

**ФАГОЦИТАРНАЯ АКТИВНОСТЬ И СПОСОБНОСТЬ К
ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВАЦИИ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ
КЛЕТОК ИНТИМЫ АОРТЫ ЧЕЛОВЕКА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

Хованцева У. С. ¹,

Матвеева Д. К. ¹,

Чакал Д. А. ¹,

Брешенков Д. Г. ¹,

Чарчян Э. Р. ¹

¹ ГНЦ РФ ФГБНУ Российский научный центр хирургии имени академика Б.
В. Петровского, Москва, Россия.

**PHAGOCYTIC ACTIVITY AND THE ABILITY TO
PROINFLAMMATORY ACTIVATION OF SMOOTH MUSCLE CELLS OF
THE TUNICA INTIMA OF HUMAN AORTA IN THE EXPERIMENT**

Khovantseva U. S.^a,
Matveeva D. K.^a,
Chakal D. A.^a,
Breshenkov D. G.^a,
Charchyan E. R.^a

^a Petrovsky National Research Center of Surgery, Moscow, Russia.

Резюме

Аорта представляет собой самый крупный кровеносный сосуд организма, который достигает в диаметре около 3 см и отвечает за транспортировку обогащённой кислородом артериальной крови от сердца к тканям и органам. Стенка аорты состоит из трёх оболочек: внутренней - *Tunica intima*, средней - *Tunica media* и наружной *Tunica adventitia*. Оболочки стенки аорты имеют разнообразный клеточный состав мезенхимального происхождения и включают в себя гладкомышечные клетки (ГМК), фибробласты, эндотелиальные клетки и др. Функциональные нарушения в клетках интимы аорты человека могут приводить к различным сердечно-сосудистым заболеваниям (ССЗ), например, аневризме и, как следствие, расслоению или разрыву грудной аорты. Ежегодно от расслоения и разрыва грудной аорты умирает более 150 тысяч человек по всему миру. Клеточные и молекулярные механизмы развития ССЗ остаются не до конца изученными, поэтому изучение функциональных особенностей различных клеточных популяций, входящих в состав аорты человека, является актуальной на сегодняшний день задачей.

Цель – оценить иммунный ответ, формируемый клетками, входящими в состав интимы аорты человека, в процессе фагоцитоза латексных частиц и интернализации липопroteинов низкой плотности (ЛПНП), для понимания их роли в патогенезе аневризмы.

Эксперименты проводили на ГМК, выделенных из интимы аорты пациентов с аневризмой. Фагоцитарную активность исследовали путём добавления к ГМК интимы латексных частиц, способность интернализировать ЛПНП оценивали с помощью красителя BDP 630/650 (Lumiprobe, Россия) и биохимического метода, оценку способности к про- и противовоспалительной активации изучали с помощью иммуноферментного анализа (ИФА).

Показано, что поглощение латексных частиц и ЛПНП стимулирует секрецию интерлейкинов гладкомышечными клетками, входящими в состав интимы аорты, а именно провоспалительных цитокинов IL-6 и IL-8. Таким образом, в условиях организма может происходить переключение фенотипа ГМК интимы аорты человека с сократительного на секреторный или макрофагоподобный, что говорит об участии данного фенотипического перехода клеток в процессе развития аневризмы.

Ключевые слова: Сердечно-сосудистые заболевания, аневризма, интима аорты человека, интерлейкины, липопroteины низкой плотности, иммуноферментный анализ, фагоцитарная активность, провоспалительная активация, латексные шары, гладкомышечные клетки.

Abstract

The aorta is the largest blood vessel in the body, which reaches a diameter of about 3 cm and is responsible for transporting oxygen-enriched arterial blood from the heart to tissues and organs. The aortic wall consists of three layers: the inner *Tunica intima*, the middle *Tunica media* and the outer *Tunica adventitia*. The layers of the aortic wall have a diverse cellular composition and include smooth muscle cells (SMCs), fibroblasts, endothelial cells, etc. Functional disorders in the cells of the intima of the human aorta can lead to various cardiovascular diseases (CVD), such as aneurysm and, as a result, dissection or rupture of the thoracic aorta. The cellular and molecular mechanisms of CVD development remain not fully understood, therefore, the study of the functional characteristics of various cell populations that make up the human aorta is an urgent task today.

