

Статті

УДК 616.13-004.6:616.153.922-008.61

В.В.Братусь, А.С.Гавриш, И.М.Исаечкина

**Роль гиперхолестеринемии
в генезе атеросклероза**

З метою вивчення патогенетичного значення гіперхолестеринемії (ГХЕ) в розвитку атеросклерозу в роботі досліджені морфофункціональні особливості стінки судин з різних відділів судинної системи при різній тривалості утримання тварин на атерогеній дієті. Встановлено, що навіть короткочасна дія ГХЕ призводить до істотного порушення реактивності судин, що проявляється у значному пригніченні вазомоторної активності ендотелію на тлі тенденції до посилення чутливості гладеньких м'язів до констрикторних впливів. Ці зрушення якісно однорідні та близькі кількісно в судинних сегментах всіх досліджених відділів, включаючи і венозний. При значному збільшенні тривалості дії ГХЕ спостерігається поглиблення вказаних змін, але вони зберігають генералізований характер. Електронно-мікроскопічні дослідження підтвердили переважне порушення структури ендотелію на ранніх етапах дії ГХЕ і генералізований його характер. Отримані результати дозволили зробити висновок, що сама ГХЕ не може відтворити всю характерну картину атеросклеротичного пошкодження судинної системи, і це свідчить про істотне значення неліпідних факторів в його патогенезі.

Введение

Вопрос о роли гиперхолестеринемии (ГХЕ) как ведущего фактора атеросклероза остается спорным и в настоящее время. В соответствии с классическими представлениями, повышение уровня липопротеидов крови приводит к возрастанию проницаемости сосудистой стенки, накоплению в ней липидов, что и является начальным этапом атеросклеротического процесса.

Однако в последние годы положение о ведущей патогенетической роли ГХЕ в развитии атеросклероза было серьезно поколеблено рядом фундаментальных исследований. Показано, что ГХЕ вызывает типичное поражение только при наличии предшествующих структурных изменений в сосудистой стенке, локализация которых и определяет характерную топографию атеросклеротического процесса [1, 2]. Поэтому в противовес липидному фактору атеросклероза на первое место выдвигается сосудистый фактор, т.е. особая форма структурных изменений в сосудистой стенке, которые в условиях ГХЕ предрасполагают к локальному отложению липидов и развитию типичных атеросклеротических бляшек [6]. Поскольку в условиях ГХЕ повреждающее действие липидов на сосудистую стенку по своей ин-

тенсивности практически одинаково во всех отделах сосудистого русла [10], то характерная локализация атероматозных бляшек должна свидетельствовать о различной уязвимости эндотелия в определенных зонах [9]. Действительно, в ряде морфологических исследований показано, что в местах значительных изменений характера потока крови (разветвление или искривление сосуда, значительное сужение просвета) даже в нормальных условиях наблюдается значительно более высокая проницаемость эндотелия. Если эти условия существуют продолжительное время, то они могут приобретать значение фактора, который в сочетании с ГХЕ определяет само развитие поражения и характерную его топографию [3].

Для решения вопроса о роли ГХЕ как фактора атеросклеротического процесса в проведенной работе исследовали особенности структуры и функциональных свойств сосудистых сегментов, изолированных из различных отделов сосудистой системы, на разных этапах развития экспериментального атеросклероза.

Методика

Исследования проведены на кроликах породы шиншилла 4 групп, из которых одна была контрольной, а остальные — с различными (2,4 и 8 мес) сроками пребывания на атерогенной диете (0,3 г холестерина на 1 кг массы ежедневно). Содержание общего холестерина в сыворотке крови определяли методом Илька в исходном состоянии, а также непосредственно перед забоем животных.

