

УДК 591.111.4:616.13-004.6-092.9

Липина О.В., Фалько О.В., Прокопюк О.С., Волина В.В.

## Влияние полиэтиленоксида на липоидоз при экспериментальном атеросклерозе у кроликов

Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины, 61015, г. Харьков, ул. Переяславская, д. 23

**Цель исследования** — изучение влияния полиэтиленоксида (ПЭО) с молекулярной массой 1500 на степень липоидоза при экспериментальном атеросклерозе (АС). **Методы.** У кроликов вызывали АС путем введения *reg os* холестерина по 200 мг/кг 6 раз в неделю в течение 6 месяцев ( $n = 7$ ). Через 6 мес. после формирования АС вводили внутривенно 15% ПЭО на физиологическом растворе (в дозе 0,1 г/кг) в течение 10 дней ( $n = 8$ ). **Результаты.** После курса ПЭО площадь очагов липоидоза на внутренней поверхности аорты была значительно меньше, чем при самопроизвольном регрессе атеросклероза: соответственно  $32 \pm 12\%$  и  $70 \pm 10\%$  ( $p < 0,05$ ). Толщина липидных образований у леченных кроликов имела тенденцию уменьшению, по сравнению с нелечеными. В экспериментах *in vitro* суточная инкубация фрагментов аорты кроликов с АС в растворе ПЭО уменьшала толщину очагов липоидоза, чего не наблюдалось при инкубации в физиологическом растворе. При гистологическом исследовании фрагментов аорты кроликов с АС было обнаружено уменьшение количества пенистых клеток в зоне атеросклеротического поражения как после инъекции ПЭО, так и после инкубации фрагментов аорты с очагами липоидоза в растворе ПЭО. Механизм антисклеротического действия ПЭО нуждается в дальнейшем изучении.

**Ключевые слова:** липоидоз, полиэтиленоксид, экспериментальный атеросклероз, кролики.

**Для цитирования:** Липина О.В., Фалько О.В., Прокопюк О.С., Волина В.В. Влияние полиэтиленоксида на развитие липоидоза при экспериментальном атеросклерозе у кроликов. Патогенез. 2016; 14(3): 38-41.

**Для корреспонденции:** Фалько Оксана Валерьевна, канд. биол. наук, научн. сотр., Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины, Харьков. e-mail: i\_falko@mail.ru

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 06.06.2016

Lipina O.V., Falko O.V., Prokopyuk O.S., Volina V.V.

### The effect of polyethylene oxide on lipoidoz in experimental atherosclerosis in rabbits

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, 23 Pereyaslavskaya str. 61015, Kharkov, Ukraine

The paper presents the experimental research data on the effect of polyethylene oxide (PEO) with molecular weight of 1500 on the rabbit aorta with experimental atherosclerosis. When approaching the peak of the atherosclerosis model, a large internal surface area of the aorta has been shown to be injured by lipidosis foci, the dimensions of those (height and area) has been decreased in 6 month after the ceasing of intravenous injections of a 15% PEO solution, that is less pronounced in atherosclerosis spontaneous regression. The *in vitro* experiments revealed that 24 h incubation of aorta fragments with experimental atherosclerosis in PEO solution resulted in reduced height of lipidosis foci that was not observed during incubation in saline. Histological examination of aorta fragments after PEO injection as well as after incubation of aortic fragments with lipidosis foci in PEO solution revealed a reduced number of foam cells in the zone of atherosclerotic lesion. The mechanism of this phenomenon should be more closely studied.

**Key words:** lipidosis foci, polyethylene oxide, experimental atherosclerosis, rabbits.

**For citation:** Lipina O.V., Falko O.V., Prokopyuk O.S., Volina V.V. The effect of polyethylene oxide on lipoidoz in experimental atherosclerosis in rabbits Patogenez. 2016; 14(3): 38-41 (In Russian).