The aim is to evaluate the inflammatory response formed by cells that are part of the *Tunica intima* of the human aorta during phagocytosis of latex particles and internalization of low-density lipoproteins (LDL) to study their role in the development of aneurysms.

The experiments were performed on smooth muscle cells (SMCs) isolated from the intima of the human aorta in patients with aneurysm. Phagocytic activity was studied by adding latex beads to the SMCs of *Tunica intima*, the ability to internalize LDL was evaluated using the BDP 630/650 dye and a biochemical method, the assessment of the ability to pro- and anti-inflammatory activation was studied using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Our results demonstrated that the absorption of latex beads and LDL stimulates the activation of interleukin secretion by smooth muscle cells that are part of the *Tunica intima* of the aorta, namely the proinflammatory cytokines IL-6 and IL-8. This fact may indicate that in the conditions of the body, the human aortic intima SMCs phenotype may switch from contractile to secretory or macrophage-like, which indicates the participation of this phenotypic cell transition in the process of aneurysm development.

Keywords: Cardiovascular diseases, aneurysm, *Tunica intima* of the human aorta, interleukins, low-density lipoproteins, enzyme-linked immunosorbent assay, phagocytic activity, proinflammatory activation, latex beads, smooth muscle cells.

1 Введение

Аорта представляет собой самый крупный кровеносный сосуд организма, который достигает в диаметре около 3 см и отвечает за транспортировку обогащённой кислородом артериальной крови от сердца к тканям и органам. Грудной отдел аорты состоит из корня аорты, восходящей аорты, дуги аорты и нисходящей аорты. Стенка аорты состоит из трёх оболочек: внутренней - *Tunica intima*, средней - *Tunica media* и наружной *Tunica adventitia*. Оболочки стенки аорты имеют разнообразный клеточный состав мезенхимального происхождения и включают в себя гладкомышечные клетки (ГМК), фибробласты, эндотелиальные клетки и др. Функциональные нарушения в клетках интимы аорты человека могут приводить к различным сердечно-сосудистым заболеваниям (ССЗ), например, аневризме и, как следствие, расслоению или разрыву грудной аорты [7].

Аневризма грудной аорты – это патологическое состояние, в процессе которого происходит расширение её диаметра до 50%. Данное заболевание может быть обусловлено как наследственными патологиями (синдром Марфана, Элерса-Данло, двустворчатая аорта), так и, например, травмой. Кроме того, к факторам, способствующим развитию аневризмы, относят: высокое кровяное давление, повышенный уровень холестерина, инфекции и др. [2]. Последствием аневризмы является расслоение грудной аорты, при котором происходит разрыв внутренней оболочки аорты - интимы, вследствие чего кровь попадает в среднюю оболочку – медию, что может приводить к внезапной смерти пациента. Ежегодно от расслоения и разрыва грудной аорты умирает более 150 тысяч человек по всему миру [8].

Аневризма и расслоение грудной аорты характеризуются схожими патогенетическими изменениями: дисфункцией внеклеточного матрикса и сократительного аппарата ГМК. Кроме того, было показано, что в развитии аневризмы аорты принимают участие ГМК различных фенотипов: сократительный, секреторный и макрофагоподобный [3], [11]. В ряде исследований показано, что клетки, входящие в состав интимы аорты у людей, больных аневризмой, могут активно интернализировать липопротеины низкой плотности (ЛПНП), что влияет на расширение диаметра восходящей аорты [1].

Клеточные и молекулярные механизмы развития ССЗ остаются не до конца изученными, поэтому изучение функциональных особенностей различных клеточных популяций, входящих в состав аорты человека, является актуальной на сегодняшний день задачей.

В связи с вышеизложенным, целью настоящей работы являлась оценка воспалительной реакции, формируемой клетками, входящими в состав интимы аорты человека, в процессе фагоцитоза латексных частиц и интернализации ЛПНП, для изучения их роли в развитии аневризмы.

