

Антиатерогенные эффекты криоконсервированного препарата фетоплацентарного комплекса при экспериментальном атеросклерозе

И.И. Кондаков

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Основной причиной возникновения и развития атеросклероза является дислиппротеидемия. Основную роль в его развитии играют модифицированные липопротеиды низкой плотности (ЛПНП). Известно 6 способов модификации ЛПНП. Из них наиболее значимым является модификация ЛПНП оксидантами и модификация их вследствие трансэндотелиального транспорта. И в том, и в другом случае, проникшие в субэндотелиальное пространство липопротеиды служат мощным хемотрактантом как для лейкоцитов крови, так и для гладкомышечных клеток. И те, и другие, накапливаясь в интима артерий, активно поглощают проникшие липопротеиды и трансформируются в пенистые клетки.

В современной литературе есть сведения, что применение препаратов фетоплацентарного комплекса корригирует показатели липидного обмена крови, как у экспериментальных животных, так и у людей [3, 8]. Однако клеточные механизмы антиатерогенных эффектов препаратов фетоплацентарного комплекса остаются малоизученными.

В связи с этим целью исследования явилось изучение молекулярных и клеточных механизмов антиатерогенного действия препаратов фетоплацентарного комплекса на обратное развитие экспериментального атеросклероза у кроликов.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили 20 кролей породы “шиншилла”, которые находились на холестериновой диете [5], из них 5 животных содержались в стандартных условиях вивария (1 группа).

В эксперименте использован холестерин производства Петербургского завода медицинских препаратов (Россия) в дозе 200 мг/кг массы тела *per os* по схеме: 5 дней – кормление холестерином, 2 дня перерыв.

В начале эксперимента и далее ежемесячно у всех животных из краевой вены уха производился забор крови в количестве 5 мл для определения биохимических показателей.

Для контроля за развитием модели атеросклероза, и далее за регрессом атеросклероза, были использованы биохимические методы исследования крови (показатели липидного обмена: общий холестерин крови (ОХС), триглицериды (ТГ), липопротеиды высокой плотности (ЛПВП), липопротеиды очень низкой плотности (ЛПОНП), липопротеиды низкой плотности (ЛПНП)). Для исследования были использованы реактивы фирмы “Lachema”, для определения уровня общего холестерина – (CHOL 150), бета-липопротеинов – (BLP 200) и триглицеридов – (TG 50).

Уровень нитритов в плазме крови определяли методом Грисса-Илосвая [1]. Концентрацию нитритов определяли на ФЕК-56.

На 27 неделе эксперимента кормление холестерином было прекращено.

Далее 10 кроликам была произведена трансплантация аллогенной криоконсервированной плаценты (3 группа). Трансплантация проводилась под местной анестезией раствором 0,5% новокаина в подкожный карман методом, разработанным в ИПКиК НАН Украины. Трансплантировались кусочки плаценты размерами 0,8 x 0,8 см объемом 0,8 – 1 мл. Показатели липидного обмена изучали каждые 7 дней в течение 6 недель.

5 животных на пике развития модели экспериментального атеросклероза, которым не производилась трансплантация криоконсервированной плаценты, были выделены во 2 группу относительного контроля (естественный регресс экспериментального атеросклероза).

Через 6 недель животные группы контроля, относительного контроля и животные, которым была произведена трансплантация фрагментов фетоплацентарного комплекса, выводились из эксперимента согласно с “Правилами использования лабораторных экспериментальных животных” (1984, приложение 4) и Хельсинской декларацией о гуманном отношении к животным.

После забоя животных выделяли аорту от дуги до бифуркации на бедренные артерии и перфузировали раствором глюкозо-формалина, импрегнировали азотнокислым серебром, проявляли в стандартном фотопроявителе и дофиксировали в 10% растворе формалина [6]. Импрегнированные серебром препараты аорты подготавливались для исследования методами световой, растровой и

Адрес для корреспонденции: Кондаков И.И., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-34-85, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

трансмиссионной электронной микроскопии. “Хетченовские” препараты изготавливали по методу [6].

Фиксированные в 10% растворе формалина аорты были окрашены спирто-формалиновым раствором Судана IV по методике [7].

Состояние моно слоя эндотелия в типичных местах исследовали на “Хетченовских” препаратах на световом тринокулярном микроскопе с использованием морфометрической программы Biovision 3.0. При анализе образцов подсчитывали число стигмат и кратеров на 100 эндотелиальных клетках при увеличении $\times 400$, а также измеряли площадь эндотелиоцитов. Статистический анализ метрических данных проводили с использованием программ Excel XP 2002 и STATGRAPH 2.1.

