочного действия и высокой стоимости лечения. Для ранней профилактики атеросклероза целесообразно использование нелекарственных и лекарственных препаратов природного происхождения (ППП), поскольку многие из них практически не обладают побочными эффектами, оказывают регулирующее воздействие в физиологических границах нормы, 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 звеньев развития атеросклероза и осуществляя, параллельно с прямым антиатеросклеротическим эффектом, не прямое антиатеросклеротическое воздействие [156,254, 408].

Целью данной работы является исследование клеточных и моле-

кулярных механизмов развития атеросклероза и создание на основе накопленных знаний ППП, обладающих высоким антиатеросклеротическим терапевтическим потенциалом.

Из этого следует, что для достижения цели необходимо решить следующие задачи:

1. Изучить отдельные аспекты атерогенеза человека:

- механизмы атерогенности ЛНП;
- влияние эстрогенов на сосуды при атерогенезе;
- участие ЛВП в обратном транспорте холестерина;
- роль иммуно-воспалительных клеток в атерогенезе.

2. Разработать следующие модели для создания ППП, обладающих антиатеросклеротическим терапевтическим потенциалом:

– модель для выявления антиатерогенной активности ППП, основанную на подавлении атерогенной модификации липопротеидов;

– клеточную модель для поиска богатых фитоэстрогенами ППП из растительного сырья, обладающего антиатеросклеротической активностью;

– клеточную модель для создания ППП, потенциально пригодных для ЛВП-терапии;

– клеточную модель для выявления антиатеросклеротической активности ППП, основанную на определении клеточных показателей иммуно-воспалительных реакций (экспрессии цитокинов).

3. С использованием разработанных моделей выявить натуральные продукты, пригодные для получения ППП, обладающих антиатеросклеротическим терапевтическим потенциалом и разработать рецептуру таких ППП.

4. Апробировать универсальный алгоритм НИР, направленных на исследование, разработку и создание антиатеросклеротических препаратов.

5. Разработать рекомендации и предложения по использованию результатов проведенных НИР в реальном секторе экономики.

1 МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТочНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АТЕРОГЕНЕЗА И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ПРЕПАРАТОВ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

1.1 Механизмы атерогенности липопротеидов низкой плотности

Атеросклероз является многофакторным заболеванием, 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. В медико-социальном аспекте атеросклероз является наиболее важной проблемой, поскольку его клинические проявления (так называемые атеросклеротические заболевания), в особенности инфаркт миокарда и острые нарушения мозгового кровообращения, занимают ведущее место в структуре заболеваемости и смертности в экономически развитых странах [179].

В настоящее время причины возникновения и механизмы развития атеросклероза изучены недостаточно. Одним из наиболее ранних проявлений атеросклеротического поражения является аккумуляция липидов клетками интимы аорты человека. Показано, что основным источником липидов являются липопротеиды низкой плотности (ЛНП) [146,155, 298, 324]. Многочисленными работами было продемонстрировано, что ЛНП, выделенные из крови здоровых лиц, не вызывали внутриклеточного отложения липидов [125, 88, 207,218, 273,349, 403]. Была выдвинута гипотеза об изменении свойств липопротеидов низкой плотности в результате некоей химической модификации. В дальнейшем были получены различные *in vitro* модифицированные ЛНП. Действительно, окисленные [383], обработанные малоновым альдегидом [153], гликозилированные [251] и ацетилированные [170] липопротеиды вызывали накопление липидов в культуре

клеток. Однако все попытки выделить такого рода модифицированные ЛНП из крови человека оказались безрезультатными. Несмотря на многочисленные неудачи, поиск *in vivo* модифицированных ЛНП активно продолжался. В пользу версии о модификации ЛНП при атеросклерозе говорил и тот факт, что липопротеиды, выделенные из крови больных атеросклерозом, в отличие от нативных ЛНП стимулировали увеличение содержания липидов (в частности, холестерина), клеточную пролиферацию и синтез внеклеточного матрикса, т.е. являлись атерогенными [312,316,400].

В дальнейшем были обнаружены ЛНП, отличающиеся от нативных липопротеидов низкой плотности пониженным содержанием сиаловой кислоты (терминального сахара биантенных углеводных цепей липопротеидной частицы), получившие название десиалированных ЛНП, которые были выделены с помощью лектин-хроматографии на *Ricinus communis* агглютинин (RCA_{120}) агарозе [314,405]. Десиалированные ЛНП вызывали аккумуляцию липидов (в частности эфиров холестерина) в клетках интимы аорты человека и макрофагах, т.е. являлись атерогенными [312,402].

Таким образом, было экспериментально доказано существование в крови человека циркулирующих модифицированных липопротеидов низкой плотности, обладающих атерогенными свойствами. Однако, полностью не известны механизмы биологических процессов, приводящих к появлению в плазме крови человека десиалированных атерогенных липопротеидов.

В десиалированных липопротеидах низкой плотности, выделенных из крови больных атеросклерозом, содержание сиаловой кислоты было в среднем в 2-3 раза ниже, чем в нативных липопротеидах [398,402]. Была установлена достоверная обратная корреляция между содержанием сиаловой кислоты в ЛНП и их способностью вызывать накопление липидов *in vitro* [317]. Более того, нативные липопротеи-

ды здоровых лиц после десалирования бактериальной нейраминидазой приобретали атерогенные свойства [313,314]. Кроме измененного содержания сиаловой кислоты, десалированные ЛНП обладали целым рядом свойств, отличающих их от нативных липопротеидов [402]. Так, диаметр частиц десалированных ЛНП был на 10-15% меньше, чем диаметр нативных липопротеидов. Плотность десалированных липопротеидов была достоверно выше, по сравнению с сиалированными ЛНП. Десалированные липопротеиды характеризовались более высокой электрофоретической подвижностью, что говорило о повышенном поверхностном отрицательном заряде липопротеидной частицы. Была продемонстрирована повышенная способность десалированных ЛНП к агрегации: десалированные липопротеиды начинали агрегировать уже после 6 часов инкубации при 37°C, в то время как сиалированные частицы не формировали агрегатов вплоть до 24 часов инкубации. Кроме этого десалированные липопротеиды отличались низким содержанием нейтральных сахаров [401].

При дальнейших исследованиях были продемонстрированы существенные различия в липидном составе сиалированных и десалированных ЛНП [402]. Так, содержание свободного и этерифицированного холестерина в десалированных ЛНП здоровых лиц было на 30-40% ниже, чем в сиалированных липопротеидах; для десалированных и сиалированных ЛНП пациентов с коронарным атеросклерозом эта разница была 1,5-2 кратной. Уровень моноглицеридов и свободных жирных кислот десалированных ЛНП здоровых лиц был на 20-25% выше, по сравнению с сиалированными липопротеидами. В десалированных ЛНП больных с коронарным атеросклерозом содержание триглицеридов было в 1,5-2 раза выше, а свободных жирных кислот, моно- и диглицеридов – в 3-5 раз выше, чем в сиалированных липопротеидах. Десалированные ЛНП здоровых лиц имели сниженный уровень фосфатидилхолина и фотфатидилэтаноламина,

а также увеличение содержания лизофосфатидилхолина. Десалирированные липопротеиды пациентов с коронарным атеросклерозом содержали в 1,5-2 раза меньше фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина и сфингомиелина, а также в 2 раза больше лизофосфатидилхолина, по сравнению с сиалированными ЛНП. Содержание основных оксистеролов (7-кето-, 5,6-диен-, 7-окси- и 25-оксихолестерин) в десалирированных ЛНП как здоровых лиц, так и пациентов с коронарным атеросклерозом, было в 2-4 раза выше, чем в сиалированных липопротеидах. Уровень жирорастворимых витаминов (А и Е) в сиалированных липопротеидах здоровых лиц был достоверно ниже, по сравнению с сиалированными липопротеидами. В десалирированных ЛНП пациентов с коронарным атеросклерозом содержание витамина А и витамина Е было примерно в 1,5 и 2 раза, соответственно, ниже, чем в сиалированных липопротеидах низкой плотности. Была обнаружена повышенная предрасположенность десалирированных ЛНП к окислению *in vitro*, которая являлась, скорее всего, следствием потери жирорастворимых витаминов, являющихся естественными антиоксидантами [402].

Было продемонстрировано изменение третичной структуры апо-белка В (апоВ) липопротеидов низкой плотности, а также модификация лизиновых аминокислотных остатков, что являлось, по всей видимости, причиной снижения связывания десалирированных ЛНП с апоВ,Е-рецептором [403]. В отличие от нативных липопротеидов низкой плотности, десалирированные ЛНП приобретали способность связываться со скэвенджер-рецептором, асиалогликопротеид-рецептором и протеогликанами клеточной стенки [404].

В ходе исследований в других лабораториях в крови человека были обнаружены ЛНП, характеризующиеся повышенным электроотрицательным зарядом, впоследствии выделенные с помощью ионообменной хроматографии [85]. “Электроотрицательные” липопротеиды

также отличались от нативных ЛНП повышенной способностью к агрегации, увеличенным содержанием апоБелка, модификацией некоторых аминокислотных остатков, сниженным содержанием эфиров холестерина, фосфолипидов, витамина Е, а также вызывали накопление липидов в перитонеальных макрофагах мыши *in vitro* [85]. К тому времени, также были получены данные о присутствии в крови человека фракции ЛНП, отличающейся от нативных меньшими размерами и более высокой плотностью – так называемых мелких/плотных ЛНП [338,343,407], имеющих низкое содержание сиаловой кислоты и вызывающих аккумуляцию липидов макрофагами [83,84,112,231,237].

Можно привести целый ряд признаков, общих как для десалирированных, так и для “электроотрицательных” и мелких/плотных липопротеидов низкой плотности: малый размер частиц, высокая плотность, увеличенный поверхностный отрицательный заряд, повышенная способность к агрегации, измененный липидный состав и низкий уровень жирорастворимых витаминов, модификация аминокислотных остатков в составе апоВ, повышенная восприимчивость к окислению, способность индуцировать внутриклеточное накопление липидов. Кроме того, было показано, что в так называемых электроотрицательных липопротеидах уровень сиаловой кислоты значительно ниже, чем в нативных ЛНП [399]. На основе полученных данных был сделан вывод, что электроотрицательные, мелкие/плотные и десалирированные ЛНП являются одними и теми же множественно модифицированными липопротеидами низкой плотности.

Таким образом, атерогенные модифицированные липопротеиды низкой плотности, обнаруженные в плазме крови человека, отличаются от нативных ЛНП по целому ряду параметров, одним из которых является содержание сиаловой кислоты. Однако необходимо заметить, что обработка нативных липопротеидов бактериальной нейраминида-

зой (приводящая только к десиалированию) сама по себе уже достаточна для возникновения атерогенности. Следовательно, можно говорить о значительной роли потери сиаловой кислоты в проявлении атерогенных свойств липопротеидов низкой плотности.

Сиаловые кислоты представляют собой семейство производных нейраминовой кислоты (5-амино-3,5-дидеокси-D-галактоногулозоновая кислота). На сегодняшний день известно около 40 различных сиаловых кислот [427]. N-ацетил нейраминовая кислота (Neu5Ac) и N-гликолил нейраминовая кислота (Neu5Gc) являются наиболее распространенными представителями этого семейства [256,361]. Некоторые сиаловые кислоты являются O-ацильными производными. Показано, что O-ацилирование может увеличивать время жизни гликоконъюгатов за счет возрастания их устойчивости к действию N-ацетилнейраминидаз [360].

Сиаловые кислоты весьма широко распространены в природе. Показано наличие сиаловых кислот в составе гликоконъюгатов некоторых вирусов [236,362, 426], бактерий [148,250, 278], многих беспозвоночных [198, 209,262, 364,376], практически всех позвоночных, в том числе млекопитающих [89, 120,161, 201,449]. Надо заметить, что некоторые паразитические микроорганизмы не синтезируют собственные сиаловые кислоты, однако способны утилизировать сиаловые кислоты клетки-хозяина с помощью особых ферментов - транссиалидаз и N-ацетилнейраминидаз [124]. У человека сиаловые кислоты представлены, как правило, производными N-ацетилнейраминовой кислоты; содержание N-гликолилнейраминовой кислоты составляет менее 1% от общего количества сиаловых кислот [360,396].

Сиаловые кислоты в свободном виде встречаются достаточно редко. Так, например, уровень свободных сиаловых кислот в ткани головного мозга млекопитающих обычно не превышает 3% от суммарного количества. В моче и плазме крови здорового человека concentra-

ция свободных сиаловых кислот составляет 1-3 мкМ [360]. Обычно сиаловые кислоты входят в состав углеводных цепей, где связаны α -гликозидной связью (исключением является CMP-Neu5Ac – высокоэнергетический донор сиаловой кислоты, утилизируемый сиалилтрансферазами).

В составе олигосахаридной цепи сиаловые кислоты могут занимать как терминальное, так и внутрицепочечное положение [360]. В первом случае сиаловая кислота может располагаться линейно, относительно основной цепи, или же образует боковое ответвление. При линейном терминальном расположении сиаловая кислота присоединена α -гликозидной связью между гидроксилем при 2 углеродном атоме сиаловой кислоты и гидроксилем при 3,4 или 6 углеродном атоме соседнего моносахаридного остатка (α 2-3, α 2-4, или α 2-6 связь, соответственно). Такого рода связь может быть образована с галактозой, N-ацетилгалактозамином, N-глюкозамином, и, очень редко, глюкозой. Наиболее распространенный при линейном положении сиаловой кислоты тип связи - α 2-3 и α 2-6 с галактозой и α 2-6 с N-ацетилгалактозамином. При боковом терминальном положении сиаловой кислоты обычно образуется α 2-6 связь с N-ацетилгалактозамином и α 2-3 связь с галактозой [224,377]. Внутрицепочечное положение сиаловой кислоты возможно как при образовании поли- и олигосиаловых цепей (α 2-8 связь), обнаруженных, в частности, у бактерий, так и в составе гетерогенных олигосахаридов, с образованием α 2-3 и α 2-6 связи [360].

Сиаловая кислота может входить в состав олигосахаридных цепей различных гликопротеидов. В зависимости от способа присоединения углеводной цепи к белковой молекуле существует разделение на N- и O-гликозиды. В случае N-гликозидов, представленных, в частности, в апоВ, олигосахаридный фрагмент присоединен к аспарагино-

вому остатку, начинаясь с консервативной последовательности: GlcNAc β -(1-4)GlcNAc-Asn. Сиаловая кислота чаще всего присоединена к галактозе α 2-3 или α 2-6 связью. В O-гликозидах олигосахарид присоединяется к серину или треонину; консервативный фрагмент - GalNAc α -O-Ser/Thr. В этом случае сиаловая кислота как правило присоединена α 2-3 связью к галактозе или α 2-6 связью к N-ацетилгалактозамину (при образовании боковой цепи) [280,281].

Сиаловые кислоты входят в состав ганглиозидов – гликофинголипидов, являющихся, в частности, важной составляющей клеточных мембран. Структурной основой всех ганглиозидов является лактозилцерамид. Церамид, в свою очередь, состоит из аминок спирта сфингазина с присоединенной к нему жирной кислотой. Для различных ганглиозидов характерно наличие в составе одной или более сиаловых кислот. В ганглиозиде сиаловая кислота в основном связана α 2-3 связью с галактозой (α 2-6 гораздо реже), а также α 2-8 при образовании связи с другой сиаловой кислотой.

Согласно литературным данным, сиаловые кислоты в составе различных гликоконъюгатов могут выполнять следующие функции:

- 1) Придание гликоконъюгатам и клеточным мембранам отрицательного заряда (влияние на межклеточное взаимодействие);
- 2) Обеспечение необходимой конформации молекул гликопротеидов.
- 3) Участие в передаче информации, т.е. присутствие в составе рецепторов для клеток, микроорганизмов, токсинов и антител.
- 4) Защита гликоконъюгатов и клеток от узнавания и деградации [360].

При высокой концентрации сиаловой кислоты на поверхности клеток взаимное электростатическое “отталкивание” клеток может приводить к значительному ослаблению межклеточного взаимодействия. Так, например, было продемонстрировано, что увеличение сиа-

лирования поверхности раковых клеток приводит к их частичному разобщению [360]. Уровень сиаловой кислоты липопротеидов плазмы крови регулирует скорость их захвата клетками. Показано, что снижение уровня сиаловой кислоты эндотелия сосуда приводит к возрастанию скорости интернализации липопротеидов низкой плотности [175,261].

Гликозидсвязанные сиаловые кислоты могут обеспечивать маскирование антигена или специфических сайтов узнавания на поверхности клетки. Так, например, эритроциты несут на своей поверхности значительные количества сиаловой кислоты, входящей в состав гликофорина А. Показано, что со временем, в процессе циркуляции в кровотоке уровень сиаловой кислоты эритроцитов снижается [442]. Потеря сиаловой кислоты приводит к экспонированию на поверхности галактозы, в результате чего эритроциты связываются рецепторами печени и выводятся из кровотока. Таким образом, сиаловая кислота “определяет” время жизни эритроцитов в кровотоке. Необходимо заметить, что аналогичный механизм регулирования времени циркуляции показан для тромбоцитов [360].

Существуют данные о важной роли сиаловых кислот в формировании иммунного ответа. Так, например, показано, что наличие терминальной сиаловой кислоты в составе олигосахаридной части иммуноглобулина G (IgG) необходимо для его нормального функционирования. Многие ганглиозиды (содержащие сиаловую кислоту) являются неотъемлемой частью в составе клеточных рецепторов, отвечающих, в основном, за связывание некоторых токсинов и гормонов [360].

Сиаловая кислота входит в состав гликоконъюгатов некоторых гормонов, причем играет важную роль в их функционировании. Так, например, после десиалирования эритропоетина, человеческого гонадотропина и фолликул-стимулирующего гормона, происходила полная потеря их биологической активности [360].

Ферменты, осуществляющие отщепление или перенос сиаловой кислоты, можно условно разделить на три класса: сиалидазы (другой вариант названия – нейраминидазы) – экзогликозидазы, которые представлены широким спектром гидролитических ферментов, обнаруженных в вирусах, бактериях, простейших и позвоночных [106,274,277,279,290,424]; сиалилтрансферазы – семейство гликозилтрансфераз, участвующих в биосинтезе сиалогликопротеидов и сиалосфинголипидов [126,393,394]; транс-сиалидазы – ферменты, переносящие сиаловую кислоту с сиалогликоконъюгатов на другие гликоконъюгаты [291,326].

Сиалидазы часто как прямо, так и косвенно связаны с различными патологическими состояниями человека, такими как инфекционные заболевания и генетически обусловленные нарушения метаболизма. Например, у патогенных бактерий *Vibrio cholerae* нейраминидаза действует как фактор вирулентности, открывая на поверхности клетки-мишени центры связывания бактериального токсина [345]. Другой классический пример - нейраминидаза вируса гриппа, необходимая для его проникновения в легочный и кишечный мукозный слой и инфицирования клеток хозяина [377]. Было обнаружено, что степень гомологии аминокислотной последовательности для вирусной и бактериальной сиалидазы составляет около 35%. Молекулярная масса этих нейраминидаз составляет 40 кДа.

Сиалидазы катализируют отщепление терминальных остатков сиаловой кислоты, связанных α -гликозидной связью с олигосахаридными цепями гликоконъюгатов. Сиалидазы занимают важное место в катаболизме сиаловых кислот различных гликоконъюгатов [341,352,363].

Сиалидазы часто как прямо, так и косвенно связаны с различными патологическими состояниями человека, такими, как инфекционные заболевания и генетически обусловленные нарушения метаболизма. Например, у патогенных бактерий *Vibrio cholerae* нейраминидаза

действует как фактор вирулентности, открывая на поверхности клетки-мишени центры связывания бактериального токсина [108]. Другой классический пример - нейраминидаза вируса гриппа, необходимая для его проникновения в легочный и кишечный мукозный слой и инфицирования клеток хозяина. Было обнаружено, что степень гомологии аминокислотной последовательности для вирусной и бактериальной сиалидазы составляет около 35%. Молекулярная масса этих нейраминидаз составляет 40 кДа [121].

На данный момент известно три нейраминидазы млекопитающих, которые отличаются по субстратной специфичности, рН-оптимуму, стабильности и субклеточной локализации [352,363]. Это цитозольная, лизосомальная и мембранная (плазматическая) сиалидазы. Наиболее хорошо изучена цитозольная сиалидаза, впервые выделенная из крысиной печени [356,275,276]. Значительные количества этого фермента обнаружены в скелетных мышцах, где возможно его участие в процессе дифференцировки миобластов [357].

Нейраминидаза плазматической мембраны, для которой специфическим субстратом являются ганглиозиды, была выделена из тканей головного мозга [216,217,244,406,448]. Было показано, что этот фермент присутствует на самых разных клетках и может оказывать влияние на пролиферацию, межклеточные контакты или фазы клеточного цикла. Оптимальный рН для активности данного фермента кислый (как и для лизосомальной сиалидазы), однако, проявляемые биохимические и иммунологические свойства отличаются от таковых для лизосомальной нейраминидазы [365].

Лизосомальная N-ацетил- α -нейраминидаза осуществляет гидролиз сиаловой кислоты олигосахаридов, ганглиозидов, гликолипидов и гликопротеидов, отщепляя их терминальную сиаловую кислоту. Фермент характеризуется кислым рН оптимумом. Он специфично гидролизует α 2-3 и α 2-6 связи, действуя в основном на олигосахариды и гли-

копептиды [111,158], а также может гидролизовать и ганглиозиды, хотя и с меньшей эффективностью [150]. Существуют данные, что в тканях млекопитающих лизосомальная сиалидаза существует в составе комплекса с глюкозидазой, β -галактозидазой и специальным белком, защищающим ферменты от расщепления лизосомальными карбоксипептидазами [127].

У человека известны два типа нарушения метаболизма, связанного с лизосомальной сиалидазой: сиалидоз, обусловленный структурным повреждением лизосомальной сиалидазы, и как следствие, падением ее активности, и галактосиалидоз, вызываемый резким снижением активности комплекса сиалидазы и β -галактозидазы, из-за отсутствия защитного белка сериновой карбоксипептидазы/катепсина А [107,171,332,331,386].

У людей с таким заболеванием в тканях и выделениях обнаруживаются большие количества недеградированных сиалированных олигосахаридов и гликопептидов [414-416]. Сиалилтрансферазы относятся к семейству гликозилтрансфераз, мембранных белков, для структуры которых характерны значительные гидрофобные участки. В основном они локализованы в аппарате Гольджи и шероховатом эндоплазматическом ретикулуме, однако, могут обнаруживаться в сыворотке и на поверхности клеток крови.

Сиалилтрансферазы катализируют перенос сиаловой кислоты с CMP-Neu5Ac (единый для всех сиалилтрансфераз донор сиаловой кислоты) на терминальный остаток специфического олигосахарида с сопутствующим образованием определенной регио- и стереоспецифической связи. Некоторые исследователи выдвигают теорию «одна связь – один фермент» [359], основываясь на разнообразии связей сиаловой кислоты в олигосахаридах клеточной поверхности а также генов различных сиалилтрансфераз клеток животных [91,92,325]. Субстратная специфичность служит основой для общего разделения сиалил-

трансфераз, присутствующих в аппарате Гольджи, на три класса: гликопротеин:сиалил-трансферазы, гликолипид:сиалил-трансферазы и муцин:сиалил-трансферазы.

Некоторые сиалилтрансферазы осуществляют сиалирование сиалогликолипидов и сиалосфинголипидов, расположенных на клеточной поверхности лимфоцитов и макрофагов. Опухолевые или раковые клетки экспрессируют большое количество различных сиалированных гликоконъюгатов. Было показано, что ингибирование сиалилтрансферазной активности может влиять на способность опухолевых клеток к метастазированию. Сиалилтрансферазы могут также играть роль в клеточной адгезии [346]. Существуют данные о возможности существования сиалилтрансферазной активности в сыворотке крови [157], которая, однако, может быть обусловлена отщеплением фермента от мембраны аппарата Гольджи под действием катепсин-D-подобной протеазы, с последующей секрецией в кровотоки [238].

Отличительная особенность транс-сиалидазы - способность переносить остаток сиаловой кислоты с одного гликоконъюгата на другой. Этот фермент не требует в качестве донора активированного комплекса нуклеотид – сиаловая кислота (CMP-Neu5Ac). Транс-сиалидазы характерны для вирусов и бактерий.

Наиболее хорошо изученной транс-сиалидазой является фермент, выделенный из *Trypanosoma cruzi*, не способной синтезировать собственные сиаловые кислоты. Оптимальный для этой транс-сиалидазы pH 7,9, температурный оптимум +13°C [182]. Данный фермент проявляет высокую активность при переносе сиаловой кислоты от экзогенных олигосахаридов, таких как Lac- α (2-3)-Neu5Ac и LacNac- α (2-3)-Neu5Ac на галактозу акцептора с образованием новой α (2-3) гликозидной связи, однако не способен утилизировать Lac- α (2-6)-Neu5Ac и свободную сиаловую кислоту. Транс-сиалидаза способна использоваться в качестве акцептора сиаловой кислоты гликоконъюгаты глико-

липидов и гликопротеидов, содержащие терминальную β -галактозу, и синтезирует исключительно $\alpha(2-3)$ гликозидную связь [369,392].

Существуют данные о существовании в плазме крови человека при различных патологиях значительной десиалирующей активности. Так, например, была продемонстрирована десиалирующая активность в плазме крови пациентов с простудными вирусными заболеваниями, которая могла сохраняться в течение нескольких недель после полного исчезновения всех симптомов инфекции. Десиалирующая активность в ряде случаев была обнаружена в плазме крови пациентов, больных раком. В крови больных постстрептококковым гломеруло-нефритом также было продемонстрировано существование ферментативной десиалирующей активности [344].

Отдельно внимания заслуживает работа, в которой исследовали кровь более чем 400 людей, используя в качестве субстрата тритий-меченный по сиаловой кислоте α_1 – гликопротеид сыворотки, в 95% случаев обнаружил десиалирующую активность [360]. рН-оптимум составлял 5,5; величина ферментативной активности в среднем равнялась примерно 10^{-10} Ед/мл сыворотки. К сожалению, приведенные данные не позволяют судить о происхождении десиалирующей активности в плазме крови: является она следствием тех или иных патологий, или же проявлением действия нативного фермента (ферментов) плазмы крови. Таким образом, вопрос о возможности существования в плазме нативного растворимого фермента (ферментов), способного десиалировать гликоконъюгаты, циркулирующие в кровотоке, все еще остается открытым.

Приведенные факты позволяют утверждать, что десиалирование играет важную, а иногда критическую роль в нормальном функционировании клеток и систем организма, а также в патологических процессах.

Для характеристики этой активности и использования полученных данных при разработке клеточных моделей предполагалось изучить субстратную и акцепторную специфичность сиалидазы. На начальной стадии этих экспериментов требовалось определить изменения основных параметров ЛНП при инкубации в плазме крови, а также их влияния на возникновение и развитие атерогенности липопротеидов.

Циркулирующие модифицированные ЛНП выделяются другими исследователями при использовании иных характеристик множественных модификаций. Фермент, активность которого приводит к де-сиалированию липопротеидов, является абсолютно новой мишенью для терапевтического антиатерогенного воздействия. Нашей задачей было создание удобной и эффективной модели на основе обнаруженной сиалидазы. На этой модели предполагалось провести скрининг фармакологических веществ (прежде всего, из растительного сырья) с целью поиска компонентов будущего антиатерогенного средства, механизм действия которого основан на подавлении атерогенной модификации липопротеидов.

1.2 Эстрогены, фитоэстрогены и их влияние на стенки сосудов

Атеросклероз – локальное сужение просвета кровеносных артерий, приводящее к инфаркту миокарда, инсульту головного мозга, гангрене нижних конечностей и другим тяжелейшим патологическим состояниям [78]. У мужчин уже к 30-35 годам можно наблюдать изменение в сосудистой стенке. У женщин при наступлении менопаузы резко возрастает риск развития атеросклероза и атеросклеротических заболеваний, которые составляют более 50% в структуре смертности, как в России, так и в других промышленно развитых странах. В молодом и зрелом возрасте, при сохраненной эндокринной функции, атеросклероз у женщин не выявляется, что,

возможно, связано с защитным действием эстрогенов. При наступлении менопаузы атеросклероз у женщин начинает быстро прогрессировать, и к 65 годам женщины становятся сравнимы с мужчинами по степени выраженности и распространенности атеросклероза [249].

Мировая наука в течение многих десятилетий уделяла пристальное внимание вопросам диагностики и профилактики атеросклероза у мужчин, в то время как механизмы атерогенеза у женщин оставались плохо изученными. В связи с этим мы намерены уделить внимание половым различиям в стратификации рисков, начале развития атеросклероза, его прогрессированию.

Для оценки риска развития сердечно-сосудистых заболеваний принято использовать Фрамингемскую шкалу оценки рисков [249]. Рассчитывается риск с учетом данных о возрасте, артериальном давлении, уровне холестерина, наличие диабета и статуса курильщика [245]. Такая шкала оценки рисков позволяет рассчитать риск возникновения ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда в ближайшие 10 лет. С течением времени статус риска может меняться, в связи с этим более точные и долгосрочные прогнозы рассчитать не представляется возможным. В результате исследования Framingham Heart Study было установлено, что у мужчин с высокими показателями факторов риска, развитие ИБС возможно уже после 45 лет, у женщин с подобными показателями рисков, только после 55 лет. На развитие атеросклероза влияет, в том числе и наследственность. Так, у мужчин с отягощенной наследственностью по сердечно-сосудистым заболеваниям проявления атеросклероза возможно в возрасте 55 лет и старше, у женщин в возрасте 65 лет и старше. Курение существенно негативно влияет на прогноз, как у мужчин, так и у женщин. Однако необходимо отметить, что курящие молодые женщины подвержены большим рискам, чем мужчины.

Такой параметр как уровень липопротеидов высокой плотности (ЛВП), не превышающий 40 мг/дл для мужчин и 50 мг/дл для женщин, является также фактором риска развития сердечно-сосудистых заболеваний. Повышение уровня общего холестерина у мужчин является фактором риска в любом возрасте, у женщин – только после наступления менопаузы. Само наступление менопаузы у женщин может рассматриваться как фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний. Такие факторы риска как гипертония, гиподинамия, ожирение и сахарный диабет, резко увеличивают риск развития сердечно-сосудистых заболеваний, как у мужчин, так и у женщин, но наличие этих факторов у женщин в менопаузе, приводит к тому, что риск возникновения сердечно-сосудистых заболеваний у женщин становится выше, чем у мужчин. В результате Фрамингемского исследования стало понятно, что риск развития сердечно-сосудистых заболеваний у мужчин и женщин не одинаков, и основной причиной увеличения рисков развития сердечно-сосудистых заболеваний у женщин является наступление менопаузы.

Постепенно сформировалась точка зрения, что защитную роль эстрогены могут играть уже на начальных стадиях патологических изменений, ведущих к развитию атеросклероза. В настоящее время накоплен большой экспериментальный материал, свидетельствующий о влиянии эстрогенов на все основные механизмы атерогенеза. Общепризнано благоприятное действие эстрогенов на липидный профиль плазмы крови - снижение концентрации более атерогенных липопротеидов низкой плотности, являющихся основными транспортными белками для холестерина, и увеличение содержания ЛВП [11,122,355]. Интересно, что подобным образом на липиды плазмы влияет также антиэстрогенный препарат тамоксифен [180], близкий по структуре природным эстрогенам. Кроме того, использование меченых ЛНП показало, что заместительная терапия

эстрогенами у самок обезьян приводит к снижению накопления ЛНП и продуктов их деградации в стенке коронарных артерий [72,428] и ослабляет активность процессов перекисного окисления ЛНП в сосудистой стенке [222].

В случае повреждения сосудистой стенки эстрадиол помогает восстанавливать функциональное состояние эндотелия [230] и ингибирует пролиферативные процессы в стенке артерии, предотвращая ее утолщение [114], значительное уменьшение степени развития атеросклероза под действием эстрадиола показано также в экспериментах по трансплантации сосудов [152], что имеет важное значение с практической точки зрения.

В настоящее время установлено наличие мембранных узнающих структур и/или внутриклеточных рецепторов половых гормонов не только в клетках половых органов, но и ряда других - например, для эстрогенов это печень, мышцы, поджелудочная железа, некоторые структуры головного мозга, костная ткань, а также ССС [104,105,421].

Таким образом, наличие рецепторов к половым гормонам в органах репродуктивной сферы доказывает многообразие их биологической активности как системных регуляторов физиологических процессов на уровне целого организма.

Как и у других стероидов, эффект эстрогенов на стенки сосудов имеет быстрый негеномный компонент (изменение проницаемости мембраны для ионов) и классический геномный эффект (активация эстрогеновых рецепторов и изменение экспрессии генов) [145].

Геномный механизм действия эстрогенов предполагает, что молекула стероидного гормона проникает в клетку либо пассивно, путем диффузии через мембрану, либо с помощью переносчика, соответственно, связываясь с внутриклеточным рецептором, расположенным в цитозоле, либо в ядре, после чего происходят конформационные изменения структуры рецептора, приводящие к диссоциации белков-

переносчиков, переходу рецептора из неактивной формы в активную и увеличению аффинности ДНК к ДНК-связывающему домену. Стероид-рецепторный комплекс мигрирует в ядро, где влияет на транскрипцию генов. Затем происходит процесс трансляции и синтезируются молекулы белка, влияющие на биологические функции клетки. В этот процесс могут вовлекаться трансмембранные системы посредников, такие как фосфолипаза С – инозитол-3-фосфат – диацилглицерол и система аденилатциклаза – циклический аденозинмонофосфат (Ас-сАМР) [387].

При этом происходит как снижение, так и увеличение транскрипции [205]. Регуляция экспрессии ряда генов, которые не содержат эстроген-чувствительный элемент, может осуществляться опосредованно через взаимодействие с другими генами, которые содержат эстроген-чувствительный элемент [137]. Размер эстроген-чувствительного элемента достаточен для связывания с целым рядом стероидных и нестероидных лигандов [144]. Таким образом, ЭР может быть активирован многими транскрипционными факторами, а не только естественным лигандом – эстрадиолом. Получены данные о том, что катехоламины через фосфорилирование протеинкиназы А и протеинкиназы С, а также посредством других механизмов, которые еще не установлены, могут повышать лиганд-связывающую активность ЭР в сосудах головного мозга [132]. Реализация геномного механизма действия эстрадиола осуществляется в течение 20 мин и блокируется ингибиторами процесса транскрипции (actinomycin D), и ингибиторами процесса трансляции [297].

Показано [71], что эстроген действует связываясь со специфическими внутриклеточными рецепторами, вызывая затем изменение экспрессии генов. Кроме того, существуют сведения о прямом эффекте через рецепторы, расположенные на поверхности мембраны.

Предполагают, что существует два механизма, обеспечивающих гипохолестеринемический эффект фитоэстрогенов. Первый – стимуляция рецепторов к ЛНП, которая позволяет повысить клиренс последних, второй – угнетение эндогенного синтеза холестерина путем угнетения активности холестерол-7 α -гидроксилазы [64].

В отечественных и зарубежных исследованиях, направленных на изучение внутриклеточного накопления холестерина, практически не исследовалась способность клеток накапливать холестерин в зависимости от половой принадлежности донора (программирующий эффект гормонов). Следует отметить, что регуляторному эффекту половых гормонов в настоящее время уделяется большее внимание. Так, в работах Stivenson с соавторами и Taskinen с соавторами было продемонстрировано влияние эстрогена на показатели липидного профиля, а также его способность тормозить окисление липидов и пролиферацию гладкомышечных клеток [385,395]. Также уделяется внимание рецепторам половых гормонов, так как все эффекты половых гормонов на сосуды опосредуются через их рецепторы [200,268,335]. Поскольку внутриклеточное накопление холестерина является ключевым механизмом развития атеросклеротических поражений, то необходимо выяснить, существует ли влияние половых гормонов на этот механизм. Одним из путей накопления холестерина в клетках является фагоцитоз. Хорошо изучена значимость этого процесса в атерогенезе [404], но влияние половых гормонов на фагоцитарную активность клеток не изучалось.

Все эффекты половых гормонов на сосуды опосредуются через рецепторы. Рецепторы эстрогена, прогестерона и тестостерона экспрессируются в разном количестве в гладкомышечных клетках и эндотелии различных сосудов. Обнаружена обратная зависимость между количеством рецептора к эстрогенам в эндотелии и риском развития сердечнососудистых заболеваний [350]. Кроме того, рецепторы

половых гормонов имеют разные подтипы, по-разному распределены в тканях и могут модулироваться разными агонистами и антагонистами. Было обнаружено два подтипа рецептора эстрогенов ER α и ER β в эндотелии и гладкомышечных клетках сосуда [268]. Рецепторы тестостерона или андрогенов (AR) также были обнаружены в эндотелиальных и гладкомышечных клетках сосуда. Экспрессия AR в гладкомышечных клетках зависит от пола и статуса гонад. У мужских особей экспрессия AR выше, чем у женских в аортальных гладкомышечных клетках крыс [200].

Отдельная подгруппа эффектов стероидных гормонов может реализовываться благодаря взаимодействию гормонов с мембранными рецепторами. В случае эстрогенов функцию их мембранных рецепторов выполняют сплайсинговые укороченные варианты (46 и 36 кДа) ER α , которые благодаря присоединению жирной кислоты способны заякориваться на плазматической мембране. Через каскады протеинкиназ и вторичных посредников эти варианты ядерного рецептора способны индуцировать как немедленные (минуты) посттрансляционные, так и отсроченные (часы, дни) транскрипционные эффекты. Другие мембранные рецепторы стероидов охарактеризованы менее полно.

Связывание половых гормонов с ядерными рецепторами вызывает геномные эффекты, сопровождающиеся ростом клеток. Таким образом половые гормоны вызывают рост эндотелиальных клеток через активацию митогенактивируемых промнкиназ (MAPK), повышения транскрипции генов, отвечающих за пролиферацию эндотелия и повышение синтеза эндотелиальной NO синтазы (eNOS). Несмотря на то, что в эндотелии эстрадиол запускает сигналы, стимулирующие рост и пролиферацию клеток, в гладкомышечных клетках эстрадиол ингибирует эти процессы [136]. Ингибирующий рост гладкомышечных клеток эффект эстрогена может быть усилен связыванием рецептора стероидов с коактиватором SRC. Подавление роста гладкомы-

шечных клеток происходит за счет индуцированного эстрогеном повышением продукции NO. Также эстрадиол может стимулировать продукцию циклического АМФ (сАМФ), который действует через собственные эффекторы, благодаря чему регулирует рост гладкомышечных клеток. Андрогены могут действовать двояко на рост и пролиферацию клеток. Низкие концентрации дигидротестостерона стимулируют рост гладкомышечных клеток, когда как высокие – ингибируют.

При негеномных эффектах эстроген связывается с рецептором на поверхности мембраны клетки эпителия и повышает образование инозитол-1,4,5-трифосфата (IP₃). В результате происходит высвобождение Ca²⁺ из эндоплазматического ретикулума и образование комплекса с кальмодулином (СМ). Этот комплекс связывается с eNOS, в результате чего происходит диссоциация eNOS и кальвеолина-1 и переход eNOS от мембраны внутрь клетки. Эстроген может также активировать фосфатидил-инозитол-3-киназу (PI₃K), которая вызывает трансформацию фосфатидил-инозитол-4,5-бисфосфата (PIP₂) в фосфатидил-инозитол-3,4,5-трифосфат (PIP₃), способный активировать белок Akt. Белок Akt способствует фосфорилированию eNOS и повторному прикреплению к плазматической мембране, где eNOS синтезирует из L-аргинина и L-цитруллина NO. NO диффундирует из образованных мембраной эндотелиальной клетки кавеол, попадает на ГМК, где связывается с гуанилатциклазой. Повышение циклического ГМФ вызывает уменьшение концентрации внутриклеточного Ca²⁺ и в конечном итоге приводит к расслаблению гладкомышечных клеток. Имеются данные, что и тестостерон вызывает зависимое от эпителия расслабление сосуда [211]. Эстроген также проявляет эффекты противоположные ангиотензину II (AngII) на гладкомышечные клетки через активацию протеиновых фосфатаз.

Накопившиеся данные говорят о том, что половые гормоны действуют и на макрофаги. Устоявшаяся точка зрения говорит о повышенной предрасположенности мужчин к атерогенезу. Между тем, данных о действии андрогенов на атерогенез немного и они весьма противоречивы. Имеются публикации, в которых мужские гормоны оказывают антиатерогенное действие [257]. Согласно же большинству публикаций, андрогены оказывают проатерогенное действие у мужчин [441]. Однако поиски ядерных рецепторов в макрофагах дают отрицательный результат. Большинство исследований, показывают, что макрофаги практически не экспрессируют ядерные AR. Пока остается непонятным, по какому пути происходит действие андрогенов на макрофаги. Можно предположить, что тестостерон регулирует функции макрофагов через мембранный рецептор. Возможно, этот рецептор связан с G белком, который запускает фосфатидилинозитол-1,4,5-трифосфатный путь сигналинга, в результате которого происходит повышение $(Ca^{2+})_i$ [184]. Возможно, что андрогены действуют на процессы поглощения и оттока холестерина внутри макрофагов [264]. Обнаружено, что тестостерон может воздействовать на экспрессию SR-BI в культуре гепатоцитов и макрофагов человека. Тестостерон способен повышать экспрессию SR-BI, чем способствует оттоку холестерина из макрофагов. В отличие от регуляции SR-BI, тестостерон никак не воздействует на экспрессию важных белков обратного транспорта холестерина ABCA1 и apoA-I [239]. Что касается влияния андрогенов на другие факторы обратного транспорта холестерина, результаты исследований крайне разрознены и противоречивы.

Действие эстрогенов на макрофаги изучено более детально. Недавние исследования показали, что в макрофагах имеются ER α и ER β [358]. Имеются работы на мышинных макрофагах, нокаутированных по гену ER α . Результаты говорят о том, что дефицит ER α у мышей муж-

ских особей приводит к раннему атеросклерозу [423]. Показано, что эстрадиол способен ингибировать окисление ЛНП в макрофагах. Окисленные ЛНП после интернализации транспортируются сначала в эндосомы, а затем и в лизосомы для дальнейшей деградации. Транспорт холестерина из лизосом к местам этерификации ингибируют С17 или С20 стероиды. Тестостерон не обладает такими эффектами. Цитозольные эфиры холестерина могут гидролизоваться нейтральными гидролазами (нСЕН), которые активируются сАМР. В жировой ткани женских особей нСЕН более активна, чем в мужских. Эстрадиол повышает активность нСЕН в мышечных макрофагах и культуре макрофагов *in vitro* [382]. По-видимому, эффект достигается путем активации зависимой от сАМР протеинкиназы А (РКА) [389]. В ряде работ показано, что эффекты эстрогена осуществлялись не через классические рецепторы эстрогена. Эстрадиол действует на рецепторы-мусорщики макрофагов и тем самым влияет на регуляцию внутриклеточного холестерина [265]. Эстрадиол способен уменьшать захват ЛНП макрофагами предположительно действуя на SR-A. В адипоцитах также показано действие эстрадиола на SR-BI, что способствует оттоку холестерина из клетки и связыванию его с ЛВП. Большой интерес вызывает вопрос о возможном действии эстрадиола на LXR. По некоторым данным, эстрадиол понижает экспрессию LXR α в макрофагах. При заместительной терапии изъятие из среды эстрадиола приводит к повышению уровня мРНК LXR α . Детальное рассмотрение строения промотора LXR α показывает отсутствие эстрогенчувствительных элементов и наличие AP-1 сайта. Известно, что эстрогены могут регулировать экспрессию cFos в разных типах клеток: нейронах, остеобластах, адипоцитах [329]. Так как cFos связывается с AP-1 сайтом, то эстрогены способны модулировать активность LXR α путем регуляции продукции cFos [228].

Большой интерес вызывает вопрос о том, как воздействуют эстрогены на экспрессию SR-BI в макрофагах. Сначала на линейных клетках было обнаружено, что эстрадиол позитивно активировал промотор SR-BI. ER α и ER β связываются с эстрогенчувствительными элементами и активируют транскрипцию. Интересно, что оба подтипа ER могут образовывать гетеродимер и связываться с коактиватором SREBP-1a [252]. Следующие работы были направлены на изучение эффектов эстрогена в мозге и печени. Было обнаружено, что эстроген повышает экспрессию SR-BI в мозге мышей, тогда как в печени, наоборот, ингибирует [381]. В крысиных Купферовских клетках эстроген также вызывает повышение экспрессии SR-BI и увеличение связанного с ЛВП обратного транспорта холестерина [151]. Работ, направленных на изучение модулирующего действия эстрогенов на экспрессию SR-BI в человеческих макрофагах, до сих пор не проводилось.

Вторым способом обратного транспорта холестерина из клетки является активация LXR промотора и синтез кассетных АТФ-связывающих транспортеров холестерина. Данный путь оттока холестерина опосредуется непосредственно через сам транспортер и белок apoA-1. Действие эстрогенов на apoA-1 пока не изучено. Атеропротекторные эффекты эстрогена через регуляцию уровня ABCA1 наблюдались в клетках мышиной печени. Эстроген двукратно повышал уровень мРНК ABCA1. Оказалось, что уровень мРНК повышается и у мышей с дефицитом ER α , следовательно, для регуляции ABCA1 не является обязательным наличие ER α , его функции могут замещаться через ER β . Таким образом, можно утверждать, что атеропротекторные эффекты эстрогенов могут быть направлены через путь, связанный с ABCA1. Однако данных касательно тех же эффектов эстрогенов на макрофаги нет.

Ранее уже отмечалась важная роль TLR во влиянии на процессы атеросклероза. Ряд исследований направлен на изучение действия эстрадиола на клетки, способные экспонировать на своей поверхности TLR. Имеются данные о том, что эстрогены способны действовать на TLR-сигналинг клетки. В опытах использовались клетки Купфера, которые являются специализированными макрофагами печени. Было показано, что 17-β эстрадиол уменьшает экспрессию TLR на поверхности клеток Купфера и активацию ядерного фактора транскрипции NFκB. В результате снижается общая концентрация провоспалительных цитокинов - IL-6 и TNF-α [203]. Подобные работы проводились и на селезеночных макрофагах мыши. В них специально индуцировали TLR-сигналинг с помощью добавления к культуре клеток LPS. В результате 17-β эстрадиол уменьшал вызванную LPS продукцию цитокинов: IL-1, IL-6 и TNF-α [130]. Вполне можно предположить, что подобные эффекты эстрадиол может проявлять на макрофагах, находящихся в зоне атеросклеротического повреждения.

В сосудистой стенке тестостерон может претерпевать ряд химических преобразований. Под действием фермента ароматазы тестостерон превращается в эстрадиол. Другим продуктом превращения тестостерона является 5α-дигидротестостерон, который образуется в периферических тканях благодаря 5α-редуктазе. Дигидротестостерон является самым активным натуральным андрогеном. Показано, что сниженный уровень дигидротестостерона может способствовать атерогенезу. В данных опытах использовалась модель индуцированного атеросклероза у кроликов. Было обнаружено, что физиологические концентрации дигидротестостерона оказывают антиатерогенный эффект. Дигидротестостерон снижает экспрессию рецептора LOX-1, чем предотвращает формирование пенных клеток [335].

Однако данные литературы по вопросу влияния эстрогенов на сердечно-сосудистую систему выглядят не столь однозначно. Суще-

ствуют противоречивые сведения о влиянии женских половых гормонов на сердечную деятельность у мужчин. Отмечается рост смертности от острых форм ИБС и тромбоэмболических осложнений у мужчин, получавших эстрогены по поводу рака предстательной железы [10, 444].

Изложенные факты позволяют заключить, что наши знания механизмов менопаузы и сопровождающих ее рисков недостаточны. Развитие исследований в этом направлении позволит понять, почему заместительная гормональная терапия оказывается неэффективной. Кроме того, знание механизмов менопаузы позволит создать эффективные лекарственные и нелекарственные средства.

Так, из продуктов, употребляемых в пищу в Азии, была выделена отдельная группа полифенольных соединений, относящихся к биофлавоноидам, обладающих структурным сходством с эндогенными эстрогенами, близкой к ним молекулярной массой и гормономиметическим действием. Эту разнородную группу веществ назвали фитоэстрогенами.

Влияние фитоэстрогенов на сердечно-сосудистую систему было продемонстрировано в эпидемиологических и клинических исследованиях. Широко известен тот факт, что частота ишемической болезни сердца в Азии ниже, чем в западных странах, что связывают с высоким уровнем потребления фито-эстрогенсодержащих продуктов [243,245].

Предполагается, что фитоэстрогены проявляют кардиопротекторные эффекты, хотя результаты некоторых исследований не подтверждают этого. Вполне вероятно и прямое антиатеросклеротическое действие некоторых из фитоэстрогенов.

Анализ прогноза и положения дел на рынке в отношении препаратов, которые можно рассматривать в качестве альтернативы заместительной гормональной терапии, позволяет сделать вывод, что по-

добных препаратов, имеющих фундаментальное научное обоснование, эффективность которых подтверждена современными клиническими подходами, не представлено. Это открывает возможности для разработки и создания препаратов на основе фитоэстрогенов, выполняющих роль альтернативы заместительной гормональной терапии. Важным конкурентным преимуществом могло бы быть сочетание у такого препарата способности облегчать симптоматику климактерия и обеспечивать профилактику особо опасных клинических осложнений, таких как сердечно-сосудистые и онкологические заболевания. В связи с этим представляется целесообразным создать клеточные модели для разработки альтернативы заместительной гормональной терапии для менопаузальных женщин.

1.3 Липопротеиды высокой плотности – роль в обратном транспорте холестерина

В настоящее время широко признается, что применение лекарств для повышения уровня липопротеидов высокой плотности (ЛВП), вероятно, будет полезно для лечения сердечно-сосудистых заболеваний [227]. Эта гипотеза основана на первоначальных данных Фрамингемского исследования, согласно которым ЛВП самостоятельно и обратно коррелируют с сердечно-сосудистыми заболеваниями, т. е. независимо от уровня липопротеидов низкой плотности (ЛНП) [174]. Широкие лабораторные исследования на моделях *in vitro* и *in vivo*, а также клинические исследования выявили множественные кардиопротекторные функции ЛВП.

Согласно полученным данным, ЛВП играют важную роль в обратном транспорте холестерина [340], регулируют сосудистый тонус [135], ингибируют воспаление [286] и действуют как антиоксиданты [214], антитромботические [295] и антиапоптотические агенты [294].

В совокупности, увеличение уровня циркулирующих ЛВП является привлекательной терапевтической мишенью. Однако, поскольку метаболический путь ЛВП является сложным, создание новых подходов к ЛВП-терапии может быть связано с определенными проблемами. Метаболизм ЛВП включает в себя ряд молекул, которые имеют различные функции, что также предоставляет целый набор препятствий. Помимо сложности метаболического пути ЛВП, сложным является состав частицы ЛВП.

ЛВП является чрезвычайно динамичной частицей, постоянно развивающейся в отношении формы, и размера, и молекулярной составляющей, начиная с молекулы обедненной липидами аполипопротеина AI (апоА I) и превращаясь в частицы, обогащенные холестерином и белком [242,299,413]. Кроме того, было также обнаружено, что определенные виды ЛВП имеют специализированные функции и/или различаются по эффективности кардиопротекторного действия [227]. Существует также споры вокруг того, какие рецепторы и транспортеры модулируют эффекты ЛВП, поскольку в некоторых исследованиях на мышах была переоценена роль определенных рецепторов [128,241,447]. Интересной ситуацией является одинаковое содержание холестерина ЛВП в плазме, но различная эффективность оттока холестерина, опосредованного транспортером ABCA1 (но не ABCG1) [128]. Терапии, которые вызывают повышение ЛВП, могут способствовать созданию лекарственного препарата, который будет воспроизводить большинство известных кардиопротекторных функций ЛВП. Однако, если потребуется стимулировать конкретные функции ЛВП, то лекарства могут быть разработаны для конкретных целей.

Несколько специфичных путей оттока холестерина из клеток с участием ЛВП включают большое число клеточных белков [215,141,159,255].

Во-первых, это ABC транспортеры, такие как ABCA1 и ABCG1, опосредующие отток холестерина на обезлипиженный апоА-I и на зрелые ЛВП, соответственно. SR-B1, другой клеточный белок, участвует в оттоке холестерина, для которого ЛВП является акцептором. Недавно было показано, что CYP27A1 и caveolin-1 также участвуют в оттоке холестерина. Ряд других белков, как было продемонстрировано, также вносят свой вклад в отток холестерина, в том числе внутриклеточный аполипопротеин AI (апо-AI), белок переноса фосфолипидов (PLTP) и белок-переносчик эфиров холестерина (CEPT) [300,450]; механизмы их участия в оттоке холестерина в основном неизвестны.

Неизвестно также, каким образом различные пути и их компоненты взаимодействуют друг с другом, являются ли они синергетичными, конкурирующими или избыточными и каков относительный вклад каждого пути в суммарный экспорт холестерина из клеток. Было высказано предположение, что ABCA1 и ABCG1 работают как последовательно, так и синергетично, приводя к образованию обогащенных холестерином ЛВП [164,149,433], а SR-B1 конкурирует с ABCA1 и ABCG1 за холестерин, предназначенный для оттока [116,446]. Взаимодействия между другими компонентами пути оттока холестерина не были исследованы.

В большинстве исследований были использованы легко трансфицируемые клеточные линии, однако, неясно, могут ли полученные на них данные точно описать пути оттока холестерина из клеток сосудистой стенки, прежде всего, из макрофагов. Существуют значительные различия в путях оттока холестерина и их регуляции в различных клетках и тканях [432]. Различные пути оттока используют различные акцепторы холестерина и вклад этих акцепторов, а следовательно, и клеточных белков, взаимодействующих с этих акцепторов, в общем экспорте холестерина остается неясным. Большинство апоА-I в плазме присутствует в липидированной форме, в то же время инактивации ABCA1, который использует обезлипиженный апоА-I в качестве ак-

цептора, приводит к развитию тяжелых форм атеросклероза [390,447], а, с другой стороны, инактивации ABCG1, который использует липидированный апоА-I, имеет небольшое и противоречивое влияние на атеросклероз [77,87,167].

Было показано, что вызванное ЛВП ингибирование экспрессии Е-селектина на человеческих эндотелиальных клетках опосредовано липополисахаридами [210], что предлагает участие сквенджер-рецептора класса В-1 (SR-B1) и рецептора S1P₃, активирующих эндотелиальную синтетазу окиси азота (eNOS), производящую NO [374]. Однако эффекты *in vivo* являются сложными и могут быть опосредованы восстановленными ЛВП (вЛВП) или обезлипиженным апоА-I. В противоположность этому, результаты исследования, полученные *in vitro* при использовании эндотелиальных клеток, продемонстрировали противовоспалительные эффекты ЛВП при активации нейтрофилов, с одним важным исключением [17, 322], когда было показано, что за противовоспалительные эффекты отвечает апоА-I [90, 140,321,334].

Примечательно, что ЛВП также ингибируют взаимодействие лейкоцитов и эндотелиальных клеток, индуцированное окисленными ЛНП (oxЛНП), без индукции экспрессии эндотелиальных молекул адгезии и без ослабления адгезии лейкоцитов путем блокирования эндотелиальных молекул адгезии [391].

Существующие и перспективные ЛВП-терапии могут быть разделены на определенные категории в зависимости от того, как достигается увеличение уровня ЛВП. По существу, уровень ЛВП может повышаться за счет увеличения их продукции, путем их ремоделирования, уменьшения клиренса и прямого введения дополнительных ЛВП в кровотоки. К способам повышения эффективности ЛВП относят также те, которые влияют на механизмы эндогенных путей метаболизма, такие, как синтез и липидирование апоА-I, множественные стадии ремоделирования ЛВП, в которых участвуют лецитин-холестерина

ацилтрансфераза (LCAT) и белок, переносящий эфиры холестерина (СЕТР), поглощение ЛВП печенью, а также добавление к существующим ЛВП избытка экзогенных ЛВП или предшественников.

Понимание комплексного характера атеросклероза благодаря экстенсивным фундаментальным и прикладным исследованиям привело к разработке многих терапевтических подходов. Воздействию на метаболизм холестерина, в частности, снижению апоВ содержащих липопротеидов, уделяется большое внимание, и в этой области необходимые результаты достигаются с переменным успехом [154]. Тем не менее, основное внимание в настоящее время смещается на использование мощного анти-атеросклеротического эффекта ЛВП, поиск механизмов для повышения этой фракции липопротеидов. Интересно, что лекарственные средства уже назначаются в течение десятилетий (например, фибраты и ниацин), но все еще продолжается их клиническая оценка, и наше понимание клеточных механизмов все еще остается в стадии развития. Кроме того, продолжается процесс упорядочения приема этих препаратов с целью повышения положительного воздействия и снижения связанных с ним неблагоприятных последствий. В частности, достигнуты значительные успехи в разработке ниацина медленного высвобождения. Понимание того, как эти препараты были разработаны, привело к выявлению более конкретных мишеней, таких, как ядерные рецепторы, в том числе PPARs и LXRs. Однако воздействие на эти мишени привело также к нежелательным побочным эффектам, таким, как гипертриглицеридемия и стеатоз печени. Это побудило к дальнейшей доработке лекарств с целью получения тканеспецифичных активаторов. Селективные ингибиторы повышения уровня ЛВП, такие, как СЕТР, также вызвали ряд критических замечаний, в частности, вопросы, что является реальным эффектом блокирования такого важного механизма, как ОТХ в организме человека, и является ли правильным повышать уровень ЛВП таким способом.

Эти вопросы наводят на мысль о прямых методах повышения ЛВП через рЛВП и миметические пептиды. Эти подходы наилучшим образом контролируются, но они и самые неудобные. Пероральные пептиды могут обеспечить возможность решения этой проблемы, однако биодоступность и токсичность для печени остаются нерешенными затруднениями.

Достижение наилучших результатов терапии с применением ЛВП, вероятно, зависит также от индивидуальности пациента, поэтому имеет важное значение развитие новых терапевтических подходов, наряду с выявлением новых мишеней для воздействия. Это может быть областью, где антагонисты рецепторов каннабиноидов могут оказаться весьма приемлемыми для совместной терапии.

Римонабант, являющийся антагонистом рецептора каннабиноидов СВ₁, был изначально разработан как препарат против ожирения, предназначенный для снижения чувства голода. Эта концепция основана на том, что эндоканнабиноиды (каннабис-подобные веществ) играют в центральной нервной системе ключевую роль в регуляции аппетита. Однако клинические испытания показали, что римонабант вызывает повышение уровня ЛВП [160].

Дисрегуляция системы эндоканнабиноидов влечет за собой целый ряд заболеваний, включая воспалительные, метаболические расстройства и сердечно-сосудистых заболевания и уже давно считается жизнеспособной терапевтической мишени [131,263] сделал открытие, что СВ₁ связан с аппетитом, что может привести к взаимодействию с нейропептидами, такими как меланокортины и пептиды кишечника, в том числе грелин [411,422].

Из многочисленных антагонистов рецепторов СВ₁ разработанный римонабант зарекомендовал себя как наиболее успешный для человека. Хотя основное внимание в исследованиях с римонабантом уделялось ожирению, исследования выявили более динамичную роль анта-

гониста рецептора CB_1 . Интересно, что антагонисты рецепторов каннабиноидов вызывают также подавление потребности в сладких продуктах, что может быть желательными для соблюдения диеты [373].

В недавнем исследовании изучалось влияние римоабанта на атеросклероза у трансгенных LDLr^{-/-} мышей. Было обнаружено, что римоабант, как ожидалось, способствовал значительному сокращению потребления продуктов питания и веса при одновременном снижении холестерина в крови и почти полностью предотвращал развитие атеросклероза [133]. Это сопровождалось уменьшением в плазме провоспалительных цитокинов, включая MCP-1, ИЛ-12 и VCAM-1. Интересно, что у животных при ограничении приема пищи снижался вес, но развивались обширные повреждения похожие на повреждения контрольных мышей. Это означает, что римоабант обладает дополнительным антиатеросклеротическим эффектом, не связанным с подавлением аппетита. Одно из возможных объяснений может быть рост ЛВП, но это остается неясным, так как низкие дозы римоабанта снижали степень развития атеросклероза без изменения уровня холестерина.

Программа The Rimobant In Obesity (RIO) была разработана для широкого исследования римоабанта в различных условиях. В исследованиях RIO-Europe, RIO-North America, RIO-Lipids and RIO-Diabetes сравнивали 2 дозы римоабанта с плацебо. Как и в большинстве исследований по ожирению, изучение диеты и образа жизни были также включены в рассмотрение. Результаты исследования показали значительное снижение веса в группах лечения на 3,9-5,4 кг и до 20% увеличение ЛВП при небольшом снижении уровня триглицеридов через 1 год [327]. Таким образом, хотя антагонисты CB_1 рецепторов и не назначаются пока как лекарства для повышения ЛВП, они без сомнения обладают выраженным липид модулирующим эффектом, который требуют дальнейшего изучения.

Антагонисты рецепторов каннабиноидов, в том числе римонабант, являются лекарствами, подавляющими аппетит, следовательно, они нежелательны для назначения больным с дислипидемией, но без ожирения. Это относится и к пациентам с сахарным диабетом I типа, у которых наблюдается потеря веса. Наиболее распространенным побочным эффектом римоабанта является тошнота. Однако серьезными побочными эффектами, которые привели к выбыванию больных из исследования RIO, были психиатрические осложнения [160].