2 Материалы и методы

В настоящей работе были использовали первичные гладкомышечные клетки, выделенные из интимы аорты пациентов с аневризмой корня и

восходящей аорты. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом Национального исследовательского центра хирургии им. Петровского (утверждение № 8 от 20 декабря 2022 г.). Первичную культуру ГМК выделяли из внутренней оболочки грудной аорты человека с помощью инкубации в коллагеназе I и IV типов (StemCell, США) [13]. Полученные ГМК высевали в 24-луночный планшет и культивировали в 0,6 мл среды DMEM/F12 (ПанЭко, Россия), содержащей, L-глутамин, пенициллин, стрептомицин, феноловый красный и 10% сыворотки (Biowest, Южная Америка) при 37 °С.

Фагоцитарную активность исследуемых клеток изучали с использованием следующих методов:

1) инкубация с латексными шарами FluoSpheres carboxylate, 0,5 мкм (Thermo Fisher Scientific, США) по протоколу производителя. Анализ количества поглощенных шаров на клетку проводился с использованием микроскопа Leica DM4000 B LED (Leica Biosystems, Германия). Оценку проводили следующим образом: вначале - по 10 клеток в пяти полях зрения, далее считали количество поглощенных шаров в каждой выбранной клетке.

2) инкубация с атерогенными ЛПНП [14]. Для получения ЛПНП использовали кровь пациентов с диагностированными ССЗ [9]. Все пациенты предоставили письменное информированное согласие. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом Национального исследовательского центра хирургии им. Петровского (утверждение № 5 от 11 декабря 2022 г.).

Накопление липидных капель оценивали с использованием двух методов - флуоресцентного красителя для липидов BDP 630/650 (Lumiprobe, Россия) согласно ранее опубликованному протоколу [6]. Для валидации результатов проводили измерения ферментативным колориметрический методом с использованием набора Cholesterol Liquicolor (HUMAN, Германия) по модифицированной методике Фолча [4], белок определяли по методу Лоури [10].

В ходе исследования в изучаемых клетках выделяли по 3 исследуемые группы:

- 1) Группа клеток после инкубации с ЛПНП.
- 2) Группа клеток после инкубации с латексными шарами.
- 3) Группа клеток без добавления веществ – контрольная группа.

После инкубации с ЛПНП или латексными шарами культуральную жидкость отбирали для последующего анализа секреции про- и противовоспалительных цитокинов.

Концентрации IL-6, IL-8 и IL-10 в образцах культуральной жидкости определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих наборов DuoSet ELISA (R&D Systems Inc., США). ИФА проводили по протоколу производителя.

Статистический анализ полученных данных был проведён с использованием языка программирования Python. Статистическая значимость оценивалась с помощью U-критерия Манна-Уитни для попарных сравнений и

критерия Краскела-Уоллиса для сравнения более двух групп. Все значения были нормированы по масштабированию на минимальные и максимальные значения (min - max scaler). Обработку изображений производили в программе Fiji.

3 Результаты исследования и обсуждение

Статистический анализ фагоцитарной активности показал, что среднее количество поглощённых шаров в ГМК интимы (**рисунок 1**), выделенных из стенки аорты человека на nm^2 составило $19284,41 \pm 8986,91$ шт. Полученные данные подтверждают, что ГМК интимы аорты человека, полученные от больных аневризмой, обладают высокой фагоцитарной активностью. Это может свидетельствовать о том, что при развитии аневризмы ГМК интимы аорты человека приобретают макрофагоподобный фенотип [3].

В ходе исследования было выявлено, что первичные ГМК, выделенные из интимы аорты человека, обладают высокой способностью интернализировать ЛПНП. Так, в ГМК интимы без добавления ЛПНП медианное значение относительного показателя нормализованной интенсивности флуоресценции красителя BDP на nm^2 в клетке составила 38,80 [26,63; 58,47] и было значимо ниже, чем в клетках, после инкубации с ЛПНП 89,58 [66,58; 112,16] ($p < 0,001$).