**For correspondence:** Falko Oksana Balerevna, candidat of biological science, PhD, Researcher Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, 23 Pereyaslavskaya str. 61015, Kharkov, Ukraine, e-mail: i\_falko@mail.ru

**Funding.** The study had no sponsorship

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 06.06.2016

## Введение

Ведущим звеном в патогенезе атеросклероза является изменение метаболизма липидов, а также нарушение гемодинамики и микроциркуляции крови [1]. Известно, что полиэтиленоксид (ПЭО), являясь криопротектором, обладает способностью влиять на характер течения жидкостей, в том числе и крови [2, 3]. Ранее проведенные нами эксперименты показали, что введение ПЭО с молекулярной массой 1500 (ПЭО-1500) ограничивает нарушения гемомикроциркуляции при общем остром охлаждении теплокровного организма [4]. Также была показана способность ПЭО-1500 уменьшать динамическую вязкость крови, особенно при малых напряжениях сдвига. Учитывая при этом тот факт, что полиэтиленоксид как многоатомный спирт может обладать жирорастворимыми свойствами, а атеросклеротические изменения кровеносных сосудов уже на ранних этапах их возникновения характеризуются отложением жиров, представляло интерес выяснить характер влияния ПЭО-1500 на состояние сосудов при экспериментальном атеросклерозе, что и стало целью данного исследования.

## Методика

В эксперименте использовали 24-месячных беспородных кроликов-самцов массой 3500—5000 г ( $n = 30$ ). Моделирование атеросклероза проводили по методике, предложенной Н.Н. Аничковым и С.С. Халатовым [5]. Для этого животным 6 раз в неделю в течение 6 месяцев вводили регос холестерин по 200 мг/кг. Для мониторинга состояния организма животных в течение всего эксперимента, начиная с первого месяца и затем ежемесячно, исследовали показатели липидного обмена: общий холестерин (ОХ), триглицериды (ТГ) и холестерин липопротеидов высокой плотности (ЛПВП, антиатерогенная фракция).

Спустя 6 месяцев (достижение пика модели атеросклероза по показателям липидного обмена) экспериментальные животные были разделены на три группы:

1 — кролики, выведенные из эксперимента на пике модели ( $n = 7$ );

2 — кролики с последующим самопроизвольным регрессом атеросклероза ( $n = 7$ );

3 — кролики, которым после достижения пика атеросклероза вводили внутривенно 15% раствор ПЭО-1500 на физиологическом растворе (в дозе 0,1 г/1 кг) в течение 10 дней ( $n = 8$ ).

Контрольную группу составляли интактные животные ( $n = 8$ ).

Для определения степени атеросклеротического поражения аорты была проведена планиметрическая оценка распространенности очагов липоидоза в интимальной оболочке грудного отдела аорты. Для этого после выведения животных из эксперимента выделяли фрагменты аорты на участке от дуги до бифуркации на бедренные артерии (на 10 мм ниже дуги аорты), поскольку известно, что преимущественная локализация атеросклеротических поражений отмечается там, где особенно выражено действие таких гемодинамических факторов как турбулентность тока крови и удар пульсовой волны, которые инициируют атеросклеротические нарушения [5]. Фрагменты аорты фиксировали в 10%-ном растворе формалина, после чего окрашивали Суданом III [6]. Площадь очагов липоидоза определяли по

морфометрической программе Biovision 3.0. и выражали в процентах от общей площади поражения.

Для гистологического анализа фрагменты аорты экспериментальных животных также фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине, промывали в проточной воде, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заливали в парафин. Срезы из парафиновых блоков толщиной 6—8 микрон окрашивали гематоксилином и эозином для получения обзорных гистологических препаратов [7] и изучали с помощью светового микроскопа.

Для оценки непосредственного действия ПЭО-1500 на очаги липоидоза проводили эксперименты *in vitro*. Для этого фрагмент аорты (1 см<sup>2</sup>) с очагом липоидоза продольно рассекали на две части так, чтобы разрез проходил через середину очага липоидоза. Затем одну часть фрагмента аорты помещали в физиологический раствор, а вторую — в 0,25% ПЭО-1500, приготовленный на физиологическом растворе, и инкубировали при температуре 38°C. Используемая концентрация ПЭО-1500 по расчетным данным приближалась к средней его концентрации в крови экспериментального животного после внутривенного введения. После суточной экспозиции оценивали размеры очага липоидоза.

Экспериментальных животных выводили из эксперимента нанесением удара по основанию черепа [8]. Работу с животными проводили в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными III Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2007) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием критерия Манна—Уитни и пакета программ Excel [9].

## Результаты и обсуждение

В представленной таблице видно, что на пике модели атеросклероза биохимические показатели липидного спектра крови нелеченных животных с АС значительно превышали исходный уровень.