Объектом функциональных исследований служили изолированные кольцевые сегменты грудного и брюшного отделов аорты, сонной артерии и задней полый вены. Их реактивность оценивали по способности реагировать на различные тестирующие воздействия, реализующие свой эффект прямым воздействием на гладкомышечные клетки (ГМК) и опосредованно через эндотелий. С помощью гиперкалиевого раствора (KCl, 60 моль/л) определяли чувствительность сократительного аппарата ГМК к кальциевой активации; реакции на норадреналин (НА, 1 мкмоль/л) позволяли оценивать адренореактивность ГМК. Способность сосудистых полосок к расслаблению определяли, применяя прямой дилататор нитроглицерин (НГ, 1 мкмоль/л), а функциональные возможности эндотелиоцитов (ЭЦ) и их способность модулировать сосудистый тонус оценивали с помощью ацетилхолина (АХ, 1 мкмоль/л). Исходное предсокращение сегментов, необходимое для осуществления дилататорных реакций, воспроизводили с помощью фенилэфрина (ФЭ, 1 мкмоль/л).

Сократительную активность изолированных сосудистых сегментов регистрировали в изометрическом режиме с помощью механотронов типа 6МХЗС. Полученные результаты обрабатывали статистически на ПЭВМ модели РС 1640 SD с использованием критерия *t* Стьюдента.

Морфологические исследования проводили на светооптическом и электронно-микроскопическом уровнях. Гистологические срезы свежесамороженной и заключенной в парафиновые блоки ткани окрашивали суданами II и IV, гематоксилином и эозином, по Ван Гизону. Для электронной микроскопии образцы фиксировали в растворах 4 %-ного параформа или 2,5 %-ного глутаральдегида при pH 7,2, дофиксировали в 1 %-ном растворе OsO₄, обезвоживали и заключали в эпоксидные смолы по стандартной прописи. Ультратонкие срезы получали на приборе LKB-8800 (Швеция), контрастировали солями тяжелых металлов и исследовали в микроскопе ЭМ 125.

Електронно-гистохимически определяли концентрацию и распределение некомпенсированных отрицательных зарядов гликозаминогликанов в гликокалексе эндотелиоцитов сосудистой стенки.

Результаты и их обсуждение

Полученные результаты свидетельствуют о развитии выраженной ГХЕ уже на ранних этапах содержания кроликов на атерогенной диете. К концу 2-го месяца концентрация холестерина в крови превышала исходную примерно в 8 раз и достигала $20,0 \text{ ммоль/л} \pm 0,8 \text{ ммоль/л}$ ($P < 0,001$). Это сочеталось с начальными изменениями реактивности сосудистых полосок: отмечалась тенденция к нарастанию реакций на тонические воздействия (КСІ и НА) и, особенно, к угнетению прямых и эндотелийзависимых дилататорных влияний, выраженная примерно в равной мере в сегментах всех исследованных областей.