Прежде чем будут сделаны серьезные выводы в отношении конкретных видов использования антагонистов рецепторов СВ₁, необходимо провести долгосрочные исследования. Тем не менее, полученные результаты позволяют предположить, что римонабант будет полезным лекарством в борьбе с ожирением. Его вклад в увеличение ЛВП требует дальнейшего изучения и проведения сравнения между римонабантом и другими препаратами, повышающими ЛВП, но снижающими холестерин у больных с ожирением. Вместе с тем, одно из крупнейших препятствий может быть эффект римоабанта на психическое здоровье. Тем более, что депрессия является частым явлением среди тучных пациентов, обращающихся за клиническим вмешательством [412]. Такие пациенты на римонабанте могут потребовать тщательного мониторинга со стороны врачей и, возможно (если допускается), назначения антидепрессантов.

Формирование ЛВП начинается с секреции в кровь апоА-I, основного белкового компонента ЛВП. Экспрессируемый в печени и кишечнике апоА-I высвобождается в виде белка без липидного компонента, которому необходимы липиды, чтобы сформировать пре- β частицы ЛВП [76,138]. Это происходит за счет взаимодействия с клеточным связанным с АТФ кассетным транспортером А1 (АВСА1). Взаимодействие между апоА-I и АВСА1 важно не только для формирования частицы ЛВП и облегчения оттока холестерина, но и для

стимуляции мощного противовоспалительного эффекта, в частности, в отношении активации моноцитов и адгезии на эндотелии [287].

Животные модели, на которых применялась оверэксперсия apoA-I или инфузия, позволили получить доказательства, что повышение уровня этого белка действительно может замедлять развитие атеросклероза. У трансгенных apoE-нуль мышей, экспрессирующих apoA-I человека атеросклероз не развивается [117]. Хотя сосудистое воспаление по-прежнему происходит, о чем свидетельствует окраска на VCAM-1, воспалительные клетки, которые инфильтрируют стенку сосуда, отсутствовали. Это говорит о том, что увеличение apoA-I регулирует активацию моноцитов и нейтрофилов. Следует отметить, что в этих моделях ген экспрессировался от рождения. Хотя доказана эффективность повышения секреции apoA-I для предотвращения атеросклероза, эффективность в отношении выраженных поражения остается неизвестной. Вместе с тем, исследования на кроликах с сосудистым воспалением, индуцированным в общей сонной артерии, показало, что воспаление сосудистой стенки может быть ослаблено благодаря применению инфузии низкой дозой обезлипиженного apoA-I [333]. Это говорит о том, что увеличение продукции apoA-I/ЛВП явно может быть полезным.

В настоящее время имеется ограниченное число терапевтических подходов, которые успешно увеличивают продукцию apoA-I. Как уже говорилось выше, ряда соединений, включая фибраты и ниацина могут вызвать транскрипцию и секрецию apoA-I. Существует также доказательство того, что производные флавоноидов могут стимулировать синтез apoA-I, в то же время ингибируя apoC-III [129]. Производные флавоноидов, как было показано, обладают активностью *in vivo*, снижая уровень триглицеридов, общего холестерина и ЛНП, но увеличивая ЛВП [183]. Компания Resverolgia произвела соединение (RVX-208), которое увеличивает транскрипцию apoA-I при пероральном приеме [232,233]. Прием RVX-208 (60mg/kg/day) африканскими

зелеными мартышками в течение 28 дней, привели к значительному росту в сыворотке уровня апоА-I, который сопровождался увеличением в плазме крови ЛВП, что свидетельствует об активном оттоке холестерина *in vivo*. Анализ в двумерном геле показал, что прием RVX-208 приводят к 3-кратному увеличению уровня пре β 1-ЛВП/обезлипиженный апоА-I. Дальнейшие эксперименты подтвердили, что увеличение апоА-I с помощью RVX-208 увеличивает *ex vivo* опосредованный ABCA1 оттока холестерина из макрофагов. Последующие исследования, в которых RVX-208 вводили хронически на срок до 63 дней показали, что уровень апоА-I и ЛВП повышались на 57% и 92%, соответственно. Сыворотка была тестирована *ex vivo* на способность повышать отток холестерина, и было обнаружено, что опосредованный ABCA1, ABCG1 и SR-BI отток был увеличен. Фаза Ia исследования безопасности и фармакокинетики показала, что RVX-208 хорошо переносится. Исследование безопасности при низких дозах (2-8mg/kg/day за 7 дней) показало, что через 7 дней уровень апоА-I значительно поднимался (11%) по сравнению с плацебо. Кроме того, уровень пре β 1-ЛВП/обезлипиженный апоА-I был также значительно выше и коррелировал с увеличением апоА-I, что подтверждает данные *ex vivo* по оттоку холестерина и позволяет предположить, что функциональные частицы ЛВП создаются в результате приема RVX-208. Таким образом, этап I исследования на людях подтверждает выводы, сделанные в исследовании на африканских зеленых мартышках.

Обнадеживающие данные фазы I небольшого исследования RVX-208 привело к инициации фазы II клинических испытаний. Первое испытание направлено на исследование безопасного диапазона доз (0-300mg/day в течение 12 недель) и эффективности RVX-208 у пациентов со стабильной ишемической болезнью сердца (ИБС). Второе испытание ориентировано на пациентов с недавним острым коронарным синдромом. Целью этого исследования является определение

роли липидных изменений в коронарных бляшке после приема RVX-208 (200-300mg/kg/day) в общей сложности в течение 12 недель. Данные, полученные на приматах и в фазе I двух текущих клинических испытаний весьма обнадеживают. Поскольку этот метод лечения находится в зачаточном состоянии, нельзя комментировать какие-либо доказательства против использования агонистов транскрипции апоА-I, кроме того, что некоторые производные флавоноидов могут иметь и другие «нецелевые» или нежелательные последствия, включая повышение уровня апоА- II.

На основе проведенного анализа публикаций по применению различных терапевтических подходов для повышения уровня ЛВП в крови оценена перспектива создания ЛВП-терапии, направленной на повышение эффективности обратного транспорта холестерина (ОТХ). В частности, анализировалось положение дел в области применения имеющихся лекарственных средств (ниацин и фибраты), лекарств в стадии разработки, таких, как антагонисты рецепторов каннабиноидов, ингибиторы белка-переносчика эфиров холестерина (СЕТР), агонисты X рецептора печени (LXR), активаторы транскрипции аполипопротеина А-I (апоА-I), реконструированные ЛВП, пептиды-миметики аполипопротеина. Взятые вместе, изученные данные позволяют предположить, что наиболее вероятным будет применение более одного терапевтического подхода для успешного повышения ЛВП.

Известно, что липопротеиды и их белковые компоненты участвуют в регуляции многих метаболических процессов. Среди них можно выделить следующие. Аполипопротеины апоА-I и апоЕ осуществляют регуляцию обмена холестерина не только в плазме крови, но и посредством рецепторов внутри клетки за счет активного его выведения с помощью встроенных в мембрану специфических транспортных

белков: АТР-связывающего кассетного транспортера (ABCA1) и мембранного рецептора для ЛПВП - сквенджер-рецептора класса В1 [73].

Проведенный анализ показал, что арсенал подходов к разработке различных форм ЛВП-терапии далеко не исчерпан. В то же время очевидно, что главным результатом антиатеросклеротической терапии является удаление холестерина из сосудистой стенки, каким бы ни был механизм этого удаления. В связи с этим создание клеточной модели, позволяющей оценивать этот процесс, является своевременной и перспективной задачей. Поэтому в рамках нашей работы над было признано целесообразным осуществить разработку методик *in vitro* и *ex vivo* для изучения оттока холестерина из культивируемых макрофагов и клеток, выделенных из субэндотелиального слоя интимы.

1.4 Локальные реакции воспалительного типа и развитие атеросклеротического поражения

В патогенетических механизмах атеросклероза, особенно в начальных стадиях, большое значение придается иммунному воспалению в артериальной стенке [47,190,194,247]. Основанием для таких взглядов являются результаты исследований, демонстрирующие присутствие активированных лимфоцитов в ранних и продвинутых атеросклеротических поражениях человека, а также присутствие в крови и в сосудистой стенке антител “атеросклеротического происхождения” [195,196,189, 220,384].

Вовлеченность иммунных реакций в развитие атеросклеротических поражений подтверждена в экспериментальных моделях, утилизирующих экспериментальных животных [94,166,270,379,430]. Наибольшее количество информации получено при исследовании трансгенных мышей с различными генетически-индуцированными дефектами. Несмотря на очевидную ценность полученной информации, эти

модели лишь частично отражают многообразие процессов, имеющих место при атеросклерозе у человека, и не могут быть полностью использованы для объяснения механизмов развития атеросклеротических поражений. Стоит отметить, что, в отличие от артерий человека, которые характеризуются утолщенной многослойной интимой, содержащей разнообразные клеточные элементы, интима артерий мышей представлена эндотелием, располагающимся на внутренней эластической мембране и отделенной от последней лишь тонкой прослойкой соединительно-тканного матрикса, практически не содержащего клеточных элементов.

Ряд классических исследований, выполненных на аутопсийном и биопсийном материале, позволил установить, что интима артерий человека представлена гетерогенной клеточной популяцией. Морфологическая разнородность клеточных популяций артерий была подвергнута изучению и основные клеточные элементы, включая эндотелиальные клетки, гладкомышечные клетки, моноциты-макрофаги, лимфоциты, перициты и тучные клетки, были распознаны [110,177]. Было показано, что подавляющая часть клеток сосудистой стенки имеет гладкомышечную природу, пролиферация и секреция ими компонентов экстрацеллюлярного матрикса которыми является ранним и важным этапом развития атеросклероза. Выявлено также присутствие в атеросклеротически пораженных артериях человека фенотипически измененных гладкомышечных клеток [134,202,208,351]. Однако до настоящего времени не была дана комплексная морфофункциональная характеристика фенотипической модуляции гладкомышечных клеток артерий человека и не доказан факт участия этих клеток в развитии патологического процесса на ранних стадиях атеросклероза. Кроме того, не выяснено, какие изменения в сосудах предшествуют появлению измененных гладкомышечных клеток.

Интима артерий и внутренняя часть медики не имеет нервных окончаний, и поддержание гомеостаза осуществляется исключительно за счет межклеточных взаимодействий. К настоящему времени накоплен большой объем информации о различных факторах, способных регулировать деятельность клеток артерий в *in vitro* условиях, однако структурные аспекты взаимодействия клеток в интима артерий человека и их роль в развитии атеросклеротических поражений недостаточно изучены.

Проведенные до настоящего времени исследования морфологической гетерогенности интимы артерий человека, в основном, не носили системный характер и не позволили связать фенотипическую модуляцию клеточных элементов интимы с локальностью возникновения атеросклеротических поражений в артериях, что затрудняет понимание значимости структурно-функциональной гетерогенности клеток в патогенезе атеросклероза. Взаимосвязь фенотипической модуляции клеточных элементов интимы с иммунно-воспалительных реакциями при атеросклерозе также не получила достаточного внимания.

В последние десятилетия было установлено, что формирование атеросклеротических поражений связано с “инфильтрацией” моноцитов крови в сосудистую стенку [165,165,347], однако структурно-функциональные особенности дифференцировки моноцитов, проникших в интиму, не получили достаточного внимания. Накапливающаяся информация дает основание считать, что популяция макрофагов в атеросклеротических повреждениях неоднородна [172,173,284,288,445], но гетерогенность интимальных макрофагов изучена недостаточно.

Моноциты-макрофаги и их роль в атеросклерозе. В последние десятилетия все большее и большее значение придают роли моноцитов-макрофагов в развитии атеросклеротических поражений [371,372]. Этим клеткам посвящен ряд обзоров, в которых детально рассматри-

ваются проблемы синтеза макрофагами различных факторов, особенности их рецепторного аппарата, механизмы и особенности взаимодействия их липопротеидами [284,288,445].

Инфильтрацию артерий моноцитами-макрофагами отмечали при экспериментальном моделировании атеросклероза у кроликов, свиней, крыс, и обезьян. Выявленная адгезия моноцитов на луминальной поверхности артерий, наличие их большого числа непосредственно под эндотелием, а более зрелых макрофагов в глубине интимы свидетельствует в пользу поступления этих клеток из крови. Локальная инфильтрация в участках формирующихся атеросклеротических поражений зачастую сочетается с накоплением Т-лимфоцитов, что указывает на воспалительный характер процесса [165,347].

С использованием планиметрического метода было наглядно показана возрастная динамика поражения атеросклерозом различных участков аорты человека. Преимущественную локализацию атеросклероза в определенных участках сосуда исследователи объясняют повреждающим действием гемодинамических факторов [169,371,372], под воздействием которых эндотелиальные клетки синтезируют макрофагальный хемореактивный фактор, что ведет к накоплению в интима моноцитов-макрофагов с последующим развитием атеросклероза. Инфильтрация моноцитов-макрофагов в интима артерий играет важную роль в запуске и развитии атеросклероза. Обычно при обсуждении роли макрофагов в патогенезе атеросклероза, исследователи акцентируют внимание на их активном поглощении липидов с последующей трансформацией в пенистые клетки. Этому способствует как известные свойства макрофагов, такие, как фагоцитоз, наличие “сквенджер” рецепторов, как и данные, указывающие на макрофагальную природу пенистых клеток стенки артерий [169,371,372].

К настоящему моменту известен большой набор активных веществ, секретлируемых макрофагами, большая часть из которых непо-

средственно участвует в патогенезе многих заболеваний, в том числе и атеросклероза, включая ранние этапы его развития. Следует отметить, что биоактивные вещества синтезируются не в каждой клетке и не постоянно, продукция их определяется фенотипом моноцитов-макрофагов. Ряд исследователей установили, что макрофаги различных источников и даже той же ткани значительно варьируют по экспрессии антигенных детерминант поверхности [172,284,288,445]. Более того, клетки свежевыделенной популяции моноцитов крови и моноцитов-макрофагов из атеросклеротической бляшки артерий человека также варьируют по функциональным способностям. Аналогичным образом можно объяснить и полиморфизм ультраструктуры моноцитов-макрофагов в интиме аорты человека. Полиморфизм структуры этих клеток несомненно отражает вариабельность фенотипа моноцитов-макрофагов, что свидетельствует о возможной функциональной специализации клеток и, следовательно, о различном вкладе в патогенез атеросклероза. Предполагается, что моноциты-макрофаги поглощают и катаболизируют белки, а затем экспрессируют на своей поверхности их короткие пептидные фрагменты, которые при участии белков активации, осуществляющих рецепторное связывание, передаются Т-лимфоцитам.

Лимфоциты в их вовлеченность в атеросклероз. Наблюдения Hansson и соавторов [191,193,195], продемонстрировавшие, что атеросклеротические поражения артерий содержат CD3+ клетки, положило начало исследованию Т-лимфоцитов в атеросклерозе. С тех пор накопился громадный объем информации, показывающий, что Т-лимфоциты являются ключевыми иммунорегуляторными клетками, вовлеченными в атеросклероз. Показано присутствие в атеросклеротических поражениях также В-лимфоцитов и плазматических клеток [194,196].

Адаптивный ответ при атеросклерозе представлен клеточным и гуморальным звеньями ответа. Клеточный иммунитет при атерогенезе

вовлекает Т-хелперы-лимфоциты (CD4+), а также цитотоксические Т-лимфоциты (CD8+), в то время как гуморальный ответ осуществляется В-клетками, продуцирующими иммуноглобулины. Баланс между клеточным и гуморальным ответами регулируется CD4+ Т-лимфоцитами [139,176,177]. Популяции этих клеток могут продуцировать практически весь спектр цитокинов, однако эффективного ответа - клеточного или гуморального - можно достичь лишь при активации определенных популяций этих клеток – высоко-поляризованных подтипов Т-лимфоцитов - Th1- и Th2-клеток. CD4+ лимфоциты подразделяются на несколько субпопуляций, включая Th1и Th2. Термины «Th1-цитокины" и "Th2-цитокины" отражают происхождение цитокинов, секретируемых этими двумя популяциями Т-хелперов [259,266,271]. Иногда цитокины, продуцируемые соответствующими Th-подтипами клеток, называют цитокинами 1-го и 2-го типа. К цитокинам 1-го типа (или Th1-цитокинам) относятся интерлейкины IL-2, IL-12, IL-18, интерферон-гамма, фактор некроза опухоли-альфа, к цитокинам 2-го типа (Th2-цитокинам) - интерлейкины IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, трансформирующий фактор роста-бета [82].

Известно, что Th1 клетки усиливают клеточный тип иммунного ответа за счет наработки IL-2, IFN- γ , в то время как Th2 клетки опосредуют развитие гуморального иммунного ответа посредством синтеза и секреции IL-4, IL-5, IL-10, IL-13). Предполагается, что помимо Th1 и Th2 лимфоцитов в атеросклеротических поражениях артерий присутствуют Th0-клетки, продуцирующих цитокины, характерные как для Th1, так и для Th2 лимфоцитов. В атеросклероз вовлечены особые субпопуляции CD4+-Т-клеток, включая Т-хелперы 3 (Th3), Т-регуляторные лимфоциты, CD4+CD25- и CD4+CD25+ Т-клетки. Выявлено, что одни субпопуляции супрессорных Т-клеток ингибируют появление аутореактивных Т-клеточных клонов [248,283,354], другие же субпопуляции CD4+Т-

клеток могут уменьшать количество ранее активированных аутореактивных Т-лимфоцитов. Свою функцию супрессорные Т-клетки выполняют различными способами, либо оказывая паракринное регуляторное воздействие путем выделения цитокинов; блокируя презентацию антигена, осуществляемую антиген-представляющими клетками; разрушая аутореактивные Т-клетки, так как Т-клеточные рецепторы (TCR) регуляторных клеток распознают доминирующие идиопептиды TCR аутореактивных лимфоцитов, что провоцирует цитотоксичность в отношении аутореактивных клонов клеток [353,438,443]. Нарушение функций супрессорных Т-лимфоцитов может запускать продукцию аутоантител, а также активацию аутореактивных клонов клеток, что приводит в некоторых случаях к развитию клинической картины аутоиммунного заболевания.

Из всех субпопуляций регуляторных клеток наиболее хорошо изучены CD4+CD25+ клетки [260,282,443]. Эти Т-клетки способствуют уничтожению опухолевых клеток, клеток трансплантата и регулируют аутоиммунные реакции. CD4+CD25+ - субпопуляция Т-клеток, выделенных из тимуса, которая присутствует в организме человека уже к моменту рождения и составляет до 5% лимфоцитов мозгового вещества тимуса, около 5% от Т-клеток периферической крови и 10% от общего количества CD4+Т-клеток. Регуляторная функция аутоиммунитета со стороны этих клеток проявляется уже в раннем возрасте. Гетерогенность TCR CD4+CD25+ лимфоцитов различна, как и репертуар общей Т-клеточной субпопуляции [219]. CD4+CD25+ клетки подвергаются клональной экспансии под влиянием антигенной стимуляции *in vivo*, в то же время сохраняя свои супрессорные качества.

Другие маркеры, находящиеся на поверхности CD4+CD25+ Т-лимфоцитов, это glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor (GITR), CTLA-4 (CD152), galectin-1, CD38, CD62L, OX-40L, CD103, TNF-R2, TGF- β R1, CD5, I-selectin, CD45RO, CD45RC. Выявлены новые

маркеры данной субпопуляции: forkhead transcription factor (FoxP3) и lymphocyte activation gene 3 (LAG-3). Показано, что для созревания лимфоцитов необходима высоко-авидная связь между TCR и экспрессируемым HLA-II в комплексе с собственными пептидами [75]. Исследования на knockout мышах показали, что для развития и выживания CD4+CD25+ Т-клеток необходимы контакт через TCR со своим специфичным антигеном, связывание CD28, CD40 и присутствие в микроокружении IL-2. Мишенями для супрессорной активности CD4+CD25+ могут быть и клетки антигенной презентации. Регуляторная функция CD4+CD25+ Т-клеток осуществляется посредством оказания цитотоксического эффекта на клетку-мишень при помощи перфорина и CD18 без участия Fas. Мишенями цитотоксичности могут быть рядом расположенные CD4+⁻, CD8+ Т-клетки, моноциты и В-клетки.

CD4+Т-лимфоциты, продуцирующие TGF-β, - уникальная субпопуляция Т-клеток - Th3. Созревание Th3 происходит в присутствии TGF-β, IL-4, IL-10. Необходимым фактором является экспрессия на поверхности клетки CD86 и CTLA-4, а также угнетение активности IL-12. На развитие данной субпопуляции влияет цитокиновое микроокружение, а именно высокие уровни TGF-β и присутствие антиген-представляющих клеток в состоянии активации, которое отличается от активации, необходимой для дифференцировки Th1 или Th2. Th3 быстрее, чем эффекторные Т-клетки, взаимодействуют с антиген-презентирующими клетками, с которыми должны вступить в контакт эффекторные лимфоциты, и оказывают на них супрессорное влияние паракринно, выделяя TGF-β. Th3 экспрессируют на своей поверхности CTLA-4.

Другая субпопуляция, участвующая в атеросклерозе, Т-регуляторные лимфоциты, продуцирующие IL-10. Эти клетки, специфичные к различным антигенам, в том числе к аутоантигенам, были обнаружены в артериях при атеросклерозе. Развитие Т-регуляторных

лимфоцитов определяется активацией лимфоцита через TCR и присутствием в микроокружении значительных концентрации TGF- β и IL-10. Кроме того, необходимыми условиями являются наличие небольших доз антигена и повторный контакт между антиген-презентирующей клеткой и CD4+-Т-клеткой. Продуцирующие IL-10 Т-регуляторные лимфоциты могут быть индуцированы *in vitro* при дифференцировке наивных CD4+ клеток в присутствии IL-10 (при взаимодействии с TNF- α) или анти-CD46-антителами, но наиболее часто CD4+CD25+ лимфоцитами, экспрессирующими $\alpha 4\beta 7$ -интегрин. Цитокиновый профиль Т-регуляторных лимфоцитов при атеросклерозе включает продукцию IL-10, в меньшей степени TGF- β и IFN- γ . IL-10 и, вероятно, TGF- β являются основными факторами реализации супрессорного влияния на пролиферацию и цитокиновую продукцию Th1, Th2, CD4+CD25+Т-клеток. Некоторые исследователи показали способность Т-регуляторные лимфоциты угнетать продукцию иммуноглобулинов В-клетками и модулировать антиген-презентирующую активность.

Таким образом, сведения о функциональной гетерогенности субпопуляций Т-лимфоцитов, вовлеченных в атеросклероз, наглядно демонстрируют, что иммунные процессы при атеросклерозе крайне сложны. В настоящее время известно, что для активации Т-лимфоцитов необходим контакт с антиген-представляющей клеткой, но механизмы этого процесса при атеросклерозе исследованы недостаточно полно.

Гладкомышечные клетки в их вовлеченность в атеросклероз. Со времени установления гладкомышечной природы подавляющей части клеток сосудистой стенки, в том числе и пораженной атеросклерозом, постоянно велись и активно ведутся поиски структурно-функциональных особенностей гладкомышечных клеток атеросклеротических поражений и их отличий от клеток нормальной интимы сосуда. Уже в ранних исследованиях было установлено, что в атеросклеро-

тическим бляшках аорты человека и экспериментальных животных, наряду с типичными ГМК, цитоплазма которых заполнена миофиламентами, а слабо развитый эндоплазматический ретикулум локализован в перинуклеарном пространстве, также встречаются клетки, содержащие хорошо развитый эндоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи при небольшом числе или полном отсутствии микрофиламентов [101,110,319,323]. Такие клетки обозначали как “модифицированные”, “секреторные” или “активированные” ГМК, а также “фиброциты”, и “фибробластоподобные клетки” [109,113,225]. Значимость выявленных ультраструктурных особенностей этих клеток стала понятнее лишь после целого ряда исследований, выполненных на культуре гладкомышечных клеток сосудов экспериментальных животных. В серии работ было показано, что гладкомышечные клетки сосудов в условиях первичной культуры спонтанно меняют свой фенотип с “сократительного” на “синтетический”. Этот процесс, обозначаемый термином “фенотипическая модуляция”, сопровождался перестройкой ультраструктуры клеток. В частности, миофиламенты замещались хорошо развитым эндоплазматическим ретикулумом и аппаратом Гольджи. Кроме того, в клетках менялась экспрессия целого ряда белков цитоскелета и сократительного аппарата.

Ряд исследователей предположили, что сходные изменения фенотипа гладкомышечных клеток имеют место и в стенке сосуда человека атеросклерозе. Именно изменениями фенотипа гладкомышечных клеток, переходом их в “секреторное” состояние с последующей пролиферацией клеток и гиперпродукцией соединительнотканнных волокон исследователи объясняют феномен утолщения интимы и формирования фиброзной бляшки. Однако до настоящего времени данная гипотеза не имеет окончательного доказательств, а существующие изыскания, свидетельствующие об изменении фенотипа гладкомышечных клеток в артериях человека, носят крайне фрагментарный характер и

касаются лишь отдельных сторон этого процесса, чаще всего экспрессии одного из маркерных белков. Белки, экспрессия которых меняется при смене фенотипа гладкомышечных клеток, обозначают маркерами модуляции, включающими миозин, актин, десмин и виментин [378].

Посредством стереометрического анализа ультраструктурных компонентов гладкомышечных клеток пораженной атеросклерозом сонной артерии человека было показано, что относительный объем миофиламентов гладкомышечных клеток в утолщенной интиме, прилежащей к фиброзной бляшке, составляет 52% а подлежащей меди 77%. При этом в непораженной части артерий гладкомышечные клетки интимы и меди имели показатели соответственно 75% и 79%, т.е. почти не отличались друг от друга. Таким образом, ультраструктура “усредненной” гладкомышечных клеток пораженного участка сосуда человека приближается к синтетическому фенотипу [1]. Анализ маркеров модуляции гладкомышечных клеток свидетельствует, что как в небольших формирующихся, так и в осложненных фиброзных бляшках аорты человека появляются гладкомышечные клетки, содержащие десмин. Ультраструктура этих клеток до сих пор не изучена, а их функция в патологическом процессе не ясна. Исследователи полагают, что появление таких клеток связано с активацией пролиферации гладкомышечных клеток или с их миграцией из меди в интиму сосуда [366,368].

В бляшках сосуда человека выявлены также гладкомышечные клетки, экспрессирующие антигены главного комплекса гистосовместимости класса II (HLA-DR). Эти белки активации свойственны Т-лимфоцитам и макрофагам и участвуют в рецепторной передаче иммунной информации. Идентификация экспрессии HLA-DR позволяет предполагать, что гладкомышечные клетки, подобно Т-лимфоцитам и макрофагам, оказываются вовлеченными в иммунные реакции при атеросклерозе. Однако структурные характеристики гладкомышечных

клеток, участвующих в иммунных реакциях при атеросклерозе, до сих пор недостаточно полно изучены.

Роль межклеточные взаимодействия и клеточного микроокружения в фенотипической модуляции клеток и в воспалительных реакциях при атеросклерозе. Механизмы контроля фенотипа различных клеток интимы *in vivo* остаются малоизученными. Такое положение обусловлено сложностью проблемы, небольшим числом методических подходов к изучению клеточных элементов артерий человека *in situ* и, возможно, отсутствием концепции, способной объединить и объяснить многочисленные и разрозненные факты. В какой-то степени это можно объяснить относительно коротким периодом, прошедшим с момента открытия различных фенотипов клеток интимы. Лишь относительно недавно было осознано, что изучение механизмов регуляции фенотипа клеток необходимо не только для понимания патогенеза атеросклероза, но и для поиска путей целенаправленного воздействия на этот процесс.

Модуляция фенотипа клеток может происходить в результате: а) взаимодействия клеток; б) изменения внеклеточного матрикса, в) повышения функциональной нагрузки на клетки и г) действия ряда сигналов, в том числе и гормональных. Модуляция клеток обеспечивается посредством: а) факторов роста, выделяемые клетками крови; б) ингибиторов и стимуляторов роста, продуцируемые клетками стенки сосуда и в) межклеточных контактов. Изменение фенотипа клеток происходит под воздействием региональных локальных факторов присутствующих в непосредственном микроокружении клеток. Изменение состава окружающего матрикса, а также изменение межклеточных взаимодействий определяется, в свою очередь, балансом факторов роста, включающих как стимуляторы, так и ингибиторы роста, продуцируемые клетками стенки сосуда, молекулами, приникшими в интиму из русла крови. Природа межклеточных взаимодействий зави-

сит от клеточного состава сосудистой стенки, который при атеросклерозе резко меняется.

Невозможно обойти вниманием влияние внеклеточного матрикса на фенотип клеток сосудов [328]. Являясь продуктом жизнедеятельности клеток, внеклеточный матрикс в значительной мере определяет структурно-функциональное состояние клеток. Внеклеточный матрикс состоит из коллагенов, гликопротеинов и протеогликанов, которые синтезируются и собираются в непосредственной близости от клеток, формируя их окружающую среду. Функционально, внеклеточный матрикс обеспечивает обмен между клетками и механическую поддержку их, выполняет динамическую роль по контролю формы, пролиферации полярности и миграции.

В сосудистой стенке структурные и метаболические взаимодействия являются постоянным и необходимым звеном поддержания гомеостаза. Значимость межклеточных контактов в регуляции роста клеток стала более понятной после серии классических работ проведенных на культуре клеток и выявивших эффект “контактного торможения” пролиферации. Наиболее наглядно этот эффект проявляется в культуре клеток эндотелия, менее выражено - в культуре у ГМК сосудов в условиях высокой плотности клеток. В сосудистой стенке человека межклеточные контакты изучены недостаточно. Особенно мало исследованы контакты между клетками интимы.

В работах, преимущественно выполненных на экспериментальных животных, описаны контакты между клетками эндотелия и моноцитами крови. В электронно-микроскопических исследованиях было установлено, что клетки эндотелия сосуда образуют между собой плотные сочленения, которые, по-видимому, препятствуют проникновению макромолекул крови в толщу сосуда. В культуре у части клеток эндотелия появляется другой, щелевой тип сочленения и специализированный кон-

такт по типу «gap junction». Подобные контакты характерны для ГМК меди, реже они встречаются у клеток интимы.

Было показано, что часть макрофагов и лимфоцитов фиброзной бляшки аорты человека контактируют между собой, экспрессируя при этом антигены активации. Взаимодействие клеток в пределах интимы опосредуется не только за счет непосредственных межклеточных контактов, но и посредством факторов ими вырабатываемых. Посредством молекулярных факторов клетки обмениваются сигналами, осуществляя регуляцию пара- и аутокринно. Вместе с другими веществами они составляют молекулярную основу многих важных процессов, включая воспалительную реакцию и иммунный ответ. Факторы роста формируют сложную сеть перекрывающихся сигналов, которые координируют защитные свойства организма. Эффект, производимый факторами роста, чрезвычайно разнообразен и является ситуационным, то есть определяется сложными сочетаниями ряда условий, таких как концентрация и действия фактора, особенностями экспрессии длительность специфических рецепторов у клеток-мишеней, наличие ингибиторов, активирующих и конкурирующих веществ [330].

HLA-DR экспрессируются главным образом антигенпредставляющими клетками (АПК) [163,185,292] и играют решающую роль в презентации белков-антигенов CD4+ Т-лимфоцитам. Презентация антигена с помощью HLA-DR является ключевым событием специфического иммунного ответа, необходимого для начала продукции антиген-специфических антител, а также для активации зависимых от клеток цитотоксических механизмов [253].

Семейство АПК включает макрофаги, лимфоциты и дендритные клетки. Дендритные клетки являются наиболее мощными АПК, часто упоминаемыми как профессиональные АПК, в то время как макрофаги и лимфоциты характеризуются как полупрофессиональные АПК. Макрофаги, В-лимфоциты и дендритные клетки являются клетками

гематогенного происхождения. Все виды АПК, а также Т-клетки были выявлены во внутреннем слое крупных артерий человека как в норме, так и при атеросклерозе, что подтверждает концепцию иммунного надзора, который является составным атрибутом артериальной стенки и, наряду с иммунными реакциями, причастен к атеросклеротическим изменениям артерий, начиная с очень ранней стадии заболевания или даже со стадии, предшествующей заболеванию [187,192,439].

Интима аорты, а также интима других крупных артерий человека состоит из нескольких слоев клеток с длинными отростками, посредством которых клетки образуют непрерывную клеточную сеть в интимальном пространстве [339]. Основные клеточные компоненты непораженной артериальной интимы включают гладкомышечные клетки [101,197] и клетки звездчатой формы с перицито-подобными свойствами, специфически выявляемые антителами против ганглиозида 3G5. Как гладкомышечные клетки, так и перициты содержат гладкомышечный α -актин, который обычно используется как специфический маркер для идентификации гладкомышечных клеток [80]. В то время как основной функцией гладкомышечных клеток в медиэ является регуляция тонуса артериальной стенки, функциональная значимость клеток интимы, экспрессирующих гладкомышечный α -актин, намного менее понятна, хотя признается важный вклад гладкомышечных клеток интимы в продукцию и поддержание внеклеточного матрикса, в основном, коллагена и эластина. Помимо гладкомышечных клеток, экспрессирующих α -актин, большинство из которых, как было установлено, происходят в эмбриогенезе из мезодермы и мезенхимы [226], артериальная интима человека содержит также клетки гематогенного происхождения, которые экспрессируют антиген CD45 [409,417]. В артериальной интиме человека CD45+ клетки представлены моноцитами/макрофагами, лимфоцитами, дендритными клетками и тучными клетками [99,305]. Wick с соавторами [439] предположили, что в нор-

мальной артериальной интиме иммунные и иммунокомпетентные клетки, которые представляют собой относительно небольшую популяцию клеток по сравнению с резидентными гладкомышечными α -актин экспрессирующими клетками, играют важную роль, образуя сосу-дисто-лимфоидную ткань (VALT), которая постоянно контролирует ар-териальную стенку на наличие «сигналов опасности». Ключевым эле-ментом интегративной VALT являются дендритные клетки. В нормаль-ных артериях дендритные клетки были обнаружены в основном в по-верхностном пространстве интимы, где они благодаря своим длинным клеточным отросткам формируют непрерывную клеточную сеть [100]. Сравнение между устойчивыми к атеросклерозу и предрасположенными к атеросклерозу областями нормальной аорты человека показали, что клеточные взаимодействия дендритных клеток и других клеток интимы изменяются в предрасположенных к атеросклерозу областях [100], что подтверждает возможность того, что дендритные клетки могут прини-мать решающее участие в развитии атеросклероза с момента самого раннего изменения сосудов до появления поражений [99,439].

Несмотря на накопленные знания об антиген-представляющих свойствах артерий, до сих пор не предпринято ни одного исследо-вания для оценки распределения и количества HLA-DR-экспрессирующих клеток в нормальной интиме.

С учетом целей нашей работы, актуальным представляется ис-следование зависимости между содержанием липидов в клетках и представлением антигенов. В частности, требуется провести морфоло-гические исследования связи между накоплением липидов в клетках артериальной интимы и антигенпрезентирующей активностью клеток, а также подтвердить, что именно накопление внутриклеточных липи-дов стимулирует представление антигенов.

Связь между инициирующими событиями атерогенеза и вовлече-нием в атерогенез воспаления и клеточного иммунитета может явить-

ся научным заделом, позволяющим рассматривать противовоспалительные средства как потенциальные антиатеросклеротические лекарственные препараты и создать клеточную модель, оценивающую эффективность фармакологических веществ по экспрессии провоспалительных цитокинов.

1.5 Перспективы применения препаратов природного происхождения в оздоровительных программах

1.5.1 Здоровье населения РФ и потребность в ППП

Как известно, в России на протяжении более 15 последних лет неуклонно растет заболеваемость, прежде всего, сердечно-сосудистыми заболеваниями [16].

К социальным проблемам в области охраны здоровья относится также ухудшение качества питания, углубление имущественной дифференциации, прогрессирование социально и профессионально обусловленных дефектов здоровья населения (это, в частности, возросшая рабочая и психологическая нагрузка, приводящая к стрессам и дезадаптации).

На государственном уровне, прежде всего, предлагается основные усилия направить на увеличение потенциала здоровья здоровых лиц (так, в Минздраве РФ активно разрабатывается концепция здорового образа жизни). На втором месте в приоритетах деятельности отечественной системы здравоохранения стоит совершенствование системы восстановительной медицины. Это реабилитационные мероприятия, направленные на возвращение здоровья больным, больным вне стадии обострения, лицам в состоянии предболезни. Эту группу населения также пытаются охватить профилактическими мерами. И только на третье место поставлено увеличение объема и повышение качества медицинской помощи [59].

Можно выделить заболевания, создающие основные проблемы современному человеку. К ним относятся, в первую очередь, упомянутые сердечно-сосудистые заболевания, онкологические заболевания и инфекционные заболевания (респираторные вирусные и грипп). В сумме эти три группы заболеваний определяют проблемы со здоровьем на 96%. Если сюда добавить желудочно-кишечные заболевания, то получится 98% - это 4 основных группы заболеваний [17,18].

Сохранение здоровья – это меры, которые позволяют избежать возникновения любых болезней, независимо от их происхождения. На основании данных медицинской статистики, от 5 до 7% населения - это абсолютно здоровые люди, 20% – больные, которые находятся в состоянии острой фазы заболевания и оставшиеся 75% – так называемые условно здоровые люди, которых характеризует наличие одного-двух хронических заболеваний в стадии устойчивой ремиссии. Группа условно здоровых в России составляет свыше 100 млн. человек. Это такая масса населения, которую официальная медицина, даже с учетом широкого распространения диспансеризации и методов восстановительной терапии, не в состоянии охватить. Только 30 миллионов человек находятся под постоянным медицинским контролем.

Хорошо известны такие факторы здорового образа жизни, как тренировка, закаливание, отказ от вредных привычек, благоприятная экологическая обстановка. Биокорректоры или препараты природного происхождения (ППП) – это фактор, который появился относительно недавно, но это то, что в обязательном порядке должно входить в компоненты здорового образа жизни. ППП нельзя рассматривать как альтернативу синтетическим лекарственным средствам.

Биокорректоры нужны, когда органы и системы человека функционируют нормально, когда им еще ничего не угрожает, чтобы они могли быть готовыми отражать различные патологические воздействия, возникающие постоянно. При инициации патологического про-

цесса биокорректоры нужны еще больше. С одной стороны для того, чтобы не давать развиваться патологическому процессу, а с другой - чтобы помогать внутренним саногенетическим механизмам противостоять этому процессу. Конечно, биокорректоры нужны на и стадии, когда организм начал побеждать болезнь, и на стадии, когда частично восстановлены функции органов и систем. То есть не следует их отменять на стадии болезни, другой вопрос, что в этот момент нельзя ограничиваться только биокорректорами. Нелекарственные средства не являются сильнодействующими, т.е. не проявляют эффекты, выходящие за рамки физиологической нормы. Если организм не справляется, нужны лекарства, которые будут работать за рамками физиологической нормы.

Среди биологически активных добавок к пище около 50% обладают общеукрепляющим, адаптогенным и иммуномодулирующим действием – все эти термины в той или иной мере можно расценивать как эквивалентные. Что касается влияния на атеросклероз или поддержания неспецифического иммунитета на должном уровне, необходимо понимать, что воздействие на организм должно быть долговременным, практически постоянным. Соответственно, к препаратам, лекарственным или нелекарственным, которые могут использоваться в оздоровительных программах, должны предъявляться определенные требования [54].

Длительный прием – вот первое условие применения биокорректоров. Второе условие – безвредность применения. Третье условие – массовость, поэтому биокорректор может применяться без назначения врача. Наконец, биокорректор должен быть доступным по стоимости.

Для биокорректоров характерно использование традиционных фармацевтических форм (порошки, таблетки, капсулы, сиропы, экстракты, настои, концентраты). Для них существует регламентация режима приема, что совершенно неприменимо к пищевым продуктам. У большинства биокорректоров имеется сопроводительная документа-

ция (аннотации, листовки, инструкции по применению), очень похожая на документацию к лекарственным препаратам.

Отличия биокорректоров от лекарств состоят, прежде всего, в том, что они применяются у здоровых или условно здоровых людей для улучшения пищевого статуса, укрепления здоровья и предупреждения ряда заболеваний. У больных такие продукты могут применяться только в качестве вспомогательных средств. Как правило, биокорректоры – многокомпонентные препараты, содержащие десятки биологически активных веществ, характеризующихся своей собственной фармакокинетикой и фармакодинамикой и сложным взаимодействием. Для подавляющего большинства биокорректоров недостаточно изучены фармакодинамические эффекты, стандартизация препаратов затруднена или даже невозможна. В результате этого они почти не используются в традиционной медицине. Более того, в официальных кругах, а сейчас и в СМИ, они часто вызывают явную антипатию.

Эффективные биокорректоры определяются как пероральные препараты на основе натуральных и/или идентичных натуральным продуктов, обладающие подтвержденным оздоровительным действием, предназначенные для профилактики неинфекционных и инфекционных заболеваний путем подавления хронических патологических процессов и коррекции основных функций организма, назначаемые для длительного (постоянного) приема, применяемые при острых состояниях лишь в качестве вспомогательных средств.

Требования к эффективным биокорректорам включают в себя научное обоснование разработки, базирующееся на результатах фундаментальных исследований. Биокорректоры должны обладать патогенетическим действием, т.е. воздействовать на ключевые звенья в патогенезе заболевания. По-прежнему остается под вопросом фармакологическая характеристика и стандартизация продукта. До сих пор непонятно, каким образом она может быть реализована, особенно это

касается парафармацевтиков. И открытым вопросом остается оценка эффективности [7,8].

Критерии объективной оценки эффективности биологически активных добавок к пище имеются. Во-первых, это учет содержания биологически активных соединений в продукте и, второе, это клинические исследования биологически активных добавок для представления результатов в орган добровольной сертификации для получения сертификата соответствия. Если отсутствует первый или второй показатель эффективности добавки, она не должна регистрироваться в качестве биологически активной добавки к пище. Поэтому о БАД, по определению, можно говорить как об эффективных продуктах, содержащих необходимые организму вещества, недостаток или отсутствие которых ведет к нарушениям гомеостаза отдельных систем или организма в целом [49].

Россия сегодня предъявляет одни из самых жестких требований в отношении контроля БАД [55]. Соответствующие законодательства других стран существенно различаются. В США перед выводом на рынок биологически активных добавок фирме-производителю достаточно предоставить в соответствующий орган информацию, доказывающую их безопасность. Регулируется лишь список веществ, которые могут служить основой для биодобавок. Для выпуска же той или иной добавки на рынок не требуется ни госрегистрации, ни доказательства эффективности препарата. Государство активно поддерживает рынок, финансируя институты, проводящие исследования в этой области, такие, как Центр комплиментарной и альтернативной медицины (NCCAM) и управление по БАД (ODS). В Европе контроль над рынком БАД более серьезный, в частности, на государственном уровне запрещена реклама БАД как лекарственных препаратов. Страны Евросоюза также ограничивают вещества, разрешенные к использова-

нию при производстве БАД, и устанавливают их безопасные дозы [289].

В Китае технологическое/исследовательское досье и образцы продукта предоставляются для рассмотрения в исследовательское учреждение, определенное Государственным управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов Китая (SFDA) для проверки [53].

Исследовательское учреждение проводит оценку стабильности, гигиенические исследования, идентификацию компонентов, тест по определению функциональной активности, оценку токсикологической безопасности и передает отчет о результатах испытаний претендентам. Завершенные досье предоставляются претендентами в SFDA. SFDA назначает инспекционное учреждение для контроля исследований образца и выдает заключение. Аттестационный центр SFDA дает заключительный комментарий и выдает разрешения на продукты, удовлетворяющие требованиям законодательства. Продолжительность полного цикла регистрации нового продукта составляет почти 260 рабочих дней с момента подачи всех необходимых материалов в SFDA. Таким образом, регулирующее воздействие государства в Китае, это:

- ответственность SFDA за пищевые добавки;
- децентрализация рекламных и маркетинговых акций;
- ограничения по дистрибуции путем прямых продаж отменены в сентябре 2005 г.

На одной из последних международных конференций IADSA (International Alliance of Dietary/Food Supplement Associations) рассматривались вопросы совершенствования законодательства в области БАД, причем в основном с точки зрения обеспечения их безопасности для потребителей [206].

К наиболее актуальным вопросам, связанным с регулированием рынка БАД, участники относят, в частности, проблемы классифика-

ции БАД, их этикетирования, контроля качества, обоснованности заявляемых эффектов. Считается, что гармонизации европейских требований к БАД мешает различие в их дистрибуции – так, во многих странах более 80% БАД реализуется через аптеки, тогда как, например, в Голландии большая часть такой продукции имеет другие каналы сбыта. Этикетка БАД, как предполагается, не должна способствовать убеждению потребителя в том, что биодобавки заменяют разнообразие естественной диеты. Судя по материалам конференции, значительное внимание участников было уделено таким «вечным» вопросам, как разграничение пищевых продуктов и лекарственных средств (включая возможность выделения БАД в особую товарную группу), различие между понятиями «физиологическое» и «фармакологическое» действие, дозирование потребления витаминов и минеральных веществ, контроль за безопасностью потребления растений (причем не только лекарственных) и их компонентов, выводу на рынок новых БАД.

По мнению одного из специалистов общества доказательной медицины (Россия), «должен быть государственный список, как в Великобритании, препаратов, эффективность которых доказана – формуляр, попасть в который можно не за деньги, а на основании проведенных испытаний. Должны быть образованные врачи, которые будут знать, что такое доказательная медицина, где взять достоверные сведения. Должны быть центры, которые занимались бы оценкой эффективности всех медицинских вмешательств в соответствии с общепринятыми мировыми стандартами. И должны быть источники информации и для пациентов. Нужно, чтобы пациенты учились защищать свои права. Все страны, так или иначе, через это прошли» [33].

Проблема оценки эффективности нелекарственных оздоровительных средств должна решаться и в России. И здесь снова целесо-

образно обратиться к зарубежному опыту, к крупнейшему рынку БАД в мире, рынку США.

Там считают, что в основном клиническая эффективность имеет отношение к БАД, созданным на основе лекарственных растений. Алгоритм для оценки клинической эффективности лекарственных растений давно разработан в Америке. Проводится идентификация и характеристика самого лекарственного (или пищевого) растения, которое является источником натурального продукта, устанавливается его биодоступность и биологическая активность, идентифицируются активные компоненты, исследуются механизмы их действия. Затем проводится клиническая оценка – обычные клинические исследования в соответствии с рекомендациями ВОЗ: фаза 1 и фаза 2, а иногда и фаза 3 клинических исследований. Никаких новшеств, никаких специальных подходов для оценки эффективности БАД, отличных от лекарственных средств, тот же самый алгоритм, характерный для клинической фармакологии. Единственное существенное отличие – здесь нет исследований по токсичности. А исследования по токсичности занимает от 60 до 90% в стоимостном выражении работ, связанных с выводом лекарства на рынок. Нет необходимости исследования токсичности, если заранее предполагается, что используются те натуральные компоненты в БАД, которые не могут нанести вреда здоровью человека. Если в рецептуру БАД вносится новый пищевой ингредиент (тот, которого не было до октября 1994 г., когда был принят специальный законодательный акт), производитель должен лишь уведомить FDA о своих планах по выводу продукта на рынок, и с этого момента это становится ответственностью FDA: не приняли никаких мер, значит, допускают наличие такого препарата на рынке. Таким образом, в США существует работающая система, позволяющая выявлять клиническую эффективность БАД и доводить до общества, прежде всего до врачей и потребителей, истинную

информацию об эффективности данного средства. Эта система имеет законодательную поддержку и федеральное финансирование [50].

Оценка клинической эффективности является ключевой проблемой нелекарственных оздоровительных средств и в России. В течение многих лет основным препятствием для более широкого и обоснованного применения как биологически активных добавок к пище, так и других аналогичных нелекарственных средств населением, было недоверие потребителей к тому, что утверждает продавец с помощью рекламы, аннотации, этикетки. Присутствие такой продукции на прилавке со всеми сопровождающими необходимыми документами, выданными государственными органами, гарантировало только ее безвредность, а ведь производитель обещал людям совсем другое и чаще всего, вынужденно или намеренно, соревновался с конкурентом в искусстве стимулирования сбыта или внешней привлекательности товара.

Постепенно наш рынок становится цивилизованнее, и часть производителей указывает на проведенные клинические исследования своих препаратов, понимая, однако, под этим самые разные процедуры. Поэтому и оценить надежность представленной информации объективно по-прежнему весьма трудно, особенно неспециалистам.

На примере биологически активных добавок к пище (БАД), которые составляют большую часть биокорректоров, можно пояснить, в чем суть этой проблемы, как она решается на сегодняшний день и как она должна быть решена. В настоящее время БАД в России проходят государственную регистрацию. Если эксперты оценивают образцы как безвредные, продукция попадает на рынок. Безусловно гарантируется безвредность, а об эффективности БАД в свидетельстве о государственной регистрации ничего не говорится.

Видимо, наиболее приемлемым вариантом является система добровольной сертификации эффективности ППП. В 2003 г. вступил в действие Федеральный закон «О техническом регулировании», кото-

рый дал законодательную базу для организации системы добровольной сертификации.

Профессиональные организации разрабатывают технический регламент на производство и распространение каких-либо товаров и услуг, правила их сертификации и сертифицируют эти товары и услуги. Органы исполнительной власти осуществляют контроль и надзор за соблюдением технического регламента и сертификацией. Они же выдают аккредитацию на право сертификации товаров и услуг. Уже аккредитованы государством центры, которые будут заниматься добровольной сертификацией эффективности оздоровительных нелекарственных продуктов и технологий. Разработчик или производитель может обратиться в Сертификационный центр и, при наличии положительного заключения экспертов, получить сертификат эффективности. Наличие таких сертификатов в местах продаж позволяет продавцу и покупателю правильно ориентироваться в выборе БАД. Разработаны знаки, подтверждающие сертификацию. Это существенно повысит конкурентоспособность ППП, позволит заявлять об эффективности биокорректоров в рекламе и других информационных материалах, снимет ответственность с производителя, продавца и рекламодателя за достоверность сведений о лечебно-профилактических (полезных) свойствах товара. А торгующие организации и рекомендуемые биокорректоры работники здравоохранения получают хороший ориентир, позволяющий им предлагать пациентам только самое лучшее из имеющегося на рынке товарного предложения.

К сожалению, за прошедшие годы процедура добровольной сертификации ППП в России не стала массовой, а критерием эффективности являются не только результаты клинических испытаний, но и подтверждение ингредиентного состава, заявленного производителем. Более того, даже самые крупные игроки рынка не смогли согласовать

позию по отношению, как к добровольной сертификации, так и способам ее проведения.

Возможно, этим объясняется в значительной степени и тот факт, что с 1 июля 2006 г. в России вступил в силу ФЗ «О рекламе» от 13 марта 2006 г. Законом предусмотрены определенные ограничения в рекламировании биологически активных добавок, например, статья 25 (п.5) запрещает говорить о том, что продукция прошла клинические испытания.

Тем не менее, сохраняется надежда на то, что оздоровительные программы с использованием ППП будут строиться на основе известных приоритетов, связанных с сохранением здоровья. Опыт проведения массовых оздоровительных мероприятий в ряде регионов свидетельствует о том, что можно за один год добиться снижения общей заболеваемости в 5-6 раз, снижения заболеваемости ОРВИ и гриппом в 7 раз, снижения общей и сердечно-сосудистой смертности в 2-3 раза, снижения риска онкологических заболеваний – на 30% [14,60].

Добиться подобных эффектов с помощью лекарственных средств невозможно ни при каких обстоятельствах. Причины необыкновенной эффективности биокорректоров достаточно простые: своевременный прием еще до появления заболевания, постоянный длительный прием (год и более) и массовое применение, что особенно важно для инфекционных заболеваний.

1.5.2 Причины стагнации российского рынка ППП

Небывалый ажиотаж, изобилие некачественного и неэффективного товара, сетевой маркетинг сопровождали появление БАД на российском фармацевтическом рынке в 90-е годы прошлого века. При этом никаких документированных и научных ссылок на действие состава

БАД на организм не было. Была только «историческая легенда» в сочетании с агрессивной рекламной кампанией.

Их коммерческий успех на отечественном рынке был предопределён и некоторыми особенностями российского менталитета: врождённой любовью к самолечению; недоверием к официальной медицине и интересом к альтернативным методикам. Плюс к этому – готовность отдать последнее «за здоровье» и воспитанное советской эпохой убеждение, что стоящую вещь можно только достать «из-под полы» и «с рук».

В настоящее время весьма трудно назвать государственную организацию или иное солидное учреждение, которое вело бы систематическое наблюдение за российским рынком БАД и приводило сведения о нем, отражающие официальную или хотя бы более или менее объективную точку зрения.

Помимо весьма приблизительной экспертной оценки емкости рынка в стоимостных единицах (около 1,5 млрд. долларов в конечных ценах для потребителя, в том числе приобретающего продукцию у «сетевиков»), известна помесечная динамика продаж БАД производителями и импортерами (опять же в денежном выражении [35,38,52,65]). Вполне доступна информация о регистрации отечественных и импортных БАД в РФ и изменении количества производителей БАД (российских и зарубежных, присутствующих на российском рынке).

Собраны некоторые сведения о крупнейших производителях и импортерах, существуют и официальные (источник – ФТС) сведения об импорте БАД.

Гораздо меньше, но все же известно о деятельности оптовых посредников, специализирующихся на БАД, и относительной «нагрузке» на разные каналы розничной дистрибуции. Есть информация по ценовой динамике в течение последних лет и нарастании цены в цепи производитель-оптовик-розница. Определена структура рынка БАД –

он, с некоторыми оговорками, пока близок к свободноконкурентному. Наконец, описан, в первом приближении, типовой портрет потребителя, включая мотивы покупки, предпочтения, факторы, влияющие на вероятность приобретения товара [34,70].

Как видно из перечисленного, российский рынок БАД отличается от смежных с ним фармацевтического и пищевого информационной непрозрачностью, что в значительной степени (но это не единственная причина) связано с сосуществованием двух принципиально отличных способов продвижения продукции – традиционного (по западной терминологии – цивилизованного) и т.н. «сетевого» (MLM).

В то же время дальнейший сбор данных затрудняется как объективными причинами, так и тем, что у маркетологов нет достаточно весомых стимулов для поиска ответа на вопросы, которые, судя по последним публикациям, ставит сама жизнь [22–25,27].

Так, например, до сих пор неизвестны реальные объемы производства БАД, выраженные в натуральных единицах (да и в стоимостных тоже) и выпуске продукции отдельными производителями. Следовательно, затруднена и оценка в таких единицах емкости российского рынка, наполнением которого активно занимаются и представители сетевого маркетинга.

Существующая сегодня классификация БАД (более развернутая, чем нутрицевтики-парафармацевтики), используемая в том числе в Госреестре как наиболее официальном документе и основанная на действии БАД на системы организма (что сближает их с лекарствами), страдает существенными изъянами (например, антиоксиданты – это уже выделение товара на основе механизма действия). Поэтому с ее помощью вряд ли удастся получить ответы на вопросы об объемах продаж товаров по ассортиментным группам, в т.ч. в регионах. В значительной степени из-за отсутствия приемлемой товарной классификации не разработаны принципы формирования оптимального оптового и розничного торгово-

го ассортимента. Не выявлены товарные группы БАД, на которые растет или падает спрос. Не определена ассортиментная насыщенность российского рынка БАД, следовательно, не идентифицированы региональные рыночные ниши.

Практически невозможен сбор информации о масштабах функционирования MLM, рыночной доле отдельных сетевых компаний, отпускных ценах производителей на их продукцию.

Наряду с отмеченными проблемами, к настоящему времени созрел и целый набор направлений развития маркетинговых исследований, проведение которых вполне возможно, но, увы, не осуществляется. Например, если емкость российского рынка БАД растет, то за счет чего – увеличения потребления известных торговых марок или постоянного расширения ассортимента, т.е. выброса на рынок новых марок? Возможно, новые БАД умирают, так и не выйдя на уровень массовых продаж или, напротив, именно новые заменяют зрелые марки, которые уходят со сцены. Насколько вообще применимо к БАД распространенное в маркетинге понятие «жизненный цикл товара»? Почти не изучена эластичность спроса на БАД (при изменении цены и изменении дохода потребителя). Неизвестно даже примерно количество российских приверженцев БАД и какие-либо критерии их регулярного потребления. Много ли у нас убежденных, что для выбора покупаемого БАД нужна предварительная диагностика организма или рекомендация врача? Какой информации о БАД потребителям не хватает? Где она должна быть размещена, чтобы ей доверяли? Меняется ли в России доля потребителей БАД, использующих их именно для профилактики и укрепления здоровья, достижения большей сбалансированности диеты? До сих пор вообще нет какой-либо разумной сегментации потребителей БАД, не говоря уже о понимании тонкостей их поведения.

Неизвестен региональный разброс цен на одни и те же марки БАД. Фактически это составная часть т.н. аудита розничной торговли БАД –

исследования, позволяющего отслеживать насыщенность товарного предложения, доли торговых марок и производителей, дистрибьюцию и многие другие важнейшие параметры, анализ которых дает наиболее полную и адекватную характеристику как состояния и движения рынка в целом, так и тенденций по его отдельным позициям.

Не проведен анализ опыта по т.н. раскрутке брэндов, в кач-ве которых могут выступать названия фирм, ассортиментных групп (зонтичные брэнды) или отдельных видов продукции. Наконец, можно ли утверждать, что рынок БАД в РФ развивается тем же путем, который прошли рынки аналогичной продукции за рубежом (почему, например, невзирая на своеобразный опыт Гербалайфа, так прочны позиции сетевиков в России?).

Помимо уже указанной выше причины, есть ряд факторов, предопределяющих недостаточную изученность российского рынка БАД маркетологами. В связи с неустоявшимся товарным позиционированием, эту продукцию не считают по-настоящему своей ни фармацевты, ни продовольственники. За редким исключением, операторами этого рынка являются представители малого и среднего бизнеса, не имеющие достаточных ресурсов для оплаты серьезных исследований. В БАД-бизнесе часто меняются правила игры (вот и сейчас кое-что должно измениться в связи с новыми СанПиН, выполнением закона «О техническом регулировании»). В то же время редко проводятся научно-практические конференции не медико-биологической, а производственно-экономической направленности, плохо работают профессиональные ассоциации.

Российский рынок БАД прошел примерно 15-летний путь своего развития. Без всякого сомнения, можно признать, что за это время он стал более насыщенным, цивилизованным и законодательно оформленным. Более того, за последние 3-4 года о роли БАД в жизни нашего населения написано едва ли не больше, чем за все предыдущее время. Од-

нако авторами этих публикаций являются специалисты разного профессионального уровня, а эмоции и домыслы часто превалируют над строгими научными фактами. В этой связи можно начать с некоторых распространенных заблуждений (иллюзий), которые якобы характеризуют современную ситуацию и тенденции развития этого бизнеса в России.

Итак, заблуждение №1. Рынок БАД бурно растет.

Ничего подобного в последние 2-3 года по России в целом не происходит. Население РФ сокращается довольно быстрыми темпами (данные Росстата) [15]. Количество регулярных потребителей БАД в России не увеличивается [13]. Помесячная динамика объемов продаж 2008-2010 гг. по всем каналам реализации свидетельствует о стагнации рынка [69]. Положение у т.н. «сетевиков» неясно вследствие непрозрачности их деятельности, но наряду с победными реляциями руководителей таких компаний, существует много разочарованных дистрибьюторов.

Что же на этом рынке растет? Несколько увеличивается импорт. Растет количество зарегистрированных в РФ БАД и прохождение их к потребителю через такой канал розничной торговли, как аптеки (т.е. имеет место перераспределение товарных потоков между каналами сбыта). Тем не менее и в аптеках провизоры отмечают слабый спрос на БАД.

Заблуждение №2. БАД-бизнес экономически привлекателен.

Действительно, рынок пока в значительной степени свободноконкурентен и входные барьеры для новых операторов относительно невысоки. Однако в связи с ужесточившейся конкуренцией и возросшим уровнем административного контроля рентабельность этого бизнеса уверенно понижается. Рост цен на БАДы постоянно отстает от уровня инфляции как потребительского, так и фармрынка – это товар не первой необходимости, спрос не него эластичен, много взаимозаменяемых с БАД средств решения тех же проблем со здоровьем. Поэтому легко указать на примеры, когда пришедшие за последнее время на этот ры-

нок компании, обладающие серьезным финансовым и административным ресурсом, потерпели фиаско или близки к этому. Более или менее успешным состоянием дел характеризуются не новые, а несколько крупных старых (существующих более 5 лет) компаний.

Заблуждение №3. У рынка хорошие перспективы в связи с реализацией государством политики в области здорового питания, осознанием населением целесообразности потребления БАД, в том числе за счет эффективности образовательных программ, роста доходов населения.

И это не так. К сожалению, производители и импортеры БАД, по их собственной оценке, в своей основной массе поддержки со стороны государства не ощущают, эффект образовательных программ меньше, чем критика в адрес БАД со стороны СМИ, а доходы если и растут, то не у тех слоев населения, которым в наибольшей степени сегодня нужны БАД.