После выведения животных из эксперимента на пике модели атеросклероза было выявлено, что органы грудной и брюшной полостей были покрыты большим количеством жировой ткани. Ткани, выстилающие полости, были неэластичными, имели желтоватый оттенок. Визуальная оценка внутренней поверхности грудного отдела аорты животных на пике модели атеросклероза выявила в отличие от аорты интактных животных очаги липоидоза, площадь которых составляла  $70 \pm 10\%$  от общей площади фрагмента аорты. При этом по данным морфометрического анализа средняя толщина очагов липоидоза составляла  $0,041 \pm 0,002$  мм (рис. 16). В то же время спустя 6 месяцев после достижения пика атеросклероза и курса введения ПЭО-1500 анализ биохимических показателей липидного обмена у этих животных (таблица) не выявил отличий от аналогичных показателей у животных с самопроизвольным регрессом атеросклероза.

Однако при вскрытии нелеченных и леченных кроликов визуальная оценка органов брюшной и грудной полостей выявила некоторые отличия. У животных, не получавших ПЭО-1500, париетальные брюшина и плевра выглядели отечными и имели цианотичный оттенок. Обра-

Показатели липидного спектра крови животных с экспериментальным атеросклерозом

Условия эксперимента / показатели липидного обмена	Общий холестерин, ммоль/л	Лipoproteиды высокой плотности, ммоль/л	Триглицериды, ммоль/л
Интактные животные (контроль)	0,6 ± 0,08	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,1
Пик модели атеросклероза	14,71 ± 1,34*	0,7 ± 0,10*	6,4 ± 0,15*
Самопроизвольный регресс	0,6 ± 0,07	0,3 ± 0,07	0,3 ± 0,08
После введения ПЭО-1500	0,6 ± 0,08	0,4 ± 0,04	0,3 ± 0,19

Примечание. \*  $p < 0,05$  — достоверность по отношению к интактным кроликам.

шало на себя внимание значительное количество жировой ткани, которая покрывала внутренние органы и аорту. Мышечная ткань имела жесткую структуру. На внутренней поверхности аорты наблюдались очаги липоидоза, площадь которых составляла  $43 \pm 10\%$  от общей площади фрагмента аорты, а толщина —  $0,036 \pm 0,003$  мм (рис. 1в).

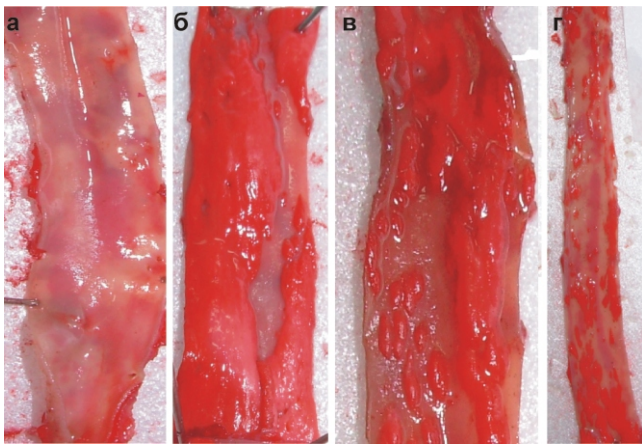


Рис. 1. Внутренняя поверхность аорты экспериментальных кроликов: а — интактных; б — на пике модели атеросклероза; в — после самопроизвольного регресса атеросклероза; г — после введения ПЭО-1500. Окраска суданом III,  $\times 10$ . Здесь и далее пояснения в тексте.

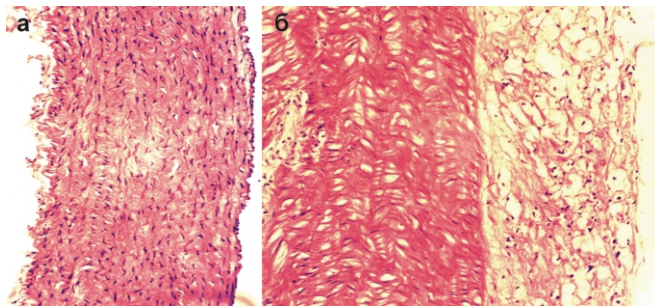


Рис. 2. Микропрепарат аорты кролика: а — интактного; б — на пике экспериментального атеросклероза. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 200$ .

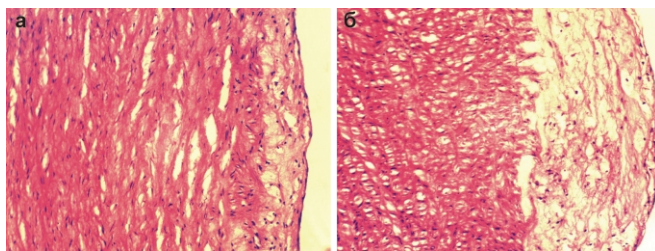


Рис. 3. Микропрепарат аорты кролика с очагом липоидоза после инкубации: а — в растворе ПЭО-1500; б — в физиологическом растворе. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 200$ .