В результате анализа по изучению способности ГМК интимы аорты человека накапливать холестерин ферментативным колориметрическим было выявлено значимое увеличение соотношения холестерина к белку в первичных клетках интимы аорты человека после инкубации с ЛПНП. Так, медианное значение относительного показателя нормализованного отношения холестерина к белку в контрольной группе клеток интимы составило 0,08 [0,04; 0,12], а в клетках интимы, после инкубации с ЛПНП 0,19 [0,12; 0,45] ($p < 0,05$).

При анализе культуральной жидкости было выявлено, что способность секретировать провоспалительные (IL-6 и IL-8) и противовоспалительные (IL-10) цитокины в ответ на внесение латексных частиц и ЛПНП значительно отличается между различными клеточными группами (**таблица 1**).

Как следует из таблицы 1, в первичных ГМК, выделенных из интимы аорты человека, после инкубации с ЛПНП секреция IL-8 была значительно выше, чем в ГМК интимы без добавления веществ ($p < 0,05$). Также, в настоящем исследовании выявлено, что секреция IL-8 исследуемыми клетками увеличивается в процессе фагоцитоза латексных шаров по сравнению с контрольной группой клеток ($p < 0,05$). Полученные данные демонстрируют, что у ГМК интимы аорты человека, выделенных у больных аневризмой, после провоспалительной активации увеличивается секреция провоспалительных цитокинов, что может свидетельствовать о том, что ГМК интимы аорты меняют свой фенотип с сократительного на секреторный.

Результаты исследования показывают, что секреция IL-6 в первичных ГМК интимы, выделенных из аорты человека, была выше в контрольной группе, по сравнению с группой клеток, после инкубации с латексными шарами ($p < 0,001$). Статистически значимых различий в секреции IL-6 между

контрольной группой клеток и группой клеток после инкубации с ЛПНП обнаружено не было. Это может быть связано с тем, что ГМК медики при развитии аневризмы приобретают фенотип, ассоциированный с секрецией провоспалительных цитокинов. Это подтверждает, что фенотипический переход ГМК может являться ключевым событием в процессе развития аневризмы внутри оболочки сосуда [3], [11], [12].

Баланс между секрецией про- и противовоспалительных цитокинов играет важную роль в развитии ССЗ. Было выявлено, что в клетках после инкубации с ЛПНП или латексными шарами секреция IL-10 увеличивалась, но незначительно. Это может свидетельствовать о том, что IL-10 играет защитную роль в развитии ССЗ и воспалительной реакции [5].

4 Заключение

Таким образом, поглощение латексных частиц и ЛПНП стимулирует активацию секреции интерлейкинов ГМК, входящими в состав интимы аорты, а именно провоспалительных цитокинов IL-6 и IL-8. Данный факт может указывать на то, что в условиях организма может происходить переключение фенотипа ГМК интимы аорты человека с сократительного на секреторный или макрофагоподобный. Это свидетельствует об участии данного фенотипического перехода клеток в процессе развития аневризмы. Полученные данные об их функциональных возможностях расширяют наши знания о роли ГМК в развитии ССЗ и являются предпосылкой для будущих исследований.

(Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (НИОКТР № 123030700024-4). Публикация размещена при участии Балтийского федерального университета им. И. Канта)

ТАБЛИЦЫ

Таблица 1. Медианное значение абсолютного показателя секретируемых цитокинов (IL-8, IL-6, IL-10) в исследуемых клетках, пг/мл, Ме [25-й; 75-й перцентили].