Результаты и обсуждение

У животных 1 группы, уровень общего холестерина сыворотки крови не превышал $2,92 \pm 0,35$ ммоль/л.

На 27 неделе кормления холестерином уровень ОХС сыворотки крови достигал максимальных значений и составлял $7,27 \pm 1,14$ ммоль/л. Повышение уровня ОХС сопровождалось достоверным повышением концентрации в сыворотке крови ТГ и ЛПНП и увеличением антиатерогенных фракций ЛПВП, что приводило к увеличению коэффициента атерогенности.

Через неделю у животных 2 группы со спонтанным регрессом экспериментального атеросклероза уровень ОХС сыворотки крови снизился до $5,32 \pm 1,07$ ммоль/л (рис. 1). Снижение уровня ОХС приводило к недостоверному снижению уровня ЛПНП и ТГ.

У животных 3 группы, которым была произведена трансплантация криоконсервированного ФПК в эти же временные сроки, отмечалось резкое и достоверное снижение уровня ОХС, который достигал $2,88 \pm 0,8$ ммоль/л. Снижение уровня ОХС приводило к достоверному снижению уровня ЛПНП (рис.2) и повышению концентрации ТГ в сыворотке крови. К концу эксперимента, на 6 неделе спонтанного регресса экспериментального атеросклероза уровень ОХС сыворотки крови достигал $2,34 \pm 0,31$ ммоль/л, что было ниже в 2 раза, чем на пике модели атеросклероза. Сравнительный анализ показателей ОХС у экспериментальных животных 3 группы показал, что трансплантация криоконсервированного ФПК в эти же временные сроки снижала уровень ОХС почти в 4 раза и значение показателей ОХС составляли $1,45 \pm 0,04$ ммоль/л.

Интересно отметить, что концентрация в сыворотке крови ТГ достоверно снижалась как по сравнению показателей на пике эксперимен-

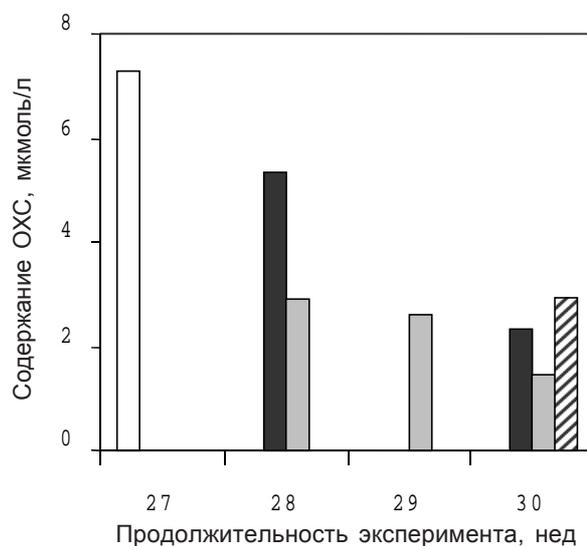


Рис. 1. Динамика уровня ОХС в сыворотке крови кролей во время эксперимента: □ – до трансплантации; ■ – регресс атеросклероза; ▣ – трансплантация ФПК; ▨ – контроль.

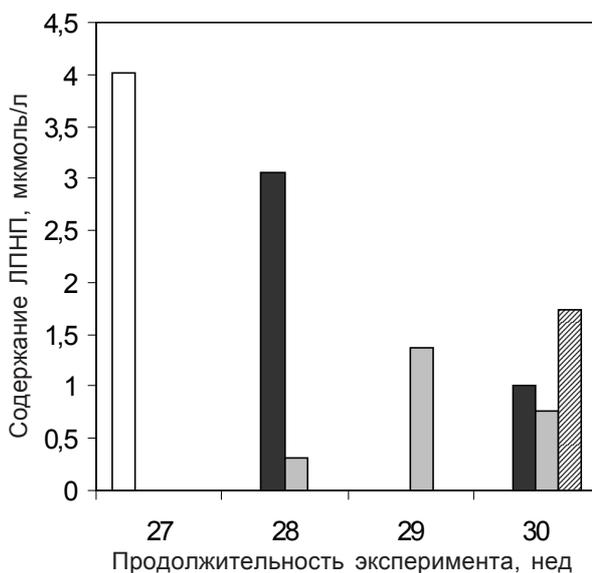


Рис. 2. Динамика уровня ЛПНП в сыворотке крови кролей во время эксперимента: □ – до трансплантации; ■ – регресс атеросклероза; ▣ – трансплантация ФПК; ▨ – контроль.