У животных, которым вводили ПЭО-1500, ткани, выстилающие брюшную и грудную полости, имели бледно-розовый цвет, были эластичными и блестящими, количество жировой ткани, покрывающей внутренние органы, соответствовало физиологической норме. При этом площадь очагов липоидоза составляла  $32 \pm 12\%$  от общей площади фрагмента аорты, а среднее значение толщины очагов липоидоза, по данным гистологических исследований, составляло  $0,033 \pm 0,002$  мм. При этом края очагов липоидоза были сглаженные и нечеткие (рис. 1г).

Уменьшение площади очагов липоидоза аорты после применения ПЭО-1500 может быть обусловлено улучшением гемомикроциркуляции, в том числе и в сосудах *vasa vasorum*, через которые осуществляется обратный транспорт липидов из очага липоидоза. Кроме того, изменение текучести крови могло способствовать нормализации гемодинамики как в самой аорте, так и в сосудах других органов. В работе М.Б. Плотникова и соавт. [10] показано, что при ишемии миокарда высокомолекулярный полиэтиленоксид способен ограничивать агрегацию эритроцитов и вязкость крови, а также увеличивать скорость течения крови в турбулентном потоке, что особенно важно при наличии атеросклеротических изменений в сосудах, искажающих геометрию их внутренней поверхности. Не менее значимым фактором влияния полиэтиленоксида на атеросклеротические изменения в аорте экспериментальных животных предположительно может быть растворение жиров, которые, как известно, являются структурными элементами очагов липоидоза.

Последующее гистологическое исследование фрагментов аорты показало, что у животных на пике атеросклероза выявлялись обширные очаги липоидоза, состоящие из большого количества пенистых клеток. В подэндотелиальной соединительной ткани, а также в средней оболочке аорты находились эластические и коллагеновые волокна, образующие эластический каркас с окончатymi мембранами, ориентированными перпендикулярно поверхности аорты. Гладкомышечные клетки располагались по отношению к мембранам в косом направлении, чего обычно не наблюдается в аорте интактных животных. В расширенных просветах питающих сосудов (*vasa vasorum*), расположенных в средней оболочке аорты, в большом количестве обнаруживались моноциты и лимфоциты (рис. 2б).

При инкубации фрагментов аорты в растворе ПЭО-1500 (по сравнению с пиком модели атеросклероза, рис. 2б) было обнаружено уменьшение размеров и количества пенистых клеток в зонах атеросклеротического поражения предположительно за счет выхода из них липидов. Наблюдалось отсутствие ориентированных перпендикулярно поверхности аорты окончатых мембран

в эластическом каркасе подэндотелиальной соединительной ткани и средней оболочки аорты (рис. 3а). Возможно, такое влияние ПЭО на очаги липоидоза можно объяснить его способностью связываться с липид-белковыми комплексами [11]. Инкубация фрагмента аорты в физиологическом растворе не влияла на размер очага липоидоза (рис. 3б).

Морфометрический анализ очагов липоидоза аорты после инкубации в растворе ПЭО-1500 показал, что происходит достоверное уменьшение их толщины: среднее значение после инкубации фрагментов аорты в растворе ПЭО-1500 составляло  $0,027 \pm 0,002$  мм, а в физиологическом растворе —  $0,039 \pm 0,003$  мм, т.е. не отличалось от исходного (рис. 2б).

Таким образом, было установлено, что внутривенное введение животным с экспериментальным атеросклерозом раствора полиэтиленоксида с молекулярной массой 1500 не влияет на динамику показателей липидного обмена, но приводит к существенному уменьшению площади очагов липоидоза аорты. В эксперименте *in vitro* при инкубации фрагмента аорты с очагами липоидоза в растворе ПЭО-1500 происходило уменьшение их толщины и уменьшение в них количества пенистых клеток. Однако механизм антиатеросклеротического действия препарата требует дальнейшего изучения.