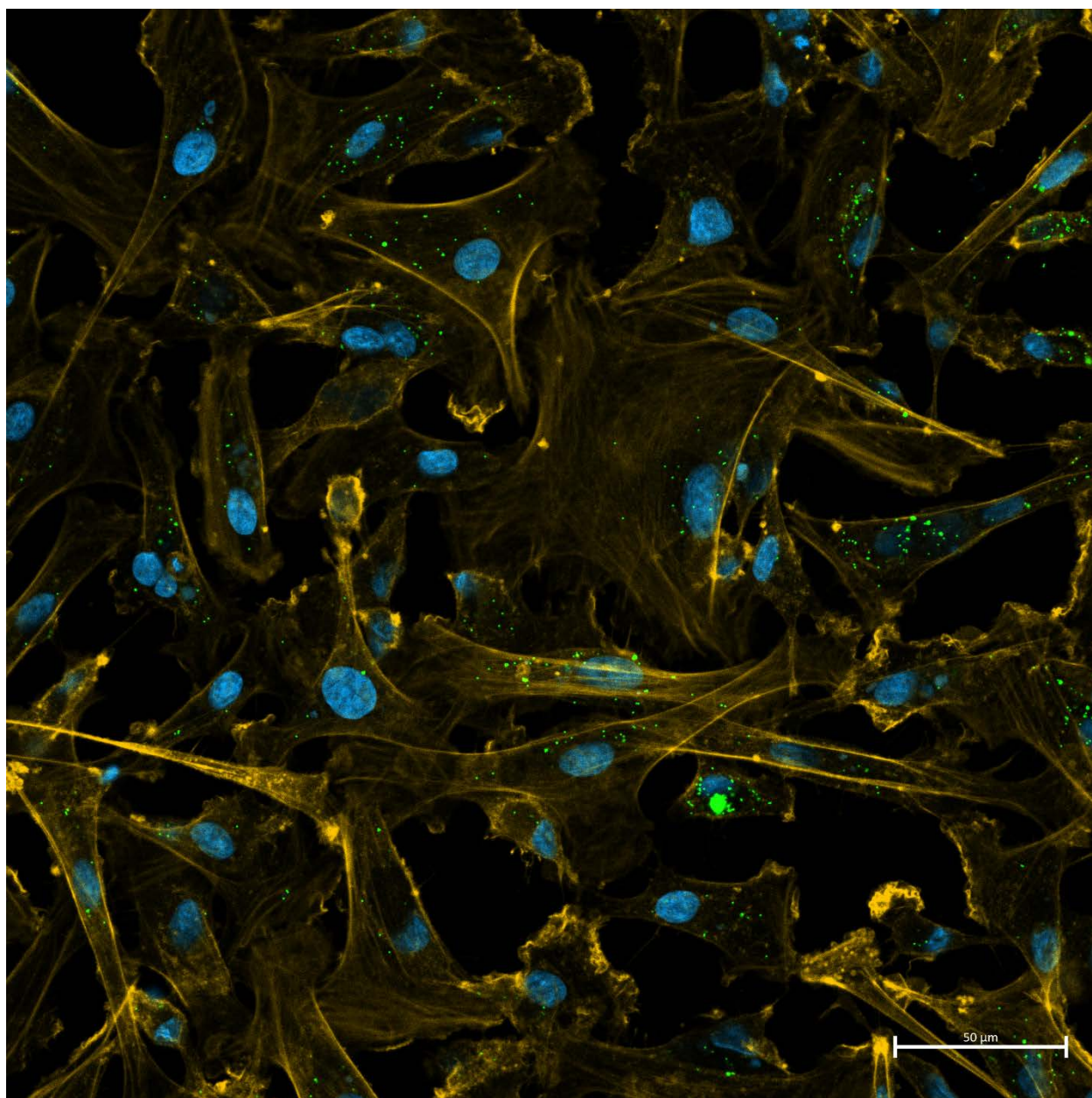
Table 1. The median value of the absolute index of secreted cytokines (IL-8, IL-6, IL-10) in the studied cells, pg/ml, Me [25th; 75th percentile].

Секретируемый цитокин/ Secreted cytokine	Группа / Group name			Статистическая значимость / significance, p
	Контроль / control (1)	ЛПНП / LDL (2)	Шары / Beads (3)	
IL-8	169 [155;180]	423 [383;487]	514 [415;585]	p (1-2) <0,05 p (1-3) <0,05
IL-6	1439 [1027;1973]	1181 [1107;1826]	135 [126;410]	p (1-3) <0,001 p (2-3) <0,001
IL-10	130 [108;1367]	132 [129;1456]	168 [165; 1279]	Статистически значимых различий между группами найдено не было / No statistically significant differences

РИСУНКИ

Рисунок 1. Клетки, выделенные из внутренней оболочки (*Tunica intima*) аорты человека после инкубации с латексными частицами. Зелёное свечение – латексные частицы, жёлтое – актиновые филаменты цитоскелета, окрашенные Rhodamine phalloidin (Thermo Fisher Scientific, США). Докраска ядер DAPI (BioFroxx, Германия) – синее свечение. Масштабный отрезок – 50 мкм.