Чтобы выявить корни некоторого пессимизма по поводу положения дел в отрасли, рассмотрим эволюцию компаний и функций маркетолога в них. Большинство российских коммерческих структур прошли 4 этапа развития и подошли к пятому (или уже вступили в него).

Это этап 1 – интуитивного маркетинга (хорошая прибыль – удача, а не наука), 2 этап – продаж (упорядочиваются отношения с покупателями и структурируется сбыт), 3 этап – мозгового штурма объединенными силами первых лиц при решении проблем со сбытом, 4 этап – появления в компании первого штатного маркетолога. Это – первые 4 этапа, и большинство операторов российского рынка БАД сейчас достигли именно его.

Дело в том, что, как правило, надежды работодателя на эффективность маркетолога возлагаются на него в соответствии с парадигмой классического, утилитарного маркетинга. Парадигма – это логическое утверждение, на котором основывается функционирование определенной области науки. Распространенной парадигмой в отноше-

нии маркетинга является признание его наукой, способной заставить людей покупать товары, которые им не особенно нужны или менее нужны, чем некие другие товары аналогичного назначения.

Что должно происходить с рынком БАД, если маркетологи пытаются действовать в соответствии с этой парадигмой? Очевидно, должны возрасти продажи не тех товаров, которые лучше удовлетворяют общественные и личные потребности, а тех, которые более искусно «продвигают» или пытаются продвигать маркетологи.

Косвенно это подтверждается большим разрывом между количеством зарегистрированных в России БАД (около 5 тыс.) и их гораздо более скромным перечнем в прайс-листах оптовых компаний и в розничном ассортименте.

Более прямое подтверждение – результаты опросов потребителей БАД со стажем, в которых им следовало высказать мнение по поводу эффективности этой продукции сейчас и несколько лет (4-5) назад. Около 70% респондентов не заметили повышения действенности обновляющегося ассортимента БАД, тогда как практически все (более 80%) согласны с тем, что лекарственные средства за тот же период времени стали более эффективны [48].

При ограниченности маркетинговых бюджетов, что вполне естественно, штатные маркетологи разных фирм соревнуются между собой в том, что называется «промоушн», или, по-современному, интегрированные маркетинговые коммуникации, основным компонентом которых является реклама. Это соответствует классической, но устаревшей парадигме маркетинга. При этом в ход идут любые, иной раз нелепые средства воздействия на потребителя.

При развитом и структурированном рынке есть много причин, которые препятствуют стабильному и длительному воплощению в жизнь классической парадигмы маркетинга. Важное место среди них занимает конкуренция, приводящая к копированию наиболее эффек-

тивных приемов «продвижения», в результате чего эти приемы перестают обеспечивать фирмам относительное преимущество. По-видимому, следует признать, что универсальных правил, заставляющих человека покупать какой-либо не очень полезный товар на протяжении достаточно длительного времени, найти никогда не удастся.

Как известно, комплекс маркетинга состоит не из одной Р («промоушн»), а из 4 Р (добавляются продукт, цена и каналы продаж). Для утверждения, что в настоящее время для БАД существует некий перекос в сторону «промоушн», требуются доказательства.

В последние годы, по аналогии с мониторингом рынка лекарственных средств (ЛС), выявляются лидирующие в продажах торговые марки БАД, т.н. ТОПы [3,21].

Анализ таких данных показал, что если за год обновляемость списка ТОПов для рецептурных ЛС минимальна (5-8%), для безрецептурных ЛС несколько выше (10-15%), то для БАД список ТОПов меняется более чем наполовину.

Значит ли это, что работа по совершенствованию товара идет столь интенсивно? Почему тогда этого не замечает потребитель? Наконец, по-прежнему слабо развита несетевая дистрибуция БАД (т.е. традиционная торговля), включая сопровождающее продажи консультирование, т.е. то, что на более цивилизованных и развитых товарных рынках принято обозначать термином мерчандайзинг.

Представляется, что очередной, пятый этап и совершенствование функций маркетинга в компании должны быть основаны на другой парадигме. Новая, менее ошибочная парадигма приписывает маркетингу способность не подталкивать потребителя к покупке, а устранять т.н. «барьеры», которые препятствуют покупке (сбалансированная работа маркетолога с комплексом из 4 Р, т.е. приведение его в состояние, максимально соответствующее интересам потребителя – это и есть минимизация барьеров). Тогда победителем в конкуренции

надлго становится компания, предложившая такой комплекс из 4 Р, который не могут предложить другие.

Важной особенностью БАД как товара является невозможность его быстрой и прямой оценки. Поэтому такое значение приобретает восприятие косвенных признаков, одним из которых, можно надеяться, станет подтверждение эффективности на основе добровольной сертификации. Введение такой процедуры – один из способов минимизации барьеров.

Другой способ – рассмотрение поведения особых, редко принимаемых во внимание групп потребителей. Например, такой группой, с учетом пригодности БАД для относительно здоровых людей, являются работники производящих БАД предприятий или штатные сотрудники фирм-импортеров. Если они скептически относятся к собственной продукции и игнорируют ее (что бывает нередко), то можно ли надеяться на иную реакцию широких масс населения или даже его особого сегмента?

Вообще же распознавание и устранение барьеров – целая технология маркетинга на современной стадии его модернизации, освоение которой предстоит пережить не только коммерческим, но и другим структурам, включая государственные. Использование этой технологии предполагает и особый подход к сегментации и дифференциации потребителей, и к анализу конкурентов, и дальнейшее развитие концепции четырех Р, и умение идентифицировать для начала те барьеры, устранение которых требует лишь малых издержек.

Что же касается перспектив дальнейшего развития отечественного рынка оздоровительной продукции и БАД в частности, то вопрос заключается, по-видимому, в том, сможет ли бизнес работать в большей степени, чем сейчас, в интересах не только себя, но и всего общества. Что этому может помешать? Ответ достаточно прост – основанное на отжившей парадигме маркетинга стимулирование продаж ма-

лоэффективных БАД за счет мощного арсенала «промоушн». Если этим путем будет продолжать идти большинство операторов российского рынка БАД и соревноваться друг с другом в основном на этом поприще, то общий для всех финал не разочарует только тех, кто нашел в БАД-бизнесе временное, но пока еще прибыльное пристанище.

Ведущие поисковые системы Рунета по запросу на ключевое слово «БАД» выдают ответ, где две трети информации – это сайты фирм, которые осуществляют свою деятельность в противоречии с законодательством РФ. Две трети сайтов позиционируют свою продукцию как лекарства с конкретным указанием лечебных свойств и применения в целях лечения. За рубежом подобная деятельность преследуется государством, а источники противозаконной информации и услуг однозначно закрываются.

Добросовестные производители БАД предлагают рынку качественный товар, используя современные технологии. Однако продвижением их продукции часто занимаются люди, не имеющие медицинского образования. Распространители БАД хранят продукцию в домашних условиях, перевозят ее на городском транспорте, вследствие чего нарушаются температурный режим хранения и параметры влажности. В настоящее время участились случаи незаконного распространения БАД, содержащих в своем составе психотропные и сильнодействующие вещества, которые реализуются под видом спортивного питания и средств для коррекции веса. При этом потребители, как правило, не информируются о составе БАД. Аннотация к данной продукции не прилагается, упаковка не имеет пояснительных надписей на русском языке.

Быстро растет количество регистрируемых БАДов – до 1,5 раз в год, но состав большинства из них повторяется, меняются только названия препаратов. Старые марки, даже хорошо зарекомендовавшие себя, исчезают за полтора-два года. Наконец, *оценка клинической эф-*

фактивности биологически активных добавок к пище не регламентирована в России. Люди получают лишь гарантию того, что это безвредно, но никто им не может сказать, что это полезно.

Что предлагает наш рынок? Спрос определяется потребителем. Потребитель часто считает, что нелекарственные средства нужны для снятия головной боли, от насморка, бессонницы, изжоги и т.д. То есть потребитель не знает, что нужно употреблять, чтобы сохранить, укрепить и восстановить свое здоровье. Могут ли ему помочь в этом продавцы? Как правило, нет. Недостаток информации – огромная и первостепенная проблема.

При сравнении медико-социальных приоритетов оздоровительных программ и предложений рынка БАД выявляется явное несоответствие [26,37,63].

Наибольшая востребованность имеется у препаратов для профилактики сердечно-сосудистых заболеваний, затем – инфекционных заболеваний, затем – онкологических заболеваний. Анализ предложений рынка БАД был проведен на основании изучения БАД с подтвержденной эффективностью. На первом месте оказались средства, стимулирующие иммунную систему – адаптогены, витаминно-минеральные комплексы, общеукрепляющие средства. На втором – средства, нормализующие деятельность ЖКТ. И только на третьем – препараты для профилактики сердечно-сосудистых заболеваний, которые теоретически должны быть на первом месте. Крайне мало онкопротекторов. Отчасти это объясняется сложностями в разработке таких препаратов, отчасти – сложностями в оценке клинической эффективности.

Несмотря на все сложности развития российского рынка БАД, он становится все более конкурентным по отношению к рынку ЛС. Дело в том, что для лекарств существует большое число регуляторных ограничений, не применяемых к БАД:

– обязательными являются доклинические и клинические испытания готовых ЛС, а для БАДов – только токсикологические и гигиенические исследования;

– для лекарств регистрируются конкретные показания, и продвижение их для лечения других заболеваний запрещено. БАДы же имеют только рекомендации по применению, что дает возможность их производителям довольно произвольно выбирать акценты при рекламе этих препаратов;

– продажа готовых ЛС разрешена только в аптечной сети, БАДы могут продаваться как в аптеках, так и в любом предприятии торговли, имеющем лицензию на торговлю пищевыми продуктами;

– торговые надбавки на готовые ЛС в большинстве регионов ограничены, на парафармацевтические товары – только в отдельных регионах, причем эти надбавки более высокие.

Несмотря на более широкие возможности продвижения БАД, ни одна из сторон сферы их оборота не является столь противоречивой и часто нарушаемой, как рекламная деятельность производителей и продавцов БАД.

Всплеск законотворческих инициатив применительно к БАД в конце 2000-х годов был продиктован несколькими причинами. По данным проверок Роспотребнадзора, около 50% производителей не соблюдали санитарные нормы. По данным ФАС, отмечались многочисленные нарушения статьи 25 ФЗ «О рекламе» [9,58]. Существенно выросло количество жалоб на качество БАД в Роспотребнадзор и Комитет по здравоохранению Госдумы России.

Чаще всего от действий мошенников страдают одинокие и пожилые люди, а также инвалиды. В 2010 г. Роспотребнадзор из-за большого числа жалоб вынужден был неоднократно заявлять о том, что дистанционные продажи БАД по телефону и через Интернет с доставкой на дом запрещены, перед покупкой БАД необходимо проконсульти-

тироваться с врачом, а телефонных и приходящих продавцов БАД нужно игнорировать.

В Федеральную службу по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека поступают многочисленные обращения граждан Российской Федерации с жалобами на недобросовестную практику распространения БАД, имеющую очевидные признаки мошенничества. Указанное, в частности, выражается в доведении до потребителей заведомо ложной информации о различных несуществующих клиниках, медицинских центрах и других недостоверных сведений, вводящих их в заблуждение.

При этом у потребителей формируется устойчивое недоверие и явно негативное отношение к БАД, даже несмотря на то, что в жалобах граждан в подавляющем большинстве случаев фигурируют находящиеся в законном обороте и прошедшие процедуру государственной регистрации пищевые продукты данной группы. Рядовые потребители не хотят больше платить деньги за «пустышки», производителям не нравится, когда успешно продается «не очень качественная» продукция конкурентов, госорганы хотят всех рассудить и тем самым оправдать свое существование.

В то же время Китай, например, констатирует расширение своего рынка ППП [53], чему способствуют его следующие особенности:

- Демографические факторы.
- Старение населения (увеличение 60+ популяции, с 11% в 2004 г. до прогнозируемых 16% в 2018 г.).
- Рост урбанизации (более 42% городского населения в настоящее время).
- Количество представителей среднего класса увеличилось на 33% (с 150 млн. в 2004 г. до 200 млн. в 2009 г.).

– Показатель валового внутреннего продукта на душу населения устойчив (с 1,214 долл. США в 2004 г. до 2,245 долл. США в 2010 г.) и в течение следующих 5 лет будет быстро возрастать.

Итак, даже такой авторитетный источник, как DSM Group, признал факт, на который эксперты указывали неоднократно – российский рынок БАД стагнирует (по данным DSM Group, стоимостной рост составлял 10-12% в последние два года, т.е. ниже уровня инфляции в стране) [57]. Что для любого разумного аналитика совсем не удивительно не только в связи с сокращением численности российского населения, а также в связи с расширением количества потребителей, ожидания которых относительно эффективности БАД были вполне цинично обмануты, о чем не преминули сообщить многие СМИ. Производители БАД сетуют на новую редакцию Закона «О рекламе», запрещающего им сообщать о результатах проведенных клинических исследований их продукции, хотя сами корректно эти исследования почти никогда не проводят.

Подводя итог сказанному, можно констатировать, что о БАД или ППП в целом можно говорить как об эффективных продуктах, содержащих необходимые организму вещества, недостаток или отсутствие которых ведет к нарушениям гомеостаза отдельных систем или организма в целом. Кроме того, БАД могут обладать доказанным терапевтическим потенциалом, что позволяет провести их добровольную сертификацию на эффективность.

1.5.3 Поиск и изучение механизмов действия ППП с помощью клеточных моделей

Последние достижения в биомедицинских дисциплинах, геномике, протеомике, биоинформатике дали фармацевтической и биотехнологической индустрии новые надежды в области лечения сложных болезней: открытие и выбор лекарственных мишеней, снижение токсично-

сти и неэффективных компонент на более ранних стадиях исследования, разработку средств индивидуализации лечения. В то же время, научная информация, возникающая сегодня, должна трансформироваться в интегрированную предсказательную модель, способствующую направленной разработке фармпрепаратов и оценке их эффективности.

Что касается ППП, то некоторые авторы предлагают многоэтапную и, как представляется, малоэффективную программу создания новых препаратов.

В частности, определяются дефициты основных биологически активных веществ в организме, связанные с патологическими процессами. Затем происходит предварительное конструирование первого эскиза (рецепта) будущего продукта, который мог бы восполнять тот или иной дефицит. На более поздних стадиях определяются необходимые ингредиенты будущего продукта, и выбирается сырье для его изготовления. Анализируются также сведения об экологическом состоянии регионов произрастания этого растительного, как правило, сырья.

При создании оригинального рецепта будущего продукта учитываются взаимоусиление и взаимодополнение положительных эффектов основных ингредиентов, устранение и смягчение нежелательных эффектов одних ингредиентов другими. Наконец, выбираются соответствующие технологии производства, которые определяются особенностями ингредиентного состава будущего продукта и базируются на результатах анализа достижений и возможностей современных высоких технологий производства ППП в мире.

Предполагается и анализ современных результатов клинической апробации основных ингредиентов продукта, которые имеются к настоящему времени в отечественной и зарубежной специальной литературе, а также проведение собственных исследований по оценке клинической активности.

Таким образом, длительной и затратной процедуре «исследований по оценке клинической активности» (которые вполне могут дать и отрицательный результат) предшествует в основном теоретическое выявление связи между патологией и дефицитом микронутриентов, что вряд ли эффективно.

В то же время известно, что методы биотестирования позволяют произвести полное доклиническое испытание практически любого фармацевтического препарата и БАД, выявить неэффективную продукцию или компоненты сырья с большой достоверностью. С помощью уже используемых тестов можно исследовать влияние веществ на состояние сердечно-сосудистой, лимфатической, иммунной, эндокринной, нервной, дыхательной и ещё ряда систем организма; определять генотоксические свойства (мутагенность), выявлять цитотоксичность, острую и хроническую токсичность, антиоксидантную активность, осуществлять контроль морфогенетической активности физических и химических факторов, проводить полное биохимическое и биофизическое исследование веществ, исследовать фармакокинетику готовых препаратов и исходного сырья [30–32].

Несомненно, что поиск мишеней с помощью биотестирования был и остается одной из фундаментальных проблем в современной фармацевтике. Именно с мишени, то есть с понимания механизма развития заболевания и способности им управлять, не затрагивая остальные биологические процессы в человеческом организме, начинается создание порядка 80% лекарственных препаратов на современном рынке. Однако далеко не каждый биотест способен определить, что найденная мишень для лекарства и отношение мишени к болезни – это взаимосвязанные или слабо коррелирующие явления.

В развитии атеросклероза участвует несколько молекулярных и клеточных систем, которые с точки зрения фармакотерапии могут рассматриваться как мишени для воздействия лекарственных препаратов.

Поиск эффективных препаратов для терапии атеросклероза связан, видимо, с выявлением плейотропных антиатеросклеротических веществ, действующих одновременно на несколько мишеней и обладающих аддитивным/синергетическим фармакотерапевтическим эффектом.

В последние годы разработан биотест - клеточная модель на основе первичной культуры клеток аорты человека для скрининга потенциальных лекарственных препаратов, изучения механизмов их действия, а также оптимизации антиатеросклеротическим лекарственной терапии. С помощью коллагеназы и эластазы клетки выделяются из субэндотелиального слоя интимы как нормальной, так и атеросклеротической части аорты [310,318]. Используя формальные критерии, клетки, культивируемые из интимы, могут быть классифицированы как клетки гладкомышечного происхождения. По некоторым расчетам, в первичной культуре субэндотелиальных клеток аорты содержится около 90% гладкомышечных клеток, которые взаимодействуют с антителами к альфа-актину. Кроме того, клетки, культивированные из субэндотелиальной части интимы, имеют ультраструктурные особенности, характерные для гладкомышечных клеток, а именно базальную мембрану и пучки филаментов с плотными тельцами [301,311].

Клетки субэндотелиального слоя интимы, выделенные из атеросклеротических поражений, сохраняют при культивировании все основные характеристики атеросклеротических клеток. Культуры клеток из жировой полосы и зон жировой инфильтрации обладают повышенной пролиферативной активностью, более высокой, чем у клеток, культивированных из непораженных участков интимы [302,306].

Многие клетки, культивируемые из атеросклеротического поражения, являются пенистыми клетками, поскольку содержат многочисленные включения в виде липидных капель, которые полностью заполняют цитоплазму. Основная часть избыточных липидов в пенистые клетки представлена свободным холестерином и эфирами холе-

стерина. Следует отметить, что состав и содержание липидов в культуре клеток в течение первых 10–12 дней культивирования остаются неизменными и соответствуют показателям свежесыводенных клеток [302,306]. Клетки, культивированные из субэндотелиального слоя интимы, способны синтезировать коллаген, протеогликаны и другие компоненты внеклеточного матрикса [301].

Таким образом, клетки, выделенные из атеросклеротического поражения аорты человека, при культивировании сохраняет все основные свойства, характерные для атеросклеротических клеток. Они обладают повышенной пролиферативной активностью, содержат избыток холестерина в виде внутриклеточных включений и синтезируют внеклеточный матрикс. Эти характеристики позволяют рассматривать культуру атеросклеротических клеток как удобную модель для исследования влияния различных агентов на атеросклеротические проявления. Исследования проводятся непосредственно именно на тех клетках, которые требуют терапевтического воздействия в естественных условиях [303,308,309].

С использованием клеточного теста представляется возможным проведение дальнейших испытаний, необходимых для потокового скрининга лекарственных средств, обладающих антиатеросклеротическим эффектом.

При оценке влияния какого-либо внешнего воздействия, лекарственного или нелекарственного, на начальные проявления атеросклероза на клеточном уровне, изучение тонких механизмов воздействия на содержание липидов в клетках является весьма трудоемким процессом. Тем не менее, мы можем напрямую оценивать интегральный эффект подобного воздействия, измеряя уровень внутриклеточных липидов, не затрагивая более глубоких механизмов, лежащих в основе антиатерогенного действия препаратов. При этом мы вполне обоснованно предполагаем, что уменьшение содержания внутриклеточных

липидов, независимо от вызвавшей его причины, характеризует патогенетическую направленность воздействия и теоретически может привести к торможению процессов атерогенеза, а на морфологическом и клиническом уровне – к регрессии атеросклероза.

Два интегральных показателя (атерогенность сыворотки крови и содержание внутриклеточных липидов) дали возможность разработки системы для оценки проатерогенных или антиатерогенных свойств лекарственных и нелекарственных средств (так называемой модели исследований *ex vivo*). Сущность этой модели состоит в следующем. Человек с известной атерогенностью сыворотки крови однократно принимает исследуемый препарат, и у него через определенные интервалы времени после приема препарата берут кровь на исследование. Сыворотку крови добавляют в клеточную культуру и оценивают, насколько прием препарата изменил ее атерогенные свойства, то есть в какой степени изменяется индуцированное сывороткой крови накопление холестерина в клетках после приема препарата по сравнению с исходными показателями атерогенности. Этот подход позволяет не только установить направленность эффекта препарата, но также оценить его выраженность и длительность. 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.

В наибольшей степени интересны натуральные продукты, обладающие антиатерогенным действием, поскольку именно они стали материальной основой для разработки ППП, предназначенных для патогенетической профилактики атеросклероза.

Таким образом, с учетом массовой распространенности субклинического атеросклероза решается задача разработки нелекарственных подходов к антиатерогенной и антиатеросклеротической терапии,

основанной на подавлении процессов внутриклеточного накопления холестерина в сосудистой стенке. К настоящему времени из растений, обладающих антиатерогенным действием, наибольшее внимание привлек чеснок (*Allium sativum*).

Разрабатываются также и клеточные модели для поиска фармакологических веществ прямого патогенетического антиатеросклеротического действия, основанного на оттоке холестерина из клеток сосудистой стенки. Отток холестерина, являющийся составной частью механизма обратного транспорта холестерина в организме – это обратная сторона накопления холестерина в артериальных клетках. Именно накопление внутриклеточного холестерина и его отток определяют, произойдет ли ретенция (удержание) холестерина в сосудистой стенке. Стимуляция оттока холестерина не менее важна для устранения риска развития атеросклероза, чем предотвращение накопления внутриклеточного холестерина. На клеточном уровне отток холестерина – это проявление регрессии атеросклероза.

В еще одной клеточной модели, культуре клеток эндотелия, рядом авторов изучена экспрессия молекул адгезии (ICAM-1, E-селектин) и факторов роста (PDGF, bFGF, TGF β) человека в норме и при атеросклерозе. Установлено, что при атеросклерозе экспрессия ICAM-1, E-селектина, bFGF, TGF β снижается, тогда как синтез ростового фактора PDGF не изменяется. Эта модель показала возможность применения пептида Lys-Glu-Trp в качестве потенциального лекарственного средства для таргетной терапии атеросклероза [36].

Полученные данные позволяют с оптимизмом рассматривать возможность применения уже применяемых и разрабатываемых биомоделей для создания новых антиатеросклеротических лекарственных и нелекарственных оздоровительных средств и для изучения механизмов их действия.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования

Приготовление водного настоя растений

Водные экстракты исследуемых натуральных компонентов получали с помощью ИФБ по методу Gebhardt [2]. Навеску сухой травы заливали кипящей водой и настаивали в закрытой емкости в течение 1 ч при комнатной температуре. Очистку экстракта от неполярных соединений проводили трижды равным объемом хлороформа. Настой фильтровали через бумажные фильтры 0,1 мм и хранили до употребления в холодильнике при 4°C не более 6 ч. В экспериментах добровольцы получали также перорально настои растений и препараты растительного происхождения в форме порошка.

Взятие крови, получение лейкоцитов и сыворотки крови

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 изотоническом фосфатном буфере (ИФБ). 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 ИФБ. В стерильную пластиковую пробирку вносили фиколл (Flow Laboratories) из расчета 0,5 мл на 1 мл полученной суспензии форменных элементов крови. На фиколл 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). Количество полученных клеток подсчитывали под микроскопом Amplival в гемоцитометре.

Кровь в количестве 5-7 мл брали стерильным одноразовым пластиковым шприцом из локтевой вены в сухую пластиковую пробирку с завинчивающейся крышкой объемом 15 мл. Пробирку с кровью выдерживали при комнатной температуре в течение 1 часа для образования сгустка, затем в холодильнике при +4°C в течение 1 часа для ретракции сгустка. Сгусток отделяли стеклянной палочкой от стенок пробирки. Пробирку центрифугировали в настольной центрифуге Beckman TJ-6 при 1800 g в течение 15 мин. Полученную сыворотку крови (без примеси эритроцитов) разливали в пластиковые пробирки типа «Эппендорф» по 1 мл. Сыворотки крови хранили в замороженном состоянии (при -18°C) до проведения исследования.

Выделение моноцитов из крови человека

Для получения моноцитов взятие крови производили утром натощак в стерильные пробирки, содержащие цитрат натрия в качестве антикоагулянта. В качестве доноров крови выступали здоровые добровольцы, не имеющие признаков острых или хронических заболеваний. Полученные образцы крови использовали для выделения моноцитов. Для прямого выделения коллоидный раствор парамагнитных наночастиц добавляли непосредственно к образцу крови из расчета 30 мкл на 5 мл цельной крови. Образец тщательно перемешивали и инкубировали при 10°C и постоянном перемешивании в течение 15 минут. Полученный образец наносили на колонку, помещенную в магнитный сепаратор. После прохождения образца через колонку ее промывали 4 раза 3 мл буфера для магнитной сепарации. Промытую колонку вынимали из сепаратора и перемещали в стерильную пробирку объемом 15 мл. Клетки элюировали 5

мл буфера для сепарации. После элюции клетки отмывали 1 раз стерильным фосфатным буфером и ресуспендировали в концентрации 10^6 клеток/мл в среде «X-vivo 10». Полученную суспензию клеток распределяли в 24-гнезную плашку из расчета 2×10^5 клеток на лунку.

Моноциты также выделяли из побочных продуктов приготовления консервов крови – лейкоцитной пленки. Лейкоцитную пленку разводили буфером PBS, содержащим Ca^{2+} и Mg^{2+} (Biochrom) в соотношении 1:1. Полученную суспензию (35 мл) наслаивали на 15 мл фикола плотности 1.077 (Biochrom) в пробирке LeucoserTM (Greiner). Образцы центрифугировали 30 мин (Beckman Coulter) при 650xg. Мононуклеарную фракцию собирали с интерфазы фикол/сыворотка, переносили в свежие пробирки и два раза отмывали буфером PBS. Во время первого центрифугирования готовили непрерывный градиент на основе перкола (PercollTM GE Healthcare). Полученную смесь помещали в 50 мл пробирку и центрифугировали при 12000xg в течение 10 мин при 20⁰C с отключенными тормозами в роторе F34-6-38 (Eppendorf). Отмытые клетки ($5-8 \times 10^8$) ресуспендировали в 5 мл PBS и наносили на полученный градиент. Градиенты центрифугировали при 650xg в течение 30 мин при 20⁰C с отключенными тормозами. В результате центрифугирования популяция клеток разделялась на две фракции. Фракция, находившаяся в верхней части градиента содержала клеточную суспензию обогащенную моноцитами до 60-80%. Эту фракцию собирали, и 3 раза отмывали буфером PBS. Полученная клеточная популяция была использована для некоторых экспериментов напрямую. При необходимости получения популяций клеток, содержащих более 90% моноцитов, обогащенная моноцитами фракция, использовалась для магнитной сортировки CD14+ клеток при помощи набора для выделения моноцитов (Miltenyi Biotec). Полученная таким образом клеточная популяция содержала 92-95% моноцитов, что контролировалось при помощи анализа поверхностной экспрессии маркера моноцитов CD14. Макрофаги культивировали

в концентрации 1×10^6 клеток/мл в бессывороточной среде X-VIVO 10™ (Cambrex), содержащей цитокины.

Получение плазмы крови и липопротеидов

Кровь брали из локтевой вены донора с утра после двенадцатичасового голодания в пластиковую пробирку, содержащую 1% этилендиамидтетраацетат натрия (ЭДТА). Клетки крови отделяли двукратным центрифугированием по 15 минут при 2500 об/мин на центрифуге TJ-6 Beckman (Industrial Estate Mervue, Galuay, Ирландия).

Для выделения липопротеидов к полученной плазме добавляли твердую соль NaBr (до конечной концентрации 0,5 г/мл). 5 мл образцов засоленной плазмы помещали в 16x76-мм поликарбонные центрифужные пробирки (Beckman Instruments, Palo Alto, CA), после чего наслаивали на них 5 мл раствора NaBr (1,019 г/мл). После ультрацентрифугирования в течение 2 часов при 41000 об/мин на роторе 65 Ti (Beckman) отбирали зоны флотировавших градиенте концентрации NaBr липопротеидов очень низкой, промежуточной и низкой плотности. Для очистки от примесных белков в образцы ЛНП повторно добавляли NaBr (до конечной концентрации 0,5 г/мл) и центрифугировали при тех же условиях. В образцы ЛОНП+ЛПП вносили NaBr (до конечной концентрации 0,5 г/мл). В центрифужные пробирки вносили по 5 мл препарата смеси липопротеидов и наслаивали 5 мл изотонического фосфатного буфера (ИФБ, 1,006 г/мл), после чего центрифугировали в течение 10 мин. (41000 об/мин, ротор 65 Ti). Разделившиеся фракции ЛОНП и ЛПП отбирали. Полученные образцы липопротеидов (ЛОНП, ЛПП, ЛНП) диализовали при 4°C в течение ночи в темноте против 2000 объемов ИФБ, после чего стерилизовали путем фильтрации (диаметр пор 0,45 мкм).

Для выделения ЛВП к оставшейся после первого ультрацентрифугирования плазме добавляли NaBr (до конечной концентрации 0,5 г/мл).

В центрифужные пробирки вносили по 5 мл плазмы и наслаивали 5 мл раствора NaBr (1,063 г/мл). Пробы подвергали ультрацентрифугированию в течение 18 часов (41000 об/мин, ротор 65 Ti). ЛВП и липопротеид-дефицитную плазму диализовали при 4°C в течение ночи против 2000 объёмов ИФБ (плазму диализовали с двойной сменой буфера), после чего стерилизовали фильтрацией (диаметр пор 0,45 мкм).

2.2 Биохимические методы исследования

Измерение экспрессии молекулы гистосовместимости II типа (HLA-DR)

Клетки отмывали пять раз 200 мкл 0,2% раствора бычьего сывороточного альбумина (БСА) в ИФБ. Для подавления эндогенной пероксидазной активности в лунки добавляли по 200 мкл 3% H₂O₂ на 10 мин при комнатной температуре. Клетки промывали пять раз 200 мкл 0,2% БСА-ИФБ. В лунки вносили 200 мкл 2% БСА-ИФБ и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Лунки промывали пять раз 200 мкл 0,2% БСА-ИФБ. К клеткам добавляли 200 мкл 2% БСА-ИФБ, содержащего мышинные моноклональные антитела против человеческой молекулы гистосовместимости II типа, из расчета 1 мкг антител на 200 мкл БСА-ИФБ. Клетки инкубировали 1 ч при 37°C. Лунки промывали 0,2% БСА-ИФБ. В лунки вносили по 200 мкл козьих поликлональных антител против иммуноглобулинов мыши, меченых пероксидазой, и инкубировали 1 ч при 37°C. Клетки промывали пять раз 200 мкл 0,2% БСА-ИФБ. Добавляли 200 мкл субстратного буфера: 12 мл 0,1 М цитратного буфера pH=4,5, 5 мг о-фенилендиамина, 18 мкл 3% H₂O₂. Инкубировали 30 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 40 мкл 50% H₂SO₄. Оптическую плотность измеряли при длине волны 492 нм на спектрофотометре Multiskan Bichromatic (Labsystems). В качестве контроля использовали лунки, в которых не было клеток.

Измерение экспрессии молекулы межклеточной адгезии-1 (ICAM-1)

Клетки отмывали пять раз 200 мкл 0,2% раствора бычьего сывороточного альбумина (БСА) в ИФБ. Для подавления эндогенной пероксидазной активности в лунки добавляли по 200 мкл 3% H_2O_2 на 10 мин при комнатной температуре. Клетки промывали пять раз 200 мкл 0,2% БСА-ИФБ. В лунки вносили 200 мкл 2% БСА-ИФБ и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Лунки промывали пять раз 200 мкл 0,2% БСА-ИФБ. К клеткам добавляли 200 мкл 2% БСА-ИФБ, содержащего мышинные моноклональные антитела против человеческой молекулы межклеточной адгезии-1, из расчета 1 мкг антител на 200 мкл БСА-ИФБ. Клетки инкубировали 1 ч при 37°C. Лунки промывали 0,2% БСА-ИФБ. В лунки вносили по 200 мкл козьих поликлональных антител против иммуноглобулинов мыши, меченых пероксидазой, и инкубировали 1 ч при 37°C. Клетки промывали пять раз 200 мкл 0,2% БСА-ИФБ. Добавляли 200 мкл субстратного буфера: 12 мл 0.1 М цитратного буфера pH=4.5, 5 мг о-фенилендиамина, 18 мкл 3% H_2O_2 . Инкубировали 30 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 40 мкл 50% H_2SO_4 . Оптическую плотность измеряли при длине волны 492 нм на спектрофотометре Multiskan Bichromatic (Labsystems). В качестве контроля использовали лунки, в которых не было клеток.

Измерение экспрессии интерлейкина-1 (IL-1) и фактора некроза опухоли-альфа (TNF- α)

Клетки отмывали пять раз 200 мкл 0,2 % БСА-ИФБ. Для подавления эндогенной пероксидазной активности в лунки добавляли по 200 мкл 3% H_2O_2 на 10 мин при комнатной температуре. Клетки промывали пять раз 200 мкл 0,2% БСА-ИФБ. В лунки вносили 200 мкл 2% БСА-ИФБ и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Лунки промывали пять раз 200 мкл 0,2% БСА-ИФБ. К клеткам добавляли 200 мкл 2% БСА-ИФБ, содержащего кроличьи поликлональные антите-

ла против человеческого интерлейкина-1 (3 мкг/мл) или фактора некроза опухоли-альфа (5 мкг/мл). Клетки инкубировали 1 ч при 37°C. Лунки промывали 0,2% БСА-ИФБ. В лунки вносили по 200 мкл козьих поликлональных антител против иммуноглобулинов кролика, меченных пероксидазой, и инкубировали 1 ч при 37°C. Клетки промывали пять раз 200 мкл 0.2% БСА-ИФБ. Добавляли 200 мкл субстратного буфера: 12 мл 0.1 М цитратного буфера pH=4.5, 5 мг ортофенилиндиамина, 18 мкл 3% H₂O₂. Инкубировали 30 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 40 мкл 50% H₂SO₄. Оптическую плотность измеряли при длине волны 492 нм на спектрофотометре Multiskan Bichromatic. В качестве контроля использовали лунки, в которых не было клеток.

Определение содержания внутриклеточного холестерина

Внутриклеточные липиды трижды экстрагировали в течение 30 мин смесью гексана и изопропанола (3:2, объем/объем). Экстракт переносили в 96-гнездный микротест и упаривали 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), добавляли по 25 мкл изопропанола и по 100 мкл раствора «Monotest» (Boehringer Mannheim) для определения общего холестерина, содержащего 0,2 Ед/мл холестеринэстеразы, 0,1 Ед/мл холестериноксидазы, 0,1 Ед/мл пероксидазы хрена, 1 мМ 4-аминофеназон, 3 мМ фенол и 2 мМ 3,4-дихлорфенол в 50 мМ Трис-буфере, pH=7,7. В качестве стандарта использовали раствор холестерина в изопропаноле, 1 мг/мл (Boehringer Mannheim). Смесью инкубировали при 37°C в течение 30 мин, после чего измеряли оптическую плотность проб при длине волны 492 нм на многоканальном плащечном ридере Multiskan Bichromatic (Labsystems) и рассчитывали содержание общего холестерина в каждой пробе.

Для оценки внутриклеточного содержания холестерина клеточный монослой подвергали тройной экстракции липидов в системе гексан-изопропанол (3:2, объем/объем), 30 минут. Липидные экстракты переносили в пластиковые 96-луночные плашки для измерения флюоресценции (Fluoroplate Labsystems, Финляндия), после чего высушивали под током воздуха. В качестве стандарта использовали 2 мкг холестерина. К сухим экстрактам вносили 100 мкл раствора FeCl_3 (0,5% в ледяной уксусной кислоте). После этого в пробы добавляли 100 мкл концентрированной H_2SO_4 ; после тщательного перемешивания пробы оставляли на 1 час при 20°C. Уровень флюоресценции измеряли (λ поглощения – 544 нм, λ испускания – 584 нм) на приборе Fluoroskan II (Labsystems, Финляндия).

Измерение клеточного белка

Фиксированные на пластике клетки растворяли в 50 мкл 0,2 N NaOH при комнатной температуре в течение 12-16 часов, после чего определяли содержание клеточного белка в каждой пробе по методу Lowry et al. 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 N реактива Фолина (Sigma) и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Измеряли оптическую плотность проб на многоканальном спектрофотометре при длине волны 690 нм и рассчитывали содержание клеточного белка в каждой пробе. В качестве стандарта использовали раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) в 0,2 N NaOH, 1 мг/мл.

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 [6], каждая экстракция продолжалась по 30 мин. Нейтральные липиды разделяли методом тонкослойной хроматографии на силикагеле

Kieselgel 60 (E. Merck, Германия) в двух последовательных системах: (а) бензол – диэтиловый эфир – этанол – уксусная кислота в объемном соотношении 50:40:2:0,2 и (б) n-гексан – диэтиловый эфир – уксусная кислота в объемном соотношении 90:10:1. Фосфолипиды хроматографировали в системе метилацетат – n-пропанол – хлороформ – метанол – 0,25% KCl в объемном соотношении 25:25:25:10:9.

Определение пролиферативной активности. 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 (ЛКВ, Швеция).

Определение синтеза коллагена. Клетки, выделенные из нормальных или пораженных атеросклерозом участков интимы аорты человека, инкубировали в течение 24 ч в присутствии 5 мкКи/мл [³H]-пролина. По окончании инкубации включение меченого пролина в обработанную коллагеназой фракцию культуральной среды определяли по методу Peterkofsky и Diegelmann [337].

2.3 Морфологические методы исследования

Иммуноцитохимические методы

Для иммуноцитохимического типирования клеток в первичной культуре были использованы методы одинарного и двойного иммуноцитохимического выявления различных антигенов [86]. 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, перидитов) 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. Перидитоподобные клетки идентифицировали по положительному окрашиванию антителами 3G5 против антигена *о*-сиалоганглиозида и антителами 2A7 против высокомолекулярного меланома-ассоциированного антигена. Фагоцитирующие клетки идентифицировали по экспрессии макрофагального антигена CD68.

2.4 Клеточные культуры

Получение первичной культуры моноцитов-макрофагов крови человека

Клетки лейкоцитов ресуспендировали в 1 мл стерильного изотонического фосфатного буфера (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). Количество полученных клеток подсчитывали под микроскопом Amplival в гемоцитометре. Полученные описанным выше методом лейкоциты ресуспендировали в 10 мл среды 199, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco), антибиотики (преднизолон, стрептомицин и фунгизон), а также глютамин. Суспензию клеток вносили в пластиковый стерильный 48-гнездный или 24-гнездный мультивел для тканевых культур (Nuclon) с плотностью $1-2 \times 10^5$. Клетки инкубировали в CO₂-инкубаторе (5% CO₂ и 95% атмосферного воздуха) при 100% влажности и 37°C в течение 1 часа, после чего не-

прикрепившиеся клетки (грагулоциты) удаляли путем трехкратного промывания средой 199. К прикрепившимся клеткам (агранулоцитам) добавляли по 250 мкл среды 199, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, антибиотики (преднизолон, стрептомицин и фунгизон), а также глютамин. Полученную чистую культуру моноцитов культивировали в CO₂-инкубаторе (5% CO₂ и 95% атмосферного воздуха) при 100% влажности и 37°C в течение 14 суток до превращения их в макрофаги. Смену инкубационной среды проводили каждые 48 часов. В экспериментах использовали культуру на 14-й день культивирования.

Получение первичной культуры 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 оригинальным методом. 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, непораженные атеросклерозом, а также участки, соответствующие жировой полосе или липофиброзной бляшке. 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 коллагена-

зы II типа (Worthington Diagnostic System, США) в среде 199, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Flow, Великобритания), 2 mM 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 антибиотики и 10% эмбриональную телячью сыворотку, и повторно центрифугировали при тех же условиях. Осадок ресуспендировали в 10 мл ростовой среды и производили подсчет полученного количества клеток в счетной камере. Клетки рассаживали в пластиковый стерильный 96-гнездный микротест для тканевых культур (Nuncloп, Дания) из расчета $2-4 \times 10^4$ клеток на 1 см² культуральной поверхности. Клетки культивировали при 37°C в насыщенной водяными парами атмосфере, содержащей 95% воздуха и 5% углекислого газа в увлажняемом CO₂-инкубаторе (Forma Scientific, США). Смену среды проводили через день. Для экспериментов использовали 7-10-дневную первичную культуру клеток. Такая культура представляет собой смешанную клеточную популяцию, состоящую преимущественно из типичных гладкомышечных клетки перцитоподобных клеток. Клетки, полученные из непораженных и атеросклеротических участков интимы аорты человека, культивировали раздельно и использовали в экспериментах различных типов, что по-

звояло в дальнейшем использовать две клеточные модели, различающиеся по своим свойствам.

Выделение и культивирование клеток интимы артерий

(для определения цитокинов)

Фрагменты сосуда отмывали от компонентов крови в коммерческом фосфатном буфере (PBS). Затем вырезали из сосуда участки интимы и вырезанные тканевые образцы обрабатывали смесью 0,15% коллагеназы (Sigma) и 0,01% эластазы (Sigma) на среде RPMI-1640, содержащей 10% телячью эмбриональную сыворотку, 0,01% глюкозу, антибиотики (100 ед/мл пенициллин, 100 мкг/мл стрептомицин), 25 мМ HEPES. На 10 мл ферментативного раствора добавляли приблизительно 1 г сырой массы ткани интимы, предварительно механически разрыхленной.

Переваривание проводили при 37°C со встряхиванием. Клетки интимы, выделенные из аорты, после полного «растворения» тканевого конгломерата (а также в ряде случаев посредством трипсинизации с использованием 0,07% трипсина на PBS) дважды промывали средой RPMI-1640 с 10% эмбриональной сывороткой, 2мМ глутамина и антибиотиками (посредством ресуспензирования осадка, полученного при центрифугировании пробирки, содержащей клетки при 700 об/мин). Клетки в ростовой среде высаживали на покровные стекла, покрытые коллагеном или другими адгезивами в чашках Петри, и культивировали в атмосфере, содержащей 95% воздуха и 5% CO₂ при 37°C. Через 12 часов клетки исследовали, используя возможности ТЭМ. В некоторых экспериментах культуры клеток были подвержены иммуногистохимическому исследованию с использованием вторичных антител меченых коллоидным золотом, полученных из Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.

Гладкомышечные клетки, культивируемые из непораженной интимы аорты человека

Гладкомышечные клетки выделяли из непораженной интимы аорты человека, обрабатывая ткань 0,1% раствором коллагеназы IV типа (Sigma). Для оценки накопления липидов, гладкомышечные клетки инкубировали 24 часа при 37°C в среде 199 (GIBCO Europe, Paisley, UK), содержащей 10% липопротеиддефицитной сыворотки и ЛНП (100 мкг апВ/мл). Контрольные клетки инкубировали в среде, не содержащей ЛНП. Белок клеток и липопротеидов определяли по методу Лоури.

Для получения макрофагов человека моноцитарного происхождения использовали свежеполученную кровь, которую подвергали центрифугированию (3000 об/мин, 10 мин) для осаждения клеточных компонентов. Осадок клеток суспендировали в равном объеме ИФБ. Суспензию наслаивали в пробирки, содержащие фикал (2 объема суспензии на 1 объем фикола), после чего центрифугировали 10 мин. при 3000 об/мин. Клетки белой крови, флотировавшие к границе раздела фаз, отбирали и промывали с помощью трехкратного центриугирования в ИФБ (3000 об/мин, 10 мин). В дальнейшем клетки культивировали 14 дней при 37°C в среде 199, содержащей 5% фетальной телячьей сыворотки.

2.5. Экспериментальные модели

2.5.1 Ферментативная модель для определения сиалидазной активности и поиска агентов, препятствующих атерогенной модификации ЛНП

Получение липопротеид-дефицитной плазмы

Для получения липопротеид-дефицитной плазмы плотность 4 мл плазмы доводили до 1,39 г/мл сухим NaBr, наслаивали 6 мл раствора NaBr с плотностью 1,065 г/мл и центрифугировали в течение 15-ти ча-

сов при 40000 об/мин (ротор 50Ti, Beckman Instruments, США). Флотировавшие липопроотеиды удаляли и липопроотеид-дефицитную плазму диализовали в течение ночи при 4°C против 4000 объемов 50 mM Tris-HCl буфером (pH 7.0).

Выделение сиалидазы из липопроотеиддефицитной плазмы крови методом аффинной хроматографии

Липопроотеиддефицитную плазму (0,7 мл) наносили на колонку, содержащую 2 мл сефарозы с ковалентно-связанной с ней полисиаловой кислотой (Neu5Ac α 2-8Neu5Ac-Sepharose FF6; Syntosome GmbH, Munich, Germany; сорбент был любезно предоставлен Н.В. Бовиным, Институт Биоорганической Химии, Москва), предварительно промытой 30 мл 50 mM Tris-HCl (pH 7,0). После прохождения плазмы колонку промывали 15 мл 50 mM Tris-HCl (pH 7,0). Связавшийся фермент элюировали 5 мл 5 mM раствора сиаловой кислоты. Полученный раствор фермента диализовали против 1000 объемов 10 mM Tris-HCl в течение суток с тройной сменой буфера. Далее фермент концентрировали методом мембранной ультрафильтрации (Amicon systems, USA, 1000 MW cut off). Все описанные выше процедуры проводились при 4°C. Полученный препарат фермента разделяли на аликвоты (200 мкл, концентрация белка 50-200 мкг/мл) и хранили при -70°C.

Мечение сиаловой кислоты, входящей в состав фетуина, тритием

К 250 мкл раствора фетуина (2 мг/мл) добавляли равный объем 0,1 M ацетатного буфера (pH 4,0). Реакционную смесь охлаждали до +4°C, помещали в ледяную баню, и вносили 50 мкл свежеприготовленного водного раствора 10 mM NaIO₄. Смесь инкубировали 10 минут при постоянном перемешивании. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл глицерина, после чего пробы инкубировали 10 мин при тех же условиях. Полученный раствор диализовали против 2000 объемов фосфатно-солевого буфера (pH 7,0) при +4°C с двойной сменой буфера в течении

суток. В раствор, содержащий окисленный субстрат, при комнатной температуре вносили 10 мкл $\text{NaB}[\text{}^3\text{H}]\text{}_4$ в 0,1 М NaOH (1 мКи). Пробы инкубировали 30 мин. при 20°C при постоянном перемешивании. Затем в инкубационную смесь вносили 10 мкл 0,1 М немеченого NaBH_4 и инкубировали 30 минут при тех же условиях. Препараты диализовали в течение 48 часов против 2000 объемов фосфатно-солевого буфера (pH 7,0) с четырьмя сменами буфера. Полученный меченый фетуин стерилизовали фильтрацией (диаметр пор 450 нм).

Получение агарозного геля, ковалентно связанного с фетуином, меченым тритием по сиаловой кислоте

300 мкг сухой бромциан-активированной агарозы суспендировали в 15 мл 1 mM HCl (pH 4,5) и инкубировали 1 час при постоянном перемешивании для набухания. Гель центрифугировали 10 мин при 3150 g, супернатант удаляли, а осадок промывали 15 мл 1 mM HCl, после чего гель центрифугировали при тех же условиях. Осадок промывали 15 мл 0,2 М карбонатно-бикарбонатного буфера (pH 8,5), затем центрифугировали при тех же условиях, супернатант удаляли.

К промытой активированной агарозе добавляли 5 мл раствора фетуина (0,4 мг/мл), меченного тритием по сиаловой кислоте. Пробы инкубировали 2 часа при комнатной температуре и постоянном перемешивании. После инкубации суспензию центрифугировали 10 мин при 3150 g, супернатант удаляли. Для блокировки непрореагировавших CN-групп к осадку прибавляли 15 мл 20 mM глицинового буфера (pH 8,5) и смесь инкубировали 1 час при постоянном перемешивании. Полученный гель промывали по 5 раз попеременно 20 мл 0,2 М ацетатного (pH 4,5) и 0,2 М карбонатно-бикарбонатного (pH 8,5) буферов. К осажденному гелю прибавляли 2 мл 50 mM Tris-HCl (pH 7,0) и хранили при 4°C.

Получение десалированного фетуина и трансферина методом кислотного гидролиза

К 5 мг белка прибавляли 1 мл 0,1 н серной кислоты. Смесь нагревали на водяной бане (80°C) в течение 1 часа. По окончании инкубации раствор белка нейтрализовали 0,1 н NaOH до pH 7,0; пробы диализовали против фосфатно-солевого буфера (pH 7,0) при +4°C в течение ночи с несколькими сменами буфера и стерилизовали фильтрацией (диаметр пор 450 нм).

Модель ин-витро - определение активности сиалидазы с использованием в качестве субстрата [³H]-меченного фетуина, трансферина, липопротеидов, ковалентно связанных с агарозой

Реакционная смесь содержала от 5 до 25 мкг фермента, 10 мкл суспензии [³H]-меченого фетуина, связанного с агарозой (донор сиаловой кислоты), 0,5 мг/мл акцептора сиаловой кислоты (десалированный фетуин), 10 мкл 20 мМ раствора CaCl₂ (конечная концентрация 2 мМ), 5 мкл 20 мМ дитиотриэтола (ДТТ) (конечная концентрация 1 мМ). Объем реакционной смеси доводили до 100 мкл 50 мМ Tris-HCl (pH 7,0). Инкубацию проводили при 37°C, в темноте, при постоянном перемешивании. По истечении времени инкубации к реакционной смеси добавляли 300 мкл воды и центрифугировали 10 мин при 4500 об/мин. После этого отбирали 200 мкл супернатанта и переносили его во флаконы для жидкостно-сцинтилляционного счета, содержащие 5 мл сцинтилляционной жидкости (ЖС-8, Реахим, Украина) и измеряли уровень радиоактивности на жидкостно-сцинтилляционном счетчике 1215 Rack-Beta (LKB, Швеция).

Модель экс-виво

Влияние на активность сиалидазы оценивалось в лабораторно-клинических исследованиях при измерении сиалидазной активности в крови после приема исследуемого агента (натурального продукта). Добровольцы принимали однократную дозу натурального продукта,

после чего у них забирали кровь через 4 и 8 часов для получения сыворотки.

К 200 мкл исследуемой сыворотки крови добавляли 60 мкл суспензии меченого тритием фетуина (донора сиаловой кислоты), связанного с агарозой. Определение ставили в двух вариантах: с добавлением 30 мкл десиалированного фетуина (акцептора сиаловой кислоты) и без него.

Объем реакционной смеси доводили до 300 мкл 50мМ Tris-HCl (рН 7,0). Инкубацию проводили при 37°C, в темноте, при постоянном перемешивании в течение 3 часов. По истечении времени инкубации к реакционной смеси добавляли 200 мкл воды и центрифугировали 10 мин при 3150 g. После этого отбирали 200 мкл супернатанта и переносили его во флаконы для жидкостно-сцинтилляционного счета, содержащие 5 мл сцинтилляционной жидкости (ЖС-8, Реахим, Украина) и измеряли количество бета-распадов трития на жидкостно-сцинтилляционном счетчике 1215 Rack-Beta (LKB, Швеция). Сиалидазную активность в сыворотке взятой крови сравнивали с активностью фермента в крови, взятой до приема продукта.

2.5.2 Клеточная модель интимы аорты для оценки накопления холестерина, оттока холестерина и образования цитокинов

Методика выделения и культивирования субэндотелиальных клеток интимы аорты человека описана в разделе «Методы исследования. Клеточные культуры».

Клетки, полученные из непораженных и атеросклеротических (пораженных) участков интимы аорты человека, культивировали отдельно и использовали в экспериментах различных типов, что позволяло в дальнейшем использовать две клеточных модели, различающиеся 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.

Накопление холестерина

1. Модель *in vitro*

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 модифицированных ЛНП и исследуемых веществ *in vitro* (прямое подавление клеточных проявлений атеросклероза),

2. Модель *ex vivo*

В модели *ex vivo* также 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.

Стимуляция накопления внутриклеточного холестерина

В день эксперимента культуральную среду заменяли на свежую среду 199 и к ней добавляли исследуемые агенты или сыворотку в концентрации 10%. Контрольные клетки инкубировали в среде 199, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Клетки инкубировали в течение 24 часов, после чего трижды отмывали ИФБ. По окончании эксперимента клетки фиксировали смесью гексана и изопропанола в соотношении 3:2.

Расчет атерогенного эффекта (оценка атерогенности сыворотки крови).

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

в контроле. Сыворотка крови пациента, вызывавшая статистически достоверное накопление внутриклеточного холестерина, рассматривалась как атерогенная.

Оценка оттока холестерина (антиатеросклеротического эффекта) в модели *in vitro*.

Для изучения антиатеросклеротического действия исследуемых веществ использовали первичную культуру субэндотелиальных клеток из пораженных атеросклерозом участков интимы аорты человека. Клетки выделяли из жировых атеросклеротических поражений. Такие клетки сохраняют в культуре избыточное содержание холестерина, являющееся основным проявлением атеросклероза на клеточном уровне. Использование этого подхода не предусматривает искусственной нагрузки культивируемых клеток холестерином.

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

Оценка оттока холестерина (антиатеросклеротического эффекта) в модели *ex vivo*.

Исследования соответствовали требованиям, предъявляемым стандартом качественных клинических испытаний (Good Clinical Practice, GCP) к исследованиям фазы I и II. У добровольцев брали кровь

(для получения сыворотки) непосредственно перед приемом исследуемого вещества, а также через соответствующие интервалы времени после его приема внутрь (обычно через 2, 4 и 6 часов при скрининговых исследованиях и при оценке краткосрочного действия, а также через 4, 8, 12 и 24 часа при оценке длительности эффекта). Инкубацию клеток из атеросклеротического поражения с сыворотками крови, экстракцию липидов из клеток и определение клеточного белка проводили, как описано в Методах. Эффект на отток холестерина (антиатеросклеротический эффект) исследуемых веществ в модели *ex vivo* определяли как их способность статистически достоверно снижать содержание холестерина в культивируемых атеросклеротических клетках. Существенной особенностью данной модели является возможность оценки антиатеросклеротического потенциала различных веществ (а также их активных метаболитов) после усвоения, распределения и биотрансформации в организме человека, то есть получение специфических фармакодинамических характеристик. Данная модель максимально приближена к ситуации в организме, что позволяет легко интерпретировать результаты, полученные на этой модели. Поскольку в сыворотке содержатся все компоненты, которые могут влиять на отток холестерина, получаемые данные следует рассматривать как интегральный показатель, отражающий конечный результат влияния всех возможных эффекторов на отток холестерина.

Измерение экспрессии цитокинов (in vitro, ex vivo)

Стимуляция экспрессии маркеров воспаления в культивируемых клетках

В день эксперимента культуральную среду заменяли на свежую среду 199 и к ней добавляли бактериальный липополисахарид (Sigma) в концентрации 1 мкг/мл, а также исследуемый агент в концентрации 1 мг/мл (*in vitro*). При оценке провоспалительного потенциала сыво-

ротки крови человека вместо агента добавляли исследуемую сыворотку в концентрации 10% (*ex vivo*).

Контрольные клетки инкубировали в среде 199, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Клетки инкубировали в течение 24 часов, после чего трижды отмывали ИФБ. По окончании эксперимента клетки фиксировали добавлением холодного 96% метанола на 10 мин при комнатной температуре.

Измерение экспрессии молекулы гистосовместимости II типа (HLA-DR), молекулы межклеточной адгезии-1 (ICAM-1), интерлейкина-1 (IL-1) и фактора некроза опухоли-альфа (TNF- α) описано в разделе «Методы. Биохимические методы исследования».

2.5.3 Клеточная модель моноцитов-макрофагов для оценки накопления и оттока холестерина

Методика выделения и культивирования моноцитов-макрофагов крови человека описана в разделе «Методы исследования. Клеточные культуры».

Накопление холестерина (in vitro, ex vivo)

1. Анализ накопления холестерина в моноцитах и макрофагах *in vitro*.

Эксперимент на моноцитах ставили через 24 часа инкубации, на макрофагах через 7 дней инкубации. В день эксперимента культуральную среду заменяли на среду DMEM с 10% липодефицитной сыворотки. К клеткам добавляли ЛНП (атерогенные липопротеиды низкой плотности, выделенные из крови больных атеросклерозом) в концентрации 100 мкг/мл по белку (в ряде экспериментов – одновременно с исследуемым агентом, например, гормоном). В качестве контроля использовали клетки, которые продолжали культивировать в среде без добавления ЛНП. Длительность инкубации составляла 3 часа для мо-

ноцитов и 12 часов для макрофагов. Липиды экстрагировали с использованием смеси гексан-изопропанол 3:2. В полученном экстракте определяли содержание холестерина ферментативным методом и нормировали на количество клеточного белка, определяемого по методу Лоури.

2. Анализ накопления холестерина в моноцитах и макрофагах *ex vivo*

Применялась стимуляция накопления внутриклеточного холестерина. В день эксперимента культуральную среду заменяли на свежую среду 199 и к ней добавляли исследуемую сыворотку в концентрации 10%. Контрольные клетки инкубировали в среде 199, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Клетки инкубировали в течение 24 часов, после чего трижды отмывали ИФБ. По окончании эксперимента клетки фиксировали смесью гексана и изопропанола в соотношении 3:2. В полученном экстракте определяли содержание холестерина ферментативным методом и нормировали на количество клеточного белка.

Отток холестерина (in vitro, ex vivo)

1. Методика *in vitro* для изучения оттока холестерина из культивируемых макрофагов

В качестве клеточной модели были выбраны первичные культуры макрофагов, полученные из моноцитов, выделенных из крови человека. Для дифференцировки моноцитов в макрофаги клетки сажали на 24-луночные планшеты и обрабатывали 100 нМ форбол-12-миристат-13-ацетатом в течение 72 ч до начала эксперимента.

Среду в культуре меняли каждые 2-3 дней. После 7 дней, когда моноциты полностью дифференцировались в макрофаги, они были нагружены меченым холестерином путем инкубации в течение 48 ч с [³H]холестерин-олеат-ацетил-ЛНП (25 мкг белка на лунку). Удельная

активность [^3H] холестеринолеата в ацетил-ЛНП была 50-90 dpm/нг белка. Была использована стандартная процедура нагрузки макрофагов холестеринном ацетил-ЛНП, которая была дозо-зависимой по крайней мере до 50 мкг/мл ацетил-ЛНП. Важно отметить, что наблюдалось зависящее от времени линейное увеличение эфиров холестерина в макрофагах при инкубации клеток с 25 мкг/мл ацетил-ЛНП до 48 ч. Большинство холестерина находилось в этерифицированной форме, содержание эфиров холестерина в пенистых клетках после нагрузки составляло в среднем $76 \pm 5,2\%$ от общей содержания холестерина в клетках. Воспроизводимость нагрузки была хорошей: содержания эфиров холестерина в липидных экстрактах из пенистых клеток было $116 \pm 11,8$ мкг/мг клеточного белка (среднее значение \pm SD, диапазон 101-126 мкг/мг клеточного белка). По сравнению с ненагруженными макрофагами, содержание эфиров холестерина в пенистых клетках возросло в 30–34 раз. Удельная активность эфиров холестерина в начале фазы оттока была 710 ± 42 dpm/мкг цитоплазмы. Изменения удельной активности эфиров холестерина между экспериментами (в расчете на SD, в процентах от среднего значения) была в пределах от 4 до 8%.

Помимо радиоизотопного метода определения оттока холестерина, в качестве альтернативы применялся высокочувствительный метод определения холестерина (раздел «Методы. Биохимические методы исследования»). Оба варианта методики при сопоставлении дали сравнимые результаты.

2. Методика *ex vivo* для изучения оттока холестерина из культивируемых макрофагов

В качестве основы для разработки методики *ex vivo* для изучения оттока холестерина из культивируемых макрофагов была использована методика, разработанная для варианта *in vitro* (описана выше). Существенным отличием от нее было то, что в культуру клеток добавляли не агенты (фармакологические вещества), а сыво-

року крови больных, принимавших различные препараты. Оценивалось влияние препарата на отток холестерина. Данная модель максимально приближена к ситуации в организме, что легко интерпретировать результаты, полученные на этой модели. Поскольку в сыворотке содержатся все компоненты, которые могут влиять на отток холестерина, получаемые данные следует рассматривать как интегральный показатель, отражающий конечный результат влияния всех возможных факторов на отток холестерина.

Используя разработанную модель, можно изучать влияние на отток холестерина как однократного приема препарата (острые пробы), так и длительного приема (курс лечения). Важным преимуществом этой модели является то, что она позволяет оценивать влияние на отток холестерина не только фармакологических препаратов, но и натуральных продуктов различного происхождения или продуктов питания.