тального атеросклероза, так и при его естественном регрессе, и составляла $0,72 \pm 0,11$ ммоль/л ($p < 0,001$) (рис. 4).

У животных 2-й группы, на пике развития модели экспериментального атеросклероза, после суданирования (Судан IV), на люминальной поверхности аорты в грудном и брюшном отделах визуализировались обширные поля липоидоза, которые располагались в основном по ходу устьев межреберных, поясничных артерий и области трифуркации аорты. В среднем площадь липоидоза составляла $78 \pm 7,5\%$ от общей площади аорты, у животных 2 группы находящихся в состоянии спонтанного регресса составляла $67 \pm 11\%$ и

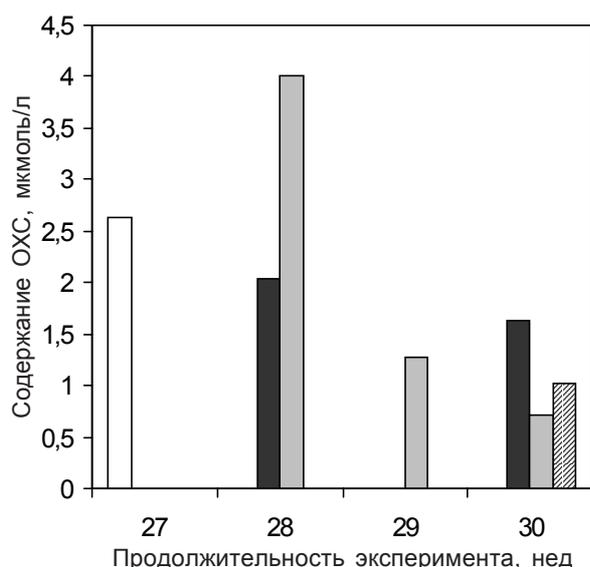


Рис. 3. Динамика уровня ТГ в сыворотке крови кролей во время эксперимента: □ – до трансплантации; ■ – регресс атеросклероза; ▒ – трансплантация ФПК; ▨ – контроль.

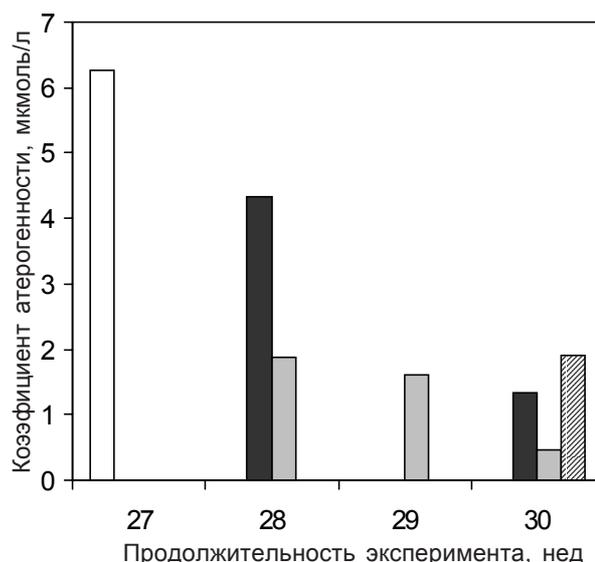


Рис. 4. Динамика коэффициента атерогенности во время эксперимента: □ – до трансплантации; ■ – регресс атеросклероза; ▒ – трансплантация ФПК; ▨ – контроль.

статистически не отличалась от животных на пике модели экспериментального атеросклероза. У животных 3 группы, которым была произведена трансплантация фрагментов фетоплацентарного комплекса, участки липоидоза приобретали очаговый характер и располагались исключительно в дистальных по отношению к току крови участках устьев отходящих от аорты артерий. Площадь липидной инфильтрации составляла $36 \pm 4\%$ ($p < 0,05$).