Figure 1. Cells isolated from the *Tunica intima* of the human aorta after incubation with latex beads. Green fluorescence – latex particles, yellow – actin filaments of the cytoskeleton stained with Rhodamine phalloidin (Thermo Fisher Scientific, USA), blue - DAPI (BioFroxx, Germany). The scale segment is 50 microns.



ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Хованцева Ульяна Сергеевна – младший научный сотрудник ГНЦ РФ ФГБНУ “Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского”

адрес: 119435, г. Москва, Абрикосовский переулок, 2;

телефон: 8(903)655-72-85;

e-mail: ulyana.khovantseva@gmail.com

Khovantseva Ulyana S. – Junior researcher, Petrovsky National Research Centre of Surgery;

address: 119435, Moscow, Abrikosovsky lane, 2;

telephone: 8(903)655-72-85;

e-mail: ulyana.khovantseva@gmail.com

Блок 2. Информация об авторах

Матвеева Диана Константиновна – младший научный сотрудник лаборатории клеточной физиологии ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем Российской академии наук;

Matveeva Diana K. – junior researcher, Laboratory of cellular physiology, Institute of Biomedical Problems of Russian Academy of Sciences;

Чакал Дейяра Алиевна – кандидат медицинских наук, научный сотрудник I кардиохирургического отделения (отделение реконструктивно-восстановительной сердечно-сосудистой хирургии), ГНЦ РФ ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского»;

Chakal Deyyara A. – Cand. Sci. (Med.), Researcher, I Cardiac Surgery Department, Petrovsky National Research Centre of Surgery;

Брешенков Денис Геннадьевич – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник I кардиохирургического отделения (отделение реконструктивно-восстановительной сердечно-сосудистой хирургии), ГНЦ РФ ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского»;

Breshenkov Denis G. – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, I Cardiac Surgery Department, Petrovsky National Research Centre of Surgery;

Чарчян Эдуард Рафаэлович – доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН, профессор, заведующий I кардиохирургическим отделением (отделение реконструктивно-восстановительной сердечно-сосудистой хирургии) ГНЦ РФ ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б. В. Петровского»;

Charchyan Eduard R. – Doc. Sci. (Med.), Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, prof., head of I Cardiac Surgery Department, Petrovsky National Research Centre of Surgery.

Блок 3. Метаданные статьи

ФАГОЦИТАРНАЯ АКТИВНОСТЬ И СПОСОБНОСТЬ К
ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВАЦИИ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК
ИНТИМЫ АОРТЫ ЧЕЛОВЕКА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ
PHAGOCYTIC ACTIVITY AND THE ABILITY TO PROINFLAMMATORY
ACTIVATION OF SMOOTH MUSCLE CELLS OF THE TUNICA INTIMA OF
HUMAN AORTA IN THE EXPERIMENT

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВАЦИЯ ГМК
PROINFLAMMATORY ACTIVATION OF SMCs

Ключевые слова: Сердечно-сосудистые заболевания, аневризма, интима аорты человека, интерлейкины, липопротеины низкой плотности, иммуноферментный анализ, фагоцитарная активность, провоспалительная активация, латексные шары, гладкомышечные клетки.

Keywords: Cardiovascular diseases, aneurysm, *Tunica intima* of the human aorta, interleukins, low-density lipoproteins, enzyme-linked immunosorbent assay, phagocytic activity, proinflammatory activation, latex beads, smooth muscle cells.

Объединенный иммунологический форум 2024.

Количество страниц текста – 4,

Количество таблиц – 1,

Количество рисунков – 1.