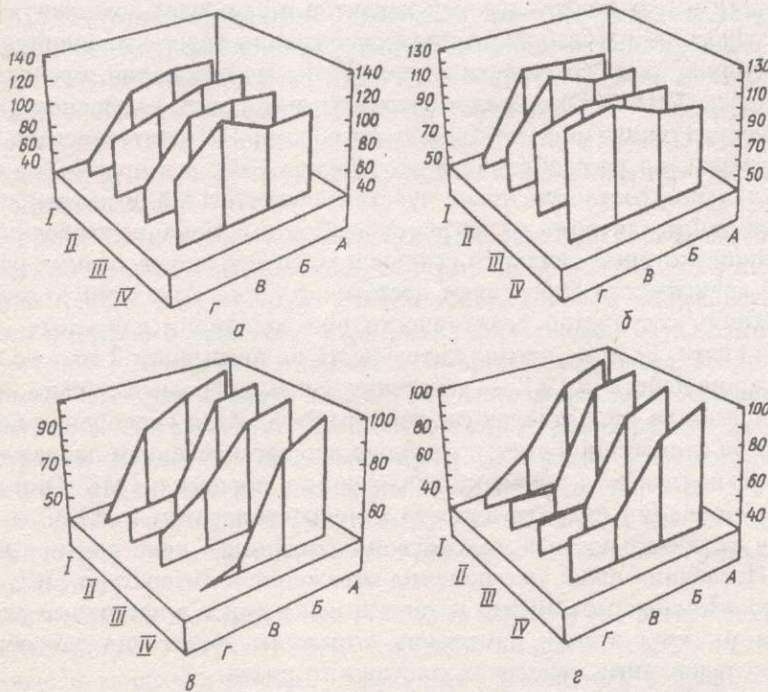
При увеличении продолжительности содержания животных на атерогенной диете до 4 мес концентрация общего холестерина крови еще повысилась (до 30 ммоль/л), а изменения сосудистой реактивности существенно прогрессировали. Устойчиво сохранялась тенденция к возрастанию сократительных ответов на прямые и рецепторопосредованные тонические влияния, причем она была существенно более выражена в венозных сегментах. Наиболее выраженные и достоверные изменения отмечались в способности сосудистых сегментов к расслаблению, более отчетливые — со стороны эндотелийзависимой дилатации на АХ и несколько менее выраженные — при прямом расслабляющем действии НГ на ГМК. Характерно, что мера угнетения реакций была практически равной в сегментах всех исследованных сосудистых областей: расслабление на АХ уменьшалось в среднем на 56 % в грудном и на 45 % — в брюшном отделах аорты, на 48 % — в сонной артерии и на 55 % — в задней полой вене. Несколько менее выражено, хотя также закономерно, угнеталась дилататорная реакция артериальных сегментов на НГ — на 20 % в грудном, на 43 % — в брюшном отделах аорты и на 30 % — в сонной артерии. Более отчетливое угнетение реакции на НГ отмечалось в задней полой вене, достигая в среднем 56 %.

К концу 8-го месяца содержания кроликов на атерогенной диете концентрация общего холестерина крови удерживалась высокой (34 ммоль/л), а изменения функциональных свойств сосудистой стенки продолжали нарастать. В артериальных отделах сосудистого русла отмечалось выраженное и достоверное угнетение констрикторных реакций на НА и гиперкалиевый раствор; более выраженные ответы сохранялись в венозных сегментах. Резко и количественно близко во всех изученных сегментах угнетались эндотелийзависимые и прямые дилататорные реакции. Так, реакция на АХ была уменьшена на 62 % в грудной и на 52 % — в брюшной аорте, на 52 % — в сонной артерии и на 46 % — в задней полой вене, реакция на НГ была ослаблена на 60 и 47 % в грудном и брюшном отделах аорты соответственно, на 45 % — в сонной артерии и на 60 % — в задней полой вене.

Каким же образом на основании полученных результатов можно представить характер и динамику поражения различных компонентов сосудистой стенки разных отделов сосудистого русла в условиях тяжелой ГХЕ? Установлено, что повышение концентрации липопротеидов в крови неизбежно сопровождается увеличением времени их полувыведения. В результате возрастания продолжительности контакта липопротеидов с клеточными элементами, обладающими выраженной оксидантной активностью (эн-

дотелиоциты, макрофаги, нейтрофилы), возникают модифицированные формы липопротеидов, обладающие рядом особых свойств, в том числе и выраженным цитотоксическим действием. Этому способствует также снижение антиоксидантной активности плазмы прежде всего за счет уменьшения содержания токоферола в липопротеидах низкой и высокой плотности (ЛНП и ЛВП соответственно) [7]. Однако в настоящее время пока еще неясно, возникает ли данный эффект непосредственно в крови или же начинается с момента проникновения ДНП в сосудистую стенку.

Одним из наиболее ранних ультраструктурных признаков повреждения ЭЦ в условиях ГХЕ является возрастание количества микропиноцитозных пузырьков и липидных капель, свидетельствующих о возрастании трансэндотелиального переноса ДНП. Характерно, что эти изменения наблюдаются практически во всех отделах сосудистого русла и не ограничиваются областями, типичными для развития атеросклеротического поражения [10]. В проведенных нами исследованиях ГХЕ также приводила к появлению выраженных генерализованных нарушений функциональных свойств эндотелия, начиная с грудной аорты и заканчивая задней полую веной, причем эти изменения во всех изученных сегментах имели количественно сопоставимый характер при продолжительности ГХЕ 2, 4 и 8 мес (рисунок, а, б, в, г).