#### Список литературы

1. Талалаева Т.В., Амброскина В.В., Крячок Т.А., Братусь В.В. Системный характер порушень обміну ліпопротеїнів крові як основа патогенезу атеросклерозу. *Журнал академії медичних наук України*. 2007; 13(1): 45-64.
2. Пушкар Н.С., Шраго М.И., Белоус А.М., Калугин Ю.В. *Криопротекторы*. Киев: Наук. думка; 1978.
3. Чичканов С.В., Мягченков В.А. Эффект Томса — перспективные области применения. *Вестник Казанского технологического университета*. 2003; 2: 314-29.
4. Луговой В.И., Липина О.В., Мазалов В.К., Слета И.В. Влияние полиэтиленоксида на реологические свойства крови белых крыс при охлаждении. *Проблемы криобиологии*. 1995; 3: 37-40.
5. Климов А.Н., Никульчева Н.Г. *Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения*. СПб.: Питер Ком; 1999.
6. Непряхин Г.Г. Новый метод окраски Суданом красным липидов клеток и тканей различных органов. *Архив патологии*. 1979; XII(8): 57-8.

#### Сведения об авторах:

Липина Ольга Васильевна (Lipina O.V.), канд. биол. наук, ст. науч. сотр., Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины

Фалько Оксана Валерьевна (Falko O.V.), канд. биол. наук, науч. сотр., Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины

Прокопюк Ольга Степановна (Prokoryuk O.S.), доктор мед. наук, ст. науч. сотр., зав. отделом «Низкотемпературный банк биологических объектов» Института проблем криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины

Волина Виктория Васильевна (Volina V.V.), канд. биол. наук, ст. науч. сотр., Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины

7. Меркулов Г.А. *Курс патологистологической техники*. Л.: Медгиз; 1961.

8. Каркищенко Н.Н., Грачева С.В. *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях*. М.: Профиль; 2010.

9. Глянц Е.В. *Медико-биологическая статистика*. М.: Практика; 1998.

10. Плотников М.Б., Чернышева Г.А., Невзоров М.С., Саратиков А.С., Смолякова В.И. Гемореологические эффекты полиэтиленоксида у крыс с острой ишемией миокарда. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2003; 66(1): 37-9.

11. Нардид О.А., Цымбал Л.В., Гулевский А.К. Влияние криопротекторов на белок-липидные взаимодействия в мембранах эритроцитов. *Физико-химические процессы в криобиологических системах: сборник научных трудов*. Харьков. 1991; 102-6.

#### References

1. Talalaeva T.V., Ambroskina V.V., Krjachok T.A., Bratus' V.V. Systemic character of disorders in the blood lipoprotein metabolism as the basis of the atherosclerosis pathogenesis. *Zhurnal akademii medichnikh nauk Ukraini*. 2007; 13(1): 45-64. (in Ukraine)

2. Pushkar' N.S., Shrago M.I., Belous A.M., Kalugin Ju.V. *Cryoprotectants*. Kiev: Nauk. dumka; 1978. (in Russian)

3. Chichkanov S.V., Mjagchenkov V.A. Effect Toms — promising scope. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta*. 2003; 2: 314-29. (in Russian)

4. Lugovoi V.I., Lipina O.V., Mazalov V.K., Sleta I.V. The effect of polyethylene oxides on the blood rheological properties of white rats under cooling. *Problemy kriobiologii*. 1995; 3: 37-40. (in Russian)

5. Klimov A.N., Nikul'cheva N.G. *Exchange of lipids and lipoproteins and its disorders*. SPb.: Piter Kom; 1999. (in Russian)

6. Nepryakhin G.G. A new method for coloring of cells lipids and tissues of different organs by Sudan Red. *Arkhiv patologii*. 1979; XII (8): 57-8. (in Russian)

7. Merkulov G.A. *The course of pathohistological techniques*. Leningrad: Medgiz; 1961. (in Russian)

8. Karkishhenko N.N., Gracheva S.V. Manual for laboratory animals and alternative models in biomedical technology. М.: Profil'; 2010. (in Russian)

9. Glyanz E.V. *Biomedical Statistics*. М.: Praktika; 1998. (in Russian)

10. Plotnikov M.B., Chernyshova G.A., Nevzorov M.S., Saratikov A.S., Smolyakova V.I. Hemorheological effects of polyethyleneoxide in rats with acute myocardial infarction. *Jeksperimental'naja i klinicheskaja farmakologiya*. 2003; 66(1): 37-9. (in Russian)

11. Nardid O.A., Tsymbal L.V., Gulevskii A.K. Influence of cryoprotectants on the protein-lipid interactions in the membranes of red blood cells. *Fiziko-khimicheskie processy v kriobiologicheskikh sistemakh: sbornik nauchnykh trudov*. Khar'kov. 1991; 102-6. (in Russian)