2.6 Статистическая обработка данных

Статистическую оценку достоверности различий проводили с использованием пакета SPSS версии 12.0 (SPSS Inc., США). Графическую обработку данных проводили с использованием пакета SigmaPlot версии 7.0 (SPSS Inc., США). Достоверными считали различия при 95% вероятности безошибочного прогноза. Для оценки связи клинико-биохимических показателей и их изменений использовали корреляционный анализ по Пирсону с поправкой Бонферрони и регрессионный анализ. В окончательном виде данные для непрерывных величин представляли в виде среднего арифметического значения с указанием стандартной ошибки. Для статистической обработки данных использовали пакет статистических программ SPSS 10.0.1. Различия считали статистически значимыми при вероятности безошибочного прогноза более 95%.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Десиалирующая модификация липопротеидов низкой плотности как фактор атерогенности и поиск эффективных антиатерогенных ППП

Как отмечалось в обзоре литературы, в плазме крови больных с подтвержденным атеросклерозом была обнаружена десиалирующая активность. Также было показано, что при десиалировании ЛНП в плазме сиаловая кислота переносится на плазменные гликоконъюгаты – акцепторы, а не остается в свободном виде. Одной из форм обнаруженной активности может быть сиалитрансферазная или транс-сиалидазная активность. Для характеристики этой активности и использования полученных данных при разработке клеточных моделей нами была изучена субстратная и акцепторная специфичность транс-сиалидазы. На начальной стадии этих экспериментов требовалось подтвердить патогенетическую важность транс-сиалидазы за счет ее способности повышать атерогенность ЛНП в культуре клеток.

3.1.1 Влияние транс-сиалидазы на атерогенность ЛНП

На рис. 1 приведены данные о влиянии нативных и обработанных транс-сиалидазой ЛНП на содержание суммарного холестерина в гладкомышечных клетках, культивируемых из непораженной интимы аорты человека. Было показано, что нативные (сиалированные) липопротеиды низкой плотности не вызывали достоверного накопления липидов клетками во всех исследованных концентрациях. Инкубация ЛНП с транс-сиалидазой в приводила к тому, что до 60% липопротеидных частиц становились десиалированными. Как следствие, обработанные ферментом ЛНП в концентрациях 25-100 мкг/мл вызывали

1,3-2,4-кратное накопление холестерина гладкомышечными клетками непораженной интимы.

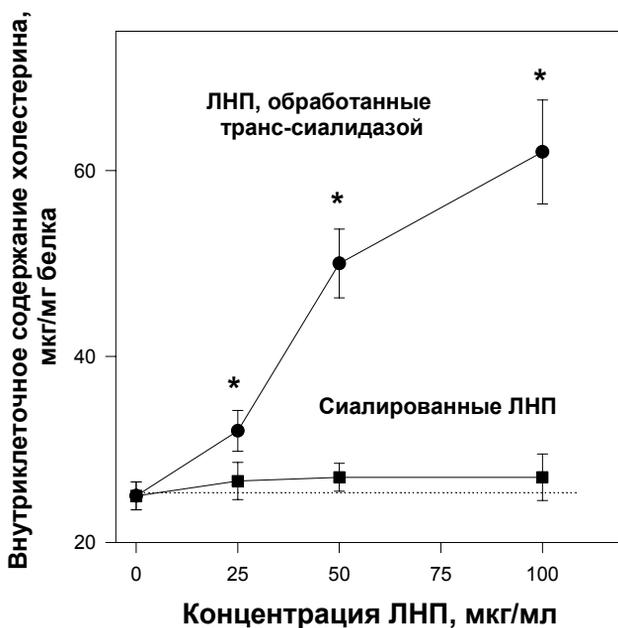


Рисунок 1 – Влияние сиалированных и обработанных транс-сиалидазой ЛНП на содержание суммарного холестерина в клетках, культивируемых из непораженной интимы аорты человека

Примечания

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

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

Таким образом, воздействие транс-сиалидазы плазмы крови человека на ЛНП приводит к возникновению у них атерогенности.

Для понимания механизмов действия транс-сиалидазы, переносящей с ЛНП сиаловую кислоту на акцепторы плазмы крови необходимо было изучить субстратную и акцепторную специфичность

транс-сиалидазы и использовать эти результаты при создании ферментативной модели.

3.1.2 Исследование донорной специфичности транс-сиалидазы плазмы крови

Для исследования донорной (субстратной) специфичности фермента в качестве доноров сиаловой кислоты были использованы [^3H]-меченые по сиаловой кислоте ЛНП, фетуин и трансферин. На рис. 2 представлена зависимость скорости переноса сиаловой кислоты транс-сиалидазой с глико- и липопротеидов на десилированный фетуин от времени инкубации.

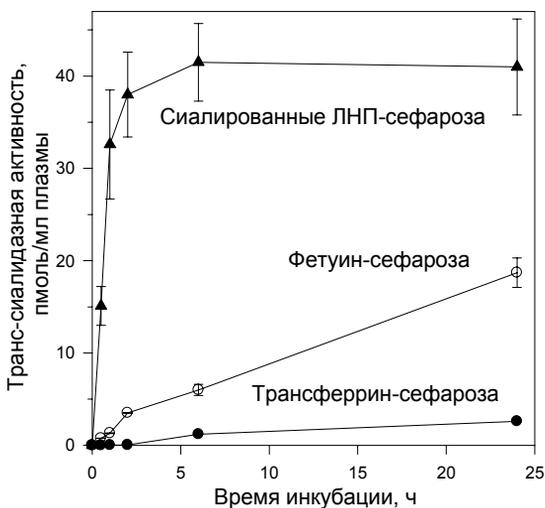


Рисунок 3.2 – Временная зависимость скорости переноса сиалидазой сиаловой кислоты с иммобилизованных на сефарозе фетуина, трансферина и ЛНП на асиалофетуин

Примечания:

1 Инкубацию проводили при 37°C рН 7,0.

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

Наиболее эффективно перенос сиаловой кислоты осуществлялся с ЛНП. Так, через 60 минут инкубации скорость переноса сиаловой кислоты с ЛНП была в 25 раз выше, чем с фетуина, и в 326 раз выше, чем с трансферина. Следовательно, липопротеиды являлись более предпочтительным, по сравнению с исследованными гликопротеидами плазмы, субстратом для транс-сиалидазы. Необходимо заметить, что величина активности линейно зависела от концентрации транс-сиалидазы в реакционной пробе в исследованном интервале от 0 до 100 мкг/мл (рис. 3.3).

Липопротеиды плазмы крови. В табл. 1 приведены данные по скорости переноса сиаловой кислоты транс-сиалидазой с разных подфракций липопротеидов на десалированный фетуин. В качестве субстрата использовали [^3H] меченные по сиаловой кислоте сиалированные (нативные) и десалированные (циркулирующие модифицированные) липопротеиды. Все липопротеиды вносили в реакционную смесь в равных, по количеству сиаловой кислоты, количествах. Наибольшая скорость переноса сиаловой кислоты транс-сиалидазой наблюдалась при использовании в качестве субстрата сиалированных ЛНП. Так, перенос сиаловой кислоты с нативных ЛНП осуществлялся со скоростью, превышающей скорость переноса с множественно модифицированных ЛНП в 17 раз. Перенос сиаловой кислоты с нативных ЛПП шел в 13 раз медленнее, чем с нативных ЛНП. Скорость переноса сиаловой кислоты в присутствии нативных ЛОНП и ЛВП была значительно ниже наблюдаемой для ЛНП и ЛПП. Скорость переноса сиаловой кислоты с нативных ЛОНП была ниже в 50 раз, а с нативных ЛВП – в 456 раз по сравнению со скоростью переноса с нативных ЛНП. Транс-сиалидаза в целом более эффективно переносила сиаловую кислоту с нативных липопротеидов, чем с циркулирующих модифицированных липопротеидов. Скорости переноса сиаловой кислоты с сиалированных и циркулирующих модифицированных липопро-

теидов отличались в 41, 15, 17 и 4,5 раза для ЛОНП, ЛПП, ЛНП и ЛВП, соответственно.

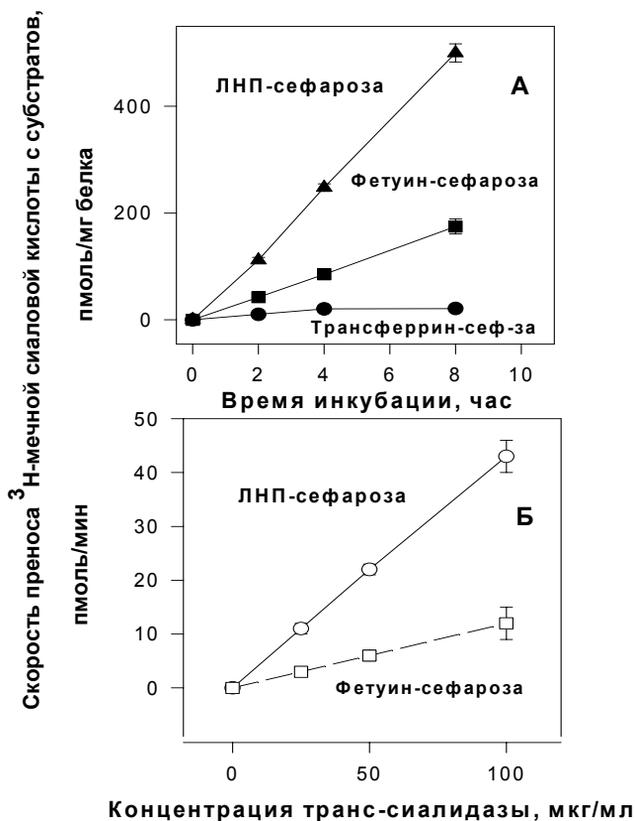


Рисунок 3 – Временная (А) и концентрационная (Б) зависимость переноса сиаловой кислоты транс-сиалидазой с сиалированными доноров на асиалофетуин

Примечания

1 Инкубацию проводили при 37°C рН 7,0.

2 Содержание сиаловой кислоты доноров в пробе - 4 нмоль.

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

Таблица 1 – Скорость переноса сиаловой кислоты с нативных и циркулирующих модифицированных липопротеидов на асиалофеттин

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

Примечания

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

2 * – достоверное отличие от сиалированных ЛНП, p<0,05.

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

Клетки крови (эритроциты). Для изучения субстратной специфичности транс-сиалидазы в данной работе были использованы [^3H] меченные по сиаловой кислоте эритроциты. Было обнаружено, что транс-сиалидаза может осуществлять перенос сиаловой кислоты с гликоконъюгатов поверхности клеток крови. Скорость переноса сиаловой кислоты составила 16,6±0,6 пмоль/мг фермента/мин.

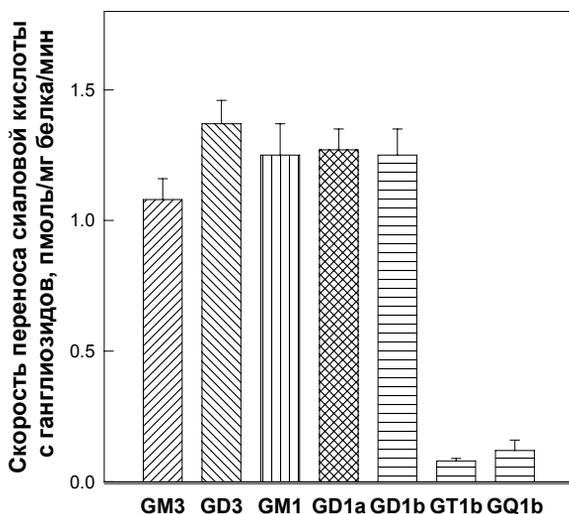


Рисунок 4 – Скорость переноса сиаловой кислоты с ганглиозидов на асиалофетуин

Примечания

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

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

Синтетические гликоконъюгаты. Для установления типов углеводных цепей, с которых транс-сиалидаза может переносить сиаловую кислоту, использовали синтезированные гликоконъюгаты, иммобилизованные на полиакриламиде, содержащие [^3H] меченную терминальную сиаловую кислоту в α 2-3, α 2-6 и α 2-8 положении. Данные об активности фермента при использовании в качестве субстрата таких гликоконъюгатов представлены в табл. 2.

Фермент с наибольшей скоростью удалял α 2-6-связанную сиаловую кислоту, а также с большой эффективностью переносил α 2-3-связанную сиаловую кислоту. При переносе с гликоконъюгатов сиаловой кислоты, связанной α 2-6 гликозидной связью, активность фер-

мента была в 1,2 раза выше, чем при использовании в качестве субстрата SiaЛьюис^a-ПАА-сефароза (α 2-3 связь), в 1,6 раза выше, чем с SiaЛьюис^x-ПАА-сефароза (α 2-3 связь) и в 3,4 раза выше, чем с Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc-ПАА-сефароза. Скорость переноса сиаловой кислоты транс-сиалидазой с гликоконъюгатов, содержащих α 2-8-связанную сиаловую кислоту, была значительно (в 26 раз) меньше, чем при использовании гликоконъюгатов, содержащих α 2-6-связанную сиаловую кислоту. Необходимо также заметить, что транс-сиалидаза оказалась неспособна использовать в качестве субстрата цитидин-5'-монофосфат-сиаловую кислоту (субстрат сиалилтрансфераз), а также сиалиллактозу.

Таблица 2 – Скорость переноса сиаловой кислоты с сиалированных гликоконъюгатов на асиалофетуин

Донор сиаловой кислоты	Транс-сиалидазная активность, (рН 7,0), пмоль сиаловой кислоты/мг белка/мин
Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4Glc-ПАА-сефароза	42,2 \pm 3,3
Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc-ПАА-сефароза	12,4 \pm 1,0
(Neu5Ac α 2-8) ₂ -ПАА-сефароза	1,6 \pm 0,4
СиалилЛьюис ^a -ПАА-сефароза	36,7 \pm 2,1
СиалилЛьюис ^x -ПАА-сефароза	25,3 \pm 2,2
СиалилЛактоза	<0,2
Цитидин-5'-монофосфат-сиаловая кислота	<0,2

Примечание: данные представлены в виде среднего трёх определений \pm S.E.M.

3.1.3 Исследование акцепторной специфичности сиалидазы плазмы крови

Гликопротеиды плазмы крови (фетуин). Следующим этапом нашего исследования являлось изучение акцепторной специфичности транс-сиалидазы плазмы крови человека. В качестве акцептора сиаловой кислоты в экспериментах использовали как нативный (сиалированный), так и искусственно десилированный фетуин.

На нативный фетуин перенос сиаловой кислоты практически отсутствовал, в то время как при использовании в качестве акцептора десилированной формы фетуина наблюдался эффективный перенос сиаловой кислоты (рис. 5). Скорость переноса сиаловой кислоты значительно возрастала с увеличением концентрации десилированного фетуина и не менялась достоверно при использовании различных концентраций его нативной формы.

Липопротеиды плазмы крови. Нами были получены данные об акцепторных свойствах различных классов липопротеидов. В табл. 3 представлены данные о скорости переноса [^3H] меченной сиаловой кислоты с фетуина на разные классы сиалированных и десилированных липопротеидов. В целом, скорость переноса на десилированные липопротеиды была заметно выше, чем на нативные формы. Так, при добавлении в пробу сиалированных ЛНП скорость переноса сиаловой кислоты, по сравнению с контролем, возрастала в 3 раза, а десилированных - в 6 раз. При использовании в качестве акцептора сиалированных ЛПП ферментативный перенос ускорялся в 2 раза, а десилированных - в 4 раза. Скорости переноса транс-сиалидазой остатков сиаловой кислоты на ЛВП и ЛОНП были достаточно близки и являлись наименьшими среди остальных липопротеидов.

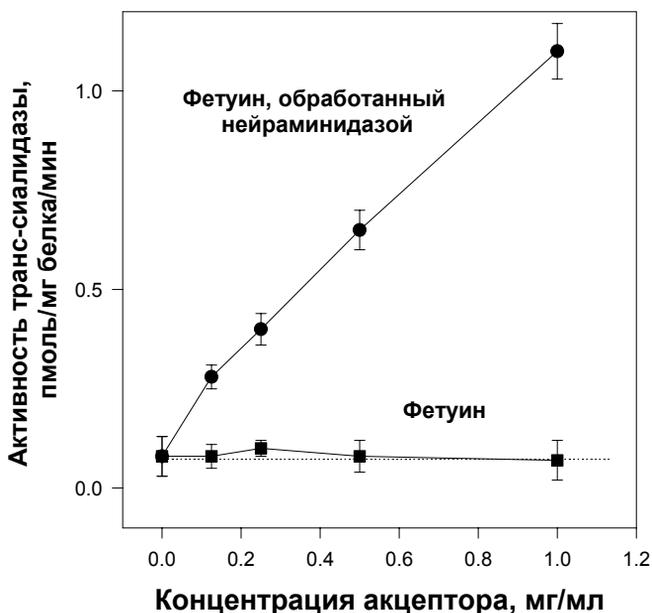


Рисунок 5 – Скорость переноса сиаловой кислоты с ЛНП-сефарозы на нативный фетуин и асиалофетуин

Примечания

1 Реакционную смесь, содержащую в финальном объеме 0,2 мл: 0,01 мл меченой по сиаловой кислоте ЛНП-сефарозы (10 мкг белка, 1050000 расп./мин), указанные концентрации нативного фетуина и асиалофетуина, 50 мМ трис-НСI (рН 7,0), 1 мМ ДТТ, 2 мМ СаСI₂, 10 мкг/мл транс-сиалидазы, инкубировали 8 час при 37°С. После инкубации в пробы добавляли 0,3 мл охлажденной до 0°С воды и центрифугировали в течение 5 мин при 5000 g. 0,2 мл супернатанта использовали для измерения радиоактивности.

2 Данные представлены в виде среднего трех определений ± стандартное математическое отклонение.

Таблица 3 – Скорость переноса сиаловой кислоты на сиалированные и десиалированные липопротеиды плазмы крови

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

Примечание

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

2 *– достоверное отличие от контроля, p<0,05.

Акцепторные свойства клеток крови (эритроциты). Была изучена возможность переноса сиаловой кислоты на поверхностные гликоконъюгаты клеток крови - эритроцитов (нативных и частично десиалированных с помощью бактериальной нейраминидазы). В качестве донора сиаловой кислоты был использован [³H] меченный фетуин. В данном эксперименте не было обнаружено переноса сиаловой кислоты на нативные эритроциты, однако был продемонстрирован перенос сиаловой кислоты на гликоконъюгаты частично десиалированных эритроцитов; скорость транс-сиалидазной реакции равнялась 0,49±0,04 пмоль/мг фермента/мин.

Сфинголипиды. При изучении переноса сиаловой кислоты на лактозилцерамид и ганглиозиды были получены данные, представленные на рис. 6. В качестве донора сиаловой кислоты был использован [³H] ме-

ченный фетуин, ковалентно-связанный с сефарозой. С наибольшей скоростью перенос сиаловой кислоты осуществлялся на лактозилцерамид (10-кратное превышение над контролем). При использовании в качестве акцептора GM3, GD3, GM1, GD1a и GD1b были получены сопоставимые значения транс-сиалидазной активности (примерно 7-кратное превышение над контролем). Не было обнаружено достоверного увеличения, по сравнению с контролем, транс-сиалидазной активности в присутствии GQ1в.

Синтетические гликоконъюгаты. Акцепторную специфичность фермента изучали также с использованием разных типов синтетических гликоконъюгатов. Донором сиаловой кислоты служил радиоактивно меченый фетуин, ковалентно связанный с сефарозой. Данные по скорости переноса сиаловой кислоты транс-сиалидазой на различные гликоконъюгаты представлены в табл. 4. Наибольшая скорость переноса сиаловой кислоты наблюдалась при использовании в качестве акцептора гликоконъюгаты Льюис^a и Льюис^x. Был также показан перенос сиаловой кислоты на связанные с полиакриламидом лактозу, N-ацетиллактозамин (LacNAc) и N-ацетилгалактозамин (α GalNAc). Транс-сиалидаза активно переносила сиаловую кислоту и на Gal β 1-3GalNAc α -ПAA – аналог фрагмента углеводных O-цепей гликопротеидов. Из представленных в табл. 4 данных следует, что сиаловая кислота может переноситься на (Neu5Ac α 2-8)₂-ПAA, но не на свободную полисиаловую кислоту. Не было обнаружено переноса сиаловой кислоты на свободную лактозу и полиакриламид.

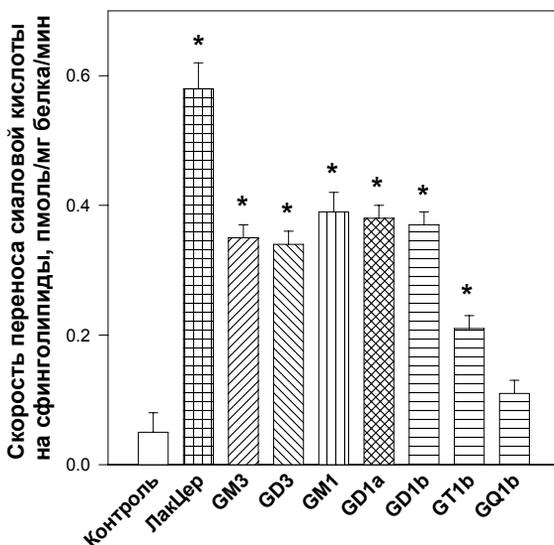


Рисунок 6 – Скорость переноса сиаловой кислоты с фетуин-сефарозы на ластозилцерамид и ганглиозиды

Примечания

1 Реакционную смесь, содержащую в финальном объеме 0,2 мл: 0,01 мл меченой по сиаловой кислоте фетуин-сефарозы (5 мкг белка, 145000 расп./мин), 100 нмоль лактозилцерамида или ганглиозида, 50 мМ трис-НСI (рН 7,0), 1 мМ ДТТ, 2 мМ СаСI₂, 5 мкг/мл транс-сиалидазы, инкубировали 8 час при 37°С. После инкубации реакционную смесь экстрагировали и ганглиозиды разделяли ТСХ как описано в Материалах и Методах. Позиции гликолипидов определяли сканирующей денситометрией и участки силикагеля, соответствующие ганглиозидам, соскребали и измеряли радиоактивность.

2 ЛакЦер, лактозилцерамид.

3 Данные представлены в виде среднего трех определений ± стандартное математическое отклонение.

4 *, достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$

Таблица 4 – Скорость переноса радиоактивно меченной сиаловой кислоты с фетуина на различные гликоконъюгаты

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

Примечание

1 Данные представлены в виде среднего трех определений ±S.E.M
2 *, достоверное отличие от контроля, p<0.05.

Для определения типа связи, образуемой сиаловой кислотой при переносе на акцептор, были использованы биотинилированные лектины: EBL, преимущественно связывающийся с терминальной сиаловой кислотой, присоединенной к галактозе α2-6 связью, и MAL II, специфичный к α2-3 гликозидной связи. Оба лектина были ковалентно связаны с биотином. Сиалидазную реакцию проводили в 96-луночных пластиковых плашках с иммобилизованным акцептором – полиакриламидсвязанной лактозой (ПАА-лактоза). В качестве субстрата использовали фетуин. После окончания реакции и промывки плашки, в лунки вносили биотинсвязанный MAL или EBL, которые специфически связывались с сиаловой кислотой, перенесенной в ходе реакции на иммобилизованный акцептор.

Далее в лунки вносили стрептавидин, ковалентно связанный с пероксидазой, имеющий высокое сродство к биотину. О количестве лектинов, специфически связавшихся с сиаловой кислотой, судили по интенсивности колориметрической реакции пероксидазы с вносимым далее о-фенилендиамином. На рис.7 видно, что в процессе транссиалидазной реакции происходило образование как α 2-6, так и α 2-3 гликозидной связи.

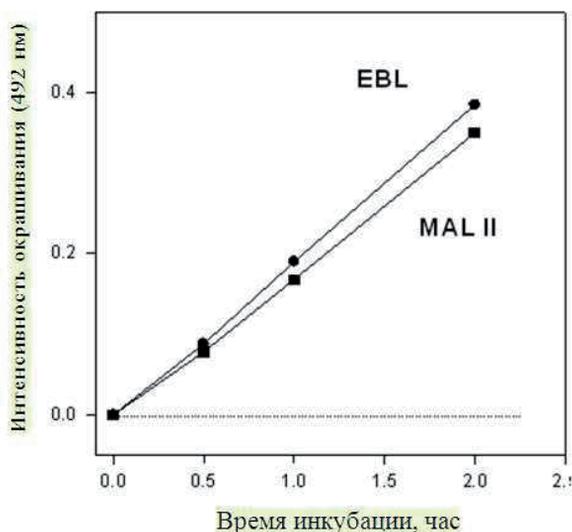


Рисунок 7 – Определения типа связи, образуемой сиаловой кислотой при переносе на акцептор

Итак, мы продемонстрировали, что десилированные транссиалидазой ЛНП вызывают накопление липидов в гладкомышечных клетках, культивируемых из непораженной интимы аорты человека, т.е. становятся атерогенными.

В процессе изучения субстратной специфичности сиалидазы показано, что различные гликоконъюгаты компонентов крови и плазмы могут

служить донором сиаловой кислоты в ходе ферментативной реакции. Для определения субстратной специфичности фермента были использованы различные искусственно синтезированные сиалированные гликоконъюгаты. Было показано, что α 2-6 – связанная сиаловая кислота отщепляется и переносится сиалидазой значительно эффективнее, чем ее α 2-3 изомер.

Таким образом, плазменная сиалидаза оказалась способной отщеплять и переносить (с различной эффективностью) сиаловую кислоту гликоконъюгатов, входящих в состав основных гликопротеидов, липопротеидов и ганглиозидов плазмы, а также клеток крови. Наибольшая эффективность переноса наблюдалась для α 2-6 связей, наименьшая – для α 2-8 связей.

В ходе изучения акцепторной специфичности сиалидазы плазмы крови человека было установлено, что в процессе ферментативной реакции сиаловая кислота переносится на гликопротеиды, липопротеиды и ганглиозиды плазмы, а также клетки крови (эритроциты).

Полученные данные позволили не только уточнить роль сиалидазы в патогенезе атеросклероза, но и перейти к созданию модельной системы, где этот фермент играет центральную роль.

3.1.4 Разработка модели на основе сиалидазы для исследования антиатеросклеротической активности фармакологических веществ

Подавление сиалидазной активности для предотвращения атерогенной модификации ЛНП является перспективной мишенью для действия новых антиатеросклеротических средств. Метод определения сиалидазной активности (см. раздел Методы) был применен в целях разработки ферментативной модели (тест-системы) для оценки эффективности и исследования механизмов антиатеросклеротического действия фармакологических веществ.

На основании исследования субстратной специфичности фермента для модели был выбран [³H]-меченый фетуин. Этот выбор объясняется относительной простотой изготовления субстрата, его стабильностью, хорошей воспроизводимостью результатов. Акцептором в ферментативной системе служил десалированный фетуин.

Разработанная модель предназначена для оценки активности различных фармакологических веществ, включая экстракты растений. В качестве примера такой оценки был взят чеснок. Чеснок был взят потому, что в предыдущих исследованиях этот натуральный продукт и препараты на его основе проявили высокую антиатеросклеротическую активность на различных моделях. В табл. 5 приведены данные экспериментов, в которых исследовалось влияние водных экстрактов чеснока на сиалидазную активность. Можно видеть, что водный экстракт чеснока значительно подавлял сиалидазную активность в концентрациях от 10 мкг/мл до 1 мг/мл.

Таблица 5 – Влияние экстрактов чеснока на сиалидазную активность

Концентрация экстракта, мкг сырого веса / мл	Сиалидазная активность, % от контроля
0 (контроль)	100±6
1000	68±5*
100	76±3*
10	82±2*
1	91±6
0,1	94±7
0,01	97±5

Примечания

1 Данные представлены в виде среднего трех определений ± SEM.

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

Любые экстракты растений имеют существенные недостатки, поскольку в экстрактах содержатся не все химические компоненты

продукта. Кроме того, попадая в организм, натуральный продукт претерпевает множество превращений, что не позволяет прямо интерпретировать данные экспериментов, полученных *in vitro*, на ситуацию в организме. Чтобы избежать этих недостатков, мы разработали вариант клеточной модели, в котором влияние на активность сиалидазы оценивалось в лабораторно-клинических исследованиях при измерении сиалидазной активности в крови после приема продукта.

Добровольцы принимали однократную дозу натурального продукта, после чего у них забирали кровь через 4 и 8 час. Сиалидазную активность в сыворотке взятой крови сравнивали с активностью фермента в крови, взятой до приема продукта. В табл.6 приведены данные оценки сиалидазной активности после приема таблеток на основе порошка чеснока, зарегистрированных в качестве биологически активной добавки к пище под названием «Алисат». Можно видеть, что чесночный препарат снижал сиалидазную активность крови уже через 4 часа после приема, однако недостоверно. Через 8 час после приема сиалидазная активность крови снижалась статистически значимо на 31%.

Таблица 6 – Влияние таблеток Алисат на сиалидазную активность сыворотки крови человека (n=15)

Сиалидазная активность, % от исходной		
0 час	4 часа	8 часов
100±7	87±7	69±5*

Примечание

1 Данные представлены в виде среднего 15 определений ± SEM.

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

Таким образом, нам удалось разработать ферментативную модель, которая позволяет оценивать эффективность фармакологических веществ отношении сиалидазы *in vitro*, что может быть использовано для первичного скрининга. Кроме того, модель в варианте *ex vivo* подходит для вторичного скрининга фармакологических веществ и для изучения механизма их действия.

3.1.5 Проведение скрининга растительных объектов с помощью модели, создание ППП

Для проведения исследований были изготовлены экспериментальные образцы на основе растительного сырья в количестве 14 и проведены исследования влияния стандартизированных (раздел Методы) водных экстрактов различных растений на сиалидазную активность.

Установлено, что экстракты ряда натуральных продуктов подавляют активность сиалидазы, выделенной из крови человека, в модели в варианте *in vitro*.

Очевидно, что модель *in vitro* применима лишь для первичного скрининга, когда необходимо отобрать эффективные препараты из большого числа образцов. Для подтверждения эффективности отобранных образцов и для разработки режима приема препарата необходимо использовать модель *ex vivo*. Наиболее эффективные натуральные продукты были исследованы на модели в варианте *ex vivo*, то есть, когда добровольцы принимали натуральный продукт (порошок в капсулах в дозе около 250 мг однократно, перорально), а сиалидазная активность определялась в крови до приема продукта и спустя 2 и 4 часа. Эффекты *ex vivo* были нестабильными и у большинства добровольцев не воспроизводились. Исключение составил корень солодки.

Таблица 7 – Результаты испытания препаратов на основе растительного сырья

Растительный препарат в концентрациях 100-150 мкг/мл и его источник	Сиалидазная активность, % от исходной
Экстракт корней лапчатки прямостоячей	89±6
Экстракт цветов календулы лекарственной	88±4
Экстракт корня солодки	18±3*
Экстракт травы зверобоя продырявленного	57±4*
Экстракт тысячелистника обыкновенного	27±3*
Экстракт корня женьшеня обыкновенного	88±6
Экстракт корня элеутерококка колючего	85±8
Экстракт корня родиолы розовой	58±5*
Экстракт прополиса	88±5
Экстракт меда	60±4*
Экстракт цветочной пыльцы	14±2*
Экстракт бурых водорослей ламинарии сахаристой	74±3*
Экстракт фукуса пузырчатого	65±2*
Экстракт лука репчатого	73±6*
Экстракт чеснока посевного	10±4*

На рис. 8 приведены результаты исследований на 5 добровольцах. Можно видеть, что сиалидазная активность у всех добровольцев существенно снижалась или исчезала после приема солодки. На основании этих данных корень солодки был отобран для создания средства, препятствующего атерогенной модификации ЛНП в крови.

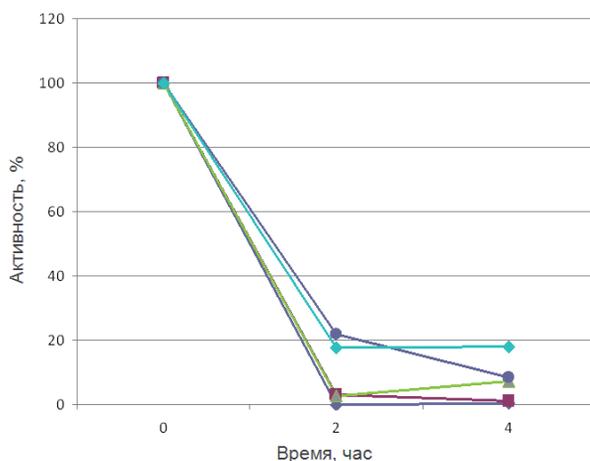


Рисунок 8 – Индивидуальные изменения активности транс-сиалидазы после приема солодки, относительно исходного уровня

Поскольку результаты, полученные на модели *ex vivo*, имеют принципиальное значение в виду возможности их прямой интерпретации, на этой модели был испытан еще один натуральный продукт - цветочная пыльца (перга), обладающая высокой эффективностью в части подавления активности сиалидазы. В табл. 8 приведены эффекты цветочной пыльцы на сиалидазную активность *ex vivo*.

Можно видеть, что *ex vivo* цветочная пыльца проявляет высокую эффективность не у каждого наблюдаемого. Так, у добровольца 1 с низкой активностью сиалидазы в крови цветочная пыльца не только не подавляла ферментативную активность, но даже стимулировала ее на поздних сроках наблюдения. У добровольца 2 с высокими значениями сиалидазной активности в крови цветочная пыльца не проявляла эффекта. Лишь у добровольца 3 с самой высокой сиалидазной активностью наблюдалось выраженное ингибирующее действие цветочной пыльцы.

Таблица 8 – Влияние цветочной пыльцы на активность сиалидазы плазмы крови

Время забора крови, час	Сиалидазная активность, фмоль сиаловой кислоты/мл сыворотки /мин
Доброволец 1	
0	0,89±0,02
2	0,95±0,04
4	1,07±0,11
6	1,35±0,03*
Доброволец 2	
0	13,4±1,7
2	13,2±1,8
4	12,0±1,0
6	16,1±2,0
Доброволец 3	
0	28,3±2,1
2	30,0±2,0
4	16,0±2,1*
6	21,0±1,1*

Примечания

1 Данные представлены в виде среднего трех определений ±SEM.

2 *, достоверное отличие от 0 часов, $p < 0,05$.

Для дальнейших исследований были отобраны больные с высоким уровнем сиалидазной активности в крови. В табл. 9 представлены эффекты различных доз цветочной пыльцы на сиалидазную активность такого больного.

Таблица 9 – Влияние цветочной пыльцы на сиалидазную активность плазмы крови больного 3

Доза, мг	Сиалидазная активность, фмоль сиаловой кислоты/мин/мл сыворотки			
	0 час	2 час	4 час	6 час
150	21±2	22±3	16±3	27±2
250	21±1	11±2*	9±3*	11±2*
600	17±2	10±2*	12±1*	24±2
1200	26±3	16±3*	52±2*	30±2

Примечания

1 Данные представлены в виде среднего трех определений ±SEM.

2 *– достоверное отличие от 0 часов, $p < 0,05$.

Очевидно, что эффективными являются дозы, начиная от 250 мг и выше. Дозовая зависимость была подтверждена в исследованиях на других добровольцах (табл. 10).

Для разработки активного препарата принципиально выявить минимальную дозу, проявляющую эффект. В связи с этим было проведено исследование доз, близких к дозе 250 мг, т.е. минимальной эффективной дозе, выявленной ранее. Установлено что доза 200 мг не всегда проявляет эффективность, в то время как доза 300 мг эффективна во всех случаях без исключения (табл. 11). Таким образом, минимальной эффективной дозой является 250 мг.

На основании полученных данных корень солодки и цветочная пыльца были отобраны для создания средств, препятствующих атерогенной модификации ЛНП в крови.

Таблица 10 – Влияние цветочной пыльцы на транс-сиалидазную активность плазмы крови добровольцев

Доза, мг	Сиалидазная активность, фмоль сиаловой кислоты/мин/мл сыворотки			
	0 час	2 час	4 час	6 час
Доброволец 3				
150	21±2	22±3	16±3	27±2
250	21±1	11±2*	9±3*	11±2*
500	17±2	10±2*	12±1*	24±2
Доброволец 4				
150	15±1	17±2	16±1	21±3
250	16±1	11±1*	8±1*	9±2*
500	17±1	8±1*	8±1*	13±1
Доброволец 5				
150	61±2	52±3	36±2*	77±5*
250	63±4	29±2*	19±2*	39±3*
500	60±4	21±3*	29±1*	48±4

Примечания

1 Данные представлены в виде среднего трех определений ±SEM.

2*, достоверное отличие от 0 часов, p<0,05.

Для этого было необходимо было разработать рецептуры БАД (фитопрепаратов), состав которых войдут оптимальные или наиболее эффективные компоненты (комбинации компонентов), а также вспомогательные средства, обеспечивающие, в том числе, пролонгированность действия БАД (фитопрепаратов).

Таблица 11 – Влияние цветочной пыльцы на сиалидазную активность плазмы крови пациентов

Доза, мг	Сиалидазная активность, фмоль сиаловой кислоты/мин/мл сыворотки			
	0 час	2 час	4 час	6 час
Доброволец 3				
200	70±5	79±2	77±4	80±5
300	78±5	19±4*	31±2*	60±6*
Доброволец 4				
200	79±6	52±2*	77±4	82±3
300	67±4	23±3*	45±2*	48±3*
Доброволец 5				
200	89±6	77±9	68±7	83±2
300	81±5	75±8	40±2*	53±2*

Примечания

1 Данные представлены в виде среднего трех определений ±SEM.

3 *, достоверное отличие от 0 часов, $p < 0,05$.

Кроме того, следовало разработать лабораторный регламент получения препаратов, а также произвести экспериментальную партию и осуществить исследовательские испытания по следующим показателям:

- физико-химических свойства (внешний вид; вкус; запах; средняя масса содержимого; влага);
- химическая безопасность (токсичные элементы: свинец; кадмий; мышьяк; ртуть; пестициды; ГХЦГ - а, в, у – изомеры; ДДТ и его метаболиты; гептахлор; алдрин);
- микробиологическая безопасность (КАМАФАНМ; БГКП – ко-лиформы; E. coli; S. Aureus; сальмонеллы; дрожжи/плесени; V. cereus);
- радиационная безопасность (радионуклиды: цезий-137; стронций-90; показатель соответствия В);

– функциональные свойства, в том числе: антиоксидантная активность; иммуномодулирующие свойства; противовоспалительные свойства; антиатеросклеротическая активность.

Сведения о регламенте получения препаратов, а также производстве экспериментальной партии и осуществлении исследовательских испытаний представлены в Приложении А. Рецептуры БАД (фитопрепарата) представлены в табл. 12 а и 12б.

Таблица 12а – Рецептура к разрабатываемой биологически активной добавке к пище (фитопрепарату) «Средство, препятствующее атерогенной модификации ЛНП в крови»

Компоненты	Содержание, %	Масса, мг
Солодка	57	200
Лактоза	36	125
Поливинилпирролидон	5	18
Стеарат кальция	2	7
Итого	100	350

Таблица 12б – Рецептура к разрабатываемой биологически активной добавке к пище (фитопрепарату) «Средство, препятствующее атерогенной модификации ЛНП в крови»

Компоненты	Содержание, %	Масса, мг
Пыльца цветочная	56	250
Лактоза	33	150
Стеариновая кислота	10	45
Аэросил	1	5
Итого	100	450

3.1.6 Обсуждение полученных данных

Итак, потеря сиаловой кислоты является одной из первых модификаций, предшествующих появлению атерогенных свойств у ЛНП [272,314]. Плазменная транс-сиалидаза оказалась способной отщеплять и переносить (с различной эффективностью) сиаловую кислоту гликоконъюгатов, входящих в состав основных гликопротеидов, липопротеидов и ганглиозидов плазмы, а также клеток крови. Наибольшая эффективность переноса наблюдалась для $\alpha 2$ -6 связей, наименьшая – для $\alpha 2$ -8 связей.

На сегодняшний день многие исследователи рассматривают перекисное окисление липидов как наиболее вероятную причину возникновения атерогенности липопротеидов низкой плотности. Изучение возможности протекания перекисного окисления ЛНП при инкубации в плазме позволило установить следующее: на протяжении 48 час инкубации уровень ТБК-реактивных продуктов и гидроперекисей достоверно не изменялся; к 48 часам инкубации происходило достоверное увеличение (на 27%) интенсивности аутофлуоресценции продуктов перекисного окисления липидов и уровня апоВ-связанного холестерина (на 23%). К 48 час инкубации происходило снижение устойчивости ЛНП к окислению, о котором судили по уменьшению, примерно на 30%, периода индукции окисления липопротеидов в присутствии ионов Cu^{2+} . Достоверное 30%-ное падение уровня витамина Е также наблюдалось после 48 часов инкубации. Таким образом, первые признаки перекисного окисления ЛНП наблюдались лишь после 48 час инкубации [51].

В нашей работе мы продемонстрировали, что десИАлированные транс-сиалидазой ЛНП вызывали накопление липидов в гладкомышечных клетках, культивируемых из непораженной интимы аорты человека, т.е. становились атерогенными. Таким образом, нами было показано существование в плазме крови человека нативной

транс-сиалидазы, способной вызывать атерогенную модификацию циркулирующих в кровотоке липопротеидов низкой плотности.

В ходе изучения акцепторной специфичности транс-сиалидазы плазмы крови человека было установлено, что в процессе ферментативной реакции сиаловая кислота переносится на гликопротеиды, липопротеиды и ганглиозиды плазмы, а также клетки крови (эритроциты). Было показано, что в качестве акцептора может выступать фетуин. Так, сиалидаза активно переносила сиаловую кислоту на десилированный фетуин, в то время как скорость реакции в присутствии нативного фетуина была крайне невелика [66].

На данный момент остается неясной истинная физиологическая роль транс-сиалидазы плазмы крови человека. Возможно, фермент может оказывать регуляторное действие на процессы в организме, зависящие от степени сиалирования (десилирования) различных клеточных и неклеточных компонентов: активность плазматических ферментов и переносчиков ионов металлов, изменение времени циркуляции глико- и липопротеидов, а также клеток в кровотоке, модификация межклеточных взаимодействий и пр. [147]. Несомненно, изучение возможной роли этого фермента в патогенезе атеросклероза должно быть продолжено и будет являться предметом наших дальнейших научных исследований.

Так, известно, что значительные сезонные колебания характерны для ряда биохимических параметров крови человека, например, концентрации гемоглобина, вязкости крови, соотношения клеточных популяций [19,61]. Также в течение года изменяется активность и концентрация некоторых сывороточных и внутриклеточных ферментов [68]. В целом, подобные изменения представляют собой стрессовый ответ организма на зимние условия окружающей среды и соответствующие социальные факторы (короткий световой день, низкие температуры, пониженная физическая нагрузка и др.).

Нам удалось продемонстрировать, что количество лиц, у которых транссиалидазная активность достигала максимальных значений зимой, почти в три раза превышало количество испытуемых с обратной сезонной динамикой.

Таким образом, изменение риска модификации циркулирующих ЛНП в результате повышения транс-сиалидазной активности сыворотки в зимний период у значительного процента людей может являться дополнительным фактором, вносящим вклад в осенне-зимнее возрастание риска острых сердечно-сосудистых заболеваний. Предполагаемое влияние транссиалидазы непосредственно на ЛНП крови может приводить к возникновению или прогрессированию атеросклеротических поражений в периоды повышенной транссиалидазной активности сыворотки крови.

Созданная на основе предварительных экспериментов ферментативная модель позволила отобрать из изученных растений солодку. Использование растительного сырья, не имеющего серьезных побочных эффектов, имеет важное значение, поскольку атеросклероз развивается годами и десятилетиями, вследствие чего антиатеросклеротическое воздействие также должно быть длительным, даже пожизненным. Безвредные лекарственные средства из растительного сырья можно широко назначать для длительного применения. Кроме того, низкая стоимость растительного сырья позволила создать недорогие препараты (месячный курс – от 30 руб.). Разработанные препараты будут обладать пролонгированным действием, что обеспечит удобство приема, усилит эффект, расширит спектр действия. Эффективность разработанных антиатеросклеротических препаратов должна быть подтверждена клиническими исследованиями и апробациями, организованными по самым высоким международным стандартам. Высокая эффективность, низкая стоимость, доступность сырья, безвредность,

удобство приема позволят рекомендовать разработанные препараты для широкого применения. Лица, которым показана антиатеросклеротическая профилактика и лечение – это все мужчины старше 40 лет и все женщины после менопаузы. Именно у них атеросклероз развивается быстро и создает опасность для жизни и здоровья. Такие лица составляют 36% населения России или 50 млн. человек.

Нам удалось разработать ферментативную модель, которая позволяет оценивать эффективность фармакологических веществ *in vitro*, что может быть использовано для первичного скрининга. Кроме того, модель в варианте *ex vivo* идеально подходит для вторичного скрининга фармакологических веществ и для изучения механизма их действия.

Очевидно, что модель *in vitro* применима лишь для первичного скрининга, когда необходимо отобрать эффективные препараты из большого числа образцов. Для подтверждения эффективности отобранных образцов и для разработки режима приема препарата необходимо использовать модель *ex vivo*.

Как известно, именно с «мишени», то есть с понимания механизма развития заболевания и способности им управлять, не затрагивая прочие процессы в человеческом организме, начинается создание лекарственных препаратов на современном рынке. В нашем случае, очевидно, такой мишенью является сиалидаза, а компоненты активного начала, действующего на мишень, содержатся в солодке.

Отметим в этой связи, что корень солодки – лекарственное растение, не запрещенное для использования при производстве БАД [62]. Активное начало корня солодки – интересные с фармакологической точки зрения флавоноиды (3–4%) и тритерпеновые сапонины (около 20%) [39].

3.2 Влияние половых гормонов на атерогенез, ППП как альтернатива заместительной гормональной терапии

3.2.1 Исследование влияния половых гормонов на внутриклеточное накопление холестерина

Анализ литературы позволил сделать вывод о возможности создания препаратов на основе фитоэстрогенов, выполняющих роль альтернативы заместительной гормональной терапии. Важным конкурентным преимуществом могло бы быть сочетание у таких препаратов способности облегчать симптоматику климактерия и обеспечивать профилактику особо опасных клинических осложнений, таких, как сердечно-сосудистые заболевания. В связи с этим представлялось целесообразным создать клеточные модели поиска эффективных источников фитоэстрогенов.

Однако предварительным этапом такого проекта должно было стать уточнение влияния женских и мужских половых гормонов на патогенез атеросклероза, в частности, на внутриклеточное накопление холестерина в клетках сосудов, инициированное какими-либо факторами. Первым этапом решения этой задачи явилось исследование действия модифицированных ЛНП на моноциты/макрофаги с учетом гендерного происхождения последних.

В опытах была использована суспензия моноцитов периферической крови человека, полученная с применением метода, разработанного нами ранее [12]. Полученная таким образом клеточная популяция содержала 92-95% моноцитов, что контролировалось при помощи анализа поверхностной экспрессии маркера моноцитов CD14 методами иммуноцитохимии и проточной цитометрии.

Выделенные моноциты в условиях первичной культуры клеток дифференцировались в макрофаги. Макрофаги культивировали в концентрации 1×10^6 клеток/мл в бессывороточной среде X-VIVO 10™

(Cambrex). Чистота культуры макрофагов определялась при помощи анализа экспрессии маркеров макрофагов CD163, MMR, FcγRI и достигала 99% (также контролировалась методами иммуноцитохимии и проточной цитометрии). Были проведены эксперименты, данные которых приведены в табл. 13.

Таблица 13 – Накопление холестерина макрофагами и моноцитами, индуцированное атерогенными ЛНП, выделенными из крови больных атеросклерозом

Тип клеток	Исходное содержание холестерина, мкг/мг клеточного белка	Содержание холестерина после инкубации с ЛНП, мкг/мг клеточного белка	Абсолютный прирост содержания холестерина, мкг/мг клеточного белка	Атерогенность ЛНП, в % от контроля
Макрофаги (n=68)	46,0±2,8 (22,8)	86,4±7,7 (63,8)	40,4±5,7 (46,7)	184±7 (61)
в т.ч., мужские (n=28)	46,9±5,8 (30,6)	102,1±17,4 (92,0)	55,2±12,7 (67,4)	209±15 (79)
в т.ч., женские (n=40)	45,3±2,5 (15,6)	75,3±4,5 (28,7)	30,0±2,3 (18,2)	167±6 (36)
Моноциты (n=67)	42,2±2,6 (20,9)	117,3±9,2 (75,3)	75,1±7,8 (63,8)	288±16 (134)
в т.ч., мужские (n=38)	44,8±4,2 (25,7)	124,2±14,4 (88,7)	79,4±11,7 (72,4)	282±20 (123)
в т.ч., женские (n=29)	38,7±2,1 (11,4)	108,2±9,8 (53,0)	69,5±9,5 (51,3)	294±28 (150)

Примечания

1 Данные представлены в виде средних значений с указанием стандартной ошибки и (в скобках) стандартного отклонения.

2 Достоверность различий между средними величинами оценивали по статистике Манна-Уитни.

Полученные данные позволяют сделать следующие выводы

1. Моноциты не отличаются от макрофагов по исходному содержанию холестерина ($p=0,187$), но накапливают холестерин значительно

но лучше, чем макрофаги. Для содержания холестерина после инкубации с ЛНП, абсолютного прироста холестерина и атерогенности ЛНП показатели достоверности различий между моноцитами и макрофагами составляют $p=0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$, соответственно.

2. Практически аналогичная ситуация сохраняется при сравнении моноцитов и макрофагов отдельно у мужчин и женщин. У мужчин показатели достоверности различий между моноцитами и макрофагами (в том же порядке, что и выше) составляют 0,712, 0,067, 0,009 и 0,002. У женщин показатели достоверности различий составляют 0,083, 0,005, $<0,001$ и $<0,001$.

3. Моноциты мужчин и женщин не различаются ни по исходному содержанию холестерина ($p=0,830$), ни по содержанию холестерина после инкубации с ЛНП ($p=0,919$), ни по абсолютному приросту холестерина ($p=0,556$), ни по атерогенности ЛНП ($p=0,714$).

4. Макрофаги мужчин и женщин не различаются ни по исходному содержанию холестерина ($p=0,830$), ни по содержанию холестерина после инкубации с ЛНП ($p=0,636$), ни по абсолютному приросту холестерина ($p=0,191$), хотя последний показатель и представляется более высоким у мужчин. Однако в терминах атерогенности ЛНП мужские макрофаги лучше накапливают холестерин, чем женские ($p=0,022$).

5. Способность клеток накапливать холестерин прямо связана с исходным содержанием в них холестерина. Для макрофагов коэффициент корреляции между исходным уровнем холестерина и абсолютным приростом холестерина составляет 0,641 ($p<0,001$), при этом у мужчин $r=0,722$ ($p<0,001$), а у женщин $r=0,436$ ($p=0,005$). Для моноцитов коэффициент корреляции между исходным уровнем холестерина и абсолютным приростом холестерина составляет 0,431 ($p<0,001$), при этом у мужчин $r=0,526$ ($p=0,001$). Но у женских моноцитов такая взаимосвязь отсутствует: $r=0,043$ ($p=0,825$).

6. Наилучшей характеристикой способности клеток накапливать холестерин является атерогенность как относительная величина, не зависящая от исходного содержания холестерина в клетках. Для макрофагов $r=0,115$ ($p=0,349$), в том числе для мужских макрофагов $r=0,168$ ($r=0,392$), для женских макрофагов $r=-0,065$ ($p=0,691$). Для моноцитов $r=-0,142$ ($p=0,250$), в том числе для мужских моноцитов $r=-0,076$ ($p=0,652$), для женских моноцитов $r=-0,340$ ($p=0,071$).

Таким образом, с учетом поставленной задачи (создание клеточной модели для изучения влияния гормонов или их аналогов на атеросклероз), следует измерять атерогенность как относительную величину, не зависящую от исходного содержания холестерина в клетках.

На следующем этапе работы был проведен анализ влияния половых гормонов *in vitro* на аккумуляцию холестерина макрофагами, дифференцированными из выделенных моноцитов периферической крови доноров-мужчин и женщин. Накопление внутриклеточного холестерина вызывали инкубацией клеток с ЛНП от доноров с подтвержденным атеросклерозом (модифицированными ЛНП).

Анализ содержания холестерина в макрофагах и моноцитах после их инкубации с ЛНП показал, что половые гормоны могут влиять на аккумуляцию холестерина в клетках.

Эстрадиол в концентрациях 1 и 100 нМ снижал содержание холестерина в макрофагах женщин, в концентрациях 0,1, 1 и 10 нМ снижал содержание холестерина в моноцитах женщин и мужчин (табл. 14). Тестостерон в исследованном диапазоне концентраций (0,1-100 нМ) не оказывал влияния на содержание холестерина в макрофагах и моноцитах мужчин и женщин (табл. 15). В то же время дигидротестостерон в концентрациях 0,1 и 1 нМ подавлял аккумуляцию холестерина в макрофагах и женщин, и мужчин, но не в моноцитах (табл. 16).

Таблица 14 – Влияние эстрадиола на накопление холестерина в культивируемых клетках

Накопление внутриклеточного холестерина, % от контроля					
Клетки	ЛНП 100 мкг/мл	+Es 10 ⁻¹⁰ М	+Es 10 ⁻⁹ М	+Es 10 ⁻⁸ М	+Es 10 ⁻⁷ М
Макрофаги мужчины (n=9)	218±37 (110), n=9	194±19 (54), n=8 P=0,215 (t) P=0,263 (w)	193±28 (84), n=9 P=0,320 (t) P=0,441 (w)	192±20 (61), n=9 P=0,217 (t) P=0,260 (w)	204±32 (95), n=9 P=0,503 (t) P=0,594 (w)
Макрофаги женщины (n=18)	178±10 (44), n=18	159±11 (47), n=17 P=0,141 (t) P=0,113 (w)	152±10 (44), n=18 P=0,053 (t) P=0,048 (w)	166±12 (49), n=18 P=0,396 (t) P=0,396 (w)	154±8 (35), n=17 P=0,023 (t) P=0,011 (w)
Моноциты мужчины (n=15)	284±30 (115), n=15	236±21 (71), n=11 P=0,013 (t) P=0,013 (w)	215±22 (83), n=15 P=0,004 (t) P=0,002 (w)	211±23 (88), n=15 P=0,007 (t) P=0,004 (w)	269±24 (94), n=15 P=0,286 (t) P=0,394 (w)
Моноциты женщины (n=13)	286±43 (154), n=13	228±27 (82), n=9 P=0,031 (t) P=0,028 (w)	211±23 (83), n=13 P=0,021 (t) P=0,028 (w)	242±27 (98), n=13 P=0,100 (t) P=0,152 (w)	231±24 (86), n=13 P=0,057 (t) P=0,087 (w)

Примечания

1 Данные представлены в виде среднего значения с указанием стандартной ошибки (в скобках - стандартного отклонения) и n (количества экспериментов).

2 Достоверность различий средних величин от относительного накопления холестерина в клетках без добавления гормонов оценена парным тестом по t-тесту (t) и по Wilcoxon (w).

Таблица 15 – Влияние тестостерона на накопление холестерина в культивируемых клетках

Накопление внутриклеточного холестерина, % от контроля					
Клетки	ЛНП 100 мкг/мл	+Tst 10 ⁻¹⁰ М	+Tst 10 ⁻⁹ М	+Tst 10 ⁻⁸ М	+Tst 10 ⁻⁷ М
Макрофаги мужчины (n=10)	203±22 (70), n=10	206±25 (78), n=10 P=0,903 (t) P=0,646 (w)	220±30 (95), n=10 P=0,499 (t) P=0,575 (w)	202±21 (65), n=10 P=0,906 (t) P=0,799 (w)	191±21 (66), n=10 P=0,275 (t) P=0,285 (w)
Макрофаги женщины (n=14)	157±6 (26), n=14	154±10 (38), n=14 P=0,842 (t) P=0,730 (w)	173±17 (62), n=14 P=0,223 (t) P=0,124 (w)	161±11 (40), n=14 P=0,491 (t) P=0,363 (w)	161±15 (54), n=13 P=0,674 (t) P=0,807 (w)
Моноциты мужчины (n=12)	306±48 (165), n=12	268±40 (140), n=12 P=0,214 (t) P=0,158 (w)	267±31 (108), n=12 P=0,155 (t) P=0,308 (w)	259±30 (103), n=12 P=0,075 (t) P=0,071 (w)	305±48 (167), n=12 P=0,972 (t) P=0,182 (w)
Моноциты женщины (n=8)	348±62 (175), n=8	280±50 (135), n=7 P=0,074 (t) P=0,176 (w)	283±41 (117), n=8 P=0,130 (t) P=0,123 (w)	292±56 (157), n=8 P=0,208 (t) P=0,263 (w)	301±48 (135), n=8 P=0,266 (t) P=0,327 (w)

Примечания

1 Данные представлены в виде среднего значения с указанием стандартной ошибки (в скобках - стандартного отклонения) и n (количества экспериментов).

2 Достоверность различий средних величин от относительного накопления холестерина в клетках без добавления гормонов оценена парным тестом по t-тесту (t) и по Wilcoxon (w).

Таблица 16 – Влияние дигидротестостерона на накопление холестерина в культивируемых клетках

Накопление внутриклеточного холестерина, % от контроля					
Клетки	ЛНП 100 мкг/мл	+DhT 10 ⁻¹⁰ М	+DhT 10 ⁻⁹ М	+DhT 10 ⁻⁸ М	+DhT 10 ⁻⁷ М
Макрофаги мужчины (n=9)	207±19 (57), n=9	174±14 (43), n=9 P=0,024 (t) P=0,015 (w)	179±15 (44), n=9 P=0,032 (t) P=0,021 (w)	206±18 (54), n=9 P=0,900 (t) P=0,678 (w)	198±22 (67), n=9 P=0,139 (t) P=0,139 (w)
Макрофаги женщины (n=16)	154±5 (21), n=16	133±8 (33), n=16 P=0,006 (t) P=0,003 (w)	137±8 (32), n=16 P=0,037 (t) P=0,020 (w)	142±10 (39), n=16 P=0,226 (t) P=0,469 (w)	142±8 (33), n=15 P=0,136 (t) P=0,156 (w)
Моноциты мужчины (n=11)	254±22 (74), n=11	252±24 (79), n=11 P=0,931 (t) P=0,929 (w)	266±23 (76), n=11 P=0,607 (t) P=0,594 (w)	301±27 (90), n=11 P=0,074 (t) P=0,110 (w)	282±19 (62), n=11 P=0,149 (t) P=0,110 (w)
Моноциты женщины (n=9)	266±39 (117), n=9	279±43 (128), n=9 P=0,726 (t) P=0,767 (w)	273±39 (116), n=9 P=0,823 (t) P=0,678 (w)	318±57 (172), n=9 P=0,160 (t) P=0,314 (w)	325±57 (170), n=9 P=0,134 (t) P=0,173 (w)

Примечания

1 Данные представлены в виде среднего значения с указанием стандартной ошибки (в скобках - стандартного отклонения) и n (количества экспериментов).

2 Достоверность различий средних величин от относительного накопления холестерина в клетках без добавления гормонов оценена парным тестом по t-тесту (t) и по Wilcoxon (w).

Приведенные данные подтверждают способность эстрогена (эстрадиола) и андрогена (дигидротестостерона) действовать односторонне на аккумуляцию холестерина в моноцитах-макрофагах. Способность половых гормонов влиять на накопления холестерина зависит от типа использованных клеток и, в какой-то степени, от пола донора.

Результаты проведенных испытаний свидетельствуют о торможении развития атеросклероза под действием половых гормонов и позволяют считать первичную культуру моноцитов-макрофагов человека подходящей основной клеточной модели для разработки альтернативы заместительной гормональной терапии для менопаузальных женщин.

3.2.2 Создание клеточных моделей для определения атерогенности сыворотки крови

В описанных ниже экспериментах ставилась задача определения атерогенности сыворотки крови в двух клеточных культурах: клетках из субэндотелиального слоя интимы аорты человека и моноцитах-макрофагах. В рамках реализуемого проекта это был предварительный шаг для последующего поиска эстроген-содержащих растительных объектов, способных воздействовать на атерогенез.

Модель *in vitro*. Выделение и культивирование клеток из субэндотелиального слоя интимы аорты человека проводили, как описано в разделе «Материалы и методы». В день эксперимента культуральную среду заменяли на свежую среду 199 и к ней добавляли исследуемые агенты или сыворотку в концентрации 10%. Контрольные клетки инкубировали в среде 199, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Клетки инкубировали в течение 24 часов, после чего трижды отмывали ИФБ. Определение содержания внутриклеточного холестерина описано в разделе «Методы».

Разработанная клеточная модель в варианте *in vitro* была испытана для оценки влияния на содержание внутриклеточного холестерина известного лекарственного средства верапамила, относящегося к классу антагонистов кальция. В первичной культуре интимальных клеток аорты человека верапамил дозозависимо снижал атерогенность сыворотки крови больных с документированным атеросклерозом, что выражалось в подавлении накопления холестерина в культивируемых клетках (табл. 17). При этом свободный (неэтерифицированный) холестерин практически не изменялся. Это свидетельствует о том, что накопление холестерина в клетках происходит исключительно за счет эфиров холестерина. Наряду с подавлением накопления общего холестерина, наблюдалось подавление накопления двух других важнейших классов внутриклеточных липидов – фосфолипидов и триглицеридов.