Характер изменений реактивности сегментов различных отделов сосудистого русла при тестировании гиперкалиевым раствором (а), норадреналином (б), нитроглицерином (в) и ацетилхолином (г) при гиперхолестеринемии (ГХЕ) различной продолжительности:

А — животные контрольной группы, Б — животные с ГХЕ продолжительностью 2 мес, В — то же 4 мес, Г — то же 8 мес; I — сегменты грудной аорты, II — сегменты брюшной аорты, III — сегменты сонной артерии, IV — сегменты задней полую вены.

Несколько неожиданным было уменьшение выраженности эндотелийнезависимых дилататорных реакций, вызываемых нитроглицерином. Так, некоторыми авторами ранее было показано, что способность нитропрепаратов вызывать дилататорные реакции в условиях ГХЕ сохраняется в полном объеме [5]. Однако это противоречие имеет только видимый характер и может быть объяснено различной продолжительностью ГХЕ. Так, при содер-

жании животных на атерогенной диете в течение 2 мес на фоне достоверного ослабления эндотелийзависимых дилататорных реакций ответы на НГ сохранялись практически полностью. Только при увеличении продолжительности ГХЕ до 4 и, особенно, до 8 мес, когда преобладает действие не ГХЕ, а уже развивающихся нарушений в сосудистой стенке, ослабление реакций на АХ и НГ идет параллельно.

Природа нарушений в условиях ГХЕ дилататорных сосудистых реакций, медируемых эндотелием, в настоящее время привлекает внимание и относится к числу одного из важнейших вопросов патогенеза атеросклероза. Предполагается, что на ранних этапах развития процесса, пока в монослое ЭЦ не развиваются выраженные структурные изменения, причиной нарушения их способности высвобождать фактор расслабления является истощение клеточных запасов предшественника последнего — аминокислоты L-аргинина. Поэтому, если сосудистые полосы, изолированные от животных с выраженной ГХЕ, предварительно инкубировать со средой, содержащей L-аргинин, они в полном объеме восстанавливают свою способность расслабляться под действием АХ [10, 11].

Однако на более поздних этапах процесса, как показали проведенные нами ранее исследования, природа нарушений эндотелийзависимого расслабления имеет более сложный характер и включает возможную инактивацию фактора расслабления при прохождении через утолщенную интиму и снижение чувствительности к нему ГМК. Исследования, проведенные на кокультуре ГМК и ЭЦ, свидетельствуют о том, что в условиях активации перекисного окисления угнетается способность ЭЦ синтезировать и высвобождать фактор расслабления и способность ГМК реагировать на него [9]. Параллельно угнетается также чувствительность ГМК к нитропрепаратам, так как для реализации их эффекта необходимо наличие свободных тиоловых групп, которые являются основной мишенью для свободных радикалов.

Эти зависимости определяют достаточно четко выраженную этапность в изменениях сосудистой реактивности при содержании животных на атерогенной диете. Если ее продолжительность не превышает 2 мес, то основное проявление действия ГХЕ — угнетение функциональных свойств эндотелия практически во всех отделах сосудистого русла. При увеличении продолжительности атерогенной диеты, наряду с прогрессированием повреждения эндотелия, появляются признаки вовлечения в процесс и ГМК. Они проявляются в снижении их реактивности к нитропрепаратам и ЭЗФР и нарастанием чувствительности к кальциевой активации и констрикторным агонистам. Последний факт уже получил отражение в литературе [10], хотя его внутриклеточные механизмы остаются неясными и в настоящее время. Однако и на этих этапах изменения выражены достаточно однообразно во всех исследованных сегментах сосудистого русла.