28.03.2024

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи или ее doi.
1.	Alegret J. M., Masana L., Martinez-Micaelo N., Heras M., Beltran-Debon R. LDL cholesterol and apolipoprotein B are associated with ascending aorta dilatation in bicuspid aortic valve patients. International Journal of Medicine, 2015, Vol. 108, no. 10, pp.795 - 801.	-	DOI: 10.1093/qjmed/hcv032
2.	Bossone E., Eagle K. A. Epidemiology and management of aortic disease: aortic aneurysms and acute aortic syndromes. Cardiology, 2021, Vol. 18, no. 5, pp. 331–348.	-	DOI: 10.1038/s41569-020-00472-6
3.	Cao G., Xuan X., Yaling Li, Jie Hu, Zhang R., Jin H., Dong H. Single-cell RNA sequencing reveals the vascular	-	DOI: 10.1186/s12964-023-01120-5

	smooth muscle cell phenotypic landscape in aortic aneurysm. Cell Communication and Signaling: CCS, 2023. Vol. 21, no.1, p. 113.		
4.	Folch J., Lees M., Sloane Stanley G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. Journal of Biological Chemistry, 1957, Vol. 226, no. 1, pp. 497–509.	-	DOI: 10.1016/S0021-9258(18)64849-5
5.	Han X., Boisvert W. A. Interleukin-10 protects against atherosclerosis by modulating multiple atherogenic macrophage function. Thrombosis and haemostasis, 2015, Vol. 113, no. 3, pp. 505–512.	-	DOI: 10.1160/TH14-06-0509
6.	Kiseleva D. G., Kolmogorov V. S., Cherednichenko V. R., Khovantseva U. S., Bogatyreva A. I., Markina Y. V., Gorelkin P. V. Erofeev A. S., Markin A. M. Effect of LDL Extracted from Human Plasma on Membrane Stiffness in Living Endothelial Cells and	-	DOI: 10.3390/cells13040358

	Macrophages via Scanning Ion Conductance Microscopy. Cells, 2024, Vol.13, no.4, p. 358.		
7.	Komutrattananont P., Mahakkanukrauh P., Das S. Morphology of the human aorta and age-related changes: anatomical facts. Anatomy & Cell Biology, 2019, Vol. 52, no. 2, p. 109.	-	DOI: 10.5115/acb.2019.52.2.109
8.	Krafcik B. M., Stone D. H., Cai Ming, Jarmel I. A., Eid M., Goodney P. P., Columbo J. A., Smith M. M. Changes in Global Mortality from Aortic Aneurysm, Journal of Vascular Surgery, 2024, Vol. 79, no. 2.	-	DOI: 10.1016/j.jvs.2024.02.025
9.	Li K., Wong D. K., Luk F. S., Kim R. Y., Raffai R. L. Isolation of Plasma Lipoproteins as a Source of Extracellular RNA. Methods in molecular biology, 2018. Vol. 1740, pp. 139–153.	-	DOI: 10.1007/978-1-4939-7652-2_11

10.	Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 1951. Vol. 193, no.1, pp. 265–275.	-	DOI: 10.1016/S0021-9258(19)52451-6
11.	Lu H., Du W., Ren L., Hamblin M. H., Becker R. C., Chen Y. E., Fan Y. Vascular Smooth Muscle Cells in Aortic Aneurysm: From Genetics to Mechanisms. Journal of the American Heart Association, 2021, Vol. 10, no. 24.	-	DOI: 10.1161/JAHA.121.023601
12.	Petsophonsakul P., Furmanik M., Forsythe R., Dweck M., Schurink G. W., Natour E., Reutelingsperger C., Jacobs M., Mees B., Schurgers L. Role of Vascular Smooth Muscle Cell Phenotypic Switching and Calcification in Aortic Aneurysm Formation. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2019, Vol. 39, no. 7, pp. 1351–1368.	-	DOI:10.1161/ATVBAHA.119.312787

13.	Poursaleh A., Esfandiari G., Beigee F. S., Eshghifar N., Najafi M. Isolation of intimal endothelial cells from the human thoracic aorta: Study protocol. Medical Journal of the Islamic Republic of Iran, 2019, Vol. 33, no. 1, p. 51.	-	DOI: 10.34171/mjiri.33.51
14.	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. Experimental and molecular pathology, 1997, Vol. 64, no. 3, pp. 127–145.	-	DOI: 10.1006/exmp.1997.2216