Таблица 17 – Антиатеросклеротические эффекты верапамила в модели *in vitro*

Исследуемый параметр	Концентрация верапамила, М	Эффект верапамила, % от контроля
Общий холестерин	10^{-7}	104±5
	10^{-6}	82±8 (p<0,05)
	10^{-5}	61±4 (p<0,01)
Свободный холестерин	5×10^{-5}	90±8
Фосфолипиды	5×10^{-5}	61±8 (p<0,05)
Триглицериды	5×10^{-5}	76±2 (p<0,05)

Примечания

1 Контрольные уровни в контроле составили 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.

2 Достоверность отличий от контроля указана в таблице.

Эффекты верапамила, выявленные на модели *in vitro*, были подтверждены на модели *ex vivo*. В модели *ex vivo* также 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 изучения 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 препарата, 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».

В табл. 18 приведены данные, полученные на разработанной модели в варианте *ex vivo*. Добровольцы однократно принимали верапамил в дозе 40 мг. Кровь брали до приема верапамила (время «0») и через 1 час, 2 часа, 4 часа и 8 часов после приема. Из образцов крови готовили сыворотку и образцы сыворотки добавляли в первичную культуру непораженных клеток. Можно видеть, что значимое снижение накопления внутриклеточного холестерина наблюдалось в случае добавления в культуру сыворотки, приготовленной из крови, взятой спустя 2 часа после однократного приема верапамила (табл. 18). Таким же эффектом обладали сыворотки, взятые через 4, 8 и 12 часов после приема верапамила. Следовательно, начиная с 2 часов после однократного приема верапамила, сы-

воротка крови приобретает антиатеросклеротические свойства. Антиатеросклеротические свойства сыворотки сохраняются, по крайней мере, в течение 12 час после приема.

Таблица 18 – Антиатеросклеротическое действие верапамила в модели *ex vivo*

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

Примечание: * – достоверное снижение накопления внутриклеточного холестерина, $p < 0,05$.

Нами было проведено дополнительное исследование возможности использования других клеток, а именно, первичной культуры моноцитов-макрофагов крови человека, для оценки основных параметров атерогенеза.

Мы измерили атерогенный потенциал сыворотки крови (индуцированное этой сывороткой 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.

На основании полученных данных была доработана технология клеточной модели для поиска препаратов, обладающих антиатеросклеротической активностью.

Во-первых, из всех испытанных клеточных параметров, связанных с атеросклерозом, был оставлен только общий холестерин. Этот параметр изменялся однонаправленно с другими параметрами под воздействием различных агентов.

Во-вторых, в качестве клеточной культуры были использованы первичные культуры моноцитов, выделенных из крови человека. Использование этих клеток упрощает процедуру выделения, укорачивает сроки культивирования и снижает стоимость анализа.

Разработанная методика была использована для оценки эффектов известного ППП (Алликора), обладающего выраженной антиатеросклеротической активностью. Исследование было проведено у 20 добровольцев, у которых была ранее выявлена высокая атерогенность сыворотки крови. После однократного приема Алликора в дозе 150 мг атерогенный потенциал сыворотки крови (способность сыворотки крови вызывать накопление холестерина в культивируемых клетках) достоверно снижался уже через 4 часа. Антиатеросклеротический эффект длится 8–12 часов после приема Алликора (табл. 19).

Таблица 19 – Средние показатели снижения атерогенности сыворотки крови при однократном приеме Алликора

Время после приема, час	Атерогенность сыворотки крови, % от исходного уровня
0	100
2	34,2±7,8 *
4	31,6±4,6 *
8	53,0±5,0 *
12	67,3±5,4 *

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

3.2.3 Поиск богатого фитоэстрогенами растительного сырья, обладающего антиатеросклеротической активностью, разработка ППП

Нами был проведен скрининг по фитохимической и этноботанический базам данных Сельскохозяйственной научно-исследовательской службы Департамента сельского хозяйства США; выявлены биологически активные компоненты, обладающие эстрогеноподобной активностью; идентифицированы растения, являющиеся естественными источниками данных компонентов; определены качественные и количественные характеристики данных растений в отношении возможности их использования для восполнения потребности человека в фитоэстрогенах (табл. 20).

Таблица 20 – Характеристика эстрогеноподобных биологически активных веществ растительного происхождения по распространенности и доступности

	Широко распространены в природе, сырьевая база доступна	Мало распространены в природе, сырьевая база доступна	Мало распространены в природе, сырьевая база недоступна
Количественные показатели доступны	бета-ситостерол диосгенин генистеин кверцитин кампферол кумарин нарингенин стигмастерол танин	биоханин А генистин глицирризин глицитеин даидзеин даидзин кумэстрол ресвератрол формононетин	вогонин рапонтицин
Количественные показатели отсутствуют	анетол апигенин лютеолин	трицин флоретин	дианетол иризолон эмбелин

Для определения растительных компонентов, предназначенных для дальнейшей разработки фитоэстрогенного комплекса, был использован метод регрессионного анализа. В качестве определяющих переменных были использованы следующие показатели:

- количественное содержание эстрогеноподобных биологически активных компонентов (скалярная переменная);
- эстрогеноподобная активность биологически активных компонентов по генистеину (скалярная переменная);
- родовой рейтинг эстрогеноподобного потенциала (ординальная переменная);
- качественное содержание эстрогеноподобных биологически активных компонентов (ординальная переменная);
- вероятность выявления антиатеросклеротического и/или антиатерогенного действия (ординальная переменная);
- коммерческая доступность сырья (номинальная переменная);
- надежность поставщиков сырья (номинальная переменная);
- отсутствие ограничений для регистрации разработки в качестве биологически активной добавки к пище (номинальная переменная);
- принадлежность растительных компонентов к естественным компонентам питания и/или использование растительных компонентов в традиционной медицине (номинальная переменная);
- отсутствие потенциальных побочных эффектов и явлений при использовании растительных компонентов в составе биологически активной добавки к пище (номинальная переменная).

По наивысшим бета-коэффициентам регрессии был определен список растений, в который вошли: виноград, соя, шалфей, морковь, апельсин, солодка, чеснок, лук, хмель, чай, фукус, ламинария, клевер, фиалка, боярышник, бузина, календула.

В рамках исследований был проведен скрининг растительных объектов, обогащенных фитоэстрогенами. Были изготовлены экспериментальные образцы в количестве 17.

В качестве примера в табл. 22 приведены результаты испытаний антиатерогенного действия ППП из винограда (оценивали влияние однократного приема танина из виноградных семян (OenoColsulting SRL, Молдова) на атерогенность сыворотки крови).

Интегральная оценка антиатерогенного эффекта показала, что в среднем через 2, 4 и 6 часов после однократного приема танина из виноградных семян в дозе 250 мг атерогенность сыворотки крови снизилась на $67\pm 6\%$, $66\pm 5\%$ и $71\pm 6\%$ (все - $p < 0,05$).

На основании всех результатов проведенных испытаний сделаны следующие выводы:

1. Исследованные натуральные продукты: соя, измельченная сушеная виноградная выжимка, измельченные ферментированные виноградные гребни, измельченные виноградные семена, сушеная морковь, апельсин, солодка, лук, фукус, ламинария, клевер, фиалка, боярышник, бузина, календула – обладают низкой эффективностью по продолжительности и выраженности.

2. Натуральные продукты, имеющие адекватный качественный и количественный фитоэстрогенный состав, пригодные для использования в качестве растительного сырья в технологическом процессе, имеющие доступную сырьевую базу: танин из виноградных семян, хмель, чеснок, зеленый чай – обладают выраженными, длительными эффектами.

На основании полученных данных танин из виноградных семян, хмель, чеснок, зеленый чай – обладают выраженными, длительными эффектами были отобраны для создания препаратов на основе фитоэстрогенов, выполняющих роль альтернативы заместительной гормональной терапии.

Таблица 22 – Оценка антиатерогенного эффекта танина из виноградных семян (250 мг) в модели «ex vivo» в первичной культуре моноцитов крови человека

Эксперимент	Время после приема танина, ч	Содержание внутриклеточного холестерина, мкг/мг	Накопление холестерина, % от контроля
Доброволец № 1	Контроль	49,4±3,3	100±7
	0	69,6±3,2	141±6 *
	2	49,7±2,3	101±5 #
	4	50,0±3,2	101±6 #
	6	52,6±1,2	106±2 #
Доброволец № 2	Контроль	49,2±1,1	100±2
	0	64,5±2,8	132±6 *
	2	60,6±2,9	123±6
	4	56,5±2,3	115±5
	6	51,3±4,7	104±9
Доброволец № 3	Контроль	51,3±1,9	100±4
	0	68,4±3,5	133±7 *
	2	50,0±2,4	97± 5 #
	4	54,8±1,5	107±3 #
	6	54,5±1,2	106±2 #
Доброволец № 4	Контроль	52,4±0,8	100±2
	0	68,8±1,8	131±3 *
	2	58,8±1,4	112±3#
	4	58,3±1,4	111±3 #
	6	54,1±2,2	103±4 #

Примечания

1 * - достоверное накопление холестерина, $p < 0,05$

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

Для этого было необходимо было разработать рецептуру БАД (фитопрепарата), состав которого войдут оптимальные или наиболее эффективные компоненты (комбинации компонентов), а также вспомогательные средства, обеспечивающие, в том числе, пролонгированность действия БАД (фитопрепаратов).

Кроме того, следовало разработать лабораторный регламент получения препарата, а также произвести экспериментальную партию и осуществить исследовательские испытания по следующим показателям:

- физико-химических свойства (внешний вид; вкус; запах; средняя масса содержимого; влага);
- химическая безопасность (токсичные элементы: свинец; кадмий; мышьяк; ртуть; пестициды; ГХЦГ - а, в, у – изомеры; ДДТ и его метаболиты; гептахлор; алдрин);
- микробиологическая безопасность (КАМАФАНМ; БГКП – колiformы; *E. coli*; *S. Aureus*; сальмонеллы; дрожжи/плесени; *B. cereus*);
- радиационная безопасность (радионуклиды: цезий-137; стронций-90; показатель соответствия В);
- функциональные свойства, в том числе: антиоксидантная активность; иммуномодулирующие свойства; противовоспалительные свойства; антиатеросклеротическая активность.

Сведения о регламенте получения препарата, а также производстве экспериментальной партии и осуществлении исследовательских испытаний представлены в Приложении Б.

Рецептура БАД (фитопрепарата) представлена в табл. 23.

Таблица 23 – Рецептура к разрабатываемой биологически активной добавке к пище (фитопрепарату) «Антиатеросклеротическое средство, обогащенное фитоэкстрагенами, предназначенное для женщин после менопаузы»

Наименование ингредиента	Масса, мг	Содержание, %
Шишки хмеля обыкновенного	160	33,97
Чай зеленый байховый листовой	115	24,42
Чеснок гранулированный сушеный	100	21,23
Экстракт виноградной косточки	40	8,49
Бета-каротин	0,5	0,11
Витамин С	30	6,37
Витамин Е (50%)	6,6	1,40
Стеариновая кислота	12,4	2,63
Поливинилпирролидон	6,5	1,38
ИТОГО:	471	100

3.2.4 Обсуждение полученных данных

В нашем исследовании, в отличие от аналогичных работ, результаты которых опубликованы в международных научных изданиях, все эксперименты проводились с использованием человеческого материала. В частности, применялись макрофаги человека и модифицированные липопротеиды, выделенные из крови больных с подтвержденным атеросклерозом. Это является важным преимуществом по сравнению с аналогичными экспериментами, поскольку атеросклероз – это патологический процесс, свойственный только человеку, его моделирование на животных практически невозможно.

Наши результаты находятся в соответствии с данными [36], что эстрадиол (ЭС) достоверно снижает накопление холестерина в макрофагах (МФ), выделенных из крови женщин постменопаузального возраста. В макрофагах женщин пременопаузального возраста и мужчин

ЭС также препятствовал накоплению холестерина, но достоверных различий не было зафиксировано. В отношении пролиферативной активности МФ женщин постменопаузального возраста выявлено, что ЭС достоверно подавлял ее. Андрогены, напротив, стимулировали накопление холестерина и пролиферацию МФ как женщин любого возраста, так и мужчин. Блокирование андрогеновых рецепторов приводило к снижению пролиферации МФ. Таким образом выявлено, что ЭС блокирует накопление холестерина и пролиферацию, а тестостерон и дегидротестостерон оказывают стимулирующий эффект на развитие атеросклеротических процессов в МФ человека, причем блокада андрогеновых рецепторов нивелирует эффект андрогенов.

Объяснение отсутствия эффектов тестостерона в наших экспериментах не проявляет активности в отношении накопления холестерина заключается в том, что в макрофагах андрогенный сигнал проводится не классическим ядерным А-Рц, а рецептором с иной специфичностью [239]. Кроме того, по предварительным данным, гидроксифлутамид, являющийся конкурентным антагонистом А-Рц, способен воспроизводить ингибирующее действие дигидротестостерона на уровень холестерина в макрофагах [257,335]. В пользу этого предположения свидетельствует крайне низкое содержание мРНК А-Рц в макрофагах [228].

Второй вопрос, возникающий при анализе приведенных результатов, касается причины наблюдаемого полового различия в реакции макрофагов на эстрадиол. Имеющиеся данные показывают, что мужские клетки не отличаются явно от женских ни по мРНК Э-Рц, ни по мРНК ферментов локального образования эстрогенов [203]. По-видимому, в клетках мужчин имеется недостаточность дополнительных элементов проведения сигнала эстрогенов, таких как коактиваторы Э-Рц, или, напротив, в этих клетках избыточно продуцируются некие транскрипционные репрессоры или корепрессоры.

Полученные результаты позволяют предполагать, что половые гормоны могут участвовать в регуляции функций клеток сосудистой стенки в условиях нормы. Анализ содержания исследуемых типов мРНК в атеросклеротически поврежденных участках сосудов показал, что клетки поврежденных участков экспрессируют те же мРНК. Содержание части из них не изменяется достоверно при патологии, но часть претерпевает заметные изменения [268].

Разрабатываемая сегодня, главным образом за рубежом, концепция кардиопротекторного влияния эстрогенных лекарственных препаратов основана на большом клиническом материале, свидетельствующем о способности эстрогенов предотвращать и задерживать прогрессирование ИБС, артериальной гипертензии (АГ), пароксизмальных форм нарушения сердечного ритма (НРС), атеросклероза – прежде всего у женщин с дефицитом эстрогенов [168,181].

Результаты эпидемиологических исследований показывают значительное - на 40-50% – снижение вероятности развития коронарных заболеваний у женщин, получавших после менопаузы заместительную терапию [178]. Авторы указывают на защитное действие эстрогенов по отношению к сердечнососудистой системе и считают, что есть основания говорить о возможном продлении жизни женщины с помощью заместительной терапии [43–46].

Как известно, одним из ведущих звеньев патогенеза большинства ССЗ и их осложнений является атеросклеротическое поражение сосудов. Экспериментальные и клинические исследования свидетельствуют о защитном антиатеросклеротическом эффекте, который наблюдается при физиологическом повышении уровня эстрогенов во время беременности [93], при использовании эстрогенов в менопаузе [222] и у овариэктомированных самок животных, находящихся на атерогенной диете [72].

Большинство авторов указывают на благоприятное влияние эстрогенов на содержание липопротеидов плазмы крови (уменьшение фракции ЛНП и увеличение ЛВП) и холестерина [11,118], а также на метаболизм холестерина в сосудистой стенке (ингибирование процессов захвата и деградации) [119], что является важным компонентом механизма антиатеросклеротического действия эндогенных эстрогенов и эстрогенных лекарственных препаратов.

В настоящее время широко распространена точка зрения, согласно которой способность эстрогенов снижать риск сердечно-сосудистых заболеваний на 25-80 % обусловлена их положительным влиянием на липидный профиль [431].

В частности, к таким эффектам относится снижение концентрации ЛНП, являющихся основными транспортными белками для холестерина, и увеличение содержания липопротеидов высокой плотности ЛВП [122]. Кроме того, использование меченых ЛНП показало, что эстроген-заместительная терапия у самок обезьян приводит к снижению накопления ЛНП и продуктов их деградации в стенке коронарных артерий [428] и ослабляет активность процессов перекисного окисления ЛНП в сосудистой стенке [223].

В случае повреждения сосудистой стенки эстрадиол помогает восстанавливать функциональное состояние эндотелия и ингибирует пролиферативные процессы в стенке артерии, предотвращая ее утолщение [114]. Фархат с сотрудниками [145] указывают на то, что кардиопротекторный эффект эстрогена опосредуется непрямым путем через липопротеиновый метаболизм и прямым путем посредством прямого действия на стенки сосудов.

Одними из главных претендентов на антиатеросклеротическую роль являются препараты заместительной гормональной терапии (ЗГТ) для женщин в постменопаузе.

Однако раннее начало ЗГТ автоматически приведет к большей ее продолжительности, а это чревато увеличением риска заболевания раком молочной железы или другими осложнениями ЗГТ. Увеличению риска развития рака эндометрия может способствовать назначение ЗГТ в пременопаузе и при той разновидности перименопаузы, когда имеется относительная гиперэстрогения, и введение дополнительных экзогенных эстрогенов, даже в сочетании с прогестагенами, является нежелательным [56].

Видимо, поэтому популярность гормонотерапии в Европе и США падает и врачи-гинекологи все чаще рекомендуют лечение климакса негормональными растительными средствами, содержащими фитоэстрогены. Устранение последствий климакса с помощью фитоэстрогенов рекомендуется тем женщинам, у которых есть противопоказания к заместительной гормонотерапии, а также в качестве альтернативы гормонотерапии.

Отметим, что исследование возможной роли фитоэстрогена генистеина в развитии сердечно-сосудистых заболеваний было изучено и на клеточных моделях [67]. Присутствие генистеина в концентрации 25 $\mu\text{моль/л}$ в культуре пролиферирующих эндотелиальных клеток приводило к торможению пролиферации, а в культуре покоящихся клеток не вызывал изменений и токсических эффектов даже в дозе до 200 $\mu\text{моль/л}$. Эти данные важны с учетом возможной необходимости использовать ФЭ в качестве лекарств с меньшим количеством побочных эффектов.

Однако с точки зрения физиологии неясно, как возможно добиться таких высоких концентраций ФЭ в крови. При оценке фармакокинетики ФЭ, учитывающей их потребление, всасывание из кишечника, распределение в периферических тканях и экскрецию, даже у людей, употребляющих большое количество богатых ФЭ продуктов, концентрация изофлавонов вряд ли может превысить 1-5 $\mu\text{моль/л}$ [388].

Различные исследования касались изучения роли генистеина в ингибировании такого фермента, как тирозинкиназа [410]. Повышенное фосфорилирование тирозиновых остатков белков тромбоцитов связано с активацией тромбоцитов и возникает в ответ на стимуляцию тромбином [234]. Таким образом, вещества способные ингибировать тирозин (например, генистеин) могут снизить фосфорилирование, что в свою очередь приведет к уменьшению агрегации тромбоцитов.

Количество клинических исследований в данной области несколько ограничено. Длительных, клинических, плацебо-контролируемых исследований эффективности и безопасности применения ФЭ практически не проводилось. До настоящего времени существует несоответствие между пониманием эффективности действия ФЭ и той ролью, которую они играют в жизни человека. ФЭ могли бы занять значимую роль в лечении климактерических расстройств у женщин с высоким риском развития эстрогензависимых опухолей или просто не желающих получать ЗГТ. Несмотря на недостаточность данных об эффективности ФЭ, полученных в клинических исследованиях, на рынок уже выведено некоторое количество БАД, содержащих ФЭ.

В этой связи можно надеяться, что разработанные нами препараты, служащие альтернативой ЗГТ и обладающие антиатеросклеротическим действием, будут представлять значительный интерес.

С позиции лекарство-мишень следует отметить, что мишенью обнаруженных нами эффективных фитоэстрогенов являются, по-видимому, рецепторы гормонов. О компонентах растений, действующих на эти мишени, известно следующее. Хмель содержит фитоэстроген 8-пренилнارينгенин. В чесноке наиболее изученные лигнаны (энтеродиол и энтеролактон) являются фитоэстрогенами и антиоксидантами. Фитоэстрогены содержатся и в зеленом чае. Основные фитоэстрогены винограда относятся к классу флавоноидов. Это танин, катехин, эпикатехин, кверцетин, кампферол, лютеин и некоторые другие

[39]. При производстве БАД разрешено использовать предлагаемые нами для рецептуры танин из виноградных семян, хмель, чеснок, зеленый чай [62].

3.3 Действие ЛВП на обратный транспорт холестерина и разработка эффективных ППП

3.3.1 Исследование влияния белков, потенциально вовлеченных в отток холестерина, на экспорт холестерина из макрофагов

Отток холестерина является первой и, скорее всего, лимитирующей стадией обратного транспорта холестерина (ОТХ). ОТХ – это путь удаления избытка холестерина из сосудистых клеток, что обеспечивает защиту сосудистой стенки от развития атеросклероза. Было описано несколько путей оттока холестерина. Одним из них является диффузионный путь, который не зависит от какого-либо специального клеточного белка. Несколько специфичных путей включают большое число клеточных белков (раздел Обзор литературы).

Поскольку патогенетические механизмы атеросклероза включают особенности функционирования белков, участвующих в оттоке холестерина, и знание этих механизмов может быть использовано при разработке клеточных моделей, мы воспользовались новым методом высокоэффективной трансфекции макрофагов [140] для избирательного усиления различных путей оттока холестерина, чтобы исследовать вклад путей, использующих апоА-I, в сопоставлении с теми путями, которые используют в качестве акцептора ЛВП, в суммарный экспорт холестерина из макрофагов *in vitro* и *in vivo*.

Восемь белков, потенциально вовлеченных в отток холестерина (ABCA1, ABCG1, CYP27A1, phospholipid transfer protein (PLTP), SR-B1, caveolin-1, cholesteryl ester transfer protein (CETP) и аполипопротеин А-I (apoA-I)), были оверэкспрессированы каждый по отдель-

сти или в комбинации в макрофагах RAW 264.7. с использованием ранее описанного протокола, который обеспечивает 80% эффективности трансфекции и равномерную выраженность гетерологичных генов во всей клеточной популяции. В стандартных условиях эксперимента клетки не были нагружены холестерином, так как нагрузка усиливает несколько путей оттока холестерина, включая ABC переносчики.

Тестирование эффектов оверэкспрессии различных белков на отток холестерина привело к созданию двух различных клеточных моделей. В одной из моделей на RAW 264.7 клетках совместная трансфекция ABCA1 или ABCA1 + SR-B1 + CYP27A1 + PLTP повышала отток холестерина на обезлипиженный апоА-I, но не на ЛВП. На другой модели на RAW 264.7 клетках трансфицированных кавеолоном-1 или кавеолоном-1 + SR-B1 повышался отток холестерина на ЛВП, но не на обезлипиженный апоА-I. Эти модели предоставляют возможность сравнить вклад этих двух акцепторов в экспорте холестерина.

Для тестирования оттока *in vitro* мы удалили апоВ-содержащие липопротеиды из плазмы путем осаждения декстрансульфатом, минимизируя неспецифической (диффузионный) отток. Плазма была использована в концентрации 2% линейной части кривой зависимости от дозы. Когда апоВ-обедненная плазма крови человека была использована в качестве акцептора, оверэкспрессия ABCA1 или ABCA1 + SR-B1 + PLTP + CYP27A1 стимулировала отток холестерина на 30% и 40%, соответственно, в то же время оверэкспрессия кавеолона-1 или кавеолона-1 + SR- B1 не влияла на уровень оттока холестерина (рис. 9).

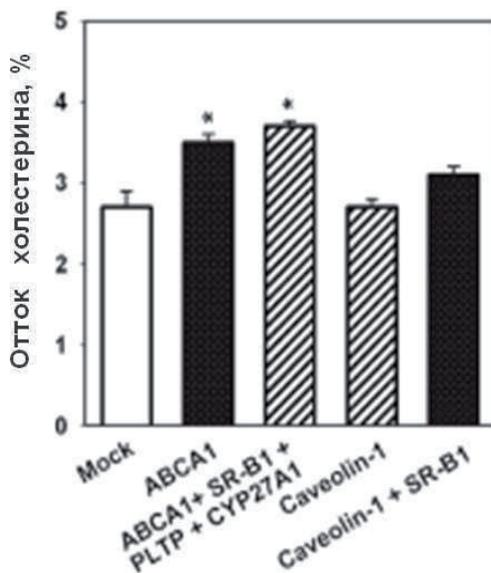


Рисунок 9 – Оверэкспрессия различных генов и отток холестерина в плазме крови человека

Примечания

1 RAW264.7 клетки были трансфицированы указанными генами. Клетки были помечены [³H]холестерином, и отток холестерина в 2% апоВ-обедненной плазме крови человека оценивается, как описано в разделе «Методы исследования».

2 Отток холестерин был выражен как доля [³H]холестерина, перенесенного с клеток в среду.

3 Приведены средние значения четырех экспериментов ± SEM.

4 * p <0,05 по сравнению с ложнотрансфицированными клетками.

Последний результат был неожиданным, так как липидированные ЛВП представляет собой основную часть плазменного апоА-I; это факт указывает на то, что плазменный уровень ЛВП не всегда является основным фактором плазмы, определяющим потенциал оттока холестерина. Мы предполагаем, что увеличение оттока холестерина в основном происходит за счет оттока на обезлипидированный апоА-I. Наши данные указывают на то, что уровень оттока холестерина из макрофа-

гов может быть повышен за счет манипулирования клеточными путями, ответственными за отток на апоА-I.

Можно заключить, что путь оттока холестерина, использующий апоА-I в качестве акцептора, имеет доминирующий вклад в экспорт холестерина из макрофагов. Ключевым элементом этого пути, по-видимому, является белок ABCA1, а белки CYP27A1, PLTP и SR-B1 играют вспомогательную роль.

Таким образом, проведенные эксперименты еще раз подтвердили сложность процесса удаления избытка холестерина из клеток сосудистой стенки, участие в специфичных путях оттока большого числа транспортеров и регуляторов. С учетом цели нашей работы, следовало предложить такую клеточную модель, которая охватывала бы все или большинство этих участников и позволяла измерять некий интегральный параметр, характеризующий эффективность оттока холестерина и ее изменение в присутствии фармакологических агентов.

3.3.2 Разработка клеточных моделей in vitro и ex vivo для поиска источников фармакологических веществ, потенциально пригодных для ЛВП-терапии

В серии проведенных экспериментов были предприняты попытки использования обеих клеточные модели – культуры моноциты-макрофаги и культуры клеток аорты человека и (раздел Методы, разновидность методик для измерения оттока холестерина). Более подходящей оказалась методика культивирования клеток, выделенных из аутопсийного материала аорты человека (раздел Методы). Клетки выделяли из субэндотелиального слоя интимы, поскольку именно в этом слое возникает и развивается атеросклеротическое поражение. Клетки выделяли из жировых атеросклеротических поражений. Такие клетки сохраняют в культуре избыточное содержание холестерина, являющееся основным проявлением атеросклероза на клеточном уровне. Использование этого

подхода не предусматривает, в отличие от моноцитов-макрофагов, искусственной нагрузки культивируемых клеток холестерином. Состав и содержание внутриклеточных липидов полностью соответствуют составу и содержанию липидов в клетках, популирующих атеросклеротическое поражение сосудистой стенки человека.

С целью расширения показателей антиатеросклеротической активности, помимо содержания внутриклеточного холестерина, определяли содержание других классов липидов, а также влияние исследуемых агентов на пролиферативную активность культивируемых клеток, а также на синтез коллагена. Повышенная пролиферативная активность и усиленный синтез компонентов внеклеточного матрикса, прежде всего коллагена, являются, наряду с накоплением внутриклеточного холестерина, наиболее яркими проявлениями атеросклероза на клеточном уровне.

С учетом полученных на предыдущих этапах исследований результатов изучения действия лекарств и для поиска растительных источников фармакологических веществ, потенциально пригодных для ЛВП-терапии, применялись как клеточная модель *in vitro*, так и модель *ex vivo*.

Для последней существенным отличием от модели *in vitro* было то, что в культуру клеток добавляли не биологические агенты, а сыворотку крови больных, принимавших различные растительные препараты. Оценивалось влияние этих препаратов на отток холестерина. Данная модель максимально приближена к ситуации в организме, что позволяет легко интерпретировать результаты наблюдений. Поскольку в сыворотке крови содержатся все компоненты, которые могут влиять на отток холестерина, получаемые данные следует рассматривать как интегральный показатель, отражающий конечный итог влияния всех возможных эффекторов на отток холестерина.

На разработанных клеточных моделях оттока холестерина в вариантах *in vitro* и *ex vivo* были испытаны известные антиангинальные лекарственные средства. Это были гиполипидемические препараты,

используемые для снижения уровня холестерина в крови, относящиеся к различным классам фармакологических веществ.

Среди них был ловастатин, относящийся к классу статинов, а также липостабил, содержащий липиды натурального происхождения. Были также испытаны ингибиторы ацил-КоА-холестерина-ацилтрансфераза (АХАТ) – фермента, принимающего участие в накоплении холестерина в клетках сосудистой стенки. Было обнаружено, что только липостабил достоверно снижал содержание холестерина в клетках, культивируемых из атеросклеротических поражений аорты человека, то есть вызывал обратный транспорт холестерина (табл. 24). Ни статинов, ни ингибиторов АХАТ не способствовали обратному транспорту холестерина из атеросклеротических клеток.

Таблица 24 – Влияние липостабила, ловастатина и ингибиторов ацил-КоА-холестерина-ацилтрансферазы (АХАТ) на содержание холестерина в атеросклеротических клетках интимы аорты человека *in vitro*

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

Примечания

1 Клетки из пораженных атеросклерозом участков интимы аорты человека выделяли и культивировали, как описано в разделе «Методы». Влияние веществ на содержание внутриклеточного холестерина изучали в концентрации 10^{-6} М. Данные представляют средние значения, полученные в трех независимых экспериментах.

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

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

Неожиданным оказалось отсутствие эффекта у ингибиторов АХАТ. Эти соединения прямо участвуют во внутриклеточном метаболизме холестерина, препятствуя этерификации свободного холестерина и, тем самым, обеспечивая накопление холестерина в клетках в форме эфиров холестерина. Тем не менее, ингибиторы АХАТ не способствовали снижению холестерина в атеросклеротических клетках, то есть не повышали обратный транспорт холестерина. Можно предполагать, что эти соединения в лучшем случае обладают антиатерогенным эффектом, то есть препятствуют возникновению и развитию атеросклеротического поражения, но не антиатеросклеротическим эффектом, проявляющемся в регрессии уже имеющихся атеросклеротических поражений.

В табл. 25 приведены данные комплексной оценки влияния на атеросклеротические показатели культивируемых клеток известного лекарственного средства верапамила, относящегося к классу антагонистов кальция. Известно, что верапамил обладает антиатеросклеротическим действием, вызывая регрессию атеросклероза у больных с документированными атеросклеротическими поражениями сосудов.

Таблица 25 – Антиатеросклеротические эффекты верапамила в модели *in vitro*

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

Примечания

1 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.

2 Достоверность отличий от контроля указана в таблице.

В первичной культуре интимальных клеток аорты человека верапамил дозозависимо снижал содержание общего холестерина, то есть способствовал обратному транспорту холестерина. При этом свободный (неэтерифицированный) холестерин не изменялся. Это свидетельствует о том, что снижение содержания холестерина в клетках происходит исключительно за счет эфиров холестерина. В отсутствие верапамила отток холестерина из клеток не наблюдался.

Наряду со снижением общего холестерина, наблюдалось уменьшение содержания двух других важнейших классов внутриклеточных липидов – фосфолипидов и триглицеридов. Таким образом, обратный транспорт холестерина из атеросклеротических клеток сопровождается снижением внутриклеточного содержания других важнейших классов липидов, что должно способствовать освобождению клеток атеросклеротического поражения от избыточного жира. Такая регрессия клеточного липидоза может объяснять механизм антиатеросклеротического действия верапамила.

Верапамил вызывал дозозависимое существенное подавление пролиферативной активности культивируемых атеросклеротических клеток (табл. 25). Кроме того, верапамил подавлял синтез коллагена в первичной культуре клеток, выделенных из атеросклеротического поражения (табл. 25).

Таким образом, верапамил не только способствует оттоку холестерина из атеросклеротических клеток, но обладает и другими антиатеросклеротическими эффектами на уровне клеток сосудистой стенки, подавляя пролиферативную и синтетическую активность, то есть уменьшает или подавляет все основные проявления атеросклероза на клеточном уровне – липоидоз, пролиферацию и фиброз. Полученные данные демонстрируют важное свойство разработанной модели для оценки оттока холестерина. Она сможет быть использована для оценки антиатеросклеротической активности в целом и для изучения механизма антиатеросклеротических эффектов различных агентов.

Влияние верапамила на отток холестерина, выявленное на модели *in vitro*, было подтверждено на модели *ex vivo*. В табл. 26 приведены данные, полученные на разработанной модели *ex vivo*. Добровольцы однократно принимали верапамил в дозе 40 мг. Кровь брали до приема верапамила (время «0») и через 1, 2, 4 и 8 часов после приема. Из образцов крови готовили сыворотку и образцы сыворотки добав-

ляли в первичную культуру атеросклеротических клеток. Можно видеть, что значимое снижение содержания внутриклеточного холестерина наблюдалось в случае добавления в культуру сыворотки, приготовленной из крови, взятой спустя 2 часа после однократного приема верапамила (табл. 26). Таким же эффектом обладали сыворотки, взятые через 4, 8 и 12 часов после приема верапамила. Следовательно, начиная с 2 час после однократного приема верапамила сыворотка крови приобретает антиатеросклеротические свойства, проявляющиеся в способствовании обратному оттоку холестерина из атеросклеротических клеток. Антиатеросклеротический свойства сыворотки сохраняются по крайней мере в течение 12 час после приема.

Таблица 26 – Антиатеросклеротическое действие верапамила в модели *ex vivo*

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

Примечания

1 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, $p < 0,05$.

Верапамил, будучи представителем класса антагонистов кальция, является антиангинальным препаратом. Антиангинальные лекарст-

венные средства широко применяются для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, морфологической основой которых является атеросклероз.

Данные о прямых антиатеросклеротических эффектах верапамила на уровне артериальных клеток, выявленные на модели *in vitro*, стали побудительным мотивом для проверки других классов антиангинальных лекарственных средств на этой модели. В дополнение к верапамилу были испытаны другие антагонисты кальция, в частности: нифедипин, дилтиазем, никардипин, циннаризин, папаверин. Кроме того, на разработанной клеточной модели *in vitro* были испытаны бета-блокаторы и нитраты, которые, наряду с антагонистами кальция, являются наиболее широко используемыми классами антиангинальных препаратов. Среди бета-блокаторов использовались: пропранолол, альпренолол, метопролол, пиндолол, тимолол. Нитратами, подвергнутыми испытаниям на модели *in vitro*, были: нитроглицерин, изосорбид, нитропруссид.

Все исследованные антагонисты кальция способствовали оттоку холестерина из атеросклеротических клеток на разработанной клеточной модели *in vitro*, вызывая значимое снижение содержания внутриклеточного холестерина в культивируемых клетках атеросклеротического поражения аорты человека (табл. 27). Помимо этого, все антагонисты кальция подавляли пролиферативную активность атеросклеротических клеток. Таким образом, можно утверждать о наличии у антагонистов кальция антиатеросклеротических эффектов, проявляемых на уровне клеток сосудистой стенки.

Напротив, все исследованные бета-блокаторы не только не способствовали оттоку холестерина из атеросклеротических клеток на разработанной модели *in vitro*, но и повышали в них содержание холестерина (табл. 27). Параллельно все бета-блокаторы стимулировали пролиферативную активности культивируемых атеросклеротических клеток (табл.

27). Таким образом, в противоположность антиатеросклеротическим эффектам антагонистов кальция, бета-блокаторы вызывают прямые проатерогенные эффекты на уровне артериальных клеток.

Таблица 27 – Влияние антагонистов кальция, бета-блокаторов и нитратов на содержание холестерина и пролиферативную активность клеток, выделенных из атеросклеротической бляшки

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

Примечания

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

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

Третий класс антиангинальных препаратов – нитраты – не способствовал оттоку холестерина на модели *in vitro*. Нитраты не оказывали значимого влияния ни на содержание холестерина, ни на пролиферативную активность атеросклеротических клеток, то есть они не обладали эффектами, имеющими отношение к атеросклерозу (табл. 27).

При этом данные о прямых антиатеросклеротических эффектах антагонистов кальция, проатерогенных эффектах бета-блокаторов и выявленное отсутствие эффектов, имеющих отношение к атеросклерозу, у нитратов имеют важное самостоятельное значения для объяснения механизмов различного действия этих препаратов на развитие атеросклероза в артериальной стенке.

Данные проведенных исследований явились иллюстрацией использования разработанной клеточной модели оттока холестерина *in vitro* для выявления эффективности различных фармакологических средств.

На основании полученных данных была доработана технология клеточной модели для поиска препаратов ЛВП-терапии, вызывающих отток холестерина.

Во-первых, из всех испытанных клеточных параметров, связанных с атеросклерозом, был оставлен только внутриклеточный холестерин. Этот параметр изменялся однонаправленно с другими параметрами под воздействием различных агентов.

Во-вторых, было отдано предпочтение биохимическому измерению внутриклеточного холестерина, а не радиометрическому определению оттока холестерина из клеток, поскольку содержание внутриклеточного холестерина является прямым индикатором оттока холестерина.

В-третьих, в качестве клеточной культуры были использованы первичные культуры субэндотелиальных клеток интимы аорты человека, полученные из атеросклеротических поражений. Такие клетки сохраняют в культуре избыточное содержание холестерина. Исполни-

зование этих клеток не предусматривает искусственной нагрузки культивируемых клеток холестерином.

3.3.3 Испытания препаратов, способствующих оттоку холестерина из клеток сосудистой стенки

Для поиска препаратов, способствующих оттоку холестерина из клеток сосудистой стенки, был проведен информационный поиск наиболее перспективных натуральных препаратов и изготовлены экспериментальные образцы в количестве 8. На моделях на основе культуры клеток интимы аорты изучались как антиатерогенный эффект, то есть подавление атерогенности (накопление холестерина), так и антиатеросклеротическое действие (отток холестерина) этих объектов.

В табл. 28 представлены данные о снижении атерогенности под воздействием натуральных продуктов. Добровольцы принимали натуральные продукты и, спустя разные промежутки времени, у них забирали кровь, готовили сыворотку и добавляли ее в первичную культуру клеток аорты человека, выделенных из непораженных участков. Различные натуральные продукты вызывали различные эффекты. Так, наиболее эффективным оказался чеснок, а наименее эффективной - солянка холмовая. Лук также вызывал весьма умеренный эффект.

При этом слабый в антиатерогенном отношении лук оказался весьма эффективным антиатеросклеротическим продуктом, вызывающим на модели *ex vivo* снижение содержания холестерина в культивируемых атеросклеротических клетках.

С другой стороны, эффективный в антиатерогенном отношении чеснок оказался довольно слабым антиатеросклеротическим натуральным продуктом, то есть не вызывал существенного оттока холестерина из культивируемых клеток, снижая содержание эфиров холестерина на $21,9 \pm 0,5\%$. В то же время, антиатерогенный эффект чесно-

ка проявлялся в полном подавлении накопления эфиров холестерина, вызванном атерогенной сывороткой крови.

Таблица 28 – Антиатерогенное и антиатеросклеротическое действие натуральных препаратов

Растительный препарат и его источник	Антиатерогенный эффект, %	Антиатеросклеротический эффект, %
Листья солянки холмовой (<i>Salsola collina</i>)	11,3±0,5	8,8±0,2
Порошок луковички лука (<i>Allium cepa</i>)	21,2±0,4*	20,6±0,4*
Порошок сока свеклы (<i>Beta vulgaris</i>)	31,6±0,5*	16,7±0,6*
Порошок спирулины (<i>Spirulina platensis</i>)	51,5±0,4*	10,2±0,4
Экстракт хвои сосны (<i>Pinus sylvestris</i>)	52,5±0,2*	5,4±0,3
Порошок корня солодки (<i>Glycyrrhiza glabra</i>)	55,3±0,3*	17,3±0,5*
Проростки пшеницы (<i>Triticum vulgare</i>)	69,8±0,6*	15,5±0,4*
Порошок луковички чеснока (<i>Allium sativum</i>)	77,5±0,7*	11,9±0,5

* - достоверное увеличение показателей по сравнению с контролем, $p < 0,05$

Таким образом, изученные растительные объекты обладают различной антиатерогенной и антиатеросклеротической эффективностью. Наивысшей антиатерогенной эффективностью обладает чеснок. Наивысшей антиатеросклеротической эффективностью обладает лук. В этой связи представляется целесообразным использовать лук в качестве растительного сырья для разработки и создания препарата, способствующего обратному транспорту холестерина.

Нами была также определена оптимальная доза порошка лука, способствующая оттоку холестерина. На рис. 10 представлены данные, полученные при испытании 4 доз порошка лука на добровольцах.

Кровь забирали до приема однократной дозы и через 2, 4 и 6 часов после приема. Сыворотку крови добавляли в первичную культуру атеросклеротических клеток и измеряли содержание внутриклеточного холестерина до и после добавления сыворотки. Можно видеть, что дозы 100 и 150 мг оказались неэффективными. В то же время, дозы 250 и 400 мг обладали сходными эффектами. Таким образом, оптимальной дозой является доза 250 мг. Именно эта доза была рекомендована для создания препарата на основе порошка лука (БАД или фитопрепарата), способствующего обратному транспорту холестерина.

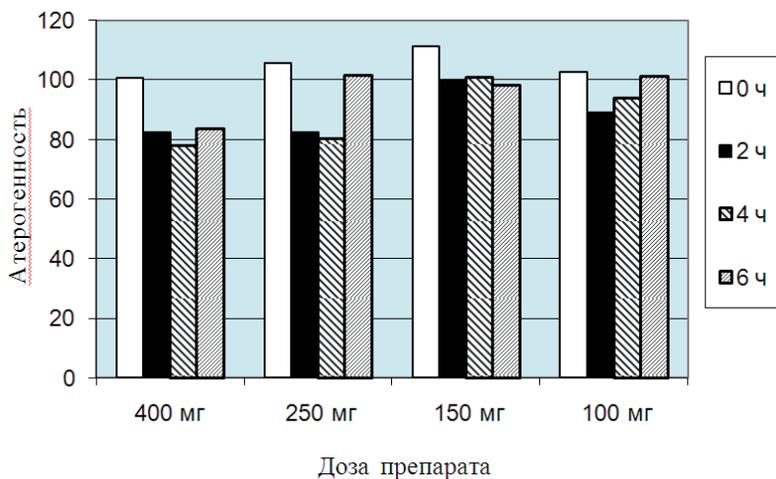


Рисунок 10 – Изменение атерогенности сыворотки крови после однократного приема различных доз порошка лука

На основании полученных данных порошок лука был отобран для создания препарата, способствующего оттоку холестерина из стенок пораженных атеросклерозом сосудов. Для этого была разработана рецептура БАД (фитопрепарата), состав которого вошли оптимальные количества порошка лука, а также вспомогательные сред-

ва, обеспечивающие, в том числе, пролонгированность действия БАД (фитопрепаратов).

Сведения о регламенте получения препарата, производстве экспериментальной партии и осуществлении исследовательских испытаний представлены в Приложении В.

Рецептура БАД (фитопрепарата) представлена в табл. 29.

Таблица 29 – Рецепт к разрабатываемой биологически активной добавке к пище «Средство, способствующее оттоку холестерина из клеток сосудистой стенки»

Наименование ингредиента	Содержание, %	Масса, мг
Лук сушеный	68,19	300
Стеариновая кислота	5,45	24
Лактоза	20,68	91
Поливинилпирролидон	5,68	25
Итого	100	440

В дальнейшем была получена опытная партия препарата для проведения испытаний. Добровольцы получали 1 таблетку ППП, и кровь у них забирали до приема и через 2, 4, 6 и 8 час после приема препарата. Из образцов крови готовили сыворотку, которую добавляли в первичную культуру атеросклеротических клеток. На рис. 11 представлено изменение свойств сыворотки крови после приема препарата на основе порошка лука. Можно видеть, что значимый отток холестерина из атеросклеротических клеток наблюдается только под воздействием сыворотки крови, взятой не ранее, чем через 4 час после приема препарата.

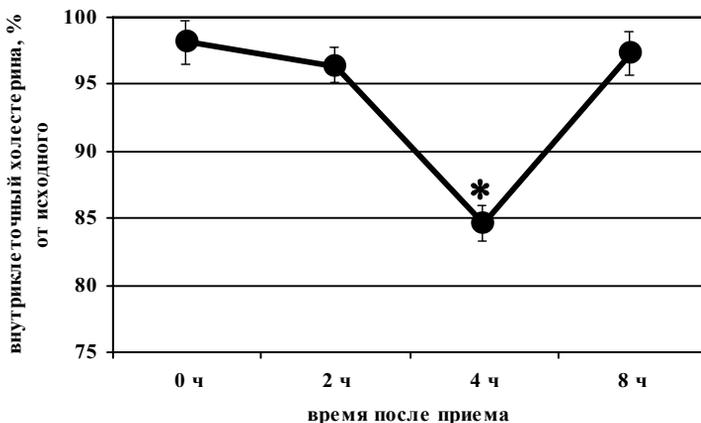


Рисунок 11 – Антиатеросклеротический эффект (отток холестерина) препарата природного происхождения на основе порошка лука
Примечание:

* - статистически значимое отличие от исходного ($P < 0,05$)

Кроме того, следовало разработать лабораторный регламент получения препарата, а также произвести экспериментальную партию и осуществить исследовательские испытания по следующим показателям:

- физико-химических свойства (внешний вид; вкус; запах; средняя масса содержимого; влага);
- химическая безопасность (токсичные элементы: свинец; кадмий; мышьяк; ртуть; пестициды; ГХЦГ - а, в, у – изомеры; ДДТ и его метаболиты; гептахлор; алдрин);
- микробиологическая безопасность (КАМАФАНМ; БГКП – колиформы; E. coli; S. Aureus; сальмонеллы; дрожжи/плесени; B. cereus);
- радиационная безопасность (радионуклиды: цезий-137; стронций-90; показатель соответствия В);
- функциональные свойства, в том числе: антиоксидантная активность; иммуномодулирующие свойства; противовоспалительные свойства; антиатеросклеротическая активность.

Результаты выполнения вышеуказанных работ представлены в Приложении Д.

3.3.4 Обсуждение полученных данных

Участию ЛВП в оттоке холестерина посвящено достаточно много работ, однако механизмы их действия изучены слабо, а эффективность терапевтического влияния ЛВП на течение атеросклероза требует дополнительных доказательств [28].

К способам повышения эффективности ЛВП относят в основном те, которые влияют на механизмы эндогенных путей метаболизма, такие, как синтез и липидирование апоА-I, множественные стадии ремоделирования ЛВП, в которых участвуют лецитин-холестерина ацилтрансфераза (LCAT) и белок, переносящий эфиры холестерина (СЕТР), поглощение ЛВП печенью, а также добавление к существующим ЛВП избытка экзогенных ЛВП или предшественников [29].

Основную роль в обратном транспорте холестерина играют липопротеиды высокой плотности (ЛВП), содержащие аполипопротеин А-I (apoA-I), и клеточные ABC-транспортеры. Зависимый от ABCA1 механизм заключается в липидировании apoA-I клеточными липидами. Это главный путь оттока холестерина для многих типов клеток. В отсутствие ABCA1 клетки не могут передавать липиды на делипидированный apoA-I и освобождаться от избытка холестерина [40–42].

Были описаны множество путей оттока холестерина, но относительный вклад каждого из них в экспорт холестерина из клеток остается неясным. Инактивация конкретных путей оттока в некоторых клетках приводит к значительному нарушению экспорта холестерина и накопление внутриклеточного холестерина, в то время как в других клетках та же инактивация оказывает минимальное влияние на отток

холестерина и накопления холестерина. Например, нокаут ABCA1 в макрофагах мыши приводит к тяжелым нарушениям оттока холестерина и к накоплению холестерина в этих клетках [74], но накопление холестерина не наблюдается в фибробlastах Танжера или эндотелиальных клетках при нехватке ABCA1 [149]. Кроме того, сверхэкспрессия СУР27А1 [142,143], кавеолина-1 [159] и ABCG1 [435] приводит к значительному повышению оттока холестерина *in vitro*, но в то же время нокаут этих генов *in vivo* имеет только умеренное влияние на накопление холестерина макрофагах [267,320,338]. Эти и другие примеры показывают, что различные клетки могут использовать различные пути для оттока холестерина и для поддержания гомеостаза холестерина и/или имеет место значительная избыточность в путях экспорта холестерина. Другой возможностью является то, что использование различных путей зависит от преобладающих метаболических обстоятельств и внутриклеточной локализации избыточного холестерина. Так, клеточный пул холестерина в макрофагах, перегруженных ЛНП, более эффективно уменьшается при использовании ABCG1-зависимого пути, в то время как клеточный пул в клетках, перегруженных ацетилированными ЛНП, снижается в основном за счет ABCA1-зависимого пути [434].

При использовании в качестве акцептора apoA-I, сверхэкспрессия комбинации ABCA1, СУР27А1, PLTP и SR-B1 (комбинация I) повышала отток в 4,3 раза. Было установлено, что стимуляция оттока обусловлена избытком ABCA1 и повышенным связыванием apoA-I с сайтами на макрофагах, не имеющими отношения к ABCA1. Эта комбинация вызывала лишь небольшое увеличение оттока к выделенным липопroteидам низкой плотности. Когда в качестве акцептора были использованы ЛВП, сверхэкспрессия кавеолина-1 или комбинации кавеолин-1 с SR-B1 (комбинация II) была наиболее активной, увеличивая отток на ЛВП без эффекта на отток на apoA-I.

Результатом нашего исследования является то, что повышение оттока холестерина при использовании апоА-I в качестве акцептора приводит к увеличению экспорта холестерина из макрофагов, при этом использование путей оттока, которые используют ЛВП в качестве акцептора, было неэффективным. Тот факт, что отток холестерина был усилен через использование апоА-I, но не ЛВП, указывает на то, что первый путь, возможно, имеет основной вклад в общий экспорт холестерина или стимулирующие его вещества потенциально могут быть объектами для разработки терапии. Это согласуется с выводами, что инактивация в макрофагах ABCA1, который является основным элементом пути оттока холестерина с использованием апоА-I, способствует атеросклерозу [74], в то время гиперэкспрессия ABCA1 защищает от атеросклероза [374]. Кроме того, в соответствии с последними работами Adorni et al. [73], ABCA1-зависимый отток в сыворотке крови человека *ex vivo* является преобладающим путем оттока холестерина. Инактивация или гиперэкспрессия ключевых элементов пути оттока, который использует ЛВП как первичный акцептор, таких как ABCG1, как было показано, имеют ограниченное влияние на развитие атеросклероза [320]. Следует признать, однако, что последствия гиперэкспрессии и инактивации белков не обязательно являются взаимодополняющими. Например, экспрессия белка не может повлиять на функцию, если белок присутствует в функционально насыщенной концентрации, как было бы в случае ABCG1. Таким образом, наши данные полезны скорее для разработки возможных подходов к повышению обратного транспорта холестерина, а не для объяснения возможных причин его нарушения.

Еще одним выводом из нашего исследования является то, что CYP27A1, PLTP и SR-B1 дополняют ABCA1-зависимый отток холестерина на апоА-I. Точный механизм взаимодействия между этими

белками и роль каждого отдельного белка остаются неясными. Сравнение оттока холестерина после различных трансфекций ясно указывает на необходимость наличия ABCA1 в этой комбинации, поскольку было достигнуто лишь умеренное увеличение оттока холестерина, когда ABCA1 был исключен из комбинации, и даже этот эффект объясняется, вероятно, влиянием сверхэкспрессированных белков на относительное содержание ABCA1. Однако относительное содержание ABCA1 в клетках и содержание ABCA1 на поверхности клетки не увеличиваются в результате совместной экспрессии ABCA1 + PLTP + CYP27A1 + SR-B1 по сравнению с сверхэкспрессией одного ABCA1. Содержание холестерина в плазматической мембране также не изменялось, и, хотя ABCA1 увеличил содержание холестерина в обогащенных холестерином доменах, совместная экспрессия трех других генов не вызвала его дальнейшего увеличения. Ни перенос холестерина на плазматическую мембрану, ни связывание апоА-I с ABCA1 не изменялись в результате совместной трансфекции. Однако, общее количество апоА-I связанного с клетками трансфицированными ABCA1 + PLTP + CYP27A1 + SR-B1 было двукратным по сравнению с ложнотрансфицированными и ABCA1 трансфицированными клетками, что может объяснить увеличение оттока холестерина. Дополнительные апоА-I сайты связывания не были найдены на четырех экспрессируемых белках и их природа остается неясной. Недавно было предположено, что для эффективного оттока холестерина требуется формирование обогащенных фосфолипидами изогнутых доменов мембраны, обладающих высоким средством связывания с апоА-I [199,419]. Вполне возможно, что сверхэкспрессия сочетания белков стимулирует образование таких доменов и усиливает ассоциацию апоА-I с этими доменами или их белковыми и/или липидными компонентами. Роли отдельных белков, особенно SR-B1, который вовлечен в основном в

отток холестерина на ЛВП, остаются неясными и механизмы еще не определены.

Итак, мы показали, что отток холестерина на апоА-I, вероятно, вносит основной вклад в уровень экспорта холестерина из макрофагов. Ключевым элементом этого пути, по-видимому, является ABCA1, а CYP27A1, PLTP и SR-B1 играют вспомогательную роль.

Эти данные находятся в соответствии с результатами работы по математическому моделированию оттока холестерина из периферических тканей мужчин с разным уровнем холестерина ЛВП. В частности, авторами показано, что при повышенном уровне холестерина ЛВП основной вклад в отток холестерина с клеточной мембраны вносит уровень апоА-I.

С учетом полученных данных, нами разработана клеточная модель, которая охватывает большинство регуляторов и участников ОТХ и позволяет измерять интегральный параметр, характеризующий эффективность оттока холестерина и ее изменение в присутствии фармакологических агентов. В этой модели используется культура клеток пораженной интимы, что позволяет избежать процедуры нагружки макрофагов холестерином.

С использованием клеточных моделей проведен поиск растительных объектов, эффективно усиливающих отток холестерина, и один такой объект обнаружен. С позиции лекарство-мишень отметим, что мишенями активных компонентов лука могут быть как ЛВП, содержащие аполипопротеин А-I, так и наиболее важные клеточные ABC-транспортеры. Компонентами лука, действующими на эти мишени, могут являться аллиин, аллицин, полисульфиды, пропантialоксид.

В этой связи уместно отметить, что некоторые из известных средств повышения ЛВП (статины, фибраты, ниацин, реконструированные ЛВП, пептиды-миметики apoA-I, ингибиторы CETP, агонисты

X рецептора печени) имеют механизм действия, легче поддающийся интерпретации в рамках концепции лекарство-мишень. Однако и они вызывают ряд критических замечаний, в частности, что является реальным эффектом блокирования такого важного механизма, как ОТХ в организме человека с помощью, например, СЕТР, и является ли правильным повышать уровень ЛВП таким способом. Это заставляет обращаться к прямым методам повышения ЛВП через рЛВП и миметические пептиды. Такие подходы наилучшим образом контролируются, но они и самые неудобные. Пероральные пептиды могут обеспечить возможность решения этой проблемы, однако биодоступность и токсичность для печени остаются нерешенными затруднениями.

Предлагаемый нами препарат на основе натурального продукта не только позволяет избежать многих из перечисленных сложностей, но и дает эффект повышения уровня ОТХ, соизмеримый с эффективностью указанных выше препаратов. Мишенями в данном случае являются апополипротеин А-I (apoA-I) и клеточные ABC-транспортеры; «лекарственные» кандидаты в составе ППП - аллиин, аллицин.

3.4 Роль иммунокомпетентных клеток в атерогенезе и поиск эффективных иммунокорректирующих ППП

В настоящее время локальная реакция воспалительного типа считается наиболее вероятной причиной возникновения и прогрессирующего развития атеросклеротического поражения в артериальной стенке. На основании проведенного анализа научной литературы с использованием российских и зарубежных источников нами было сделано заключение, что существует связь между врожденным иммунитетом, воспалением как проявлением ответа врожденного иммунитета и атеросклерозом. Согласно предварительным данным, триггером воспаления при атеросклерозе могут быть провоспалительные цито-

кины, индуцируемые накоплением липидов в клетках сосудистой стенки.

В этой связи мы предприняли попытку подтвердить, что накопление внутриклеточных липидов способно привести к экспрессии молекул, связанных с представлением антигенов. Для этого требовалось провести морфологические исследования связи между накоплением липидов в клетках артериальной интимы и антигенпрезентирующей активностью этих клеток.

3.4.1 Количественный анализ ассоциации между накоплением липидов, числом иммунно-воспалительных клеток и экспрессией HLA-DR

Известно, что на первых стадиях атеросклероза антигенпрезентирующие клетки активируются и экспрессируют увеличенные количества молекул главного комплекса гистосовместимости класса II – HLA-DR [188]. Молекула HLA-DR считается маркером иммунной активации [186]. Экспрессия HLA-DR отражает способность иммунно-воспалительных клеток доставлять антиген к Т-клеткам.

Общепризнанно, что накопление иммунно-воспалительных клеток и отложение липидов могут быть взаимосвязаны, начиная с самых ранних стадий атерогенеза [187], однако отсутствуют сведения о количественной связи этих событий в артериях человека.

Показано, что примедиальный мышечно-эластический слой интимы, в отличие от прилюминального, вовлечен в атерогенез в значительно меньшей степени [307]. Хотя отложения липидов главных классов были обнаружены в обоих субслоях, увеличение содержания липидов в прилюминальном субслое было более выраженным и обусловлено в основном свободным и этерифицированным холестерином [285]. Сообщалось, что в нормальной интиме количество иммунно-воспалительных клеток различается в субслоях, а лимфоциты,

дендритные клетки и макрофаги более часто встречаются во внешней части интимы [96].

С учетом изложенного, мы сочли целесообразным изучить степень корреляции между отложением липидов, содержанием иммуновоспалительных клеток и экспрессией молекул HLA-DR главного комплекса гистосовместимости класса II в диффузном утолщении интимы (ДУИ). Последнее, как считают, представляет собой самое раннее проявление патологических изменений интимы, предшествующих развитию атеросклеротических поражений сосудов [425].

Наряду с анализом корреляции между отложением липидов, содержанием иммуновоспалительных клеток и экспрессией HLA-DR в ДУИ, мы также изучили корреляцию между отложением липидов и содержанием иммуновоспалительных клеток при сравнении прилюминальных и примедиальных субслоев интимы. Эти параметры определялись в последовательных криостатных срезах одних и тех же образцов интимы.

Мы установили, что между общим количеством липидов, обнаруженных с помощью окрашивания, и количеством эфиров холестерина, свободным холестерином и фосфолипидами существует положительная корреляция ($r = 0,72-0,95$). Положительная корреляция существовала и между вне- и внутриклеточными липидами и количеством свободного холестерина, эфиров холестерина и фосфолипидами ($r = 0,68-0,95$). Не обнаружено значимой корреляции между количеством триглицеридов, идентифицированных химическим способом, и количеством липидов, определенных морфометрически после окрашивания.

Последовательные криостатные срезы тканей ДУИ были подвергнуты дальнейшему анализу для поиска корреляции между липидами, окрашенными масляным красным O, и содержанием иммуновоспалительных клеток, идентифицированных иммуногистохимиче-

ски с помощью смеси антител анти-CD14 и анти-CD45. Общее отложение липидов достоверно коррелирует с суммарным количеством иммуно-воспалительных клеток ($r = 0,59$).

Корреляция между общим отложением липидов и числом иммуно-воспалительных клеток была выше в прилюминальном субслое, чем в примедиальном субслое интимы (0,69 и 0,28 соответственно). Число как внеклеточных, так и внутриклеточных липидов, идентифицированных окрашиванием, положительно коррелировало с общим числом иммуно-воспалительных клеток в интиме (0,58 и 0,51 соответственно). Коэффициенты корреляции между количеством иммуно-воспалительных клеток и вне- и внутриклеточными отложениями липидов в примедиальном субслое (0,28 и 0,18 соответственно) были заметно ниже, чем аналогичные параметры в прилюминальном субслое (0,70 и 0,48 соответственно). Не было обнаружено значимой корреляции между количеством иммуно-воспалительных клеток и внутриклеточным отложением липидов в примедиальном субслое (0,18). Напротив, в прилюминальном субслое коэффициент корреляции между внутриклеточным содержанием липидов и числом иммуно-воспалительных клеток был значительно выше (0,48), чем это значение для примедиального субслоя.

Корреляция между содержанием липидов разных классов и количеством иммуно-воспалительных клеток в ДУИ была значимой с эфирами холестерина, свободным холестерином и фосфолипидами (0,82–0,97), но не с триглицеридами (табл. 30). Было также обнаружено, что экспрессия HLA-DR положительно коррелирует в образцах ткани ДУИ как с количеством иммуно-воспалительных клеток, так и с суммарными липидными отложениями (0,66 и 0,79 соответственно) (табл. 31).