Таким образом, исследования характера изменений функциональных свойств сосудистой стенки на различных этапах действия ГХЕ позволяют сделать заключение, что ее эффект имеет генерализованный характер и проявляется в качественно однородных и количественно близких изменениях реактивности сосудов разного калибра, включая и венозные. Ранее подобные данные были уже получены в отдельных исследованиях [12, 13].

Для проверки этого заключения мы провели сравнительное исследование особенностей ультраструктуры стенки аорты в проксимальном и дистальном отделах, резистивных сосудов и капилляров миокарда в конце 2-го месяца содержания животных на атерогенной диете.

Установлено, что основным проявлением развивающихся изменений бы-

ла характерная морфофункциональная перестройка эндотелиального моно-слоя, в основе которой лежало активирование пластических процессов, направленное, по-видимому, на адаптацию его клеток к новым условиям. Потребность в усилении внутриклеточной регенерации определялась ускоренным износом цитомембран и прежде всего цитолеммы вследствие активирования ПОЛ, а также ее прямыми потерями при микроклазматозе и в связи с ростом внутриклеточного катаболизма, осуществляемого с участием лизосомного аппарата ЭЦ.

Одним из наиболее ранних признаков повреждения эндотелиального моно-слоя в условиях ГХЕ являлось повышение его проницаемости за счет облегчения диффузионных трансмембранных процессов в ЭЦ и повышения проходимости межэндотелиальных стыков вплоть до образования течей. Существенная, хотя и несколько менее значима, роль в этом процессе принадлежала активации в ЭЦ везикулярного транспорта. В результате прогрессирования деструктивных изменений в отдельных ЭЦ наблюдались отек, фрагментация и гомогенизация цитомембран, лизис рибосом, грубо-лыбчатая конденсация либо вымывание хроматина из ядер, нередко сочетавшиеся с накоплением в клетке липидных включений и лизосом. Одним из проявлений процесса клеточной деградации была перестройка гликокаликса, в котором вследствие угнетения синтеза гликозаминогликанов уменьшалось количество некомпенсированных отрицательных зарядов, приводя к изменению гемостатических свойств сосудистой стенки. В редакцию, направленную на восстановление тканевого гомеостаза, вовлекались гистиоцитные и гематогенные элементы — ГМК, фибробласты, тромбоциты, моноциты, адгезирующие к эндотелию и проникающие в субэндотелиальное пространство.

На этапе атерогенеза, предшествующем манифестированным липосклеротическим изменениям, наиболее значимыми проявлениями в интиме аорты были: отек с разрушением ячеисто-фибрилярной инфраструктуры основного аморфного вещества: нарушение фильтрации и транспорта грубо-дисперстных компонентов плазмы и липопротеидов через образующийся макромолекулярный фильтр в более глубокие слои сосудистой стенки. Эти результаты свидетельствуют о системном характере морфофункциональной перестройки сосудистого эндотелия при ГХЕ с рядом стереотипных проявлений этой реакции вне зависимости от калибра сосуда. Вместе с тем, следует отметить несколько большую меру изменений ЭЦ восходящего отдела грудной аорты, что, по-видимому, обусловлено особенностями локальной гемодинамики.

Таким образом показано, что ГХЕ сама по себе, вне зависимости от продолжительности и выраженности, способна вызвать стереотипные функциональные и морфологические изменения в различных отделах сосудистой системы, и потому она не может рассматриваться как единственный фактор развития типичной картины атеросклероза. Это указывает на бесспорную значимость изменений в сосудистой стенке, которые обозначаются как «до-липидные» или «предатеросклеротические» и создают структурную основу для развития атеросклеротических бляшек.