Известно, что повышение уровня ОХС так и ЛПНП в сыворотке крови является токсичным для эндотелиальных клеток артерий и приводит к нарушению морфо-функционального состояния эндотелия. Функционально дисфункция эндотелия проявляется в уменьшении способности эндотелиоцитов секреции ряда вазоактивных агентов, среди которых ключевую роль в развитии атеросклероза имеет оксид азота (NO). Морфологически дисфункция эндотелия проявляется в нарушении состояния межэндотелиальных контактов, изменении микроархитектоники люминальной поверхности плазмолеммы, геометрии клеток и нарушении везикулярного трансэндотелиального транспорта.

Изучение содержания NO₂ сыворотки крови кролей на фоне кормления холестерином показало, что по мере развития экспериментального атеросклероза его концентрация постепенно снижалась и к 27 неделе составляла 1,63 мкмоль/л против 5,025 мкмоль/л у контрольных животных.

У животных 2 группы через неделю спонтанного регресса атеросклероза уровень NO₂ не отличался от такового на пике развития модели

атеросклероза и оставался на таком же низком уровне до окончания эксперимента.

У кролей 3 группы эффекты аллогенной трансплантации фрагментов криоконсервированного ФПК на синтез эндотелием NO₂ проявлялись, начиная с 6 недели. К концу эксперимента уровень NO₂ у животных 3 группы в 2 раза (2,33 мкмоль/л) превышал аналогичный показатель у кролей 2 группы.

Сравнительный морфологический анализ на “Хетченоских” препаратах эндотелия аорты кролика показал, что у животных контрольной группы монослой эндотелия образован мономорфными вытянутыми по току крови эндотелиальными клетками с узкими межэндотелиальными границами. Изредка, по ходу межклеточных границ, встречаются мелкие “пуговичные” образования и более крупные кольцеобразные структуры, которые по литературным данным называют “стигматы” и “кратеры” [9, 10]. В местах гемодинамической травматизации (устья межреберных артерий) встречаются аргирофильные клетки.

По метрическим параметрам диаметр стигматы не превышает 6 мкм² и соответствует сквозному дефекту межэндотелиальных контактов. Электронно-микроскопический анализ подтвердил, что стигматa представляет собой минимальное расхождение межэндотелиальных контактов. Среди описанных образований по ходу межэндотелиальных границ встречаются кратеры более крупные, округлой формы аргирофильные образования, приобретающие иногда вид кольцевидных структур. На “Хетченоских” препаратах

размеры этих структур колеблются от 10 до 16 мкм².

Сравнительный анализ количества стигмат и кратеров при экспериментальном атеросклерозе и после трансплантации ФПК показывает, что количество стигмат достоверно ниже у животных 3 группы, чем у 2 группы и приближается к норме, но количество кратеров по-прежнему остается высоким (таблица).

Распределение эндотелиоцитов в монослое аорты кролика в зависимости от их логарифма площади (LnS) рассчитанное на 100 клеток в норме, при регрессе атеросклероза и после трансплантации криоконсервированного ФПК, в зависимости от их числа в монослое, представлено на рис. 5.

Как показывает сравнительный анализ распределения числа эндотелиоцитов в зависимости от их логарифма площади (LnS) в аорте кроликов контрольной группы, на пике модели атеросклероза и после трансплантации фрагментов криоконсервированного ФПК, в норме эндотелий аорты гетерогенен и состоит из очень малых по площади эндотелиоцитов, называемых “стомата”, средних и гигантских эндотелиальных клеток.

Однако, площадь эндотелиоцитов при экспериментальном атеросклерозе достоверно меньше ($p < 0,001$), чем у контрольных животных.

Выводы

Таким образом, моделирование экспериментального атеросклероза приводит к увеличению ОХС и атерогенных фракций липопротеидов в сыворотке крови и приводит к дисфункции эндотелия.

Морфологически дисфункция эндотелия проявляется уменьшением количества эндотелиоцитов с малой площадью поверхности, расширением межэндотелиальных контактов в виде стигмат и кратеров. Результатом этого является прогрессирующее увеличение площади липоидоза в аорте кроликов.

Биохимически дисфункция эндотелия проявляется уменьшением уровня NO₂ в плазме крови.

Трансплантация ФПК нормализует показатели липидного обмена в течение 2 недель и повышает уровень NO₂ в плазме крови.

Снижение коэффициента атерогенности сопровождается снижением площади эндотелиоцитов, уплотнением межэндотелиальных контактов, снижением числа стигмат и уменьшением площади липоидоза интимы аорты кроликов.