Таблица 30 – Корреляция между разными классами липидов и иммунокомпетентными клетками в ДУИ аорты

Имуногистохимический анализ	Классы липидов			
	Триглицериды	Эфиры холестерина	Свободный холестерин	Фосфолипиды
Содержание иммунокомпетентных клеток	0,20	0,82	0,82	0,97
	NS	p = 0,024	p = 0,024	p < 0,001

Таблица 31 – Корреляции между экспрессией HLA-DR, содержанием иммунокомпетентных клеток и накоплением липидов в ДУИ

ИФА	Содержание иммунокомпетентных клеток	Общие липиды
Антиген HLA-DR	0,66	0,79
	p < 0,001	p < 0,001

Таким образом, на ранних стадиях атеросклероза вклад внутреннего прилюминального субслоя в иммунные процессы является более выраженным, чем вклад внешнего примедиального мышечно-эластичного субслоя, однако и вклад примедиального субслоя в ранней стадии атеросклероза также может быть достаточно важен (более подробно – в обсуждении).

На следующем этапе работы HLA-DR + клетки были визуализированы в интима аорты человека с помощью иммуногистохимического и иммунофлуоресцентного методов (рис. 12 А, В).

Из рисунка (А) видно, что интимальные клетки, располагающие в клеточном матриксе, значительно различаются по степени экспрессии HLA-DR. Так, имеются интимальные клетки, интенсивно экспрессирующие HLA-DR (указаны стрелками) (продукт иммуногистохимической реакции выявляется в виде коричневого цвета гранул, распределенных достаточно равномерно по цитоплазме клеток). Также оче-

видно, что некоторые интимальные клетки совершенно не экспрессируют экспрессирующие HLA-DR.

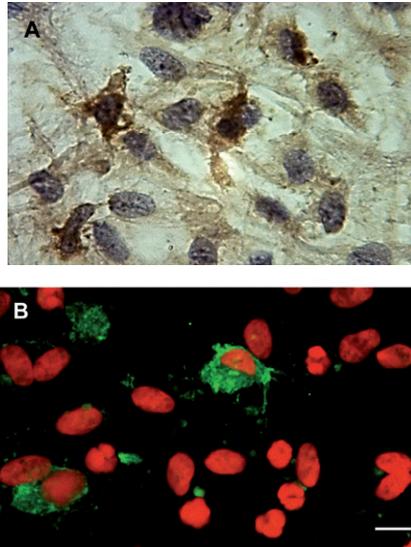


Рисунок 12 – HLA-DR + клетки, выявленные иммуногистохимическим (А) и иммунофлуоресцентным (В) методом в интимае аорты человека

Примечания

1 (А): «Hautchen» образец интимы. Иммунопероксидазная визуализация HLA-DR с использованием DAB в качестве хромогена. Ядра контрастировали гематоксилином (голубого цвета).

1 Рисунок (В) демонстрирует «отдельные» срезы, полученные конфокальной микроскопией интимы.

2 Шкала = 10 мкм (А, В).

Методы конфокальной микроскопии позволили исследовать интиму без повреждения взаимосвязей между клетками и это явилось предпочтительным подходом для анализа межклеточного структурного взаимодействия, а также для количественной оценки клеток, расположенных на различной «глубине» от просвета аорты. Конфокальная

микроскопия выявила сложную систему взаимосвязей между HLA-DR + клеток (рис. 13, А-С). Количественный анализ HLA-DR + клеток в общей толщине интимы показал, что в некоторых сегментах интимы число HLD-DR + клеток составляло до 15% от общей численности популяции интимальных клеток.

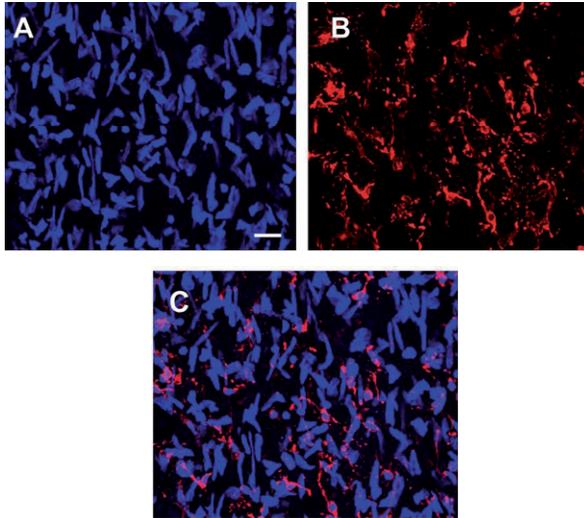


Рисунок 13 – Иммунофлуоресцентное изображение, представляющее наложение 45 оптических «конфокальных» срезов интимы, полученных с Z-интервалом 1 мкм (А-В)

Примечания

- 1 (А): Ядра были визуализированы окрашиванием бромидом этидия (голубого цвета).
- 2 (В): Распределение и сети, образованные HLA-DR + клетками, обнаруженными с применением анти-антител HLA-DR, конъюгированных с Alexa 633 (красного цвета).
- 3 (С): наложение изображения показаны на рисунках (А) и (В).
- 4 Образец аорты человека.
- 5 Шкала = 20 мкм (А).

Из рисунка видно, что только часть интимальных клеток экспрессирует антиген HLA-DR (это выражается в одновременном «наложении» голубого и красного цветов в изображении).

Нами изучено также распределение клеток HLA-DR⁺ в толщине интимы аорты. Для оценки количества HLA-DR⁺ клеток, расположенных на различных глубинах от просвета поверхностью интимы, толщина каждой анализируемой интимы была разделена на три равные части: поверхностная треть, находящаяся под просветом поверхности аорты, треть, прилежащая к внутренней эластической пластинке, а также средняя часть, расположенная между этими двумя обозначенными частями. Результаты количественного анализа представлены на рис. 14А-С.

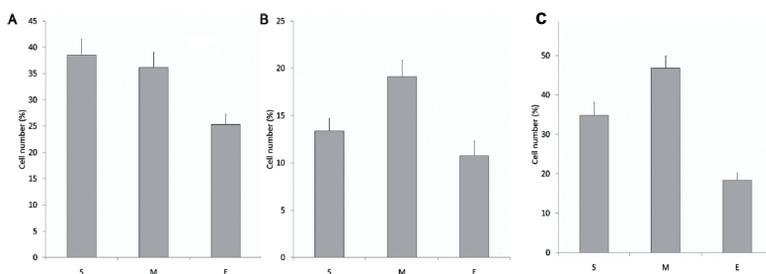


Рисунок 14 – Количественный анализ числа клеток и экспрессии HLA-DR в различных частях нормальной человеческой интимы (А-С). (А): Количество клеток в разных частях интимы, рассчитанное в процентах от общего числа клеток во всей интиме. (В): Процент HLA-DR⁺ клеток в различных частях интимы, рассчитанный в каждой соответствующей части интимы. (С): Количество HLA-DR⁺ клеток в разных частях интимы, рассчитанное в процентах от общего количества HLA-DR⁺ клеток в интиме. На рисунках (А-С) «S», «M» и «E» означает поверхностную, среднюю и внешнюю трети (часть) интимы, соответственно

Как видно из рис. 14А, поверхностная и средняя трети (части) в интиме характеризовались значительно более высокой плотностью

клеток по сравнению с внешней третью интимы ($38,5 \pm 3,0$ против $25,3 \pm 2,0$, значение $p < 0,05$; $36,2 \pm 2,9$ и $25,3 \pm 2,0$; значение $p < 0,05$, соответственно), тогда как не было никаких существенных различий в клеточной плотности между поверхностной и средней частями ($38,5 \pm 3,0$ против $36,2 \pm 2,9$, значение $p > 0,05$). Количество HLA-DR+ клеток, заселяющих поверхностную, среднюю и внешнюю трети интимы, составило $13,4 \pm 1,3$, $19,1 \pm 1,7$ и $10,7 \pm 1,6$, соответственно, в указанных частях интимы (рис. 14 В). Количество HLA-DR+ клеток оказалось значительно выше в средней трети интимы, чем в поверхностных и глубоких частях ($13,4 \pm 1,3$ против $19,1 \pm 1,7$, значение $p < 0,05$; $19,1 \pm 1,7$ против $10,7 \pm 1,6$, значение $p < 0,05$; соответственно). Число клеток, экспрессирующих HLA-DR, в поверхностных, средних и внешних третях интимы, рассчитанное в процентах от общего числа HLA-DR+ клеток от популяции HLA-DR+ клеток во всей оболочке интимы, было $34,8 \pm 3,2$, $46,8 \pm 3,1$ и $18,3 \pm 1,9$; при этом в средней части содержалось наибольшее количество HLA-DR+ клеток ($46,8 \pm 3,1$ против $34,8 \pm 3,2$, значение $p < 0,05$; $46,8 \pm 3,1$ против $18,3 \pm 1,9$, значение $p < 0,05$) (рис. 14 С).

Для того, чтобы убедиться, что HLA-DR+ клетки интимы могут содержать апо-В (апо-В представляет собой характерный белок липопротеидов низкой плотности (ЛНП), которые являются ключевыми элементами в инициации и прогрессировании атеросклероза, мы использовали конфокальную микроскопию, которая показала, что, хотя подавляющее большинство экспрессирующих HLA-DR интимных клеток не содержало апо-В, встречались некоторые редкие клетки, содержащие апо-В. В последних клетках апо-В был локализован преимущественно в перинуклеарной цитоплазме (рис. 15).

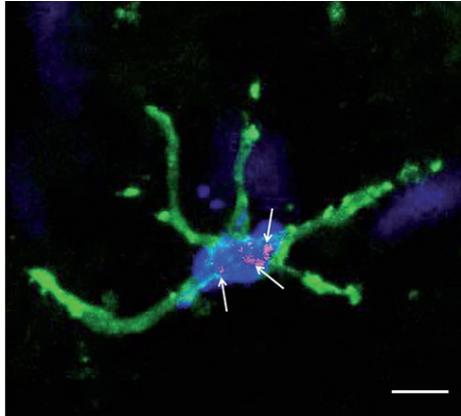


Рисунок 15 – Apo-B (красный, показано стрелками) в перинуклеарной цитоплазме HLA-DR + клеток, идентифицированный с помощью иммунофлуоресцентного анализа, в сочетании с конфокальной микроскопией

Примечания

1 Антиген HLA-DR был окрашен FITC, а апо-В был визуализирован с использованием антител к апо-В, конъюгированными с Alexa 633; ядро окрашивали использованием бромистого этидия.

2 Шкала = 10 мкм.

3.4.2 Исследование связи между содержанием липидов в клетках и представлением антигенов

Морфологические исследования, результаты которых приведены выше, выявили связь между накоплением липидов в клетках артериальной интимы и антигенпрезентирующей активностью клеток. Мы предположили, что именно накопление внутриклеточных липидов стимулирует представление антигенов.

Для проверки этого предположения из непораженных участков интимы аорты человека были выделены жизнеспособные клетки путем ферментативного диспергирования внеклеточного матрикса.

Клетки были посажены в культуру и через 5 дней культивирования в первичную культуру интимальных клеток были добавлены нативные и множественно модифицированные липопротеиды низкой плотности. Нативные (немодифицированные) ЛНП не вызывали накопления внутриклеточных липидов и не влияли на экспрессию HLA-DR (табл. 32). Мы определяли также уровень экспрессии провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-1, которые наряду с презентацией антигенов играют ключевую роль в клеточном иммунитете. Нативные ЛНП не влияли на экспрессию провоспалительных цитокинов (табл. 32).

Таблица 32 – Влияние нативных ЛНП на накопление внутриклеточных липидов и экспрессию иммунокомпетентных молекул

	Накопление внутриклеточных липидов, % от контроля	Экспрессия, % от контроля		
		HLA-DR	TNF- α	IL-1
Контроль	100 \pm 3	100 \pm 12	100 \pm 2	100 \pm 12
Нативные ЛПНП	105 \pm 7	107 \pm 4	110 \pm 8	115 \pm 10

Множественно модифицированные атерогенные ЛВП, циркулирующие в крови больных с подтвержденным атеросклерозом, вызывали существенное накопление липидов в культивируемых интимальных клетках аорты человека. Известно, что именно модифицированные ЛНП, но не нативные ЛНП обладают атерогенными свойствами, вызывая накопление липидов в клетках артериальной стенки, являясь, тем самым, триггером атерогенеза. Накопление внутриклеточных липидов, вызванное атерогенными модифицированными ЛНП, значительно увеличивало экспрессию HLA-DR (табл. 33). Параллельно увеличивалась экспрессия провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-1.

Таблица 33 – Влияние множественно модифицированных ЛНП на накопление внутриклеточных липидов и экспрессию иммунокомпетентных молекул

	Накопление внутриклеточных липидов, % от контроля	Экспрессия, % от контроля		
		HLA-DR	TNF- α	IL-1
Контроль	100 \pm 3	100 \pm 12	100 \pm 2	100 \pm 12
Модифицированные ЛНП	201 \pm 27*	167 \pm 6*	142 \pm 4*	156 \pm 4*

Мы обнаружили положительную корреляцию с высокой степенью статистической значимости между накоплением внутриклеточных липидов и экспрессией HLA-DR, TNF- α и IL-1 (табл. 34).

Таким образом, экспериментами на первичной культуре интимальных клеток аорты мы установили, что именно накопление липидов в клетках в артериальной стенке стимулирует представление антигенов и, возможно, активизирует другие механизмы клеточного иммунитета.

Таблица 34 – Корреляции между накоплением внутриклеточных липидов и экспрессией иммунокомпетентных молекул

HLA-DR	0,986*
TNF- α	0,986*
IL-1	0,934*

3.4.3 Разработка клеточных моделей для исследования антицитокиновой активности фармакологических веществ

Обнаруженная связь между инициирующими событиями атерогенеза и вовлечением в атерогенез воспаления и клеточного иммунитета является научным заданием, позволяющим рассматривать антицитокиновые средства как потенциальные антиатеросклеротические лекарственные препараты.

На фармацевтическом рынке представлены отечественные и импортные противовоспалительные препараты. Практически все они зарегистрированы как лекарственные средства. Существенным недостатком этих препаратов являются побочные эффекты, что характерно для синтетических высокоочищенных веществ. Среди противовоспалительных препаратов пролонгированные средства встречаются нечасто. Ни одно из имеющихся противовоспалительных лекарств не рассматривается как антиатеросклеротическое средство. Максимально эффективной комбинации натуральных компонентов, обладающих указанными выше свойствами, на данный момент нет. Важность использования натуральных продуктов, а не химически чистых синтезированных соединений, объясняется практически полным отсутствием у них негативных побочных эффектов и привыкания. При длительном (пожизненном) приеме, который необходим для профилактики и лечения атеросклероза, это обстоятельство наряду с преимуществами препарата пролонгированного действия позволяет рассматривать противовоспалительный препарат на натуральной основе в качестве почти идеального продукта для воздействия на атеросклероз и хронические патологические состояния, связанные с воспалением.

Для скрининга противовоспалительной (антицитокиновой) активности фармакологических веществ *in vitro* была разработана клеточная модель, подробно описанная в разделе Методы. Для оценки противовоспалительных свойств исследуемых препаратов измеряли экспрессию провоспалительных молекул в культивируемых интимальных клетках аорты человека.

Критерием оценки противовоспалительной эффективности было выраженное (не менее 15%) достоверное снижение липополисахарид-индуцированной экспрессии интерлейкина-1 при 24-часовой инкубации с водным экстрактом (настоем) лекарственного растения в концентрации 1 мг/мл. Критерием оценки безопасности

было отсутствие цитотоксичности водного экстракта (настоя) при тех же условиях.

В опытах *ex vivo* принимали участие здоровые добровольцы, 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.

У добровольцев брали кровь непосредственно до приема настоя лекарственных трав, а также через соответствующие интервалы времени после приема настоя внутрь. Сыворотка крови была использована в дальнейшем для определения влияния настоя лекарственной травы на атерогенные и провоспалительные свойства сыворотки крови.

Для проверки работы клеточной модели *экс-виво* была выполнена ее тестирование с помощью стандарта оценки противовоспалительной эффективности продуктов. В качестве стандарта, обладающего выраженной противовоспалительной активностью, был использован диклофенак. Исследование было проведено у 3 добровольцев, у которых ранее был выявлен повышенный провоспалительный потенциал сыворотки крови. После однократного приема диклофенака в дозе 100 мг провоспалительный потенциал сыворотки крови, о котором судили по экспрессии провоспалительных цитокинов, антигена гистосовместимости и молекул межклеточной адгезии, достоверно снижается.

Противовоспалительный эффект развивается через 4 часа после приема диклофенака и достигает максимума через 8 часов (табл. 35). Наиболее чувствительным маркером является интерлейкин-1 (IL-1).

Таким образом, пример испытания диклофенака на клеточной модели позволяет заключить, что разработанная клеточная модель по-

звolyет выявлять антицитокиновую активность фармакологических веществ.

Таблица 35 – Средние показатели снижения провоспалительного потенциала сыворотки крови при однократном приеме диклофенака

Время после приема, час	TNF- α	IL-1	HLA-DR	ICAM-1
0	100	100	100	100
2	80,0 \pm 10,0	78,0 \pm 5,5 *	86,7 \pm 6,9	84,7 \pm 8,1
4	88,0 \pm 7,5	73,3 \pm 7,9 *	83,3 \pm 9,0	71,3 \pm 6,4 *
8	61,3 \pm 6,6 *	51,0 \pm 21,8 *	71,7 \pm 7,9 *	67,7 \pm 13,3 *

Примечание

*, достоверное снижение провоспалительной реакции, $p < 0,05$.

3.4.4 Проведение испытаний для поиска растений, обладающих противовоспалительным антицитокиновым действием, создание ППП

Проведение исследований in vitro. В модели in vitro изучались на противовоспалительную активность 31 лекарственное растение: арония черноплодная, барбарис амурский, боярышник, бузина черная, вереск обыкновенный, вероника лекарственная, дуб обыкновенный, женьшень, зверобой продырявленный, ива белая, коланхоэ перистый, календула обыкновенная, клевера луговой, кипрей узколистный, клеква болотная, крапива двудомная, лапчатка гусиная, лопух большой, мать-и-мачеха, медуница лекарственная, можжевельник обыкновенный, мята обыкновенная, подорожник большой, пырей ползучий, ромашка аптечная, солодка голая, толокнянка обыкновенная, тысячелистник обыкновенный, фиалка трехцветная, череда трехраздельная, шалфей.

В результате скрининга для дальнейшего изучения были отобраны следующие лекарственные растения, обладающие выраженным

ингибирующим влиянием на экспрессию интерлейкина-1 и характеризующиеся полным отсутствием цитотоксичности:

- бузина черная;
- зверобой продырявленный;
- календула обыкновенная;
- фиалка трехцветная;
- боярышник

Оценка противовоспалительной активности комбинаций лекарственных трав. По результатам ранжирования эффективности лекарственных трав боярышник был исключен из дальнейшего исследования как наименее эффективный. Были изучены в экспериментах *ex vivo* противовоспалительные эффекты следующих комбинаций лекарственных трав:

1) двухкомпонентные смеси

- Календула + Бузина
- Зверобой + Бузина
- Календула + Зверобой
- Фиалка + Бузина
- Календула + Фиалка
- Фиалка + Зверобой

2) трехкомпонентные смеси

- Календула + Фиалка + Бузина
- Календула + Фиалка + Зверобой
- Календула + Бузина + Зверобой
- Фиалка + Зверобой + Бузина

3) четырехкомпонентные смеси

- Календула + Фиалка + Бузина + Зверобой

Для изготовления смесей использовали цветки календулы по 2,5 г, плоды бузины по 2,5 г, траву зверобоя по 3 г, траву фиалки по 1.5 г. Было изучено влияние настоя из смесей лекарственных трав на

экспрессию маркеров воспаления. Изучали экспрессию провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-1 как наиболее информативных показателей. Каждое исследование было проведено у 3 добровольцев. Результаты оценки противовоспалительного эффекта комбинаций лекарственных трав представлены в табл. 36.

Таблица 36 – Средние показатели снижения экспрессии провоспалительных цитокинов после однократного приема многокомпонентной комбинации лекарственных трав

Время после приема, час	TNF- α	IL-1
1	2	3
Календула + Бузина		
0	100	100
2	89,3 \pm 4,2 *	90,0 \pm 6,9
4	82,8 \pm 7,6 *	84,3 \pm 6,7 *
8	94,5 \pm 5,5	82,2 \pm 7,1 *
Зверобой + Бузина		
0	100	100
2	91,3 \pm 9,2	88,3 \pm 2,2 *
4	83,1 \pm 9,7 *	87,2 \pm 3,4 *
8	89,5 \pm 12,4	93,8 \pm 6,7
Календула + Зверобой		
0	100	100
2	94,2 \pm 6,4	86,4 \pm 4,5 *
4	87,3 \pm 4,2 *	82,5 \pm 7,6 *
8	96,5 \pm 12,1	98,2 \pm 5,8
Фиалка + Бузина		
0	100	100
2	68,0 \pm 8,5 *	77,3 \pm 12,7 *
4	82,7 \pm 6,1 *	80,7 \pm 13,8
8	77,0 \pm 7,0 *	97,7 \pm 16,0
Календула + Фиалка		
0	100	100
2	88,7 \pm 4,4 *	73,7 \pm 2,8 *
4	87,0 \pm 5,5 *	85,0 \pm 7,9 *
8	122,3 \pm 12,8	89,7 \pm 10,1

Окончание табл. 36

1	2	3
	Фиалка + Зверобой	
0	100	100
2	90,0±4,0 *	85,0±5,0 *
4	88,7±3,0 *	96,3±1,9
8	84,0±9,0	91,0±5,6
	Календула + Фиалка + Бузина	
0	100	100
2	74,3±2,7 *	69,3±2,7 *
4	83,7±0,9 *	77,3±0,3 *
8	91,7±1,8 *	83,0±3,6 *
	Календула + Фиалка + Зверобой	
0	100	100
2	86,7±1,2 *	79,0±1,7 *
4	87,3±1,8 *	88,0±2,5 *
8	96,0±2,5	90,3±7,5
	Календула + Бузина + Зверобой	
0	100	100
2	95,0±3,1	91,3±4,3
4	85,7±4,4 *	90,7±4,1 *
8	83,7±9,2 *	82,0±4,6 *
	Фиалка + Зверобой + Бузина	
0	100	100
2	82,3±1,5 *	81,7±6,0 *
4	86,7±4,9 *	87,3±6,3
8	92,7±3,5	93,7±3,3
	Календула + Фиалка + Бузина + Зверобой	
0	100	100
2	92,7±3,0 *	84,3±5,2 *
4	83,7±1,9 *	86,0±5,7 *
8	96,3±2,6	85,3±3,5 *

Примечание

*, достоверное снижение провоспалительной реакции, $p < 0,05$.

Ранжирование противовоспалительной активности комбинаций лекарственных трав. После оценки противовоспалительной активности комбинаций лекарственных трав были оценены средние величины эффектов в сравнении с диклофенаком, что позволило провести ранжирование противовоспалительной эффективности лекарственных трав. Результаты представлены в табл. 37 (эффективность диклофенака принята за 100%).

Таблица 37 – Сравнительная оценка противовоспалительной эффективности комбинаций лекарственных трав

Препарат	Эффективность снижения экспрессии провоспалительных цитокинов, %	
	TNF- α	IL-1
Диклофенак 100 мг	100	100
Календула + Бузина	60	43
Зверобой + Бузина	56	49
Календула + Зверобой	3	17
Фиалка + Бузина	50	55
Календула + Фиалка	100	45
Фиалка + Зверобой	50	18
Календула + Фиалка + Бузина	95	81
Календула + Фиалка + Зверобой	59	51
Календула + Бузина + Зверобой	54	42
Фиалка + Зверобой + Бузина	67	48
Календула + Фиалка + Бузина + Зверобой	62	36

На основе полученных данных была получена интегральная оценка противовоспалительного эффекта лекарственных трав и их

комбинаций. Результаты ранжирования по степени убывания эффективности представлены в табл. 38.

Таблица 38 – Ранговая оценка противовоспалительной эффективности лекарственных трав и их комбинаций

Препарат	Ранг
Диклофенак	100,0
Календула + Фиалка + Бузина	87,7
Календула	68,5
Календула + Фиалка	67,1
Фиалка	64,5
Фиалка + Зверобой + Бузина	56,7
Календула + Фиалка + Зверобой	54,8
Фиалка + Бузина	52,5
Зверобой + Бузина	52,4
Бузина	52,0
Календула + Бузина	50,8
Календула + Бузина + Зверобой	47,6
Календула + Фиалка + Бузина + Зверобой	47,2
Зверобой	37,5
Фиалка + Зверобой	30,0
Календула + Зверобой	7,1

Результаты анализа данных табл. 38 говорят о том, что наиболее сильным компонентом противовоспалительного действия является календула. Усиление ее противовоспалительной активности возможно при комбинации с фиалкой и бузиной, но не зверобоем. По-видимому, в случае использования комбинаций лекарственных трав имеются антагонистические и протагонистические взаимодействия биологически активных компонентов.

В результате выполнения работ были получены данные по ингредиентному составу разрабатываемого натурального противовоспалительного препарата. Данный препарат должен содержать следующие растительные объекты: цветки календулы обыкновенной, плоды бузины черной и траву фиалки трехцветной. Противовоспалительная эффективность этой комбинации составляет 88% от эффективности диклофенака, одного из самых мощных нестероидных противовоспалительных средств, применяемых в современной медицине.

На основании полученных данных цветки календулы обыкновенной, плоды бузины черной и траву фиалки трехцветной – обладают выраженными, длительными эффектами и были отобраны для создания противовоспалительных препаратов.

Для этого было необходимо было разработать рецептуру БАД (фитопрепарата), состав которого войдут оптимальные или наиболее эффективные компоненты (комбинации компонентов), а также вспомогательные средства, обеспечивающие, в том числе, пролонгированность действия БАД (фитопрепаратов).

Кроме того, следовало разработать лабораторный регламент получения препарата, а также произвести экспериментальную партию и осуществить исследовательские испытания по следующим показателям:

- физико-химических свойства (внешний вид; вкус; запах; средняя масса содержимого; влага);

- химическая безопасность (токсичные элементы: свинец; кадмий; мышьяк; ртуть; пестициды; ГХЦГ - а, в, у – изомеры; ДДТ и его метаболиты; гептахлор; алдрин);

- микробиологическая безопасность (КАМАФАНМ; БГКП – колиформы; E. coli; S. Aureus; сальмонеллы; дрожжи/плесени; V. Cereus);

- радиационная безопасность (радионуклиды: цезий-137; стронций-90; показатель соответствия В);

– функциональные свойства, в том числе: антиоксидантная активность; иммуномодулирующие свойства; противовоспалительные свойства; антиатеросклеротическая активность.

Сведения о регламенте получения препарата, а также производстве экспериментальной партии и осуществлении исследовательских испытаний представлены в Приложении Г.

Рецептура БАД (фитопрепарата) представлена в табл. 39

Таблица 39 – Рецептура к разрабатываемой биологически активной добавке к пище (фитопрепарату) «Противовоспалительное антицитокинное средство, обладающее прямым антиатеросклеротическим действием»

Наименование ингредиента	Содержание, %	Масса, мг
Цветки бузины черной	21,0	145
Цветки календулы	21,0	145
Фиалка трехцветная	21,0	145
Лактоза	24,0	39
Стеариновая кислота	7,8	6
Поливинилпирролидон	4	20
Итого	100	500

3.4.5 Обсуждение полученных данных

Известно, что атеросклеротическое поражение характеризуется накоплением иммуно-воспалительных клеток [188,304]. Общеизвестно, что это накопление и отложение липидов происходит на ранних стадиях развития атеросклероза [4,187], однако до сих пор не было количественной оценки взаимосвязи этих процессов. В настоящей работе предприятия попытка закрыть эту «брешь». Мы провели анализ отложения липидов, концентрирования иммуно-воспалительных клеток и экспрессии HLA-DR в одних и тех же образцах ткани при использовании ее после-

довательных срезов. Нами впервые показано, что существует положительная корреляция между отложением липидов и содержанием иммуно-воспалительных клеток в ДУИ, что соответствует представлению об ответственности иммуно-воспалительных клеток за активацию лимфоцитов, начиная с самых ранних стадий развития атеросклероза [95].

В ряде работ на аутопсийном материале было показано, что присутствие липидов в интима артерий часто обнаруживается в местах, которые не проявляют макроскопических признаков атеросклеротического поражения [81,162]. В этой связи предполагается, что фокальное накопление липидов в интима может служить микроцентрами, в которых инициируется каскад реакций, приводящих к образованию атеросклеротического поражения [367].

Вместе с тем, в настоящей работе установлено, что существует положительная корреляция между отложением липидов и экспрессией HLA-DR. Молекула HLA-DR считается маркером иммунной активации. Экспрессия HLA-DR отражает способность иммуно-воспалительных клеток доставлять антиген к Т-клеткам. Нормальная интима артерии содержит разные клетки, включая макрофаги, Т-клетки и дендритные клетки, совокупность которых контролирует микроокружение на присутствие потенциально опасных антигенов [417].

Ранее показано, что на первых стадиях атеросклероза антигенпрезентирующие клетки активируются и экспрессируют увеличенные количества молекул главного комплекса гистосовместимости класса II [439].

Другим маркером клеточной активации, который указывает на стресс клеток, является белок теплового шока 70 (Hsp-70). Его повышенная экспрессия обнаружена на самых ранних стадиях атеросклеротических изменений интимы [98].

Образование кластеров дендритными клетками и лимфоцитами также происходит на ранних стадиях атеросклеротического поражения.

В согласии с более ранними сообщениями [96], в настоящей работе показано, что в ДУИ Т-клетки вступают в прямой контакт с клетками, экспрессирующими HLA-DR.

Факторы, отвечающие за активацию клеток интимы при развитии атеросклероза, до конца не изучены. Тем не менее, признано, что атерогенные ЛНП и окисленные фосфолипиды могут играть важную роль в иммунной активации [187,188]. Настоящее флуоресцентное исследование позволило проанализировать возможную ассоциацию апоВ и клеток, экспрессирующих HLA-DR. Обнаружено присутствие апоВ в цитоплазме некоторых клеток, экспрессирующих HLA-DR. Этот факт указывает на наличие «микро-эпицентров», в которых на ранних стадиях атеросклероза может происходить начальная активация антиген-презентирующих клеток интимы. В пользу этого свидетельствуют результаты, полученные *in vitro*, в которых установлено, что модифицированные ЛНП влияют как на экспрессию HLA-DR, так и на образование цитокинов в клетках интимы. Отметим, что статины снижают инфильтрацию иммуно-воспалительными клетками и экспрессию провоспалительных цитокинов при атеросклерозе у человека и животных [221].

В отличие от «простой» интимы экспериментальных животных, широко используемой для моделирования атеросклероза [436], интима больших артерий человека является более сложной системой, которую можно разделить на субслои, играющие, вероятно, разную роль на начальных этапах патологии [420]. Нами продемонстрировано, что коэффициенты корреляции между количеством иммуно-воспалительных клеток и экспрессией HLA-DR различны для разных субслоев. В соответствии с более ранними публикациями [285,79], в настоящей работе подтверждено, что на ранних стадиях атеросклероза вклад внутреннего прилюминального субслоя в иммунные процессы явля-

ется более выраженным, чем вклад внешнего примедиального мышечно-эластичного субслоя.

Тем не менее, и вклад примедиального субслоя в ранние стадии атеросклероза также может быть достаточно важен. В отличие от прилюминального субслоя, в котором липиды обнаруживаются внутри клеток и во внеклеточном матриксе, в примедиальном субслое липиды, включая неэтерифицированный холестерин и нейтральные липиды, обнаруживаются, главным образом, вдоль и внутри эластических волокон. Эластические волокна, которые содержали липидные отложения, имели признаки дегенерации, выраженные в виде вакуолизации и разрушения. Эластин – наиболее распространенный белок в стенке больших артерий, подвергаемый пульсирующему напряжению при сердечном сокращении [103]. В последние годы интенсивно изучали процессы биосинтеза и функции эластина. Стало известно, в частности, что эластин – важный аутокринный фактор, обеспечивающий гомеостаз сосудов за счет биомеханической поддержки и биосигнализации [213]. Накапливаются данные о том, что эластин – важный регулятор активности гладкой мускулатуры в сосудистом морфогенезе и патологии [213]. С возрастом происходят структурные изменения эластина. Показано, что содержание эластина снижается по мере накопления липидов в процессе атеросклероза, что приводит к потере эластичности и увеличению подверженности действию ферментов, разрушающих эластин [213].

Факт, что неэтерифицированный холестерин и нейтральные липиды захватываются деградирующими эластическими волокнами в примедиальном субслое интимы, свидетельствует о вкладе внеклеточных структур в аккумуляцию холестерина, начиная с самых ранних стадий патологии. Взаимодействия между эластином и липидами, имеющие место в разрушающихся эластических волокнах, изучены недостаточно [296,370]. Мы надеемся возродить интерес к анализу

взаимодействия между липидами и эластином, а также вкладу этого взаимодействия в атеросклеротическое поражение.

Наряду с ДУИ, нами предпринята попытка анализа дистрибуции и количества клеток, экспрессирующих HLA-DR в визуально непораженной интиме. Ранее изучение HLA-DR+ клеток было затруднено методическими трудностями, которые возникают при использовании рутинных иммуногистохимических методик и в связи с низкой разрешающей способностью «классической» иммуногистохимии. Использование иммунофлуоресцентного анализа в сопряжении с современной конфокальной микроскопией позволило нам впервые исследовать обширные зоны структурно интактной интимы с визуализацией трехмерной интеграции HLA-DR-экспрессирующих клеток в непрерывной системе.

Наши результаты позволяют по-новому оценить организацию сосудисто-лимфоидной ткани (VALT), которая постоянно контролирует артериальную стенку на наличие «сигналов опасности». VALT может состоять из двух субсистем. Первая из них сформирована из профессиональных АПК, локализована в поверхностной части интимы и связана со второй субсистемой, которая сформирована из непрофессиональных антиген-презентирующих клеток, которые широко разбросаны по интиме [6,212]. Несмотря на то, что идентификация точной природы типов клеток, которые образуют HLA-DR+ клеточную популяцию второй субсистемы VALT, требует дальнейшего уточнения, настоящем исследовании подтверждено существование структурного интегративного механизма, не отмечавшегося ранее.

Функциональная необходимость существования системы, состоящей как из профессиональных, так и непрофессиональных антиген-презентирующих клеток, интегрированных в протяженные сети, может отражать особенность архитектоники артерий: оболочка интимы и внутренние две трети оболочки меди не иннервированы и, таким образом,

наблюдение и поддержание гомеостаза сосудов требует альтернативных компенсаторных механизмов. Мы предполагаем, что широкое распространение HLA-DR-экспрессирующих клеток в макроскопически непопавшей интима аорты человека может играть определенную роль в поддержании гомеостаза сосудов и представлять собой механизм, который компенсирует отсутствие наблюдения за целостностью интимы со стороны нервной системы [5]. Принимая во внимание большую протяженность внутренней поверхности артерий в теле человека, дальнейший детализированный анализ антиген-презентирующих свойств резидентных клеток интимы может обеспечить новое понимание не только функциональных механизмов, вовлеченных в поддержание гомеостаза артерий, но и малоизвестных функций иммунной системы.

Как известно, развитие атеросклеротического поражения сопровождается избыточным накоплением ЛНП. Идентификация белка апо-В в перинуклеарной цитоплазме HLA-DR+ клеток может рассматриваться как еще более ранний, пре-атеросклеротический период развития патологии.

Такая возможность подтверждается тем фактом, что нами апо-В был обнаружен в перинуклеарной части только некоторых редко встречающихся клеток интимы. Таким образом, накопление апо-В в перинуклеарной цитоплазме – неслучайное событие, происходящее в интактных клетках интимы. Избыточные липиды в интима артерий при атеросклерозе имеют своим источником циркулирующие в крови ЛНП, которые проникают в интиму [347]. Также хорошо известно, что клетки интимы по-разному взаимодействуют с нормальными и модифицированными ЛНП [397]. Нормальные ЛНП захватываются посредством рецептор-зависимых механизмов и утилизируются без превращения в «липидные капли» в цитоплазме [235].

Модифицированные ЛНП, наоборот, захватываются сквенджер-рецепторами, что ведет к избыточной аккумуляции липидов и образо-

ванию пенистых клеток [95,235]. В этом случае компоненты ЛНП, включая апо-В, могут удерживаться в цитоплазме внутри эндосом и обнаруживаться с помощью морфологического анализа высокого разрешения, что и сделано нами.

Мы показали, что в большинстве HLA-DR+клеток апо-В не обнаруживается, тогда как в некоторых таких клетках апо-В встречается в перинуклеарной цитоплазме, то есть именно там, где первые липидные капли трансформируются в пенистые клетки. В соответствии с этим, электронная микроскопия продемонстрировала наличие клеток интимы, которые содержали небольшое количество липидных капель в своей цитоплазме, в основном вокруг ядра. Мы полагаем, что обнаруженные апо-В+/HLA-DR+клетки могут представлять собой микрофокус патологических изменений интимы во внешне непораженных участках аорты. Следует также указать на то, что использованные в экспериментах такие участки были получены из аорт 40-45-летних субъектов, а именно на этот возраст приходится возрастание риска развития атеросклероза. И в более ранних работах указывалось на экспрессию HLA-DR на ранних и более поздних стадиях атеросклеротического поражения [97,213].

Настоящее исследование явилось первым, направленным на анализ распределения и количества HLA-DR-экспрессирующих клеток в непораженной интима аорты человека. Морфологические исследования выявили связь между накоплением липидов в клетках артериальной интимы и антигенпрезентирующей активностью клеток. Было предположено, что именно накопление внутриклеточных липидов стимулирует представление антигенов. Для проверки этого предположения из непораженных участков интимы аорты человека были проведены эксперименты на первичной культуре клеток, полученных из интимы аорты человека. Была обнаружена положительная корреляция с высокой степенью статистической значимости между накоплением

внутриклеточных липидов и экспрессией HLA-DR, TNF- α и IL-1. Таким образом, экспериментами на первичной культуре интимальных клеток аорты мы установили, что именно накопление липидов в клетках в артериальной стенке стимулирует представление антигенов и активизирует другие механизмы клеточного иммунитета.

С позиции лекарство-мишень отметим, что мишенью обнаруженных нами эффективных противовоспалительных растительных объектов являются, видимо, иммуно-воспалительные клетки в целом и провоспалительный цитокины – в частности. О компонентах растений, действующих, вероятно, на эти мишени, известно следующее.

Календула обыкновенная содержит каротиноиды – до 3% (3-каротин, ликопин, лютеин, виолаксантин, цитроксантин, неоликопин, хризантемаксантин, флавоксантин, рубиксантин); флавоноиды (до 4%), сапонины, фитонциды, эфирные масла, горькие и дубильные вещества, смолы (около 3,5%). Бузина черная содержит флавоноиды, фитостеролы, кислоту салициловую. Трава фиалки трехцветной содержит флавоновый гликозид виолакверцетин и антоциановые гликозиды – дельфинидин, пеонидин, виоланин (состоящий из дельфинидина, глюкозы, рамнозы и оксикоричной кислоты) [39].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В проведенном исследовании уточнена роль транс-сиалидазы в патогенезе атеросклероза - изучена субстратная и акцепторная специфичность транс-сиалидазы. Впервые изучено влияние женских и мужских половых гормонов на патогенез атеросклероза, в частности, на внутриклеточное накопление холестерина в клетках сосудов, инициированное какими-либо факторами.

Получены данные, подтверждающие, что путь оттока холестерина, использующий apoA-I в качестве акцептора, имеет доминирующий вклад в экспорт холестерина из макрофагов *in vivo*. Проведено морфологическое исследование связи между накоплением липидов в клетках артериальной интимы и антигенпрезентирующей активностью этих клеток.

Дано экспериментальное обоснование профилактического и лечебного применения ряда растительных объектов при развитии атеросклероза. Проведена оценка эффективности этих объектов с использованием моделей, имеющих разные патогенетические основы, что позволило установить различные механизмы их действия и предложить алгоритм поиска наиболее перспективных ППП.

Инновационная направленность потенциальных продуктов определяется следующими характеристиками: направленностью на процесс накопления холестерина в артериальной сосудистой стенке; плейотропным механизмом действия; патентоспособной рецептурой и технологией получения ППП.

Получено экспериментальное подтверждение фармакологической эффективности (антиатерогенное и антиатеросклеротическое действие) ряда растительных объектов. Экспериментально обоснована целесообразность применения указанных растительных объектов в составе моно- и комплексных препаратов для терапии атеросклероза.

Созданы клеточные и ферментативные модели, которые целесообразно применять для оценки антиатеросклеротической активности растительного сырья для создания препаратов, обладающих антиатеросклеротическим терапевтическим потенциалом.

Уточнены патофизиологические механизмы, которые реализуются в возникновении и развитии атеросклеротического поражения с участием транс-сиалидазы, процессов воспаления в сосудистой стенке, половых гормонов и липопротеидов высокой плотности (ЛВП).

Представленные в работе клеточные модели позволяют адекватно воспроизводить важнейшие проявления атерогенеза и могут использоваться для создания эффективных препаратов природного происхождения с целью терапевтического воздействия на течение атеросклероза.

Транс-сиалидазная активность и ее подавление является перспективной мишенью для действия антиатеросклеротических средств. Метод определения транс-сиалидазной активности применен в ферментативной модели (тест-системе) для оценки эффективности и исследования механизмов антиатеросклеротического действия ППП.

Первичная культура макрофагов человека служит основой для клеточной модели с целью поиска источника фитоэстрогенов как альтернативы заместительной гормональной терапии для менопаузальных женщин.

Для создания препаратов ЛВП-терапии, вызывающих отток холестерина, целесообразно использовать первичные культуры субэндотелиальных клеток интимы аорты человека, полученные из атеросклеротических поражений.

Обнаруженная связь между инициирующими событиями атерогенеза и вовлечением в атерогенез воспаления и клеточного иммунитета позволяет рассматривать антицитокиновые средства как потенциальные антиатеросклеротические препараты. Для оценки про-

тивовоспалительных свойств таких препаратов может использоваться модель с измерением экспрессии провоспалительных молекул накопление липидов в культивируемых интимальных клетках аорты человека.

ВЫВОДЫ

1. Установлена субстратная и акцепторная специфичность транс-сиалидазы, переносящей с ЛНП сиаловую кислоту на акцепторы плазмы крови (гликопротеиды и гликолипиды).

2. Разработана ферментативная модель *ex vivo* на основе оценки транс-сиалидазной активности. Модель использована для создания антиатерогенного натурального препарата, подавляющего активности транс-сиалидазы, то есть препятствующего атерогенной модификации липопротеидов низкой плотности.

3. Выявлена способность эстрогена (эстрадиола) и андрогена (дигидротестостерона) подавлять накопление холестерина в моноцитах-макрофагах, то есть препятствовать развитию атерогенеза на клеточном уровне.

4. Разработана клеточная модель для оценки антиатерогенной активности натуральных продуктов, обогащенных фитоэстрогенами. Модель использована для создания антиатерогенного натурального препарата, обогащенного фитоэстрогенами, предназначенного для женщин период перименопаузы и постменопаузы.

5. Вклад каналов, использующих апоА-I, определен как основной в суммарном экспорте холестерина из макрофагов в сопоставлении с каналами, использующими в качестве акцептора ЛВП плазмы крови.

6. Учитывая большое разнообразие факторов, влияющих на обратный транспорт холестерина, а также их возможных комбинаций, разработана и создана клеточная модель, позволяющая оценивать интегральный показатель – суммарное снижение уровня холестерина в клетке. Созданная клеточная модель была использована для разработки натурального препарата, вызывающего снижение холестерина в клетках жирового атеросклеротического поражения, то есть способствующего регрессии атеросклероза на клеточном уровне.

7. Выявлена высокая степень положительной корреляции между отложением липидов, содержанием иммуно-воспалительных клеток и экспрессией молекул HLA-DR главного комплекса гистосовместимости класса II в диффузном утолщении интимы. Обнаружено, что накопление внутриклеточных липидов, вызванное атерогенными модифицированными ЛНП, значимо увеличивает как экспрессию HLA-DR, так и экспрессию провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-1.

8. Разработана и создана клеточная модель для оценки секреции про- и противовоспалительных молекулярных регуляторов и маркеров. Созданная модель использована для создания антиатерогенного противовоспалительного натурального препарата, способствующего подавлению воспалительных реакций, выявляемых даже при самых ранних атеросклеротических изменениях в сосудистой стенке.

9. Разработанные натуральные препараты прошли тестирование физико-химических свойств и показателей химической и микробиологической безопасности.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Бабаев В. Р., Бобрышев Ю. В., Стенина О. И., Тарарак Э. М. Фенотипические варианты гладкомышечных клеток в атероматозных бляшках человеческой аорты // Архив патологии. – 1990. – Т.52., №5. – С. 16-21.
2. Безчаснюк Е.М., Дяченко В.В., Кучер О.В. Процесс экстрагирования из лекарственного растительного сырья // Фармаком. – 2003. – №1. – С. 54-56.
3. Биологически активные добавки: 100 производителей и торговых марок-лидеров за 2009 – 2010 гг. в России // Рейтинги DSM Group. – 2011. – №2. – С.45-48.
4. Бобрышев Ю.В., Карагодин В.П., Ковалевская Ж.И., Шапырина Е.В., Каргаполова Ю.М., Галактионова Д.Ю., Салямов В.И., Орехов А.Н. Клеточные механизмы атеросклероза: врожденный иммунитет и воспаление // Фундаментальные науки и практика. – 2010. – №1(4). – С.140–148.
5. Бобрышев Ю.В., Карагодин В.П., Мойсенович М.М., Гаврилин М.А., Мельниченко А.А., Орехова В.А., Бородачев Е.Н., Собенин И.А., Орехов А.Н. Клеточные сети интимы аорты и гомеостаз кровеносных сосудов // Биомедицинский журнал Medline.ru. – 2012. – Т. 13. – С. 408–432.
6. Бобрышев Ю.В., Карагодин В.П., Мойсенович М.М., Мельниченко А.А., Орехов А.Н. Анализ воспалительных процессов в диффузном утолщении интимы аорты человека // Цитология. – 2013. – №55 (6). – С. 394–405.
7. Гигиенические требования по применению пищевых добавок: Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы (СанПиН

2.3.2.1293-03).– М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2003. – 79 с.

8. Гичев Ю.Ю., Гичев Ю.П. Руководство по микронутриентологии. Роль и значение биологически активных добавок к пище. – М.: Триада-Х, 2006. – 312 с.

9. Гнускина А.А. Кризис: бренд или тренд? // Фармацевтический вестник. – 2009. – № 19 (551). – С. 56-59.

10. Гориловский Л.М. Сердечно-сосудистые и тромбозэмболические осложнения пожизненной эстрогенотерапии больных раком предстательной железы в пожилом и старческом возрасте // Урология и нефрология. – 1992. – № 20. – С. 11–15.

11. Грацианский Н.А. Заместительная терапия эстрогенами в менопаузе: реальный метод первичной профилактики сердечно-сосудистых заболеваний или только интересная тема для обсуждения? // Клин. фармакол. и терапия. – 1994. – № 3. – С. 30–39.

12. Грачев А.Н., Карагодин В.П., Мясоедова В.А., Кириченко Т.В., Рудимов Е.Н., Орехова Е.А., Хренов М.О., Авхачева Н.В., Мубаракшина Э.К., Кжышкковская Ю.Г., Орехов А.Н. Выделение моноцитов из крови человека с помощью магнитной сепарации для последующего использования в клеточной тест-системе // Бюлл. МОИП. – 2010. – Т. 115. – С. 117–119.

13. Гуревич Д.А. Рынок биодобавок будет развиваться, но БАД не должны подменять собою лекарства // Фармацевтический вестник. 2003. – № 16 (295). – С. 23-26.

14. Демин В.Ф., Ключников С.О., Болдырев В.Б. Биологически активные добавки к пище. Проблемы и перспективы применения в педиатрии / Тезисы докл. науч.-практ. конф. «Биокорректоры: возможности, опыт, перспективы». – Челябинск, 2005. – С. 18.

15. Демографический ежегодник России. –М.: Росстат, 2010. – 612 с.

16. Заболеваемость населения России в 2011 году. Статистические материалы. Часть I // Министерство здравоохранения РФ, ФГУ «Центральный научно-исследовательский институт организации и информатизации здравоохранения» Росздрова. – М. – 2012. – 118 с.
17. Землянова Е.В. Смертность в России в первом десятилетии XXI века // Социальные аспекты здоровья населения. Информационно-аналитический вестник. – 2008. – № 1. – С. 52–56.
18. Зиверт Ш., Захаров С., Клинггольц Р. Исчезающая мировая держава // Berlin Institute for Population and Development. – 2011. – 148 с.
19. Игнатьева С.Н., Терновский Л.Н., Соловьева Н.В. Изменения метаболических свойств клеток крови у студентов в течение учебного года на Европейском Севере // Нижегородский мед. журнал. – 2002. – № 1. – С.17-19.
20. Информационный бюллетень ВОЗ, 2011.– №317.
21. Карагодин В.П. БАД в России и парадигма маркетинга // Тезисы докл. X Юбилейной конф. «Эффективность нелекарственных оздоровительных продуктов». – М., 2003. – С. 65–67.
22. Карагодин В.П. Биологически активные добавки к пище – товарная группа с неясной перспективой (часть 1) // Товаровед продовольственных товаров. – 2013. – №3. – С. 15–20.
23. Карагодин В.П. Биологически активные добавки к пище – товарная группа с неясной перспективой (часть 2) // Товаровед продовольственных товаров. – 2013. – №4. – С. 5–13.
24. Карагодин В.П. Комплексное исследование российского рынка биологически активных добавок к пище // Ремедиум. – 2001. – №6.– С. 28–35.
25. Карагодин В.П. Нужен ли реинжиниринг бизнес-процессов операторам российского рынка биологически активных добавок? // Рынок БАД. – 2002. – №2(4) . – С. 11–13.

26. Карагодин В.П. Реально ли избавиться от неэффективных биологически активных добавок к пище? // Поликлиника. – 2007. – №3. – С. 35–42.
27. Карагодин В.П., Жукова С.С. Биологически активные добавки к пище – товарная группа с неясной перспективой (часть 3) // Товаровед продовольственных товаров. – 2013. – №5. – С. 5–10.
28. Карагодин В.П., Орехова В.А., Мельниченко А.А., Орехов А.Н. ЛВП-терапия – терапевтические подходы к коррекции дисфункций липопротеидов высокой плотности // Патогенез. – 2013. – № 1. – С.38–45.
29. Карагодин В.П., Собенин И.А., Мухамедова Н.М., Мельниченко А.А., Смутова В.А., Орехова В.А., Мясоедова В.А., Никифоров Н.Г., Сюсина М.А., Горшкова Т.Н., Бордачев Е.Н., Ромкина А.Ю., Орехов А.Н. Белок переноса фосфолипидов увеличивает отток клеточного холестерина и фосфолипидов, вызванный аполипопротеинами липопротеидов высокой плотности // Современный мир, природа и человек. – 2011. – №2(1). – С.37–42.
30. Карагодин В.П., Чертокоева З.А. Биотестирование как метод обнаружения загрязнителей окружающей среды // Биотехнология, экология, охрана окружающей среды: Сб. науч. тр. / М., 2005. – С. 49–50.
31. Карагодин В.П., Чертокоева З.А. Возможность использования биотестирования для предварительной оценки эффективности БАД // Рынок БАД. – 2006. – №5 (31). – С. 34–35.
32. Карагодин В.П., Чертокоева З.А., Нагдалиев Ф.Ф. Контроль потенциальной опасности и экологической чистоты биологически активных добавок // Биотехнология – охране окружающей среды: Сб. (ч.2), 2004. – С. 72–75.
33. Ключин Д.А., Петунин Ю.И. Доказательная медицина. Применение статистических методов. – М.: Диалектика, 2007. – 320 с.

34. Крылов А.А., Череватая Е.Н. Анализ рынка и потребителей биологически активных добавок // ФАРМ-индекс. – 2005. – № 196. – С. 13–17.
35. Крылов А.А., Череватая Е.Н. Анализ рынка биологически активных добавок // Рынок БАД. – 2005. – № 4(24). – С. 45–49.
36. Кувшинова Е.А. Влияние половых гормонов на пролиферативную активность и накопление холестерина в культуре клеток моноцитов/макрофагов человека // Внутренние болезни. – 2006. – №5. – С. 68-75.
37. Малинин В.В., Дурнова А.О., Полякова В.О. Факторы роста и молекулы адгезии эндотелия сосудов как молекулярные мишени для создания пептидных лекарственных препаратов против атеросклероза // Молекулярная медицина. – 2013. – №3. – С. 58-64.
38. Марголина А.А. Нужны ли для здоровья биологически активные добавки? // Наука и жизнь. – 2008. – № 7. – С. 67–69.
39. Мировые эксперты: Российский рынок БАД – самый динамично развивающийся в мире // Фармацевтический вестник. – 2009. – № 6(28). – С.28-31.
40. Монографии ВОЗ о лекарственных растениях, широко используемых в Новых независимых государствах (ННГ). – Всемирная организация здравоохранения. Женева, 2010. – 453 с.
41. Мухамедова Н.М., Свиридов Д.Д., Карагодин В.П., Мельниченко А.А., Мясоедова В.А., Орехова В.А., Собенин И.А., Орехов А.Н. Липопротеиды высокой плотности подавляют воспалительную реакцию моноцитов // Проблемы и перспективы современной науки. – 2011. – №3(1). – С.64–68.
42. Мухамедова Н.М., Свиридов Д.Д., Карагодин В.П., Мельниченко А.А., Мясоедова В.А., Орехова В.А., Собенин И.А., Орехов А.Н. Исследование влияния белков, потенциально вовлеченных в от-

ток холестерина, на экспорт холестерина из макрофагов // Проблемы и перспективы современной науки. – 2011. – 3(1). – С.68–73.

43. Мухамедова Н.М., Свиридов Д.Д., Карагодин В.П., Орехова В.А., Мясоедова В.А., Мельниченко А.А., Собенин А.И., Орехов А.Н. Липопротеиды высокой плотности: терапевтические подходы (ЛВП-терапия) // Фундаментальные науки и практика. – 2010. – №1(4). – С. 116–126.

44. Мясоедова В.А., Карагодин В.П., Нейфельд И.В., Силина Т.С, Гитинова Х. М., Тиханина О.В., Мартиросян Д.М., Курмачева Н.А., Орехов А.Н. Механизмы половых различий при атеросклерозе // Фундаментальные науки и практика. – 2010. – №1(4). – С. 51–58.

45. Мясоедова В.А., Кириченко Т.В., Меркулова Д.М., Собенин И.А., Меркулов Ю.А., Мухамедова Н.М., Мартиросян Д.М., Карагодин В.П., Орехов А.Н. Новый биомаркер в ранней диагностике цереброваскулярной патологии: диффузное интимо-медиальное утолщение сонных артерий // Биомедицинский журнал Медлайн.ру. – 2011. – №11. – Т. 12. – С.998–1007.

46. Мясоедова В.А., Кириченко Т.В., Орехова В.А., Собенин И.А., Карагодин В.П., Орехов А.Н. Изучение показателя толщины интимо-медиального слоя сонных артерий (ТИМ) как показателя естественного течения атеросклероза в московской популяции // Проблемы и перспективы современной науки. – 2011. – 3(1). – С. 96–98.

47. Мясоедова В.А., Кириченко Т.В., Орехова В.А., Собенин И.А., Мухамедова Н.М., Мартиросян Д.М., Карагодин В.П., Орехов А.Н. Изучение толщины интимо-медиального слоя сонных артерий (ТИМ) как показателя естественного течения атеросклероза в московской популяции // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2012. – № 3. – С.43–50.

48. Недоговорова К.Н. Российский аптечный рынок БАД: краткие итоги года // Рынок БАД. – 2009. – № 2(48). – С. 34–38.

49. Орехов А. БАД: кому и зачем они нужны? // 9 месяцев. – 2005. – №3. – С. 42–46.
50. Орехов А.Н. Мировой опыт. БАД в США: клинические исследования под контролем государства // Доктор Эд. – 2007. – №4. – С. 46–48.
51. Орехов А.Н., Карагодин В.П., Мельниченко А.А., Кириченко Т.В., Смутова В.А., Чернова У.В., Сафонова В.М., Калабушев С.Н., Пшежецкий А.В. Сиаломика и атеросклероз // Фундаментальные науки и практика. – 2010. – №1(4). – С.59–65.
52. Петрунук Э.А. БАД в профилактике и лечении желчнокаменной болезни // Тезисы докл. науч.-практ. конф. «Биокорректоры: возможности, опыт, перспективы». – Челябинск, 2005. – С. 28.
53. Петтерман С.В. Китай. Нормативно-правовое регулирование и рынок в переходный период // Рынок БАД. – 2006. – №2(28). – С. 52–56.
54. Пища и пищевые добавки. Роль БАД в профилактике заболеваний: Пер. с англ. / Под. ред. Дж.Ренсли – М.: Мир, 2004. – 312 с.
55. Позняковский В.М., Австриевских А.Н., Вековцев А.А. Пищевые и биологически активные добавки. – Кемерово: Издательское объединение «Российские университеты», 2005. – 275 с.
56. Практические рекомендации. Ведение женщин в пери- и постменопаузе / Под ред. В.П. Сметник, Л.М. Ильина. – Ярославль: ИПК Литера, 2010. – 222 с.
57. Рынок БАД: Итоги 2009-2010 // Рынок БАД. 2011. – № 8(59). – С. 11–14.
58. Совинский М. Правила препаратной борьбы // Коммерсантъ-Деньги. – 2007. – № 39 (645). – С. 56-59.
59. Стародубов В.И., Соболева Н.П., Лукашев А.М. Управляемые факторы в профилактике заболеваний // М.: Изд-во ЦНИИОИЗ, 2003. – 170 с.

60. Сурнин С.А., Собенин И.А., Карагодин В.П., Орехов А.Н. Результаты апробации пребиотика «Алликор» в условиях оздоровительной программы по профилактике респираторных и сердечно-сосудистых заболеваний // Проблемы и перспективы современной науки. – 2011. – Т. 3. – С. 76–78.
61. Терновский Л.Н. Оптимизация адаптации к факторам среды обитания Европейского Севера: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. – М., 1996.
62. Технический регламент Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции» (ТР ТС 021/2011). Приложение 7, 2011. – 242 с.
63. Тутельян В.А. Биологически активные добавки – прорыв в медицине или большая авантюра? // Наука и жизнь. – 2006. – №6. – С. 30–35.
64. Тутельян В.А., Павлючкова М.С., Погожева А.В. и др. Применение фитоэстрогенов в медицине // Вопросы питания. – 2003. – №2. – С. 48–53.
65. Фармацевтический рынок России. Аналитический обзор рынка // DSM Group. – 2009. – № 7. – С.55.
66. Феоктистов А.С., Орехова Е.А., Мясоедова В.А., Смутова В.А., Собенин И.А., Карагодин В.П., Пшежецкий А.В., Орехов А.Н. Роль сиаловой кислоты в проявлении атерогенных свойств липопротеидами низкой плотности // Биомедицинский журнал Медлайн.ру. – 2011. – №11. – Т. 12. – С.1098–1117.
67. Чазова И.Е., Сметник В.П., Балан В.Е. Ведение женщин с сердечно-сосудистым риском в пери- и постменопаузе / Консенсус российских кардиологов и гинекологов. Пробл репрод. – 2008. – № 5. – С.79–87.
68. Шурлыгина А.В., Литвиненко Г.И., Дергачева Т.И., Труфакин В.А. Суточные и сезонные вариации активности дегидрогеназ

лимфоцитов крови при вторичном иммунодефицитном состоянии у женщин с острыми воспалительными гинекологическими заболеваниями неспецифической этиологии // Бюл эксперим биол и медицины. – 1998. – № 125 (5). – С. 576–578.

69. Шустов Е.П. Анализ каналов распространения БАД: MLM-сети и альтернативные внеаптечные каналы // ФАРМ-индекс. – 2010. – № 259. – С. 21–24.

70. Шустов Е.П. Потребители БАД: характеристика // ФАРМ-индекс. – 2005. – № 205. – С. 23–27.

71. Acute modulation of Ca²⁺ influx on rat heart by 17beta-estradiol / C.Buitrago, V.Massheimer, A. R. de Boland // Cell Signal. – 2000. – № 1 (Vol. 12). – P. 47–52.

72. Adams M.R., Wagner J.D., Clarkson T.B. Effects of estrogens and progestins on atherosclerosis in primates // Sex steroids and the cardiovascular system. Schering Foundation Workshop. – Springer – Verlag. – 1992. – P. 161-175.

73. Adorni M.P., Zimetti F., Billheimer J.T., Wang N., Rader D.J., Phillips M.C. and Rothblat G.H. The roles of different pathways in the release of cholesterol from macrophages // Lipid Res. – 2007. – Vol. 48 – P. 2453-2462.

74. Aiello R.J., Brees D., Bourassa P.-A., Royer L., Lindsey S., Coskran T., Haghpassand M. and Francone O.L. Increased Atherosclerosis in Hyperlipidemic Mice With Inactivation of ABCA1 in Macrophages // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2002. – Vol. 22 – P. 630-637.

75. Ait-Oufella H, Salomon BL, Potteaux S, Robertson AK, Gourdy P, Zoll J, et al. Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice // Nat Med – 2006. – Vol. 12: –178-180.