V.V.Bratus, A.S.Gavrish, I.M.Isaechkina

THE ROLE OF HYPERCHOLESTEROLEMIA IN GENESIS OF ATHEROSCLEROSIS

The pathogenic role of hypercholesterolemia in the development of atherosclerosis was determined by investigation of the vessel's wall structural and functional peculiarities in rabbits, which were kept on atherogenic diet. It was evident, that even short duration of hypercholesterolemia led to significant disturbances of vascular reactivity, which manifested mainly in the inhibition of endothelial vasomotor activity against a background of the initial increase of smooth muscle sensitivity to contracting influences. These changes were almost the same in quality and magnitude in all the investigated sections of the vascular system including venous. After the prolonged periods of hypercholesterolemia these changes became much more pronounced but remained well spread through the whole system. The data of the electron microscopy confirmed both predominant disturbances of endothelial structure and their generalized character under the influence of hypercholesterolemia. These results indicate that hypercholesterolemia itself cannot create all the features of vascular atherosclerotic damage and that unlipid factors must be considered as not less important in its pathogenesis.

N.D.Strazhesko Ukrainian Research Institute of Cardiology,
Ministry of Public Health of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Вухерт А.М., Жданов В.С., Осис Ю.Г. Роль ритмических структур интимы аорты в развитии атеросклероза // *Терап. архив.* — 1988. — 60, № 12. — С. 7—12.
2. Нагорнев В.А., Денисенко А.Д. Современные представления о механизмах развития атеросклероза // *Патол. физиология и эксперим. терапия.* — 1989. — № 2. — С. 3—10.
3. Asakura T., Karino T. Flow patterns and spatial distribution of atherosclerotic lesions in human coronary arteries // *Circ. Res.* — 1990. — 66, № 4. — P. 1045—1066.
4. Betz E. Cell culture systems to study progression and inhibition of intimal proliferations // *Basic Res. Cardiol.* — 1991. — 86, № 2. — P. 79—86.
5. Bossaler C., Habib G.B., Yamamoto H. et al. Impaired muscarinic endothelium-dependent relaxation and cyclic guanosine 5-monophosphate formation in atherosclerotic human coronary artery and rabbit aorta // *J. Clin. Invest.* — 1987. — 79, № 1. — P. 170—174.
6. Campbell J.H., Tachas G., Black M.J. et al. Molecular biology of vascular hypertrophy // *Basic Res. Cardiol.* — 1991. — 86, suppl. 1. — P. 3—11.
7. Clevidence B.A., Ballard-Barbash R. Tocopherol contents of lipoproteins from frozen plasmas separated by affinity chromatography // *Lipids.* — 1991. — 26, № 9. — P. 723—728.
8. Galle J., Bassenge E., Busse R. Oxidized low density lipoproteins potentiate vasoconstrictions to various agonists by direct interaction with vascular smooth muscle // *Circ. Res.* — 1990. — 66, № 5. — P. 1287—1293.
9. Hansson G.K., Bondjers G. Endothelial dysfunction and injury in atherosclerosis // *Acta Med. Scand.* — Suppl. 715. — P. 11—17.
10. Kuo L., Davis M.J., Cannon M.S., Chilian W.M. Pathophysiological consequences of atherosclerosis extend into the coronary microcirculation // *Circ. Res.* — 1992. — 70, № 3. — P. 465—476.
11. Ma X.-L., Weirich S., Lefer A.M. Reversal of endothelial dysfunction by L-arginine in cat coronary arteries following myocardial ischemia-reperfusion injury // *J. Vasc. Res.* — 1992. — 29, № 2. — P. 164.
12. Motz W., Vogt M., Rabenau O. et al. Evidence of endothelial dysfunction in coronary resistance vessels in patients with angina pectoris and normal coronary angiograms // *Amer. J. Cardiol.* — 1991. — 68, № 10. — P. 996—1003.
13. Quillen J.E., Sellke F.W., Armstrong M.L., Harrison D.J. Long-term cholesterol feeding alters the reactivity of primate coronary microvessels to platelet products // *Arteriosclerosis and Thrombosis.* — 1991. — 11, № 3. — P. 639—644.

Укр. науч.-исслед. ин-т
кардиологии им. Н.Д.Стражеско
М-ва здравоохранения України, Киев

Матеріал поступив
в редакцію 10.06.93