Проведенное исследование показывает, что ФПК при трансплантации кроликам с холесте-

Сравнительный анализ частоты встречаемости межэндотелиальных дефектов в эндотелии аорты кроликов в норме, при экспериментальной модели атеросклероза и после трансплантации ФПК

Частота встречаемости дефектов					
Модель атеросклероза		Контроль		После трансплантации	
стигматы	кратеры	стигматы	кратеры	стигматы	кратеры
63,0±5,79*	19,5±1,03*	20,0±2,75	3,5±0,58	20,0±0,64**	16,0±1,05*

Примечание: * – достоверные различия по сравнению с контролем ($p < 0,01$); ** – достоверные различия по сравнению с моделью атеросклероза $p < 0,05$. Расчет межклеточных дефектов эндотелия производили на 100 клеток.

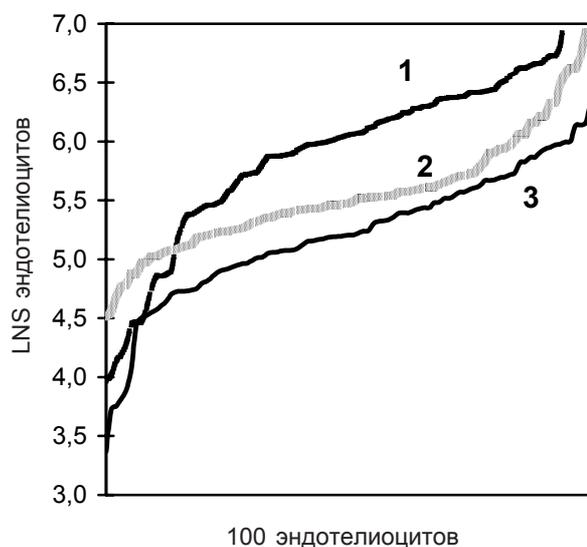


Рис. 5. Распределение эндотелиоцитов в монослое аорты кролика в зависимости от их логарифма площади (LnS) рассчитанное на 100 клеток контрольной группы (1), на пике модели атеросклероза (2) и после трансплантации фрагментов криоконсервированного ФПК (3).

риновой моделью обладает выраженным антиатерогенным и ангиотрофическим эффектом и способствует ускоренному регрессу экспериментального атеросклероза.

Литература

1. Ванхане В.Д., Суханова Г.А. Техника санитарно-гигиенических исследований.– Киев: Вища школа, 1983.– С. 236-237.
2. Гайер Г. Электронная гистохимия.– Москва: Мир, 1974.– 475 с.
3. Голдобина А.В., Колесникова Л.И., Никифоров С.Б. Сравнительная оценка антиоксидантного препарата диквертина и комплекса фетальных тканей при лечении больных коронарным атеросклерозом // Бюл. эксперим. биол. и мед.– 1998.– Прил. 1.– С. 165-167.
4. Смирнов В.Н., Репин В.С. Атеросклероз: клеточные проявления и механизмы развития заболевания в артериях человека // Бюл. Всесоюзного кардиологи-

ческого научного центра АМН СССР.– 1985.– Т. 8, №2.– 13 с.

5. *Кетлинский С.А., Тарарак Э.М., Шивинская Т.Г., Виноградов А.Г.* Изучение динамики пролиферативной активности клеток аорты в процессе образования атеросклеротической бляшки. // Кардиология.– 1980.– Т. 20, №8.– 27 с.
6. *Кондаков І.К., Яковцова А.Ф., Гавриш О.С.* Способи оцінки морфо-функціонального стану ендотелію: Методичні рекомендації.–Харків-Київ, 2000.– 19 с.
7. *Непряхин В.П.* Новый способ окраски суданом красным липидов клеток и тканей различных органов // Арх. патол.– 1979.– Т. 12, Вып. 8.– С. 57-58.
8. *Рунович А.А., Курильская Т.Е., Кузнецова Э.Э.* Влияние аллотрансплантации фетальных тканей на течение ишемической болезни сердца. // Трансплантация фетальных тканей человека.– М., 1996.– С. 93-98.
9. *Gavrish A.S., Lisovets M.A., Blagodarova E.V.* Changes in the vascular wall in a combination of hypercholesterolemia and posttraumatic regeneration of endothelium // Lik. Sprava.– 2000.– N3-4.– P. 68-71.
10. *Zand T., Underwood J.M., Nunnari J.J. et al.* Endothelium and "silver Lines". En elestron microscopic study. // Virchows Arch. (Path. Anat.)– 1982.– Vol. 395.– P. 133-144.