76. Ajees A.A., Anantharamaiah G.M., Mishra V.K., et al. Crystal structure of human apolipoprotein A-I: insights into its protective effect

against cardiovascular diseases // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2006. – Vol. 103. – P. 2126-2131.

77. Altschul R., Hoffer A., Stephen J.D. Influence of nicotinic acid on serum cholesterol in man // Arch. Biochem. – 1955. – Vol. 54. – P. 558-559.

78. American Heart Association. Heart disease and stroke statistics – 2003. – Vol. 22: –128-130.

79. Andreeva E.R., Pugach I.M., Orekhov A.N. Collagen-synthesizing cells in initial and advanced atherosclerotic lesions of human aorta // Atherosclerosis. – 1997. – Vol. 130. – P. 133–142.

80. Andreeva E.R., Pugach I.M., Gordon D., Orekhov A.N. Continuous subendothelial network formed by pericyte-like cells in human vascular bed // Tissue Cell. – 1998.– Vol.30. – P. 127-135.

81. Anichkow N.N. Vessels. In: Handbook on particular human anatomy and pathology. Part II. Heart and vessels // Medgiz. – 1947. – P. 262–558.

82. Aukrust P., Otterdal K., Yndestad A., Sandberg W.J., Smith C., Ueland T., Øie E., Damås J.K., Gullestad .L, Halvorsen B. The complex role of T-cell-based immunity in atherosclerosis // Curr Atheroscler Rep. – 2008. – Vol. 10. – P. 236-43.

83. Austin M.A., Breslow J.L., Hennekens C.H. et al. Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction // JAMA. – 1988. – Vol. 260. – P. 1917–1921.

84. Austin M.A., King M.C., Vranizan K.M., et al. Inheritance of low-density lipoprotein subclass patterns: results of complex segregation analysis // Am. J. Hum. Genet. – 1988. – Vol. 43. – P. 838–846.

85. Avogaro P., Bittolo Bon G., Cazzolato G. Presence of a modified low density lipoprotein in humans // Atherosclerosis. – 1988. – Vol. 8. – P. 79–86. 28

86. Babaev V.R., Bobryshev Y.V., Sukhova G.K., Kasantseva I.A. Monocyte/macrophage accumulation and smooth muscle cell phenotypes in early atherosclerotic lesions of human aorta // *Atherosclerosis*. – 1993. – Vol. 100. – P. 237-48.
87. Backes J.M., Gibson C.A., Howard P.A. Optimal lipid modification: the rationale for combination therapy // *Vasc. Health. Risk. Manag.* – 2005. – Vol. 1. – P. 317-331.
88. Badimón L., Vilahur G., Padró T. Lipoproteins, platelets and atherothrombosis // *Rev. Esp. Cardiol.* – 2009. – Vol. 62. – P. 1161–1178.
89. Baerenwaldt A., Biburger M., Nimmerjahn F. Mechanisms of action of intravenous immunoglobulins // *Expert. Rev. Clin. Immunol.* – 2010. – Vol. 6(3). – P. 425–434.
90. Basso F., Amar M.J., Wagner E.M., Vaisman B., Paigen B., Santamarina-Fojo S., and Remaley A.T. Enhanced ABCG1 expression increases atherosclerosis in LDLr-KO mice on a western diet // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* – 2006. – Vol. 351 – P. 398-404.
91. Basu M., De, T., Das K.K., et al. Glycolipid glycosyltransferases // *Method. Enzymol.* – 1987. – Vol. 138. – P. 575-607.
92. Basu M., Hawes J.W., Li Z., et al. Biosynthesis in vitro of SA-Lex and α 1-3 fukosyltransferases from colon carcinoma cells and embryonic brain tissues // *Glycobiology*. – 1991. – Vol. 1. – P. 527-535.
93. Berge L., Amesen E., Forsdahl A. Pregnancy related changes in some cardiovascular risk factors // *Acta Obstet Gynecol Scand.* – 1996. – Vol. 75. – P. 439-442.
94. Binder C.J., Chou M.Y., Fogelstrand L., Hartvigsen K., Shaw P.X., Boullier A., Witztum J.L. Natural antibodies in murine atherosclerosis // *Curr Drug Targets*. – 2008. – Vol.9. – P.190-195.
95. Bobryshev Y.V. Dendritic cells in atherosclerosis: current status of the problem and clinical relevance // *Eur. Heart J.* – 2005. – Vol. 26. – P.1700–1704.

96. Bobryshev Y.V., Lord R.S. Langhans cells of human arterial intima: uniform by stellate appearance but different by nature // *Tissue Cell*. – 1996. – Vol. 28. – P.177–94.
97. Bobryshev Y.V., Lord R.S. Mapping of vascular dendritic cells in atherosclerotic arteries suggests their involvement in local immune-inflammatory reactions // *Cardiovasc Res*. –1998. – Vol. 37. – P.799–810.
98. Bobryshev Y. ., Lord R.S. Expression of heat shock protein-70 by dendritic cells in the arterial intima and its potential significance in atherogenesis // *Vasc. Surg*. – 2002. – Vol.35. –P. 368–375.
99. Bobryshev Y.V. Dendritic cells and their role in atherogenesis // *Lab. Invest*. – 2010. – Vol. 90. – P. 970-984.
100. Bobryshev Y.V., Lord R.S. Ultrastructural recognition of cells with dendritic cell morphology in human aortic intima. Contacting interactions of Vascular Dendritic Cells in athero-resistant and athero-prone areas of the normal aorta // *Arch. Histol. Cytol*. – 1995. – Vol. 58. – P. 307-322.
101. Bochaton-Piallat M.L., Gabbiani G. Modulation of smooth muscle cell proliferation and migration: role of smooth muscle cell heterogeneity // *Handb Exp Pharmacol*. – 2005. – Vol. 170. –645-663.
102. Böhma B., Bouhrel M.A., Derudas B., Rigamonti E., Dievart R., Brozek J., Haulon S., Zawadzki C., Jude B., Torpier G., Marx N., et al. PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties // *Cell Metab*. – 2009. – Vol. 6. – P. 137-143.
103. Brooke B.S., Bayes-Genis A. Li DY. New insights into elastin and vascular disease // *Trends Cardiovasc. Med*. – 2003. – Vol.13. – P.176–181.
104. Brubaker Ê., Gay Ñ. Specific binding of estrogen to osteoclast surfaces // *Biochem Biophys Res Commun*. – 1994. – Vol. 200. – P. 899-907.

105. Bucusooglu C., Krieger N. Estrogen-specific target site identified by progesterone-11-alpha-hemisuccinate-(2-[125I]-iodohistamine) in mouse brain membranes // *Steroid Biochem Mol Biol.* – 1996. – Vol. 58. – P. 89-94.
106. Buschiazzo A., Alzari P.M. Structural insights into sialic acid enzymology // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 2008. – Vol. 12. – P. 565-572.
107. Caciotti A., Di Rocco M., Filocamo M., et al. Type II sialidosis: review of the clinical spectrum and identification of a new splicing defect with chitotriosidase assessment in two patients // *Neurol.* – 2009. – Vol. 256. – P. 1911-1915.
108. Calm J.E., Ketley J.M., Fansano A., et al. Role of *Vibrio cholerae* neuraminidase in the function of cholerae toxin // *Infedt. Immun.* – 1992. – Vol. 60. – P. 406-415.
109. Campbell G.R., Campbell J.H. Smooth muscle phenotypic changes in arterial wall homeostasis: implications for the pathogenesis of atherosclerosis // *Exp Mol Pathol.* – 1985. – Vol. 42. – P. 139-162.
110. Campbell G.R., Campbell J.H., Manderson J.A., Horrigan S., Rennick R.E. Arterial smooth muscle. A multifunctional mesenchymal cell // *Arch Pathol Lab Med.* – 1988. – Vol. 112. – P. 977-986.
111. Cantz M. Sialidosis // *Sialic acids* (editor Schauer R.). Springer Verlag., Vienna, Austria. – 1980. – P. – 307-320.
112. Chait A., Brazg R.L., Krauss R.M. Increased oxidative susceptibility of LDL subfractions in subjects with the atherogenic lipoprotein phenotype // *Arterioscler Thromb.* – 1991. – Vol. 11. – P. 1425a.
113. Chamley-Campbell J.H., Campbell G.R. What controls smooth muscle phenotype? // *Atherosclerosis.* – 1981. – Vol. 40. – P. 347-357.
114. Chen S., Li H., Durand J. et al. Estrogen reduces myointimal proliferation after balloon injury of rat carotid artery // *Circulation.* – 1996. – Vol. 93. – p. 577-584.

115. Chen S., Li H., Durand J., et al. Estrogen reduces myointimal proliferation after balloon injury of rat carotid artery // *Circulation*. – 1996. – Vol. 93. – P. 577-584.
116. Chen W., D.L. Silver J.D. Smith and A.R. Tall. Scavenger receptor-BI inhibits ATP-binding cassette transporter 1-mediated cholesterol efflux in macrophages // *Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275 – P. 30794-30800.
117. Choudhury R.P., Rong J.X., Trogan E., et al. High-density lipoproteins retard the progression of atherosclerosis and favorably remodel lesions without suppressing indices of inflammation or oxidation // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2004. – Vol. 24. – P. 1904-1909.
118. Chow M.S. Benefit/risk of estrogen therapy in cardiovascular disease: current knowledge and future challenges // *Clin Pharmacol.* – 1995. – Vol. 35. – p. 11S-17S.
119. Clarkson T.B., Anthony M.S., Klein K.P. Effects of estrogen treatment on arterial wall structure and function // *Drugs*. – 1994. – Vol. 47. – p. 42-51.
120. Colley K.J. Structural basis for the polysialylation of the neural cell adhesion molecule // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2010. – Vol. 663. – P. 111–126.
121. Colman P.M. Influenza virus neuraminidase: structure, antibodies, and inhibitors // *Protein Sci.* – 1994. – Vol. 3. – P. 1687-1696.
122. Conard J., Basdevant A., Thomas J.L. et al. Cardiovascular risk factors and combined estrogen-progestin replacement therapy: a placebo-controlled study with noregestrol acetate and estradiol // *Fertil Steril.* – 1995. – Vol. 64. – p. 957-962.
123. Conard J., Basdevant A., Thomas J.L. et al. Cardiovascular risk factors and combined estrogen-progestin replacement therapy: a placebo-controlled study with noregestrol acetate and estradiol // *Fertil Steril.* – 1995. – Vol. 64. – p. 957-962.

124. Corfield T. Bacterial sialidase - roles in pathogenicity and nutrition // *Glycobiology*. – 1992. – Vol. 2. – P. 509.
125. Dallinga-Thie G.M., Franssen R., Mooij H.L., et al. The metabolism of triglyceride-rich lipoproteins revisited: new players, new insight. *Atherosclerosis*. – 2010. – Vol. 211. – P. 1–8.
126. Datta A.K. Comparative sequence analysis in the sialyltransferase protein family: analysis of motifs // *Curr. Drug. Targets*. – 2009. – Vol. 10. – P. 483-498.
127. d'Azzo A., Andria G., Strisenglio P., Galjaard H. Galactosialidosis // *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. Mc. Craw-Hill, New York. – 1995. – Vol. 2. – P. 2825-2838.
128. De la Llera-Moya M., Drazul-Schrader D., Asztalos B.F., et al. The ability to promote efflux via ABCA1 determines the capacity of serum specimens with similar high-density lipoprotein cholesterol to remove cholesterol from macrophages // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. – 2010. – Vol. 30. – P. 796-801.
129. Deng T., Ji W., Lian J., et al. Identifying Natural Derived Upregulators of Human ApoA-I Expression via a Cell-Based Drug Screening System // *Pharmaceutical. Biology*. – 2006. – Vol. 46. – P. 610-615.
130. Deshpande R., Khalili H., Pergolizzi R.G., Michael S.D., Chang M.D. Estradiol down-regulates LPS-induced cytokine production and NFkB activation in murine macrophages // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 1997. – V. 38(1). – P.46-54.
131. Di Marzo V. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? // *Nat. Rev. Drug. Discov*. – 2008. – Vol. 7. – P. 438-455.
132. Diverse actions of ovarian steroids in the serotonin nuclear system / C.L. Bethea, N.Z. Lu, C. Gundlan et al // *Front. Neuroendocrinol*. – 2002. – Vol. 23. – P. 41–100.
133. Dol-Gleizes F., Paumelle R., Visentin V., et al. Rimonabant, a selective cannabinoid CB1 receptor antagonist, inhibits atherosclerosis in

LDL receptor-deficient mice // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2009. – Vol. 29. – P. 12-18.

134. Doran A.C., Meller N., McNamara C.A.. Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2008. – Vol. 28. – P. 812-819.

135. Drew B.G., Fidge N.H., Gallon-Beaumier G., et al. High-density lipoprotein and apolipoprotein AI increase endothelial NO synthase activity by protein association and multisite phosphorylation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – Vol. 101. – P. 6999-7004.

136. Dubey R.K., Gillespie D.G., Imthurn B., Rosselli M., Jackson E.K., and Keller P.J. Phytoestrogens inhibit growth and MAP kinase activity in human aortic smooth muscle cells // *Hypertension.*–1999.–V.33.–P.177–182.

137. Effect of acute testosterone on myocardial ischemia in men with coronary artery disease / C.M. Webb, D.L. Adamson, D.de Zeigler, et al // *Am. J. Cardiol.* – 1999. – Vol. 83. – P. 437–439.

138. Eggerman T.L., Hoeg J.M., Meng M.S., et al. Differential tissue-specific expression of human apoA-I and apoA-II // *Lipid. Res.* – 1991. – Vol. 32. – P. 821-828.

139. Elia A.R., Cappello P., Puppo M., Fraone T., Vanni C., Eva A., Musso T., Novelli F., Varesio L., Giovarelli M. Human dendritic cells differentiated in hypoxia down-modulate antigen uptake and change their chemokine expression profile // *Leukoc Biol.* –2008. – Vol. 84. – P. 1472-1482.

140. Escher G., Hoang A., Georges S., Tchoua U., El-Osta A., Krozowski Z., and Sviridov D. Demethylation using the epigenetic modifier, 5-azacytidine, increases the efficiency of transient transfection of macrophages // *Lipid Res.* – 2005. – Vol. 46 – P. 356-365.

141. Escher G., Krozowski Z., Croft K.D., and Sviridov D. Expression of Sterol 27-Hydroxylase (CYP27A1) Enhances Cholesterol Efflux // *Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278 – P. 11015-11019.
142. Escher G., Hoang A., Georges S., Tchoua U., El-Osta A., Krozowski Z. and Sviridov D. Demethylation using the epigenetic modifier, 5-azacytidine, increases the efficiency of transient transfection of macrophages // *Lipid Res.* – 2005. – Vol. 46. – P. 356-365.
143. Escher G., Krozowski Z., Croft K.D. and Sviridov D. Expression of Sterol 27-Hydroxylase (CYP27A1) Enhances Cholesterol Efflux // *Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278 – P. 11015-11019.
144. Estrogen actions throughout the brain / B.S. McEwen // *Rec. Progress Horm. Res.* – 2002. – Vol. 57. – P. 357–384.
145. Farhat M., Abi-Younes S., Vargas R., et al. Vascular non-genomic effects of estrogen // *Sex steroids and the cardiovascular system / P.Ramwell, et al.* – Springer – Verlag. – 1992. – P. 145-160.
146. Feeman W.E. Cholesterol guidelines // *Ann. Intern. Med.* – 1989. – Vol. 111. – P. 1047–1048.
147. Feoktistov Alexander S., Karagodin Vasilij P., Sobenin Igor A., Suprun Igor V., Alexandra A. Melnichenko, and Alexander N. Orekhov. The Interaction of Plasma Sialylated and Desialylated Lipoproteins with Collagen from the Intima and Media of Uninvolved and Atherosclerotic Human Aorta // *Journal of Lipids.* – 2011. – Vol.9. – P.8.
148. Ferrero M.A., Aparicio L.R. Biosynthesis and production of polysialic acids in bacteria // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 86. – P. 1621–1635.
149. Fielding P.E., Nagao K., Hakamata H., Chimini G., and Fielding C.J. A two-step mechanism for free cholesterol and phospholipid efflux from human vascular cells to apolipoprotein A-1 // *Biochemistry* – 2000. – Vol. 39 – P. 14113-14120.

150. Fingerhut R., van der Horst G.T.J., Verheijen F.W., Connelmann E. Degradation of gangliosides by the lysosomal sialidase requires an activator protein // *Biochem.* – 1992. – Vol. 208. – P. 623-629.
151. Fluiter K., Van Der Westhuijzen D.R., Van Berkel T.J. In vivo regulation of scavenger receptor BI and the selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters in rat liver parenchymal and Kupffer cells // *Biol. Chem.*–1998.–V.273.–P.8434–8438.
152. Foegh M., Zhao Y., Lou H. et al. Estrogen and prevention of transplant atherosclerosis // *Heart Lung Transplant.* – 1995. – Vol. 14. – p. S170-S172.
153. Fogelman A.M., Schechter I., Seager J., et al. Malondialdehyde alteration of LDL leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte macrophage // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1980. – Vol. 77. – P. 2215–2218.
154. Ford I., Murray H., Packard C.J., et al. Long-term follow-up of the West of Scotland Coronary Prevention Study // *N. Engl. J. Med.* – 2007. – Vol. 357. – P. 1477-1486.
155. Forrester J.S. Redefining normal low-density lipoprotein cholesterol: a strategy to unseat coronary disease as the nation's leading killer // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2010. – Vol. 56. – P. 630–636.
156. Frank J., Taleb S., Mallat Z., and Tedgui A. Recent advances on the role of cytokines in atherosclerosis // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2009. – Vol. 31. – P. 969-979.
157. Fraser I.H., Coolbear T., Sarkar M., Mookerjee S. Increase of sialyltransferase activity in the serum and liver of inflamed rats // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1984. – Vol. 799. – P. 102-105.
158. Frish A., Neufeld E.F. A rapid and sensitive assay for neuramidase: Application to cultured fibroblast // *Annal. Biochem.* – 1979. – Vol. 95. – P. 222-227.

159. Fu Y., Hoang A., Escher G., Parton R.G., Krozowski Z., and Sviridov D. Expression of Caveolin-1 Enhances Cholesterol Efflux in Hepatic Cells // *Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279 – P. 14140-14146.

160. Gadde K.M., Allison D.B. Cannabinoid-1 receptor antagonist, rimonabant, for management of obesity and related risks // *Circulation.* – 2006. – Vol. 114. – P. 974-984.

161. Garlatti V., Martin L., Lacroix M., et al. Structural insights into the recognition properties of human ficolins // *Innate. Immun.* – 2009. – Vol. 2(1). – P. 17–23.

162. Geer J.C., McGill H.C., Strong J.P., Holman R.L. Electron microscopy of human atherosclerotic lesions // *Fed. Proc.*– 1960. – Vol.19. – P.15–18.

163. Geissmann F., Manz M.G., Jung S., Sieweke M.H., Merad M., Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells // *Science.* – 2010. – Vol. 327. – P. 656-661.

164. Gelissen I.C., Harris M., Rye K.-A., Quinn C., Brown A.J., Kockx M., Cartland S., Packianathan M., Kritharides L., and Jessup W. ABCA1 and ABCG1 Synergize to Mediate Cholesterol Export to ApoA-I // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2006. – Vol. 26 – P. 534-540.

165. Gerrity R.G. The role of the monocyte in atherogenesis: I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions // *Am J Pathol.* – 1981. – Vol. 103. – P. 181-190.

166. Getz G.S. Overview of murine atherosclerosis series // *Curr Drug Targets.* – 2007. – Vol. 8. – P.1144-1149.

167. Gille A., Bodor E.T., Ahmed K., Offermanns S. Nicotinic acid: pharmacological effects and mechanisms of action // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2008. – Vol. 48. – P. 79-106.

168. Giraud G., Morton M., Wilson R., et al. Effects of estrogen and progesterin on aortic size and compliance in postmenopausal women // *Am J Obstet Gynecol.* – 1996. – Vol. 174. – P. 1708-1717.

169. Glass C.K., Witztum J.L. Atherosclerosis // The road ahead. *Cell.* – 2001. – Vol. 104. – P.503-516.
170. Goldstein J.L., Ho H.S.K., Basu S.K., Brown M.S. Binding site on macrophage that mediates uptake and degradation of acetylated LDL producing massive cholesterol deposition // *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* – 1979. – Vol. 76. – P. 333–337.
171. Gopaul K.P., Crook M.A. The inborn errors of sialic acid metabolism and their laboratory investigation // *Clin. Lab.* – 2006. – Vol. 52. – P. 155-169.
172. Gordon S. Macrophage heterogeneity and tissue lipids // *Clin Invest.* – 2007. – Vol. 117. – P. 89-93.
173. Gordon S., Taylor P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity // *Nat Rev Immunol.* – 2005. – Vol. 5. – P. 953-964.
174. Gordon T., Castelli W.P., Hjortland M.C., et al. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study // *Am. J. Med.* – 1977. – Vol. 62. – P. 707-714.
175. Gorog P., Born G.V.R. Increased uptake of circulating LDL and fibrinogen by arterial walls after removal of sialic acids from their endothelial surface // *Br. J. Exp. Pathol.* – 1982. – Vol. 63. – P. 447-451.
176. Gotsman I., Gupta R., Lichtman A.H. The influence of the regulatory T lymphocytes on atherosclerosis // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2007. – Vol. 27. – P. 2493-1495.
177. Gown A.M., Tsukada T., Ross R. Human atherosclerosis. II. Immunocytochemical analysis of the cellular composition of human atherosclerotic lesions // *Am J Pathol.* – 1986. – Vol. 125. – P. 191-207.
178. Grady D., Rubin S., Petitti D. et al. Hormone therapy to prevent disease and prolong life in postmenopausal women // *Ann Intern Med.* – 1992. – Vol. 117. – P. 1016-1037.
179. Graham I., Atar D., Borch-Johnsen K. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (Fourth Joint Task

Force of the European Society of Cardiology and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice) // *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* – 2007. – Vol. 14. – P. S1–S113.

180. Grey A., Stapleton J., Evans M., Reid I. The effect of the anti-estrogen tamoxifen on cardiovascular risk factors in normal postmenopausal women // *Clin Endocrinol Metab.* – 1995. – Vol. 80. – P. 3191-3195.

181. Grodstein F., Stampfer M., Manson J., et al. Postmenopausal estrogen and progestin use and the risk of cardiovascular disease // *N Engl J Med.* – 1996. – Vol. 335. – P. 453–461.

182. Gross G.A., Takle G.B. The surface trans-sialidase family of *Trypanosona cruzi* // *Annu. Rev. Microbiol.* – 1993. – Vol. 47. – P. 385-411. 122

183. Guo L., Hu W.R., Lian J.H., et al. Anti-hyperlipidemic properties of CM108 (a flavone derivative) in vitro and in vivo // *Pharmacol.* – 2006. – Vol. 551. – P. 80-86.

184. Guo Z., Benten W.P., Krücken J., Wunderlich F. Nongenomic testosterone calcium signaling. Genotropic actions in androgen receptor-free macrophages // *Biol. Chem.*–2002.–V.277(33).–P. 2960.

185. Handunnetthi L., Ramagopalan S.V., Ebers G.C., Knight J.C. Regulation of major histocompatibility complex class II gene expression, genetic variation and disease // *Genes Immun.* – 2010. – Vol. 11. – P.99–112.

186. Handunnetthi L., Ramagopalan S.V., Ebers G.C., Knight J.C. Regulation of major histocompatibility complex class II gene expression, genetic variation and disease // *Genes Immun.* – 2010. – Vol. 11. – P. 99-112.

187. Hansson G.K. Atherosclerosis – an immune disease: the Anitschkov lecture 2007 // *Atherosclerosis.*– 2009. – Vol.202. –P.2–10.

188. Hansson G.K., Hermansson A. The immune system in atherosclerosis // *Nat. Immunol.* – 2011. – Vol.12. – P.204–212.

189. Hansson G.K. Atherosclerosis-an immune disease: The Anitschkov Lecture 2007 // *Atherosclerosis*. – 2009. – Vol. 202. – P. 2-10.

190. Hansson G.K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease // *N Engl J Med*. – 2005. – Vol. 352. – P. 1685-1695.

191. Hansson G.K., Holm J., Jonasson J. Detection of activated T lymphocytes in the Human Atherosclerotic Plaque // *Amer J Pathol*. – 1989. – Vol. 135. – P.169-175.

192. Hansson G.K., Jonasson L. The discovery of cellular immunity in the atherosclerotic plaque // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. – 2009. – Vol. 29. – P. 1714-1717.

193. Hansson G.K., Jonasson L., Lojstshed B., Stemme S., Kocher O., Gabbiani G. Localization of T lymphocytes and macrophages in fibrous and complicated human atherosclerotic plaques // *Atherosclerosis*. – 1988. – Vol. 72. – P. 135-141.

194. Hansson G.K., Libby P. The immune response in atherosclerosis: A double-edged sword // *Nat Rev Immunol*. – 2006. – Vol. 6. – P. 508-519.

195. Hansson G.K., Libby P., Schonbeck U., Yan Z.Q. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis // *Circ. Res*. – 2002. – Vol. 91. – P.281–291.

196. Hansson G.K., Nilsson J. Vaccination against atherosclerosis? Induction of atheroprotective immunity // *Semin Immunopathol*. – 2009. – Vol. 31. –P. 95-101.

197. Hao H., Gabbiani G., Bochaton-Piallat M.L. Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. – 2003. – Vol. 23. – P. 1510-1520.

198. Harrison R.L., Jarvis D.L. Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell expression system and engineering of insect cells to pro-

duce "mammalianized" recombinant glycoproteins // *Adv. Virus. Res.* – 2006. – Vol. 68. – P. 159–191.

199. Hassan H.H., Denis M., Lee D.-Y.D., Iatan I., Nyholt D., Ruel I., Krimbou L. and Genest J. Identification of an ABCA1-dependent phospholipid-rich plasma membrane apolipoprotein A-I binding site for nascent HDL formation: implications for current models of HDL biogenesis // *Lipid Res.* – 2007. – Vol. 48 – P. 2428-2442.

200. Higashiura K., Mathur R.S., and Halushka P.V. Gender-related differences in androgen regulation of thromboxane A2 receptors in rat aortic smooth-muscle cells // *Cardiovasc. Pharmacol.*–1997.–V.29.–P.311–315.

201. Hildebrandt H., Mühlhoff M., Gerardy-Schahn R. Polysialylation of NCAM // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2010. – Vol. 663. – P. 95–109.

202. Hinz B., Phan S.H., Thannickal V.J., Galli A., Bochaton-Piallat M.L., Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins // *Am J Pathol.* – 2007. – Vol. 170. – P. 1807-1816.

203. Hsieh Y.C., Frink M., Thobe B.M. 17Beta-estradiol downregulates Kupffer cell TLR4-dependent p38 MAPK pathway and normalizes inflammatory cytokine production following trauma-hemorrhage // *Mol. Immunol.*–2007. – V. 44 – P. 2165–2172.

204. Hsieh Y.C., Frink M., Thobe B.M. 17Beta-estradiol downregulates Kupffer cell TLR4-dependent p38 MAPK pathway and normalizes inflammatory cytokine production following trauma-hemorrhage // *Mol. Immunol.*–2007. – Vol. 44. – P. 2165–2172.

205. Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions / M. T. Tzukerman, A. Esty, D. Santiso-Mere et al // *Mol. Endocrinol.* – 1994. – Vol. 8. – P. 21–30.

206. IADSA (Международная федерация ассоциаций производителей диетических/пищевых добавок). URL: www.iadsa.org (Дата обращения: 29.05.2011).
207. Ishigaki Y., Oka, Y., Katagiri H. Circulating oxidized LDL: a biomarker and a pathogenic factor // *Curr. Opin. Lipidol.* – 2009. – Vol. 20. – P. 363–369.
208. Iyemere V.P., Proudfoot D., Weissberg P.L., Shanahan C.M. Vascular smooth muscle cell phenotypic plasticity and the regulation of vascular calcification // *Intern Med.* – 2006. – Vol. 260. – P. 192-210.
209. Jarvis D.L. Developing baculovirus-insect cell expression systems for humanized recombinant glycoprotein production // *Virology.* – 2003. – Vol. 310. – P. 1–7.
210. Joyce C.W. - Vol. M.J., Amar A., Lambert G., Vaisman B.L., Paigen B., Najib-Fruchart J., Hoyt R.F., Neufeld Jr., E.D., Remaley A.T., Fredrickson D.S., Brewer H.B. and Santamarina-Fojo S. The ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) modulates the development of aortic atherosclerosis in C57BL/6 and apoE-knockout mice // *PNAS* – 2002. – Vol. 99 – P. 407-412.
211. Julia M. Orshal and Raouf A. Khalill. Gender, sex hormones, and vascular tone // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*–2004.– V.286.–P.R233–R249.
212. Karagodin V.P., Bobryshev Y.V., Moisenovich M.M., Melnichenko A.A. and Orekhov A.N. Analysis of Inflammatory Processes in Diffuse Thickening of Human Aorta Intima // *Cell and Tissue Biology.* – 2013. – Vol. 7. – N. 5. – P. 439–449.
213. Katsuda S, Kaji T. Atherosclerosis and extracellular matrix // *Atheroscler. Thromb.* – 2003. – Vol.10. – P.267–274.
214. Kekulawala J.R., Murphy A., D'Souza W., et al. Impact of freezing on high-density lipoprotein functionality // *Anal. Biochem.* – 2008. – Vol. 379.– P. 213-215.

215. Kennedy M.A., Barrera G.C., Nakamura K., Baldan A., Tarr P., Fishbein M.C., Frank J., Francone O.L., and Edwards P.A. ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation // *Cell Metab* – 2005. – Vol. 1 – P. 121-131.

216. Kido H., Okumura Y., Takahashi E., et al. Host envelope glycoprotein processing proteases are indispensable for entry into human cells by seasonal and highly pathogenic avian influenza viruses // *Mol. Genet. Med.* – 2008. – Vol. 3. – P. 167-175.

217. Kido H., Okumura Y., Yamada H., et al. Proteases essential for human influenza virus entry into cells and their inhibitors as potential therapeutic agents // *Curr. Pharm. Des.* – 2007. – Vol. 13(4). – P. 405-414.

218. Kita T., Yokode M., Ishii K., et al. The role of atherogenic low density lipoproteins (LDL) in the pathogenesis of atherosclerosis // *Ann. NY Acad. Sci.* – 1990. – Vol. 598. – P. 188–193.

219. Kleemann R., Zadelaar S., Kooistra T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice // *Cardiovasc Res.* – 2008. – Vol. 79. – P.360-376.

220. Klimov A.N., Nagornev V.A. Evolution of cholesterol concept of atherogenesis from Anitchkov to our days // *Pediatr Pathol Mol Med.* – 2002. – Vol. 21. – P. 307-320.

221. Klingenberg R., Hansson G.K. Treating inflammation in atherosclerotic cardiovascular disease: emerging therapies // *Eur. Heart.* – 2009. – Vol.30. – P. 2838–2344.

222. Knopp R., Zhu X., Bonet B. Effects of estrogens on lipoprotein metabolism and cardiovascular disease in women // *Atherosclerosis.* – 1994. – Vol. 110. – P. S83-S91

223. Knopp R., Zhu X., Bonet B. Effects of estrogens on lipoprotein metabolism and cardiovascular disease in women // *Atherosclerosis.* – 1994. – Vol. 110. – P. S83-S91.

224. Kobata S. Use of endo- and exoglycosidases for structural studies of glycoconjugates // *Anal. Biochem.* – 1979. – Vol. 100. – P. 1-14.
225. Kocher O, Gabbiani G. Cytoskeletal features of normal and atheromatous human arterial smooth muscle cells // *Human Pathol.*– 1986. – Vol. 17. – P. 875-880.
226. Kolpakov V., Polishchuk R., Bannykh S., Rekhter M., Solovjev P., Romanov Y., Tararak E., Antonov A., Mironov A. Atherosclerosis-prone branch regions in human aorta: microarchitecture and cell composition of intima // *Atherosclerosis.* – 1996. – Vol. 122. – P. 173-189.
227. Kontush A., Chapman M.J. Antiatherogenic small, dense HDL-guardian angel of the arterial wall? // *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* – 2006. – Vol. 3. – P. 144-153.
228. Kramer P.R., Wray S. 17-Beta-estradiol regulates expression of genes that function in macrophage activation and cholesterol homeostasis // *Steroid. Biochem. Mol. Biol.* – 2002. – V.81. – P. 203-216.
229. Kramer P.R., Wray S. 17-Beta-estradiol regulates expression of genes that function in macrophage activation and cholesterol homeostasis // *Steroid. Biochem. Mol. Biol.* – 2002. – V.81. – P. 203–216.
230. Krasinski K., Spyridopoulos I., Asahara T., et al. Estradiol accelerates functional endothelial recovery after arterial injury // *Circulation.* – 1997. – Vol. 95. – P. 1768-1772.
231. Krauss R.M., Burke D.J. Identification of multiple subclasses of plasma low density lipoproteins in normal humans // *Lipid. Res.* – 1982. – Vol. 23. – P. 97–104.
232. Krimbou L., Jahagirdar R., Bailey D., et al. Compound RVX-208 Modulates HDL-C Levels and Function in Non-human Primates and in Early (phase I) Human Trials // *Circulation.* – 2008. – Vol. 118. – P. 371.
233. Krimbou L., Jahagirdar R., Ruel I., et al. Oral Administration of Compound RVX-208 Increases Serum Levels of ApoA-I and Improves

High-Density Lipoprotein-Mediated Cholesterol Efflux in African Green Monkeys // *Circulation*. – 2007. – Vol. 116. – P. 126.

234. Kritz-Silverstein D., Von Muhlen D., Barrett-Connor E., Bressel M.A. Isoflavones and cognitive function in older women: the Soy and Postmenopausal Health In Aging (SOPHIA) Study Menopause.– 2003. – Vol. 10. – P.196-202.

235. Kruth H.S. Localization of unesterified cholesterol in human atherosclerotic lesions. Demonstration of filipin-positive, Oil-Red-O-negative particles // *Am. J. Pathol.* – 1984. – Vol. 114. – P.201–208.

236. Kumlin U., Olofsson S., Dimock K., Arnberg N. Sialic acid tissue distribution and influenza virus tropism // *Influenza. Other. Respi. Viruses.* – 2008. – Vol. 2. – P. 147–154.

237. La Bell M., Krauss R.M. Differences in carbohydrate content of low density lipoproteins associated with low density lipoprotein subclass patterns // *Lipid. Res.* – 1990. – Vol. 31. – P. 1577–1588.

238. Lammers G., Jamieson J.C. The role of cathepsin D-like activity in the release of Gal β 1-4GlcNAc α 2-6 sialyltransferase from rat liver Golgi membrane during acute phase response // *Biochem.* – 1988. – Vol. 256. – P. 623-631.

239. Langer C., Gansz B., Goepfert C., Engel T., Uehara Y., von Dehn G., Jansen H., Assmann G., von Eckardstein A. Testosterone up-regulates scavenger receptor BI and stimulates cholesterol efflux from macrophages // *Biochemical and Biophysical Research Communications.*– 2002.–V.296.–P.1051–1057.

240. Langer C., Gansz B., Goepfert C., Engel T., Uehara Y., von Dehn G., Jansen H., Assmann G., von Eckardstein A. Testosterone up-regulates scavenger receptor BI and stimulates cholesterol efflux from macrophages // *Biochemical and Biophysical Research Communications.* – 2002. – V.296. – P.1051–1057.

241. Larrede S., Quinn C.M., Jessup W., et al. Stimulation of cholesterol efflux by LXR agonists in cholesterol-loaded human macrophages is ABCA1-dependent but ABCG1-independent // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2009. – Vol. 29. – P. 1930-1936.

242. Lawn R.M., Wade D.P., Garvin M.R., et al. The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway // *Clin. Invest.* – 1999. – Vol. 104. – P. R25-R31.

243. 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.

244. Leiser M., Harms E., Kern H., et al. Ganglioside GM3 sialidase activity in fibroblast of normal individuals and of patients with sialidosis and mucopolidosis // *Biochem.* – 1989. – Vol. 260. – P. 69-74.

245. Leslee J.S., Bairey Merz C.N., Pepine C.J., et al. Insights from the NHLBI Sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) Study // *Am. Coll. Cardiol.* – 2006. – Vol. 47 – P. S4-S20.

246. Libby P., Ridker P.M., Simon D.I. et al., Inflammation and cardiovascular disease mechanisms // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2011. – Vol. 83(2). – P. 456S-460S.

247. Libby P. Inflammation in atherosclerosis // *Nature.* – 2002. – Vol. 420. – P. 868-874.

248. Liuzzo G., Kopecky S.L., Frye R.L., O'Fallon W.M., Maseri A., Goronzy J.J., et al. Perturbation of the T-cell repertoire in patients with unstable angina // *Circulation.* – 1999. – Vol. 100. – P. 2135-2139.

249. Lloyd-Jones D.M., Wilson P.W., Larson M.G., et al. Framingham risk score and prediction of lifetime risk for coronary heart disease // *Am. J. Cardiol.* – 2004. – Vol. 94 – P. 20-24.

250. Löfling J.C., Paton A.W., Varki N.M., et al. A dietary non-human sialic acid may facilitate hemolytic-uremic syndrome // *Kidney. Int.* – 2009. – Vol. 76. – P. 140-144.

251. Lopes-Virella M.F., Klein R.L., Lyons T.J., et al. Glycosylation of LDL enhances cholesteryl ester synthesis in human-derived macrophages // *Diabetes*. – 1988. – Vol. 37. – P. 550–557.

252. Lopez D., Sanchez M.D., Shea-Eaton W., McLean M.P. Estrogen activates the high-density lipoprotein receptor gene via binding to estrogen response elements and interaction with sterol regulatory element binding protein-1A // *Endocrinology*. – 2002. – V.143(6). – P.2155-68.

253. Lotze M.T., Thomson A.W., Dendritic cells: biology and clinical applications. 2nd ed. – San Diego, CA // Academic Press. – 2001. – Vol. 113. – P. 115-120.

254. Lu N.C., Calkin A.C., and Tontonoz P. Liver x receptor signaling pathways and atherosclerosis // *Arterioscler Thromb Vasc Biol* . – 2009. – Vol. 30. – P.1513-1518.

255. Major A.S., Dove D.E., Ishiguro H., Su Y.R., Brown A.M., Liu L., Carter K.J., Linton M.F., and Fazio S. Increased Cholesterol Efflux in Apolipoprotein AI (ApoAI)-Producing Macrophages as a Mechanism for Reduced Atherosclerosis in ApoAI(-/-) Mice // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. – 2001. – Vol. 21 – P. 1790-1795.

256. Makatsori E., Aletras A., Karamanos N.K., Tseggenidis T. Analysis of N-acetyl and N-glycolylneuraminic acid in rat serum and tissues with Walker 256 carcinoma by high-performance liquid chromatography // *Biomed. Chromatogr*. – 1999. – Vol. 13. – P. 57–60.

257. Malkin C.J., Pugh P.J., Jones R.D., Jones T.H., Channer K.S. Testosterone as a protective factor against atherosclerosis-immunomodulation and influence upon plaque development and stability // *Endocrinol*. – 2003. – V.178(3). – P.373-380.

258. Malkin C.J., Pugh P.J., Jones R.D., Jones T.H., Channer K.S. Testosterone as a protective factor against atherosclerosis--immunomodulation and influence upon plaque development and stability // *Endocrinol*. – 2003. – V.178(3). – P.373-80.

259. Mallat Z., Ait-Oufella H., Tedgui A. Regulatory T-cell immunity in atherosclerosis // *Trends Cardiovasc Med.* – 2007.– Vol. 17. – P.113-118.
260. Mallat Z., Taleb S., Ait-Oufella H., Tedgui A. The role of adaptive T cell immunity in atherosclerosis // *Lipid Res.*– 2009. – Vol. 50. – S364.
261. Malmendier C.E., Deleroix C., Fontaine M. Effect of sialic acids removal in human LDL catabolism in vivo // *Atherosclerosis.* – 1980. – Vol. 37. – P. 227-284.
262. Marchal I., Jarvis D.L., Cacan R., Verbert A. Glycoproteins from insect cells: sialylated or not? // *Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 382. – P. 151–9.
263. Matsuda L.A., Lolait S.J., Brownstein M.J., et al. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA // *Nature.* – 1990. – Vol. 346. – P. 561-564.
264. McCrohon J.A., Death A.K., Nakhla S., Jessup W., Handelsman D.J., Stanley K.K., Celermajer D.S. Androgen receptor expression is greater in macrophages from male than from female donors. A sex difference with implications for atherogenesis // *Circulation.*–2000.–V.101(3).–P.224–6.
265. McCrohon J.A., Nakhla S., Jessup W., Stanley K.K., Celermajer D.S. Estrogen and progesterone reduce lipid accumulation in human monocyte-derived macrophages: a sex-specific effect // *Circulation.*–1999.–V.100(23).–P.2319-25.
266. Meier P., Meier R., Blanc E. Influence of CD4+/CD25+ regulatory T cells on atherogenesis in patients with end-stage kidney disease // *Expert Rev Cardiovasc Ther.* – 2008. – Vol. 6. – P. 987-997.
267. Meir K., Kitsberg D., Alkalay I., Szafer F., Rosen H., Shpitzen S., Avi L.B., Staels B., Fievet C., Meiner V., Bjorkhem I. and Leitersdorf E. Human Sterol 27-Hydroxylase (CYP27) Overexpressor Transgenic

Mouse Model. Evidence against 27-hydroxycholesterol as a critical regulator of cholesterol homeostasis // *Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277 – P. 34036-34041.

268. Mendelsohn M.E. Genomic and nongenomic effects of estrogen in the vasculature // *Am. J. Cardiol.*–2002.–V.90.–P.3F–6F.

269. Mendelsohn M.E. Genomic and nongenomic effects of estrogen in the vasculature // *Am. J. Cardiol.* – 2002. – Vol.90. – P.3F–6F.

270. Mestas J., Hughes C.C. Of mice and not men: Differences between mouse and human immunology // *Immunol.* – 2004. – Vol. 172. – P.2731-2738.

271. Methe H., Brunner S., Wiegand D., Nabauer M., Koglin J., Edelman E.R. Enhanced T-helper-1 lymphocyte activation patterns in acute coronary syndromes // *J Am Coll Cardiol.* – 2005. – Vol. 45. – P. 1939-1945.

272. Millar J.S. The sialylation of plasma lipoproteins // *Atherosclerosis.* – 2011. – 154. – P. 1-13.

273. Miller Y.I., Choi S.H., Fang L., Tsimikas S. Lipoprotein modification and macrophage uptake: role of pathologic cholesterol transport in atherogenesis // *Subcell. Biochem.* – 2010. – Vol. 51. – P. 229–251.

274. Miyagi T. Aberrant expression of sialidase and cancer progression // *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* – 2008. – Vol. 84. – P. 407-418.

275. Miyagi T., Sagawa J., Konno K., et al. Biochemical and immunological studies on two distinct gangliosid-hydrolysing sialidase from the particulate fraction of the rat brain // *Biochem.* – 1990. – Vol. 107. – P. 787-793.

276. Miyagi T., Tsuiki S. Purification and characterisation of cytosolic sialidase from rat liver // *Biol. Chem.* – 1985. – Vol. 260. – P. 6710-6716.

277. Miyagi T., Wada T., Yamaguchi K., et al. Plasma membrane-associated sialidase as a crucial regulator of transmembrane signalling // *Biochem.* – 2008. – Vol. 144. – P. 279-285.

278. Mizanur R.M., Pohl N.L. Bacterial CMP-sialic acid synthetases: production, properties, and applications // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2008. – Vol. 80. – P. 757–765.

279. Monti E., Preti A., Venerando B., Borsani G. Recent development in mammalian sialidase molecular biology // *Neurochem. Res.* – 2002. – Vol. 27. – P. 649-663.

280. Montreuil J. Primary structure of glycoprotein glycans: basis for molecular biology of glycoproteins // *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* – 1980. – Vol. 37. – P. 158-223.

281. Montreuil J. Structural similarity of the terminal carbohydrate sequence of glycoproteins and glycolipids // *Pure. Appl. Chem.* – 1975. – Vol. 42. – P. 431-497.

282. Mor A., Luboshits G., Planer D., Keren G., George J. Altered status of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in patients with acute coronary syndromes // *Eur Heart.* – 2006. – Vol. 27. – P. 2530-2537.

283. Mor A., Planer D., Luboshits G., Afek A., Metzger S., Chajek-Shaul T., et al. Role of naturally occurring CD4+ CD25+ regulatory T cells in experimental atherosclerosis // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2007. – Vol. 27. – P. 893-900.

284. Mosser D.M., Edwards J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation // *Nat Rev Immunol.* – 2008. – Vol. 8. – P. 958-969. 30-3

285. Mukhin D.N., Orekhov A.N., Andreeva E.R., Schindeler E.M., Smirnov V.N. Lipids in cells of atherosclerotic and uninvolved human aorta. III. Lipid distribution in intimal sublayers // *Exp. Mol. Pathol.* – 1991. – Vol. 54. – P. 22–30.

286. Murphy A.J., Chin-Dusting J.P., Sviridov D., Woollard K.J. The anti inflammatory effects of high density lipoproteins // *Curr. Med. Chem.* – 2009. – Vol. 16. – P. 667-675.
287. Murphy A.J., Woollard K.J., Hoang A., et al. High-density lipoprotein reduces the human monocyte inflammatory response // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2008. – Vol. 28. – P. 2071-2077.
288. Nagornev V.A., Maltseva S.V. The phenotype of macrophages which are not transformed into foam cells in atherogenesis.// *Atherosclerosis.* – 1996. – Vol. 121. – P. 245-251.
289. National Institutes of Health Office of Dietary Supplements (ODS). URL: <http://ods.od.nih.gov> (Дата обращения: 19.05.2011).
290. Nayak J.L., Treanor J.J. Antiviral treatment and prophylaxis of influenza virus in children // *Pediatr. Ann.* – 2009. – Vol. 38. – P. 667-674.
291. Neres J., Bryce R.A., Douglas K.T. Rational drug design in parasitology: trans-sialidase as a case study for Chagas disease // *Drug. Discov. Today.* – 2008. – Vol. 13. – P. 110-117.
292. Nielsen M., Lund O., Buus S., Lundegaard C. MHC class II epitope predictive algorithms // *Immunology.* – 2010. – Vol. 130. – P. 319-328.
293. Nissen S.E., Tedgui A., and Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways // *Physiol Rev.* – 2003. – Vol. 86. – P. 515-581.
294. Nofer J.R., Levkau B., Wolinska I., et al. Suppression of endothelial cell apoptosis by high density lipoproteins (HDL) and HDL-associated lysosphingolipids // *Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. – P. 34480-34485.
295. Nofer J.R., Walter M., Kehrel B., et al. HDL3-mediated inhibition of thrombin-induced platelet aggregation and fibrinogen binding occurs via decreased production of phosphoinositide-derived second messen-

gers 1,2-diacylglycerol and inositol 1,4,5-tris-phosphate // *Arterioscler. Thromb. Vasc Biol.* – 1998. – Vol. 18. – P. 861-869.

296. Noma A., Takahashi T., Wada T. Elastin–lipid interaction in the arterial wall. Part 2. In vitro binding of lipoprotein–lipids to arterial elastin and the inhibitory effect of high density lipoproteins on the process // *Atherosclerosis.* – 1981. – Vol.38. – P.373–382.

297. Nongenomic Steroid Action: Controversies, Questions, and Answers / R. M. Lösel, E. Falkenstein, M. Feuring et al // *Physiol. Rev.* – 2003. – Vol. 83. – P. 965–1016.

298. Ohlsson L. Dairy products and plasma cholesterol levels // *Food. Nutr. Res.* – 2010. – P.50-54.

299. Oram J.F. HDL apolipoproteins and ABCA1: partners in the removal of excess cellular cholesterol // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2003. – Vol. 23. – P. 720-727.

300. Oram J.F., Wolfbauer G., Vaughan A.M., Tang C., and Albers J.J. Phospholipid Transfer Protein Interacts with and Stabilizes ATP-binding Cassette Transporter A1 and Enhances Cholesterol Efflux from Cells // *Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278 – P. 52379-52385.

301. Orekhov A.N. In vitro models of antiatherosclerotic effects of cardiovascular drugs // *Am. J. Cardiol.* – 1990. – Vol. – 66. – P. 231-281.

302. Orekhov A.N. Primary culture of human aortic intima cells as a model for testing antiatherosclerotic drugs. Effects of cyclic AMP, prostaglandins, calcium antagonists, antioxidants, and lipid-lowering agents // *Atherosclerosis.* – 1986. – Vol. 60. – P. 101-110.

303. Orekhov A.N. Use of human atherosclerotic cells for optimization of antiatherosclerotic therapy // *Agents Actions.* – 1991. – Vol. 32. – P. 130-131.

304. Orekhov A.N., Andreeva E.R., Andrianova I.V., Bobryshev Y.V. Peculiarities of cell composition and cell proliferation in different

type atherosclerotic lesions in carotid and coronary arteries // *Atherosclerosis*. – 2010. – Vol. 212. – P. 436–443.

305. Orekhov A.N., Andreeva E.R., Andrianova I.V., Bobryshev Y.V. Peculiarities of cell composition and cell proliferation in different type atherosclerotic lesions in carotid and coronary arteries // *Atherosclerosis*. – 2010. – Vol. 212. – P. 436–443.

306. Orekhov A.N., Andreeva E.R., Krushinsky A.V., Smirnov V.N. Primary cultures of enzyme-isolated cells from normal and atherosclerotic human aorta // *Med. Biol.* – 1984. – Vol. 62. – P. 255–259.

307. Orekhov A.N., Andreeva E.R., Tertov V. The distribution of cells and chemical components in the intima of human aorta // *Soc. Med. Rev. A: Cardiol.* – 1987. – Vol. 1. – P. 75–100.

308. Orekhov A.N., Andrianova I.V., Rekhter M.D., et al. Beta-blockers: propranolol, metoprolol, atenolol, pindolol, alprenolol and timolol, manifest atherogenicity on in vitro, ex vivo and in vivo models. Elimination of propranolol atherogenic effects by papaverine // *Atherosclerosis*. – 1992. – Vol. 95. – P. 77–85.

309. Orekhov A.N., Baldenkov G.N., Tertov V.V., et al. Antiatherosclerotic effects of calcium antagonists. Study in human aortic cell culture // *Herz*. – 1990. – Vol. 15. – P. 139–145.

310. Orekhov A.N., Tertov V.V. In vitro effect of garlic powder extract on lipid content in normal and atherosclerotic human aortic cells // *Lipids*. – 1997. – Vol. 32. – P. 1055–1060.

311. Orekhov A.N., Tertov V.V., Kudryashov S.A., et al. Primary culture of human aortic intima cells as a model for testing antiatherosclerotic drugs. Effects of cyclic AMP, prostaglandins, calcium antagonists, antioxidants, and lipid-lowering agents // *Atherosclerosis*. – 1986. – Vol. 60. – P. 101–110.

312. Orekhov A.N., Tertov V.V., Kudryashov S.A., Smirnov V.N. Triggerlike stimulation of cholesterol accumulation and DNA and extracel-

lular matrix synthesis induced by atherogenic serum or low density lipoprotein in cultured cells // *Circ. Res.* – 1990. – Vol. 66. – P. 311–320.

313. Orekhov A.N., Tertov V.V., Mukhin D.N., et al. Desialylated low density lipoprotein – naturally occurring lipoprotein with atherogenic potency // *Atherosclerosis.* – 1991. – Vol. 86. – P. 153–161.

314. Orekhov A.N., Tertov V.V., Mukhin D.N., Mikhailenko I.A. Modification of LDL 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. – Vol. 162. – P. 206–211.

315. Orekhov A.N., Tertov V.V., Mukhin D.N., Mikhailenko I.A. 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. – Vol. 162. – P. 206–211.

316. Orekhov A.N., Tertov V.V., Pokrovsky S.N., et al. Blood serum atherogenicity associated with coronary atherosclerosis. Evidence for non-lipid factor providing atherogenicity of LDL and an approach to its elimination // *Circ. Res.* – 1988. – Vol. 62. – P. 421–429.

317. Orekhov A.N., Tertov V.V., Sobenin I.A. et al. Sialic acid content of human low density lipoproteins affects their interaction with cell receptors and intracellular lipid accumulation // *Lipid Res.* – 1992. – Vol. 33. – P. 805–807.

318. Orekhov A.N., Tertov V.V., Sobenin I.A., Pivovarova E.M. Direct anti-atherosclerosis-related effects of garlic // *Ann. Med.* – 1995. – Vol. 27. – P. 63–65.

319. Osborn M., Caselitz J., Püschel K., Weber K. Intermediate filament expression in human vascular smooth muscle and in arteriosclerotic plaques // *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* – 1987. – Vol. 411. – P. 449–458.

320. Out R., Hoekstra M., Hildebrand R.B., Kruit J.K., Meurs I., Li Z., Kuipers F., Van Berkel T.J.C. and Van Eck M. Macrophage ABCG1 Deletion Disrupts Lipid Homeostasis in Alveolar Macrophages and Moderately Influences Atherosclerotic Lesion Development in LDL Receptor-Deficient Mice // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2006. – Vol. 26 – P. 2295-2300.

321. Out R., Hoekstra M., Hildebrand R.B., Kruit J.K., Meurs I., Li Z., Kuipers F., Van Berkel T.J.C. and Van Eck M. Macrophage ABCG1 Deletion Disrupts Lipid Homeostasis in Alveolar Macrophages and Moderately Influences Atherosclerotic Lesion Development in LDL Receptor-Deficient Mice // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2006. – Vol. 26 – P. 2295-2300.

322. Out R., Hoekstra M., Meurs I., de Vos P., Kuiper J., Van Eck M. and Van Berkel T.J.C. Total Body ABCG1 Expression Protects Against Early Atherosclerotic Lesion Development in Mice. *Arterioscler // Thromb. Vasc. Biol.* – 2007. – Vol. 27 – P. 594-599.

323. Owens G.K. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells // *Physiol Rev.* – 1995. – Vol. 75. – P. 487-517.

324. Packard C.J., Shepherd J. Low density lipoprotein metabolism // *Prog. Clin. Biol. Res.* – 1988. – Vol. 255. – P. 117–123.

325. Paulson J.C., Colley L.J. Glycosyltransferases. Structure, localization and control of cell type-specific glycosylation // *J. Biol. Chem.* – 1989. – Vol. 264. – P. 17615-17618.

326. Pereira-Chioccola V.L., Schenkman S. Biological role of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase // *Biochem. Soc. Trans.* – 1999. – Vol. 27. – P. 516-518.

327. Pi-Sunyer F.X., Aronne L.J., Heshmati H.M., et al. Effect of rimonabant, a cannabinoid-1 receptor blocker, on weight and cardiometabolic risk factors in overweight or obese patients: RIO-North America: a randomized controlled trial // *JAMA.* – 2006. – Vol. 295. – P. 761-775.

328. Prager M., Türel Z., Speidl W.S., Zorn G., Kaun C., Niessner A., Heinze G., Huk I., Maurer G., Huber K., Wojta J. Chlamydia pneumoniae in carotid artery atherosclerosis: a comparison of its presence in atherosclerotic plaque, healthy vessels, and circulating leukocytes from the same individuals // *Stroke*. – 2002. – Vol. 33. – P. 2756-27561.

329. Priest C.A., Roberts J.L. Estrogen and tamoxifen differentially regulate beta-endorphin and cFos expression and neuronal colocalization in the arcuate nucleus of the rat // *Neuroendocrinology*. – 2000. – V.72. – P.293–305.

330. Pryshchep O., Ma-Krupa W., Younge B.R., Goronzy J.J., Weyand C.M. Vessel-specific Toll-like receptor profiles in human medium and large arteries // *Circulation*. – 2008. – Vol. 118. – P.1276-1284. 190

331. Pshezhetsky A.V., Ashmarina M. Lysosomal multienzyme complex: biochemistry, genetics, and molecular pathophysiology // *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* – 2001. – Vol. 69. – P. 81-114.

332. Pshezhetsky A.V., Hinek A. Serine carboxypeptidases in regulation of vasoconstriction and elastogenesis // *Trends. Cardiovasc. Med.* – 2009. – Vol. 19. – P. 11-17.

333. Puranik R., Bao S., Nobecourt E., et al. Low dose apolipoprotein A-I rescues carotid arteries from inflammation in vivo // *Atherosclerosis*. – 2008. – Vol. 196. – P. 240-247.

334. Pyle L., Sviridov D. and Fidge N. Characterization of the maturation of human pro-apolipoprotein A-I in an in vitro model // *Biochemistry* – 2001. – Vol. 40 – P. 3101-3108.

335. Qiu Y., Yanase T., Hu H., Tanaka T., Nishi Y., Liu M., Sueishi K., Sawamura T., Nawata H. Dihydrotestosterone Suppresses Foam Cell Formation and Attenuates Atherosclerosis Development // *Endocrinology*. – 2010. – V.151(7). – P.3307-3316.

336. Qiu Y., Yanase T., Hu H., Tanaka T., Nishi Y., Liu M., Sueishi K., Sawamura T., Nawata H. Dihydrotestosterone Suppresses Foam Cell

Formation and Attenuates Atherosclerosis Development // *Endocrinology*. – 2010. – V.151(7). – P.3307-3316.

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

338. Raal F.J. Pathogenesis and management of the dyslipidemia of the metabolic syndrome // *Metab. Syndr. Relat. Disord.* – 2009. – Vol. 7. – P. 83–88.

339. Rekhter M.D., Zhang K., Narayanan A.S., Phan S., Schork M.A., Gordon D. Type I collagen gene expression in human atherosclerosis. Localization to specific plaque regions // *Am. J. Pathol.* – 1993. – Vol. 143. – P. 1634-1648.

340. Remaley A.T., Amar M., Sviridov D. HDL-replacement therapy: mechanism of action, types of agents and potential clinical indications // *Expert. Rev. Cardiovasc. Ther.* – 2008. – Vol. 6. – P. 1203-1215.

341. Reuter G., Gabius H.J. Review sialic acids: structure – analysis – metabolism – occurrence – recognition // *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* – 1996. – Vol. 377. – P. 325-342.

342. Ridker P.M., Rubic T., and Lorenz R.L. Downregulated CD36 and oxLDL uptake and stimulated ABCA1/G1 and cholesterol efflux as anti-atherosclerotic mechanisms of interleukin-10 // *Cardiovasc Res.* – 2012. – Vol. 69. – P. 527-535.

343. Rizzo M., Kotur-Stevuljevic J., Berneis K., et al. Atherogenic dyslipidemia and oxidative stress: a new look // *Transl. Res.* – 2009. – Vol. 153. – P. 217–223.

344. Rodriguez-Iturbe B., Katiyar V.N., Coello J. Neuraminidase activity and free sialic acid levels in the serum of patients with acute poststreptococcal glomerulonephritis // *N. Eng. J. Med.* – 1981. – Vol. 304. – P. 1506-1510.

345. Roggentin P., Schauer R., Heyer L.L., Vimr E.R. Micro review: The sialidase superfamily and its spread by horizontal gene transfer // *Mol. Microbiol.* – 1993. – Vol. 9. – P. 915-921.
346. Roseman S. The synthesis of complex carbohydrates by multiglycosyltransferases systems and their potential funktion in intracellular adhesion // *Chem. Phys. Lipids.* – 1970. – Vol. 5. – P. 270-297.
347. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease // *N. Engl. J. Med.* – 1999. – Vol.340. – P.115–126.
348. Ross R. Atherosclerosis: An inflammatory disease // *N Engl J Med.* – 1999. – Vol. 340. – P. 115-126.
349. Rothender M., Krempler F., Kostner G.M. Interaction of various lipoproteins from normal and dyslipoproteinemic plasma with mouse peritoneal macrophages // *Ann. Biol. Clin. (Paris).* –1988. – Vol. 46. – P. 30–34.
350. Rubanyi G.M., Freay A.D., Kauser K., Sukovich D., Burton G., Lubahn D.B., Couse J.F., Curtis S.W. and Korach K.S. Vascular estrogen receptors and endothelium-derived nitric oxide production in the mouse aorta. Gender difference and effect of estrogen receptor gene disruption // *Clin. Invest.*–1997.–V.99.–P.2429–2437.
351. Rzucidlo E.M., Martin K.A., Powell R.J. Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation // *Vasc Surg.* – 2007. – Vol. 45. – P.25-32.
352. Saito, M., Yu, R.K. Biochemistry and function of sialidase // *Biology of sialic acids.*// Plenum Press, New York, NY. – 1995. – Vol. 261–313.
353. Sakaguchi S., Sakaguchi N., Shimizu J., et al. Immunologic tolerance maintained by CD25+CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance // *Immunol Rev.* – 2001. – Vol. 182. – P. 18-32.

354. Sakaguchi S., Yamaguchi T., Nomura T., Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance // *Cell*. – 2008. – Vol. 133. – P. 775-787.

355. Samsioe G. Effects of hormone replacement therapy on lipid metabolism and incidence of cardiovascular disease // Parthenon Publ Group. – 1993. – P. 35-40.

356. Sato K., Miyagi T. Genomic organisation and the 5'-upstream sequence of the rat cytosolic sialidase gene // *Glycobiology*. – 1995. – Vol. 5. – P. 511-516.

357. Sato K., Miyagi T. Involvement of an endogeneous sialidase in skeletal muscle cell differentiation // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1996. – Vol. 221. – P. 826-830.

358. Scariano J.K., Emery-Cohen A.J., Pickett G.G., Morgan M., Simons P.C., Alba F. Estrogen Receptors Alpha (ESR1) and Beta (ESR2) Are Expressed in Circulating Human Lymphocytes // *Journal of Receptors and Signal Transduction*. – 2008. – V.28. – P.285–293.

359. Schachter H., Roseman S. Mammalian glycosyltransferases: their role in the synthesis and function of complex carbohydrates and glycolipids // *The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans*. Plenum Press, New York. – 1980. – Vol. 85. – P. 160-198.

360. Schauer R. Chemistry, methabolism and biology function of sialic acids // *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* – 1982. – Vol. 40. – P. 131–234.

361. Schauer R. Role of sialic acides // *Trends. Biochem.* – 1985. – Vol. 7. – P. 357–360.

362. Schauer R. Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2009. – Vol. 19(5). – P. 507–514.

363. Schauer R., Keim S., Reuter G., et al. Biochemistry and role of sialic acids // Plenum Press, New York, NY. – 1995. – P. 7-67.

364. Schlesinger R.W. Sindbis virus replication in vertebrate and mosquito cells: an interpretation // *Med. Biol.* – 1975. – Vol. 53(5). – P. 295–301.
365. Schneider-Jacob H.R., Cantz M. Lysosomal and plasma membrane ganglioside GM3 sialidase of cultured human fibroblast-differentiation by detergent and inhibitors // *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.* – 1991. – Vol. 377. – P. 443-450.
366. Schwartz S.M., Campbell G.R., Campbell J.H. Replication of smooth muscle cells in vascular disease // *Circ. Res.* – 1986. – Vol. 58. – P. 427-444.
367. Schwartz S.M., de Blois D., O'Brien E.R. The intima: soil for atherosclerosis and restenosis // *Circ. Res.* – 1995. – Vol.77. – P.445–465.
368. Schwartz S.M., Heimark R.L., Majesky M.W. Developmental mechanisms underlying pathology of arteries // *Physiol Rev.* –1990. – Vol. 70. – P. 1177-1209.
369. Scudder P., Doom J.P., Chuenkova M., et al. Enzymatic characterization of beta-D-galactoside alpha 2,3-trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* // *Biol. Chem.* – 1993. – Vol. 115. – P. 7862-7878.
370. Seyama Y., Wachi H. Atherosclerosis and matrix dystrophy // *Atheroscler. Thromb.* – 2004. – Vol.11. – P.236–245.
371. Shibata N., Glass C.K. Regulation of macrophage function in inflammation and atherosclerosis // *Lipid Res.* –2009. – Vol. 50. – P.S277-281.
372. Shimada K. Immune system and atherosclerotic disease. Heterogeneity of Leukocyte Subsets Participating in the Pathogenesis of Atherosclerosis // *Circ J.* – 2009. – Vol. 73. –P. 994-1001.
373. Simiand J., Keane M., Keane P.E., Soubrie P. SR 141716, a CB1 cannabinoid receptor antagonist, selectively reduces sweet food intake in marmoset // *Behav. Pharmacol.* – 1998. – Vol. 9. – P. 179-181.
374. Singaraja R.R., Fievet C., Castro G., James E.R., Hennuyer N., Clee S.M., Bissada N., Choy J.C., Fruchart J.-C., McManus B.M., Staels B.

and Hayden M.R. Increased ABCA1 activity protects against atherosclerosis // *Clin. Invest.* – 2002. – Vol. 110 – P. 35-42.

375. Singaraja R.R., Fievet C., Castro G., James E.R., Hennuyer N., Clee S.M., Bissada N., Choy J.C., Fruchart J.-C., McManus B.M., Staels B. and Hayden M.R. Increased ABCA1 activity protects against atherosclerosis // *Clin. Invest.* – 2002. – Vol. 110. – P. 35–42.

376. Slifkin M., Doyle R.J. Lectins and their application to clinical microbiology // *Clin. Microbiol. Rev.* – 1990. – Vol. 3. – P. 197–218.

377. Slomiany A., Slomiany B.L. Structures of the acidic oligosaccharides isolated from rat sublingual glycoprotein // *Biol. Chem.* – 1979. – Vol. 249. – P. 7742-7746.

378. Sobue K., Hayashi K., Nishida W. Expressional regulation of smooth muscle cell-specific genes in association with phenotypic modulation // *Mol Cell Biochem.* – 1999. – Vol. 190. – P. 105-118.

379. Soliman A., Kee P. Experimental models investigating the inflammatory basis of atherosclerosis // *Curr Atheroscler Rep.* – 2008. – Vol. 10. – P.260-271.

380. Soloperto G. & Casciaro S. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis // *Nat Rev Immunol.* – 2012. – Vol. 10. – P. 36-46.

381. Srivastava R.A. Scavenger receptor class B type I expression in murine brain and regulation by estrogen and dietary cholesterol // *Journal of the Neurological Sciences.*–2003.–V.210.–P.11–18.

382. St Clair R.W. Effects of estrogens on macrophage foam cells: a potential target for the protective effects of estrogens on atherosclerosis // *Curr. Opin. Lipidol.*–1997.–V.8(5)–P.281-6.

383. Steinberg D., Parthasarathy S., Carew T.E., et al. Modification of LDL that increase its atherogenicity // *N. Engl. J. Med.* – 1989. – Vol. 320. – P. 915–924.

384. Stemme S., Faber B., Holm J., Wiklund O., Witztum J.L., Hansson G.K. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1995. – Vol. 92.– P.3893-3897.
385. Stevenson J. The metabolic and cardiovascular consequences of hormone replacement therapy // *Br. J. Clin. Pract.*–1995.–V.49.–P.87–90.
386. Strehle E.M. Sialic acid storage disease and related disorders // *Genet. Test.* – 2003. – Vol. 7. – P. 113-121.
387. Stress and anxiety across the lifespan: structural plasticity and epigenetic regulation / Richard G. Hunter, Bruce S. McEwen // *Epigenomics*. – 2013. – Vol. 5(2). – P.177-94.
388. Sturdee D.W. Pines on behalf of the International Menopause Society Writing Group. Updated IMS recommendations on postmenopausal hormone therapy and preventive strategies for midlife health // *Climacteric*.– 2011. – Vol. 14. – P.302-320.
389. Sulistiyani St, Clair R.W. Effect of 17 beta-estradiol on metabolism of acetylated low-density lipoprotein by THP-1 macrophages in culture // *Arterioscler. Thromb.Vasc. Biol.*–1997.–V.17(9).–P.1691-700.
390. Sviridov D., Nestel P., Watts G. Statins and metabolism of high density lipoprotein // *Cardiovasc. Hematol. Agents. Med. Chem.* – 2007. – Vol. 5. – P. 215-221.
391. Sviridov D., Pyle L. and Fidge N. Efflux of cellular cholesterol and phospholipid to apolipoprotein A-I mutants // *Biol. Chem.* – 1996. – Vol. 271 – P. 33277-33283.
392. Takahashi N., Lee K.B., Nakagawa H., et al. Enzymatic sialylation of N-linked oligosaccharides using an alpha-2,3-specific trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi*: structural identification using a three-dimensional elution mapping technique // *Annal. Biochem.* – 1995. – Vol. 230. – P. 333-342.

393. Takashima S. Characterization of mouse sialyltransferase genes: their evolution and diversity // *Biosci Biotechnol Biochem.* – 2008. – Vol. 72. – P. 1155-1167.
394. Taniguchi A. Promoter structure and transcriptional regulation of human beta-galactoside alpha2, 3-sialyltransferase genes // *Curr. Drug. Targets.* – 2008. – Vol. 9. – P. 310-316.
395. Taskinen M.R., Puolakka J., Pyorala T., Luotola H., Bjaorn M., Kaarianen J., et al. Hormone replacement therapy lowers plasma Lp(a) concentrations. Comparison of cyclic transdermal and continuous estrogen/progestin regimens // *Arterioscler. Thromb.Vasc. Biol.*–1996.–V.16.– P.1215–21.
396. Taylor G. Sialidases: structures, biological significance and the-rapeutic potential // *Curr Opin Struct Biol.* – 1996. – Vol. 6. – P. 830–837.
397. Tertov V.V., Orekhov A.N. Metabolism of native and naturally occurring multiple modified low density lipoprotein in smooth muscle cells of human aortic intima // *Exp. Mol. Pathol.* – 1997. – Vol.64. – P.127–145.
398. Tertov V.V., Bittolo-Bon G., Sobenin I.A., et al. Naturally oc-curing modified LDL are similar if not identical: more electronegative and desialylated lipoprotein subfraction // *Exp. Mol. Pathol.* – 1995. – Vol. 62. – P. 166–172.
399. Tertov V.V., Kaplun V.V., Dvoryantsev S.N., et al. Apolipo-protein B-bound lipids as a marker for evaluation of low density lipoprotein oxidation in vivo // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1995. – Vol. 214. – P. 608–615.
400. Tertov V.V., Orekhov A.N., Martsenyuk O.N., et al. LDL isolated from the blood of patients with coronary heart disease induce the accumula-tion of lipids in human aortic cells // *Exp. Mol. Pathol.* – 1989. – Vol. 50. – P. 337–347.
401. Tertov V.V., Orekhov A.N., Sobenin I.A., et al. Carbohydrate content of protein and lipid components in sialic acid-rich and –poor low

density lipoproteins from subjects with and without coronary artery disease // *Lipid Res.* – 1993. – Vol. 34. – P. 365–375.

402. Tertov V.V., Orekhov A.N., Sobenin I.A., et al. Three types of naturally occurring modified lipoproteins induce-intracellular lipid accumulation due to lipoprotein aggregation // *Circ. Res.* – 1992. – Vol. 71. – P. 218–228.

403. Tertov V.V., Sobenin I.A., Gabbazov Z.A., et al. Lipoprotein aggregation as an essential condition of intracellular lipid accumulation caused by modified low density lipoproteins // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1989. – Vol. 163. – P. 489–493.

404. Tertov V.V., Sobenin I.A., Gabbazov Z.A., et al. Multiple-modified desialylated LDL that cause intracellular lipid accumulation. Isolation, fractionation and characterisation // *Lab. Invest.* – 1992. – Vol. 67. – P. 665–675.

405. Tertov V.V., Sobenin I.A., Tonevitsky A.G., et al. 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. – Vol. 167. – P. 1122–1127.

406. Tettamanti G., Morgan I.G., Gombos G., et al. Sub-synaptosomal localization of brain particulate neuraminidase // *Brain. research.* – 1972. – Vol. 47. – P. 515-518.

407. Therond P. Catabolism of lipoproteins and metabolic syndrome // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* – 2009. – Vol. 12. – P. 366–371.

408. Tinahones C., Charo I.F., and Taub R. Anti-inflammatory therapeutics for the treatment of atherosclerosis // *Nat Rev Drug Discov.* – 2009. – Vol. 10. – 365-376.

409. Trowbridge I.S., Thomas M.L. CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development // *Annu. Rev. Immunol.* – 1994. – Vol. 12. – P. 85-116.

410. Tsai S.A., Stefanick M.L., Stafford R.S. Trends in menopausal hormone therapy use of US office-based physicians, 2000-2009 // *Menopause.* – 2011. – Vol. 18. – P. 385–92.

411. Tucci S.A., Rogers E.K., Korbonits M., Kirkham T.C. The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 blocks the orexigenic effects of intrahypothalamic ghrelin // *Br. J. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 143. – P. 520-523.

412. Tuthill A., Slawik H., O’Rahilly S., Finer N. Psychiatric comorbidities in patients attending specialist obesity services in the UK // *QJM.* – 2006. – Vol. 99. – P. 317-325.

413. Vaisar T., Pennathur S., Green P.S., et al. Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the anti-inflammatory properties of HDL // *Clin. Invest.* – 2007. – Vol. 117. – P. 746-756.

414. Van Pelt J., Kamerling J.P., Vliegthart J.E., et al. A comparative study of the accumulated sialic acide-containing oligosaccharides from cultured human galactosialidosis and sialidosis fibroblast // *Clin. Chim. Acta.* – 1988. – Vol. 174. – P. 325-335.

415. Van Pelt J., Kamerling J.P., Vliegthart J.E., et al. Isolation and structural characterisation of sialic acide-containing storage material from mucopolilipids I (sialidosis) fibroblasts // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1988. – Vol. 956. – P. 36-45.

416. Van Pelt J., Kamerling J.P., Vliegthart J.E., et al. Structural analysis of O-glycosidic type of sialyloligosaccharide-alditors derived from urinal glycopeptides of a sialidosis patiens // *Biochem.* – 1988. – Vol. 174. – P. 183-187.

417. Vanderlaan P.A., Reardon C.A. Thematic review series: the immune system and atherogenesis. The unusual suspects: an overview of the minor leukocyte populations in atherosclerosis // *Lipid Res.*– 2005. – Vol. 46. – P.829-838.

418. Vanderlaan P.A., Reardon C.A. The unusual suspects: an overview of the minor leukocyte populations in atherosclerosis // *Lipid. Res.* – 2005. – Vol. 46. –P. 829-838.

419. Vedhachalam C., Duong P.T., Nickel M., Nguyen D., Dhanasekaran P., Saito H., Rothblat G.H., Lund-Katz S. and Phillips M.C. Mechanism of ATP-binding Cassette Transporter A1-mediated Cellular Lipid Efflux to Apolipoprotein A-I and Formation of High Density Lipoprotein Particles // *Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282 – P. 25123-25130.

420. Velican C., Velican D., Tancu I. The relationship between intimal necrosis and lipid accumulation during the onset and progression of atherosclerotic lesions // *Med. Interne.* – 1988. – Vol. 26. – P.97-107.

421. Venkov C., Rankin A., Vaughan D. Identification of authentic estrogen receptor in cultured endothelial cells. A potential mechanism for steroid hormone regulation of endothelial function // *Circulation.* – 1996. – Vol. 94. – p. 727-733.

422. Verty A.N., McFarlane J.R., McGregor I.S., Mallet P.E. Evidence for an interaction between CB1 cannabinoid and melanocortin MCR-4 receptors in regulating food intake // *Endocrinology.* – 2004. – Vol. 145. – P. 3224-3231.

423. Villablanca A., Lubahn D., Shelby L., Lloyd K., Barthold S. Susceptibility to early atherosclerosis in male mice is mediated by estrogen receptor alpha // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2004. – V. 24. - P. 1055-1061.

424. Vimr E.R., Kalivoda K.A., Deszo E.L., Steenbergen S.M. Diversity of microbial sialic acid metabolism // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2004. – Vol. 68. – P. 132-153.

425. Virmani R., Kolodgie F.D., Burke A.P., Farb A., Schwartz S.M. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2000. – Vol.20. – P.1262-1275.

426. Von Itzstein M., Thomson R. Anti-influenza drugs: the development of sialidase inhibitors // *Handb. Exp. Pharmacol.* – 2009. – Vol. – P. 111–154. 44

427. Von Itzstein M., Thomson R.S. Sialic acids and sialic acid-recognising proteins: drug discovery targets and potential glycoparmacuticals // *Curr. Med. Chem.* – 1997. – Vol. 4. – P. 185–210.

428. Wagner J., Clarkson T., StClair R. et al. Estrogen and progesterone therapy reduces low density lipoprotein accumulation in the coronary arteries of surgically postmenopausal cynomolgus monkeys // *Clin Invest.* – 1991. – Vol. 88. – P. 1995-2002.

429. Wagner J., Clarkson T., StClair R. et al. Estrogen and progesterone therapy reduces low density lipoprotein accumulation in the coronary arteries of surgically postmenopausal cynomolgus monkeys // *Clin Invest.* – 1991. – Vol. 88. – P. 1995-2002.

430. Waksman R., Weber C., Zerneck A., and Libby P. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models // *Nat Rev Immunol.* – 2010. – Vol. 8. – P.802-815.

431. Walsh B.,Schiff I., Rosner B. et al. Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins // *N Engl J Med.* – 1991.–Vol. 325. – P. 1196-1204.

432. Wang M.-D., V. Franklin M. Sundaram R.S. Kiss K. Ho M. Gallant and Y.L. Marcel. Differential Regulation of ATP Binding Cassette Protein A1 Expression and ApoA-I Lipidation by Niemann-Pick Type C1 in Murine Hepatocytes and Macrophages // *Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282 – P. 22525-22533.

433. Wang X., Collins H.L., Ranalletta M., Fuki I.V., Billheimer J.T., Rothblat G.H., Tall A.R. and Rader D.J. Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport in vivo // *Clin. Invest.* – 2007. – Vol. 117 – P. 2216-2224.

434. Wang M.-D., Kiss R.S., Franklin V., McBride H.M., Whitman S.C. and Marcel Y.L. Different cellular traffic of LDL-cholesterol and acetylated LDL-cholesterol leads to distinct reverse cholesterol transport pathways // *Lipid Res.* – 2007. – Vol. 48 – P. 633-645.
435. Wang N., Lan D., Chen W., Matsuura F. and Tall A.R. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins // *PNAS* – 2004. – Vol. 101 – P. 9774-9779.
436. Weber C., Zernecke A., Libby P. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models // *Nat. Rev. Immunol.* – 2008. – Vol.8. – P.802–815.
437. Weber C., Zernecke A., Libby P. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: Lessons from mouse models // *Nat Rev Immunol.* – 2008. – Vol. 8. – P. 802-815.
438. Weyand C.M., Younge B.R., Goronzy J.J. T cells in arteritis and atherosclerosis // *Curr Opin Lipidol.* – 2008. – Vol. 19. – P. 469-477.
439. Wick G., Knoflach M., Xu Q. Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis // *Annu. Rev. Immunol.* – 2004. – Vol.22. P.361–403.
440. Wick G., Knoflach M., Xu Q. Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis // *Annu. Rev. Immunol.* – 2004. – Vol. 22. – P. 361-403.
441. Wu F.C., von Eckardstein A. Androgens and coronary artery disease // *Endocr. Rev.*–2003.–V.24(2).–P.183-217.
442. Yaari A. Mobility of human red bld cells of different age groups in an electric field // *Blood.* – 1969. – Vol. 33. – P. 159-163.
443. Yamazaki S., Steinman R.M. Dendritic cells as controllers of antigen-specific Foxp3+ regulatory T cells // *Dermatol Sci.* – 2009. – Vol. 54. – P. 69-75.

444. Yamell J., Beswick A., Sweetnam P., Riad-Fahmy D. Endogenous sex hormones and ischemic heart disease in men. The Caerphilly prospective study // *Arterioscler Thrombosis*. – 1993. – Vol. 13. – p. 517-520.
445. Yan Z.Q., Hansson G.K. Innate immunity, macrophage activation, and atherosclerosis // *Immunol Rev.* – 2007. – Vol. 219. – P. 187-203.
446. Yvan-Charvet L., Pagler T.A., Wang N., Senokuchi T., Brundert M., Li H., Rinninger F. and Tall A.R. SR-BI inhibits ABCG1-stimulated net cholesterol efflux from cells to plasma HDL // *Lipid Res.* – 2008. – Vol. 49 – P. 107-114.
447. Yvan-Charvet L., Welch C., Pagler T.A., et al. Increased inflammatory gene expression in ABC transporter-deficient macrophages: free cholesterol accumulation, increased signaling via toll-like receptors, and neutrophil infiltration of atherosclerotic lesions // *Circulation*. – 2008. – Vol. 118. – P. 1837-1847.
448. Zeigler M., Sury V., Bach G. The identification of lysosomal ganglioside sialidase in human cells // *Eur. J. Biochem.* – 1989. – Vol. 183. – P. 455-458.
449. Zhang H. Tissue and host tropism of influenza viruses: importance of quantitative analysis // *Sci. China. C. Life. Sci.* – 2009. – Vol. 52(12). – P. 1101-1110.
450. Zhang Z., Yamashita S., Hirano K., Nakagawa-Toyama Y., Matsuyama A., Nishida M., Sakai N., Fukasawa M., Arai H., Miyagawa J. and Matsuzawa Y. Expression of cholesteryl ester transfer protein in human atherosclerotic lesions and its implication in reverse cholesterol transport // *Atherosclerosis*. – 2001. – Vol. 159 – P. 67-75.

ПРИЛОЖЕНИЕ

ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ

на производство биологически активной добавки к пище:

«Средство, препятствующее атерогенной модификации ЛНП в крови»

1 Характеристика готового продукта

- Биологически активная добавка к пище «Средство, препятствующее атерогенной модификации ЛНП в крови»
- В качестве средства, препятствующего атерогенной модификации ЛНП в крови
- таблетка круглой формы со слегка шероховатой поверхностью бежевого цвета с желтоватым оттенком или капсула из пищевой желатины любого цвета
- упаковка производится в потребительскую тару из упаковочных материалов отечественного производства или получаемых по импорту и разрешенных для контакта с пищевыми продуктами органами Роспотребнадзора.
- Маркировка потребительской тары осуществляется согласно ГОСТ Р 51074-2003 и СанПиН 2.3.2.1290-03.
- Транспортируют Продукцию всеми видами транспорта, обеспечивающими сохранность тары и продукции в соответствии с ГОСТ 17768-90Е по правилам перевозки грузов, действующим на данном виде транспорта.
- Продукцию следует хранить в сухом, защищенном от света месте, при температуре не выше 25⁰С, недоступном для детей
- Срок годности: в упаковке изготовителя - 2 года с даты производства.

2 Характеристика сырья и материалов

Наименование	Обозначение НД	Сорт	Показатели, обязательные для проверки	Регламентируемые показатели с допустимыми отклонениями
Порошок корня солодки голой	ГОСТ 22839-88	По НД	Содержание глицирризиновой кислоты	не менее 6,0%
Лактоза моногидрат	ЕФ	По НД	Содержание лактозы	Не менее 99%
Стеарат кальция	ТУ 6-09-17-317-96	По ТУ	Содержание	99–100%
поливинилпирролидон низкомолекулярный медицинский	ФС 42-1194-78	По ФС	Содержание N-винилпирролидон	не более 0,2%

3 Изложение технологического процесса

3.1 Подготовка сырья

На весах электронных ВНМ-3/15 производим отвешивание компонентов (порошка солодки, лактозы, стеарат кальция, поливинилпирролидон низкомолекулярный медицинский), которые отвечают требованиям НД.

На 20 кг таблеток/капсул необходимо отвесить:

Загружено, наименование компонентов	Загружено, кг
Порошок корня солодки	11,43
Лактоза	7,16
Поливинилпирролидон	1,00
Стеарат кальция	0,41
ИТОГО	20

Порошок корня солодки предварительно измельчаем на универсальном измельчителе УИМ-2. Принцип действия измельчителя заключается в механическом измельчении сырья путем дробления его между вращающимися пальцами ротора и неподвижными пальцами крышки с последующей выгрузкой через лоток в мешок. Далее солодку просеиваем через универсальное сито. Просеянный порошок солодки загружают в смесители марки ОН 119А, после чего добавляют просеянные вспомогательные компоненты. Измельченные и просеянные компоненты загружаются в смеситель типа ОН 199А. Перемешиваемые компоненты загружают в дежу смесителя и включают привод. Смесь перемешивают в течение 2-х часов до получения гомогенной массы. Далее дежу наклоняют вращая рукоятку и смесь выгружают из дежи.

Полученную смесь перемалывают на роторной мельнице. Перемолотую смесь высыпаяем в сухую и чистую специальную ёмкость с плотно закрывающейся крышкой. Смесь подают на участок капсулирования или таблетирования.

3.2 Капсулирование

Капсулы готовятся с помощью автоматической установки для капсулирования марки DGM-800.

3.3 Маркировка

Маркировка потребительской тары осуществляется согласно ГОСТ Р 51074-2003 и СанПиН 2.3.2.1290-03.

4 Контроль качества

4.1. Отбор проб

Для проверки качества из партии отбирают среднюю пробу по ГОСТ 15113-77.

4.2. Внешние признаки определяют визуально, качество упаковки и массу нетто определяют по ГОСТ 15113-77.

4.3. Вкус оценивают сочетанием вкусовых ощущений, получаемых от исходного сырья, входящего в состав продукта, по ГОСТ 15113-77.

4.4. Запах определяют органолептически при комнатной температуре по ГОСТ 15113-77.

4.5. Цвет определяют при дневном освещении в белой фарфоровой чашке или лотке по ГОСТ 15113-77.

4.6. Содержание влаги определяется по ГОСТ 1936.

4.7. Содержание флавоноидов определяется по методам, изложенным в Р 4.1.1672-03.

4.8. Отбор проб для определения токсичных элементов проводят по ГОСТ 26929; определение содержания токсичных элементов проводится по ГОСТ 26927, ГОСТ 26930 - ГОСТ 26933, ГОСТ 269-32.

4.9. Пестициды (МУ 2142-80) и радионуклиды (МУК 2.6.1.1194-03) определяют по методам, утвержденным органами Роспотребнадзора.

4.10. Отбор проб для определения микробиологических показателей проводят по ГОСТ 26668; подготовку проб - по ГОСТ 26669; определение показателей - по ГОСТам: ГОСТ 10444.15-94, ГОСТ Р 50474-93, ГОСТ 30726-2001, ГОСТ Р 50480-93, ГОСТ 10444.12-88, ГОСТ 10444.8-88.

Паспорт качества и безопасности средства,
препятствующего атерогенной модификации ЛНП в крови

Наименование продукта	Средство, препятствующее атерогенной модификации ЛНП в крови
Дата выпуска	02.07. 2011 г.
Количество штук	57140
Масса нетто	20,0 кг
Условия хранения	Хранить в сухом, недоступном для детей месте при комнатной температуре (не выше 25 ⁰ С)
Срок годности	2 года

№ П/п	Наименование показателя	Норма	Результаты испытаний
1	2	3	4
1	Внешний вид	Таблетка со слегка шероховатой поверхностью	Соответствует
2	Цвет	Бежевый с желтоватым оттенком	Соответствует
3	Запах и вкус	Свойственный корню солодки, сладковатый, не допускается запах плесени и затхлости	Соответствует
4	Средний вес таблетки, г	0,35 ± 0,035	0,35
5	Влага, %, не более	9,0	5,3
6	Содержание глицирризиновой кислоты, %, не менее	6,0	9,8
7	КМАФАнМ, КОЕ/г не более	1,0·10 ⁴	1,6·10 ²
8	БГКП (колиформы) в 0,1г	не допускаются	Не обнаружено

1	2	3	4
9	E. coli, в 1,0 г	не допускаются	Не обнаружено
10	S. aureus в 1,0 г	не допускаются	Не обнаружено
11	Патогенные, в т. ч. сальмонеллы в 10,0 г	не допускаются	Не обнаружено
12	Дрожжи/ плесени КОЕ/г, не более	100/100	Не обнаружено
13	V. cereus, КОЕ/г, не более	200	Не обнаружено
14	Содержание свинца, мг/кг не более	6,0	Менее 1,0
15	Содержание кадмия, мг/кг не более	1,0	Менее 0,3
16	Содержание мышьяка, мг/кг не более	0,5	Менее 0,02
17	Содержание ртути, мг/кг не более	0,1	Менее 0,003
18	Содержание пестицидов, мг/кг не более:		
	ГХЦГ (сумма изомеров) ДДТ и его метаболиты	0,1 0,1	Менее 0,005 Менее 0,005
19	Гептахлор	0,002	Не обнаружено
20	Алдрин	0,002	Не обнаружено

Заключение: Соответствует НД

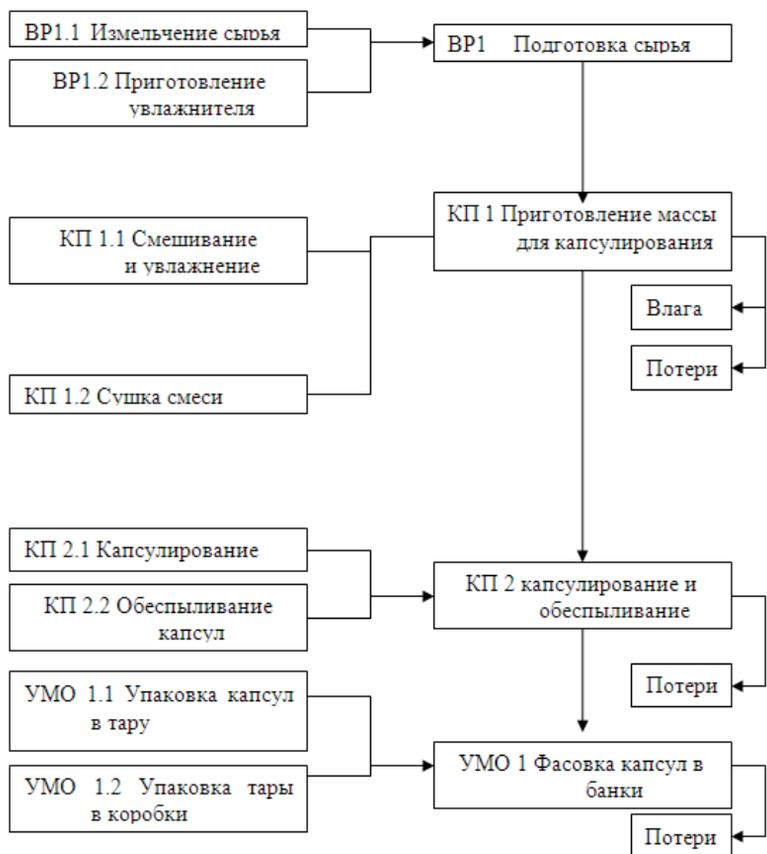
ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ

на производство биологически активной добавки к пище:
«Антиатеросклеротическое средство, обогащенное фитоэстрогенами,
предназначенное для женщин после менопаузы»

1 Характеристика готового продукта

- Биологически активная добавка к пище: «Антиатеросклеротическое средство, обогащенное фитоэстрогенами, предназначенное для женщин после менопаузы»
- В качестве антиатеросклеротического средства, обогащенного фитоэстрогенами, предназначенного для женщин после менопаузы
 - капсула из пищевой желатины любого цвета
 - упаковка производится в потребительскую тару из упаковочных материалов отечественного производства или получаемых по импорту и разрешенных для контакта с пищевыми продуктами органами Роспотребнадзора.
- Маркировка потребительской тары осуществляется согласно ГОСТ Р 51074-2003 и СанПиН 2.3.2.1290-03.
- Транспортируют БАД всеми видами транспорта, обеспечивающими сохранность тары и продукции в соответствии с ГОСТ 17768-90Е по правилам перевозки грузов, действующим на данном виде транспорта.
- Продукцию следует хранить в сухом, защищенном от света месте, при температуре не выше 25⁰С, недоступном для детей
- Срок годности: в упаковке изготовителя - 2 года с даты производства.

2 Технологическая схема производства



3 Характеристика сырья и материалов

Наименование	Обозначение НД	Сорт	Показатели, обязательные для проверки	Регламентируемые показатели с допустимыми отклонениями
1	2	3	4	5
Шишки хмеля обыкновенного	ГОСТ 21948-76	По ГОСТ	Содержание золы в пересчете на сухое вещество)	%, не менее 14,0
Чай зеленый байховый	СЭЗ №78.01.01.919.П.0 17008.09.08	По НД	Содержание кофеина	не менее 50 %
Чеснок гранулированный сушеный	СЭЗ №78.01.01.916.П.0 02588.02.10	По НД	Содержание аллицина	не менее 90%
Экстракт виноградных косточек	ТУ 9176-011-15197089-04	По ТУ	Массовая доля полифенолов, в пересчете на галловую кислоту Массовая доля проантоцианидинов	95%, не менее 25%, не менее
Витамин С (аскорбиновая кислота)	ФС 42-2668-95	По ФС	Содержание Органические примеси. Сульфатная зола	Не менее 99,0% К 0,1 г препарата прибавляют 2 мл концентрированной серной кислоты и оставляют на 30 минут. Окраска раствора не должна превышать окраску эталона № 56, разведенного в 2 раза

1	2	3	4	5
			Тяжелые металлы	Сульфатная зола из 0,5 г препарата не должна превышать 0,1% не более 0,001 % в препарате
Бета-каротин	ТУ 9291-077-54655660-02	По ТУ	Массовая доля бета-каротина	не менее 90 %
Витамин Е (альфа-токоферол)	Европейская фармокопея	По ЕФ	Содержание dl-альфа токоферола	не менее 50 %
Кислота стеариновая	ГОСТ 9419-78	По НД	Массовая доля стеариновой кислоты	99%, н/м
Поливинилпирролидон низкомолекулярный медицинский	ФС 42-1194-78	По ФС	Содержание N-винилпирролидон	не более 0,2%

4 Изложение технологического процесса

4.1 Подготовка сырья

Составные компоненты со склада предприятия перемещают в помещение растаривания производственного цеха, откуда оно передается в отделение подготовки сырья и массы для наполнения капсул.

На весах электронных ВНМ-3/15 производим отвешивание компонентов (шишки хмеля, чай зеленый, чеснок гранулированный, экстракт виноградной косточки, бета-каротин, витамин С, витамин Е, стеариновая кислота, поливинилпирролидон низкомолекулярный медицинский), которые отвечают требованиям НД.

На 20 кг необходимо отвесить:

Загружено, наименование компонентов	Загружено, кг
Шишки хмеля обыкновенного	6,79
Чай зеленый байховый листовой	4,88
Чеснок гранулированный сушеный	4,25
Экстракт виноградной косточки	1,70
Бета-каротин	0,02
Витамин С	1,27
Витамин Е (50%)	0,28
Стеариновая кислота	0,53
Поливинилпирролидон	0,28
ИТОГО	20

Шишки хмеля и чай зеленый предварительно измельчаем на универсальном измельчителе УИМ-2. Принцип действия измельчителя заключается в механическом измельчении сырья путем дробления его между вращающимися пальцами ротора и неподвижными пальцами крышки с последующей выгрузкой через лоток в мешок. Далее эти компоненты по отдельности просеиваем через универсальное сито. Измельченные и просеянные шишки хмеля, чай зеленый, чеснок гранулированный, экстракт виноградной косточки, бета-каротин, витамин С, витамин Е, стеариновая кислота, поливинилпирролидон низкомолекулярный медицинский загружаются в смеситель марки ОН 199А. Перемешиваемые компоненты загружают в дежу смесителя и включают привод. Далее все перемешивают в течении 4-х часов до получения гомогенной массы. При этом происходит досушка смеси. Затем дежу наклоняют вращая рукоятку и смесь выгружают из дежи.

По истечении времени перемешивания мешалку отключают, полученную смесь выгружают в сухую и чистую специальную ёмкость с

плотно закрывающейся крышкой. Смесь подают на участок капсулирования.

4.2 Капсулирование

Капсулы готовятся с помощью автоматической установки для капсулирования марки DGM-800 (рис. 1).

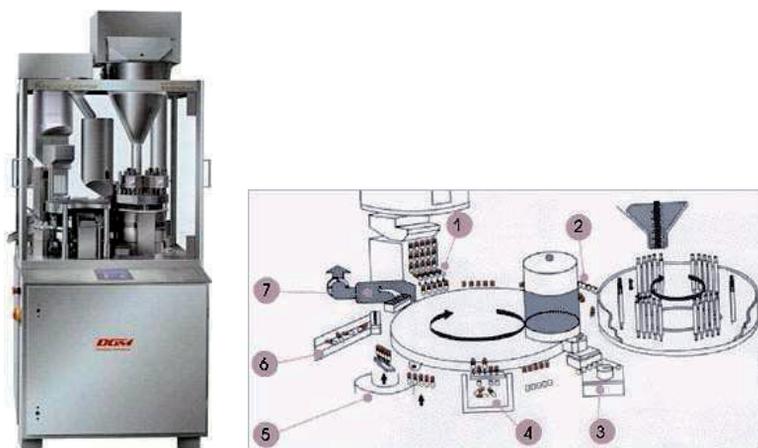


Рисунок 1

4.3 Маркировка

Маркировка потребительской тары осуществляется согласно ГОСТ Р 51074-2003 и СанПиН 2.3.2.1290-03.

Информация о БАД должна содержать:

- наименования БАД, и в частности:
- товарный знак изготовителя (при наличии);
- обозначения нормативной или технической документации, обязательным требованием которых должны соответствовать БАД;
- состав БАД, с указанием ингредиентного состава в порядке, соответствующем их убыванию в весовом или процентном выражении;

- сведения об основных потребительских свойствах БАД;
- сведения о весе или объеме БАД в единице потребительской упаковки и весе или объеме единицы продукта;
- сведения о противопоказаниях для применения при отдельных видах заболеваний;
- указание, что БАД не является лекарством;
- дата изготовления, гарантийный срок годности или дата конечного срока реализации продукции;
- условия хранения;
- информация о государственной регистрации БАД с указанием номера и даты;
- место нахождения, наименование изготовителя (продавца) и место нахождения и телефон организации, уполномоченной изготовителем (продавцом) на принятие претензий от потребителей.

5 Контроль качества

5.1 Отбор проб

Для проверки качества от каждой партии отбирают среднюю пробу по ГОСТ 27668.

5.2. Внешние признаки определяют визуально, качество упаковки и массу нетто определяют по ГОСТ 28539.

5.3. Вкус оценивают сочетанием вкусовых ощущений, получаемых от исходного сырья, входящего в состав продукта, по ГОСТ 27558.

5.4. Запах определяют органолептически при комнатной температуре по ГОСТ 27558.

5.5. Цвет определяют при дневном освещении в белой фарфоровой чашке или лотке по ГОСТ 27558.

5.6. Содержание влаги определяется по ГОСТ 1936.

5.7. Содержание витаминов определяется по ГОСТам 30697.2, 30697.3, ТУ 9353-014-05766117-97.

5.8. Отбор проб для определения токсичных элементов проводят по ГОСТ 26929; определение содержания токсичных элементов проводится по ГОСТ 26927, ГОСТ 26930 - ГОСТ 26933.

5.9. Пестициды и радионуклиды определяют по методам, утвержденным органами Роспотребнадзора.

5.10. Отбор проб для определения микробиологических показателей проводят по ГОСТ 26668; подготовку проб - по ГОСТ 26669; определение показателей - по ГОСТам, перечисленным в табл. 3.

5.11. Пестициды (МУ 2142-80) и радионуклиды (МУК 2.6.1.1194-03) определяют по методам, утвержденным органами Роспотребнадзора.

5.12 Отбор проб для определения микробиологических показателей проводят по ГОСТ 26668; подготовку проб - по ГОСТ 26669; определение показателей - по ГОСТам: ГОСТ 10444.15-94, ГОСТ Р 50474-93, ГОСТ 30726-2001, ГОСТ Р 50480-93, ГОСТ 10444.12-88, ГОСТ 10444.8-88.

Паспорт качества и безопасности антиатеросклеротического средства,
 обогащенного фитоэстрогенами, предназначенного для женщин после
 менопаузы

Наименование продукта	Антиатеросклеротическое средство, обогащенное фитоэстрогенами, предназначенное для женщин после менопаузы
Дата выпуска	01.07.2011 г
Количество штук	22140
Масса нетто	10,0 кг
Условия хранения	Хранить в сухом, защищенном от света, и недоступном для детей месте при температуре не выше 25°C
Срок годности	2 года

№ П/п	Наименование показателя	Норма	Результаты испытаний
1	2	3	4
1	Внешний вид	Капсула из пищевой желатины	Соответствует
2	Цвет	Желтый	Соответствует
3	Запах и вкус	Отсутствует	Соответствует
4	Средняя масса, г	0,471+/-0,05	0,45
5	Влага, %, не более	9,0	7,7
6	Бета-каротин, мг/капс	1,0+/-0,10	1,05
7	Витамин С, мг/капс	20,0+/-2,0	21,0
8	Витамин Е, мг/капс	3,3+/-0,30	3,1
9	Аллицин, мг/капс	0,33+/-0,03	0,32
10	Полифенолы, мг/капс	18,0+/-1,8	19,0
11	Кмафам, КОЕ\ г, не более	$1,0 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^2$

1	2	3	4
12	БГКП (колиформы) в 0,1г	Не допускаются	Не обнаружены
13	E. Coli в 1.0 г	Не допускаются	Не обнаружены
14	S. Aureus в 1.0 г	Не допускаются	Не обнаружены
15	V. Cereus, КОЕ в 1,0 г , не более	200	Не обнаружены
16	Патогенные микроорганизмы, в т.ч. Сальмонеллы в 10 г	Не допускаются	Не обнаружены
17	Дрожжи, КОЕ\г	100	Не обнаружены
18	Плесень, КОЕ\г	100	Не обнаружены
19	Токсические элементы, мг/кг, не более: Свинец Кадмий Мышьяк Ртуть	6,0 1,0 0,5 0,1	Менее 1,0 Менее 0,3 Менее 0,2 Менее 0,03
20	Пестициды, мг/кг, не более: ГХЦГ(а,в,у –изомеры) ДДТ и его метаболиты	Не более 0,1 Не более 0,1	Менее 0,005 Менее 0,005
21	Гептахлор, мг/кг	Не допускается (менее 0,002)	Не обнаружено
22	Алдрин, мг/кг	Не допускается (менее 0,002)	Не обнаружено

Заключение: Соответствует НД.

Приложение В

ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ

на производство биологически активной добавки к пище:

«Средство, способствующего оттоку холестерина из клеток сосудистой стенки»

1 Характеристика готового продукта

- Биологически активная добавка к пище «Средство, способствующего оттоку холестерина из клеток сосудистой стенки»
- В качестве средства, способствующего оттоку холестерина из клеток сосудистой стенки
 - таблетка круглой формы с гладкой поверхностью бежевого цвета неоднородного окраса или капсула из пищевой желатины любого цвета
 - упаковка производится в потребительскую тару из упаковочных материалов отечественного производства или получаемых по импорту и разрешенных для контакта с пищевыми продуктами органами Роспотребнадзора.
 - Маркировка потребительской тары осуществляется согласно ГОСТ Р 51074-2003 и СанПиН 2.3.2.1290-03.
 - Транспортируют Продукцию всеми видами транспорта, обеспечивающими сохранность тары и продукции в соответствии с ГОСТ 17768-90Е по правилам перевозки грузов, действующим на данном виде транспорта.
 - Продукцию следует хранить в сухом, защищенном от света месте, при температуре не выше 25⁰С, недоступном для детей
 - Срок годности: в упаковке изготовителя - 2 года с даты производства.

2 Характеристика сырья и материалов

Наименование	Обозначение НД	Сорт	Показатели, обязательные для проверки	Регламентируемые показатели с допустимыми отклонениями
Лук сушеный	ГОСТ 7587-71	По НД	Содержание Аллицина	не менее 4 мг
Лактоза моногидрат	ЕФ	По НД	Содержание лактозы	Не менее 99%
Стеариновая кислота	ГОСТ 9419-78	По НД	Массовая доля стеариновой кислоты	99%, н/м
поливинилпирролидон низкомолекулярный медицинский	ФС 42-1194-78	По ФС	Содержание N-винилпирролидон	не более 0,2%

3. Изложение технологического процесса

3.1 Подготовка сырья

На весах электронных ВНМ-3/15 производим отвешивание компонентов (лук сушеный, лактозы, стеариновой кислоты, поливинилпирролидон низкомолекулярный медицинский), которые отвечают требованиям НД.

На 20 кг таблеток/капсул нам необходимо отвесить:

Загружено, наименование компонентов	Загружено, кг
Лук сушеный	13,63
Лактоза	4,14
Поливинилпирролидон	1,13
Стеариновая кислота	1,1
ИТОГО	20

Порошок лука сушеного предварительно измельчаем на универсальном измельчителе УИМ-2. Принцип действия измельчителя заключается в механическом измельчении сырья путем дробления его между вращающимися пальцами ротора и неподвижными пальцами крышки с последующей выгрузкой через лоток в мешок. Далее лук просеиваем через универсальное сито. Просеянный порошок лука загружают в смесители марки ОН 119А, после чего добавляют просеянные вспомогательные компоненты. Измельченные и просеянные компоненты загружаются в смеситель типа ОН 199А. Перемешиваемые компоненты загружают в дежу смесителя и включают привод. Смесь перемешивают в течение 2-х часов до получения гомогенной массы. Далее дежу наклоняют вращая рукоятку и смесь выгружают из дежи. Полученную смесь перемалывают на роторной мельнице. Перемолотую смесь высыпаем в сухую и чистую специальную ёмкость с плотно закрывающейся крышкой. Смесь подают на участок капсулирования или таблетирования.

3.2 Капсулирование

Капсулы готовятся с помощью автоматической установки для капсулирования марки DGM-800.

3.3 Таблетирование

Процесс таблетирования протекает в роторной таблеточной машине РТМ-41.

3.4 Маркировка

Маркировка потребительской тары осуществляется согласно ГОСТ Р 51074-2003 и СанПиН 2.3.2.1290-03.

Информация о БАД должна содержать:

- наименования БАД, и в частности:
- товарный знак изготовителя (при наличии);
- обозначения нормативной или технической документации, обязательным требованием которых должны соответствовать БАД;
- состав БАД, с указанием ингредиентного состава в порядке, соответствующем их убыванию в весовом или процентном выражении;
- сведения об основных потребительских свойствах БАД;

- сведения о весе или объеме БАД в единице потребительской упаковки и весе или объеме единицы продукта;
- сведения о противопоказаниях для применения при отдельных видах заболеваний;
- указание, что БАД не является лекарством;
- дата изготовления и срок годности;
- условия хранения;
- информация о государственной регистрации БАД с указанием номера и даты;
- место нахождения, наименование изготовителя (продавца) и место нахождения и телефон организации, уполномоченной изготовителем (продавцом) на принятие претензий от потребителей.

4 Контроль качества

4.1. Отбор проб

Для проверки качества из партии отбирают среднюю пробу по ГОСТ 15113-77.

4.2. Внешние признаки определяют визуально, качество упаковки и массу нетто определяют по ГОСТ 15113-77.

4.3. Вкус оценивают сочетанием вкусовых ощущений, получаемых от исходного сырья, входящего в состав продукта, по ГОСТ 15113-77.

4.4. Запах определяют органолептически при комнатной температуре по ГОСТ 15113-77.

4.5. Цвет определяют при дневном освещении в белой фарфоровой чашке или лотке по ГОСТ 15113-77.

4.6. Содержание влаги определяется по ГОСТ 1936.

4.7. Содержание флавоноидов определяется по методам, изложенным в Р 4.1.1672-03.

4.8. Отбор проб для определения токсичных элементов проводят по ГОСТ 26929; определение содержания токсичных элементов проводится по ГОСТ 26927, ГОСТ 26930 - ГОСТ 26933, ГОСТ 269-32.

4.9. Пестициды (МУ 2142-80) и радионуклиды (МУК 2.6.1.1194-03) определяют по методам, утвержденным органами Роспотребнадзора.

4.10. Отбор проб для определения микробиологических показателей проводят по ГОСТ 26668; подготовку проб - по ГОСТ 26669; определение показателей - по ГОСТам: ГОСТ 10444.15-94, ГОСТ Р 50474-93, ГОСТ 30726-2001, ГОСТ Р 50480-93, ГОСТ 10444.12-88, ГОСТ 10444.8-88.

Паспорт качества и безопасности средства, способствующего оттоку
холестерина из клеток сосудистой стенки

Наименование продукта	Средство, способствующее оттоку холестерина из клеток сосудистой стенки
Дата выпуска	05.07. 2011 г.
Количество штук	45450
Масса нетто	20,0 кг
Условия хранения	Хранить в сухом, недоступном для детей месте при комнатной температуре (не выше 25°C)
Срок годности	2 года

№ П/п	Наименование показателя	Норма	Результаты испытаний
1	2	3	4
1	Внешний вид	Таблетка с гладкой поверхностью	Соответствует
2	Цвет	Бежевый, неоднородный окрас	Соответствует
3	Запах и вкус	Свойственный луку, специфический, не допускается запах плесени и затхлости	Соответствует
4	Средний вес таблетки, г	0,44 ± 0,044	0,43
5	Влага, %, не более	9,0	5,3
6	КМАФАнМ, КОЕ/г не более	1,0·10 ⁴	1,6·10 ²
7	БГКП (колиформы) в 0,1 г	Не допускаются	Не обнаружено
8	E. coli, в 1,0 г	Не допускаются	Не обнаружено
9	S. aureus в 1,0 г	Не допускаются	Не обнаружено
10	Патогенные, в т. ч. сальмонеллы в 10,0 г	Не допускаются	Не обнаружено

1	2	3	4
11	Дрожжи/ плесени КОЕ/г, не более	100/100	Не обнаружено
12	<i>V. cereus</i> , КОЕ/г, не более	200	Не обнаружено
13	Содержание свинца, мг/кг не более	6,0	Менее 1,0
14	Содержание кадмия, мг/кг не более	1,0	Менее 0,3
15	Содержание мышьяка, мг/кг не более	0,5	Менее 0,02
16	Содержание ртути, мг/кг не более	0,1	Менее 0,003
17	Содержание пестицидов, мг/кг не более: ГХЦГ (сумма изомеров) ДДТ и его метаболиты	0,1 0,1	Менее 0,005 Менее 0,005
18	Гептахлор	0,002	Не обнаружено
19	Алдрин	0,002	Не обнаружено

Заключение: Соответствует НД

ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ

на производство биологически активной добавки к пище:

«Противовоспалительное антицитокиновое средство,
обладающее прямым антиатеросклеротическим действием»

1 Характеристика готового продукта

- Биологически активная добавка к пище «Противовоспалительное антицитокиновое средство, обладающее прямым антиатеросклеротическим действием»;
- в качестве противовоспалительного антицитокинового средства, обладающего прямым антиатеросклеротическим действием;
- таблетка круглой формы с шероховатой поверхностью зеленовато-коричневого цвета или капсула из пищевой желатины любого цвета;
- упаковка производится в потребительскую тару из упаковочных материалов отечественного производства или получаемых по импорту и разрешенных для контакта с пищевыми продуктами органами Роспотребнадзора.
- Маркировка потребительской тары осуществляется согласно ГОСТ Р 51074-2003 и СанПиН 2.3.2.1290-03.
- Транспортируют Продукцию всеми видами транспорта, обеспечивающими сохранность тары и продукции в соответствии с ГОСТ 17768-90Е по правилам перевозки грузов, действующим на данном виде транспорта.
- Продукцию следует хранить в сухом, защищенном от света месте, при температуре не выше 25⁰С, недоступном для детей

- Срок годности: в упаковке изготовителя – 2 года с даты производства.

2 Характеристика сырья и материалов

Наименование	Обозначение НД	Сорт	Показатели, обязательные для проверки	Регламентируемые показатели с допустимыми отклонениями
Цветки бузины черной	ГФ XI, вып.2, ст. 10	По ГФ	Содержание суммы флавоноидов (в пересчете на рутин), %, не менее 2,0	Не менее 2,0 %
Цветки календулы	ГФ XI, вып.2, ст. 5	По ГФ	Содержание экстрактивных веществ, извлекаемых 70% раствором этанола	Не менее 35%
Трава фиалки	ГФ XI, вып.2, ст. 62	По ГФ	Содержание экстрактивных веществ, извлекаемых водой	Не менее 30%
Кислота стеариновая	ГОСТ 9419-78	По ГОС Т	Массовая доля стеариновой кислоты	99%,н/м
Стеарат кальция	ТУ 6-09-17-317-96	По ТУ	Содержание	99–100%
Поливинилпирролидон низкомолекулярный медицинский	ФС 42-1194-78	По ФС	Содержание N-винилпирролидон	Не более 0,2%

3 Изложение технологического процесса

3.1 Подготовка сырья

На весах электронных ВМ-3/15 производим отвешивание компонентов (цветки бузины, цветки календулы, трава фиалки, стеариновая кислота, стеарат кальция, поливинилпирролидон низкомолекулярный медицинский), которые отвечают требованиям НД.

На 20 кг таблеток необходимо отвесить:

Загружено, наименование компонентов	Загружено, кг
Цветки бузины черной	5,80
Цветки календулы	5,80
Трава фиалки	5,80
Стеариновая кислота	1,56
Стеарат кальция	0,24
Поливинилпирролидон низкомолекулярный медицинский	0,80
ИТОГО	20

Цветки бузины, календулы и траву фиалки предварительно измельчаем на универсальном измельчителе УИМ-2. Принцип действия измельчителя заключается в механическом измельчении сырья путем дробления его между вращающимися пальцами ротора и неподвижными пальцами крышки с последующей выгрузкой через лоток в мешок. Далее эти компоненты по отдельности просеиваем через универсальное сито. Измельченные и просеянные бузина, календула, фиалка, стеариновая кислота, стеарат кальция, поливинилпирролидон загружаются в смеситель типа ОН 199А. Перемешиваемые

компоненты загружают в дежу смесителя и включают привод. После перемешивания в течении нескольких минут смесь орашается водой и перемешивается в течении 40 минут, затем перемешивают еще 20 минут до получения гомогенной массы. Далее дежу наклоняют вращая рукоятку и смесь выгружают из дежи.

Полученную смесь перемалывают на роторной мельнице. Перемолотую смесь высыпаем в сухую и чистую специальную ёмкость с плотно закрывающейся крышкой. Смесь подают на участок капсулирования или таблетирования.

3.2 Таблетирование

Процесс таблетирования протекает в роторной таблеточной машине РТМ-41 (рис. 2).

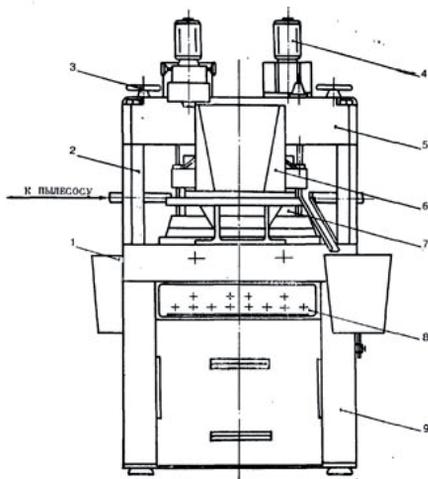


Рисунок 2

Принцип действия. При вращении ротора толкатели, с укрепленными на них пуансонами, проходят систему копиров, в профиле которых запрограммирован весь цикл технологического процесса от заполнения матрицы до выдачи готовой таблетки в приемную тару.

Материал из питающего бункера (6) поступает в питатель (4), в котором смонтирован ворошитель, вращающийся от индивидуального привода. При вращении ротора (7), матрицы, проходя под питателем (4), заполняются пресс-материалом на определенную глубину, которая задается положением нижних штоков, опирающихся на нижний копиер. Прессование происходит при прохождении верхних штоков и нижних роликов давления, при этом пуансоны уплотняют пресс-материал, находящийся в матрице. Таблетка формируется за один оборот ротора. Копир выталкивания доводит таблетку до верхнего уровня, а выталкиватель регулируется таким образом, чтобы таблетка выводилась из матрицы на поверхность стола, затем ротором таблетка подводится к ножу, который направляет ее на лоток и далее в приемную тару.

3.3 Маркировка

Маркировка потребительской тары осуществляется согласно ГОСТ Р 51074-2003 и СанПиН 2.3.2.1290-03. Транспортная маркировка осуществляется по ГОСТ 14192-96 или ГОСТ 24508-80.

4 Контроль качества.

4.1. Отбор проб

Для проверки качества из партии отбирают среднюю пробу по ГОСТ 15113-77.

4.2 Внешние признаки определяют визуально, качество упаковки и массу нетто определяют по ГОСТ 15113-77.

4.3 Вкус оценивают сочетанием вкусовых ощущений, получаемых от исходного сырья, входящего в состав продукта, по ГОСТ 15113-77.

4.4 Запах определяют органолептически при комнатной температуре по ГОСТ 15113-77.

4.5 Цвет определяют при дневном освещении в белой фарфоровой чашке или лотке по ГОСТ 15113-77.

4.6 Содержание влаги определяется по ГОСТ 1936.

4.7 Содержание флавоноидов определяется по методам, изложенным в Р 4.1.1672-03.

4.8 Отбор проб для определения токсичных элементов проводят по ГОСТ 26929; определение содержания токсичных элементов проводится по ГОСТ 26927, ГОСТ 26930 - ГОСТ 26933, ГОСТ 269-32.

4.9 Пестициды (МУ 2142-80) и радионуклиды (МУК 2.6.1.1194-03) определяют по методам, утвержденным органами Роспотребнадзора.

4.10 Отбор проб для определения микробиологических показателей проводят по ГОСТ 26668; подготовку проб - по ГОСТ 26669; определение показателей - по ГОСТам: ГОСТ 10444.15-94, ГОСТ Р 50474-93, ГОСТ 30726-2001, ГОСТ Р 50480-93, ГОСТ 10444.12-88, ГОСТ 10444.8-88.

Паспорт качества и безопасности противовоспалительного антицитокинового средства, обладающего прямым антиатеросклеротическим действием

Наименование продукта	Противовосполительное антицитокинового средство, обладающее прямым антиатеросклеротическим действием
Дата выпуска	07.07.2011 г.
Количество штук	54000
Масса нетто	27,0 кг
Условия хранения	При комнатной температуре в сухом, недоступном для детей месте
Срок годности	2 года

№ П/п	Наименование показателя	Норма	Результаты испытаний
1	2	3	4
1	Внешний вид	Таблетка круглой формы с шероховатой поверхностью	Соответствует
2	Цвет	Зеленовато-коричневый	Соответствует
3	Запах и вкус	Не допускается запах плесени и затхлости, специфический, свойственный растениям	Соответствует
4	Средний вес таблетки, г	$0,50 \pm 0,05$	0,48
5	Флавоноиды (в пересчете на рутин), мг на табл./капс., не менее	4,0	4,8
6	КМАФАнМ, КОЕ\ г, не более	$1,0 \cdot 10^4$	$2,4 \cdot 10^1$

1	2	3	4
7	БГКП (колиформы) в 0,1г	Не допускаются	Не обнаружены
8	E. Coli в 1 г	Не допускаются	Не обнаружены
9	S. aureus в 1 г	Не допускаются	Не обнаружены
10	V. cereus (КОЕ\ г, не более)	200	Не обнаружено
11	Патогенные, в т.ч. сальмонеллы, в 10,0 г	Не допускаются	Не обнаружены
12	Дрожжевые, плесневые грибы (КОЕ\ г, не более)	100/100	Не обнаружены
13	Влага, %, не более	9,0	6,1
14	Свинец	6,0	Менее 0,001
15	Кадмий	1,0	Менее 0,001
16	Мышьяк	0,5	Менее 0,002
17	Ртуть	0,1	Менее 0,0001
18	а, г-ГХЦГ, мг/кг	Не более 0,1	Менее 0,001
19	ДДТ, мг/кг	Не более 0,1	Менее 0,001

Заключение: Соответствует НД.

**Рекомендации и предложения по использованию результатов,
проведенных НИР в реальном секторе экономики**

А) Основанием для проведения НИР, выполняемой в рамках федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы», является Государственный контракт от 14.02. 2011г. №16.512.11.2021. В результате проведения НИР были разработаны и созданы рецептуры, лабораторные регламенты и технические задания для проведения последующих ОТР для постановки на производство следующих биологически активных добавок к пище: антиатеросклеротическое средство, обогащенное фитоэстрогенами, предназначенное для женщин после менопаузы; противовоспалительное антицитокиновое средство, обладающее прямым антиатеросклеротическим действием; средство, препятствующее атерогенной модификации ЛНП в крови; средство, способствующее оттоку холестерина из клеток сосудистой стенки.

Б) Рекомендуется поставить на производство биологически активные добавки на основе разработанных средств: антиатеросклеротическое средство, обогащенное фитоэстрогенами, предназначенное для женщин после менопаузы; противовоспалительное антицитокиновое средство, обладающее прямым антиатеросклеротическим действием; средство, препятствующее атерогенной модификации ЛНП в крови; средство, способствующее оттоку холестерина из клеток сосудистой стенки.

В) Исполнитель организационно связан с производственной компанией ООО «ИНАТ-Фарма», специализирующейся в разработке, регистрации и производстве биологически активных добавок к пище и других нелекарственных оздоровительных продуктов. Благодаря тому, что исполнитель и ООО «ИНАТ-Фарма» имеют одних учредителей, ООО «ИНАТ-Фарма» фактически является производственной структурой научно-производственного объединения, включающего, в частности, исполнителя и ООО «ИНАТ-Фарма». В соответствии со сложившейся практикой все разработки исполнителя передаются для дальнейшей коммерциализации компании ООО «ИНАТ-Фарма». Технологи компании принимали участие в выполнении настоящего проекта. Полученные продукты: рецептуры, регламенты, и технические задания на проведение последующих ОТК разрабатывались с учетом возможностей и потребностей компании и будут использованы компанией ООО «ИНАТ-Фарма» для дальнейшей коммерциализации.



MoreBooks!
publishing



yes i want morebooks!

Покупайте Ваши книги быстро и без посредников он-лайн – в одном из самых быстрорастущих книжных он-лайн магазинов! окружающей среде благодаря технологии Печати-на-Заказ.

Покупайте Ваши книги на
www.more-books.ru

Buy your books fast and straightforward online - at one of world's fastest growing online book stores! Environmentally sound due to Print-on-Demand technologies.

Buy your books online at
www.get-morebooks.com



VDM Verlagsservicegesellschaft mbH

Heinrich-Böcking-Str. 6-8
D - 66121 Saarbrücken

Telefon: +49 681 3720 174
Telefax: +49 681 3720 1749

info@vdm-vsg.de
www.vdm-vsg.de

