

## Применение сыворотки плацентарной крови человека – перспективный метод коррекции атеросклеротических изменений (экспериментальное исследование)

UDC 611.018.54.013.8:616.13-004.6-092.4

O.V. FALKO

## Application of Human Placental Blood Serum as Perspective Method to Correct Atherosclerotic Changes (Experimental Study)

Показана возможность коррекции нарушений липидного обмена и восстановления структуры аорты у кроликов с экспериментальным атеросклерозом путем введения сыворотки плацентарной крови человека (СПКЧ). Было установлено, что применение СПКЧ увеличивает уровень антиатерогенной фракции липопротеидов в крови, снижает степень липоидоза аорты, а также восстанавливает целостность эндотелиального слоя.

**Ключевые слова:** модель атеросклероза, кролики, эндотелий аорты, сыворотка плацентарной крови человека, коррекция атеросклеротических нарушений, липопротеиды высокой плотности.

Показана можливість корекції порушень ліпідного обміну і відновлення структури аорти у кролів з експериментальним атеросклерозом шляхом введення сироватки плацентарної крові людини (СПКЛ). Було встановлено, що застосування СПКЛ збільшує рівень антиатерогенної фракції ліпопротеїдів в крові, знижує ступінь ліпоїдозу аорти, а також відновлює цілісність ендотеліального шару.

**Ключові слова:** модель атеросклерозу, кролі, ендотелій аорти, сироватка плацентарної крові людини, корекція атеросклеротичних порушень, ліпопротеїди високої щільності.

There was demonstrated the possibility to correct the lipid metabolism disorders and to recover an aortic structure in rabbits with experimental atherosclerosis by administration of human placental blood serum (HPBS). The HPBS application has been established to increase the level of antiatherogenic fraction of lipoproteins in blood, to reduce the rate of aortic lipoidosis, as well as to recover the integrity of endothelial layer.

**Key words:** atherosclerosis model, rabbits, aortic endothelium, human placental blood serum, correction of atherosclerotic disorders, high density lipoproteins.

Практика борьбы человечества с атеросклерозом имеет более чем двухвековую историю. Однако, несмотря на существующий мощный арсенал препаратов, обладающих антиатерогенным действием, результаты лечения этой патологии остаются неудовлетворительными. Атеросклероз занимает лидирующее положение в структуре сердечно-сосудистых заболеваний, а тяжелые формы его осложнений лидируют среди общей патологии и являются сложной социально-экономической проблемой [7, 9].

Современная концепция атеросклероза объясняет причины неудовлетворительных результатов лечения. Патогенез атеросклероза сложен и неоднозначен, традиционные схемы его лечения, которые существуют на сегодняшний день, оказывают в большинстве случаев только гиполлипидемическое действие, тогда как ведущему патогенетическому звену атеросклероза – нарушению целостности и проницаемости эндотелия не уделяется

The practice of the mankind fighting against atherosclerosis has counted more than two centuries' history. However, despite the powerful arsenal of drugs with antiatherogenic effect the results of this pathology treatment have still remained unsatisfactory. The atherosclerosis is a leader in the structure of cardiovascular diseases and its severe complications dominate among the general pathology and are the complex social and economic problem [7, 9].

The modern concept of atherosclerosis explains the reasons of unsatisfactory results of treatment. The pathogenesis of atherosclerosis is complex and ambiguous, the traditional protocols for its treatment, existing today cause in the most cases only hypolipidemic effect, while the leading pathogenetic link of atherosclerosis, that is the disorder of endothelial integrity and permeability has still remained without sufficient attention, not allowing the achieving of a complete rehabilitation of the patients [14, 18, 19, 21].

Институт проблем криобиологии и криомедицины  
НАН Украины, г. Харьков

\*Адрес для корреспонденции: ул. Переяславская, 23, г. Харьков,  
Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-42-84, факс: (+38 057) 373-  
30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

\*Address for correspondence: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov,  
Ukraine 61015; tel.:+380 57 373 4284, fax: +380 57 373 3084,  
e-mail: cryo@online.kharkov.ua

достаточного внимания, что не позволяет добиться полной реабилитации больных [14, 18, 19, 21].

Таким образом, лечение атеросклероза является сложной проблемой, а поиск новых нестандартных подходов к его лечению остается актуальным.

В последнее десятилетие все большее внимание клиницистов привлекают препараты плацентарного происхождения. Применение таких препаратов в клинике позволяет значительно повысить эффективность терапии заболеваний, при которых ведущим патогенетическим звеном является нарушение функционирования сердечно-сосудистой системы [4, 14, 15].

Целесообразность применения сыворотки плацентарной крови человека (СПКЧ) базируется на наличии в ней широкого спектра биологически активных веществ, синтезируемых плацентой во время беременности (гормоны, ферменты, интерлейкины, ростовые факторы и др.), которые реализуют комплексное биологическое действие при различных патологиях [1, 2, 11, 17].

Цель данной работы – изучить действие СПКЧ на липидный обмен и аорту животных с экспериментальным атеросклерозом.

### Материалы и методы

Эксперимент выполнен на беспородных 24-месячных кроликах-самцах массой 3500–5000 г ( $n = 29$ ). Для моделирования атеросклероза по методике, предложенной Н.Н. Аничковым и С.С. Халатовым [5], животным вводили *per os* по 200 мг/кг холестерина (Петербургский завод медицинских препаратов, Россия) в сутки 6 раз в неделю в течение 6 месяцев.

Для мониторинга состояния организма животных, начиная с первого месяца эксперимента и затем ежемесячно в течение всего эксперимента, исследовали показатели липидного обмена в сыворотке крови животных: общий холестерин (ОХ), триглицериды (ТГ), холестерин липопротеидов высокой плотности (ЛПВП, антиатерогенная фракция) – при помощи биохимических диагностических наборов реагентов («Диакон-ДС», Россия). Холестерин липопротеидов низкой плотности (ЛПНП, атерогенная фракция) и индекса атерогенности (ИА) рассчитывали по формулам: ЛПНП = ОХ – (ЛПВП + (ТГ/2,18)); ИА = ОХ – ЛПВП/ЛПВП [4].

Для определения степени выраженности атеросклеротического поражения аорты была проведена планиметрическая оценка степени и распространенности очагов липоидоза в интимальной оболочке грудного отдела аорты. Для этого фрагменты аорты животных выделяли на участке от дуги до бифуркации на бедренные артерии, фикси-

Thus, the atherosclerosis treatment is a complex problem and the search for the new innovative approaches for its treatment has continued to be actual.

In the recent decade, much more attention of clinicians has been paid to the preparations of placental origin. The use of such preparations in clinic enables a significant improvement of therapy efficiency for such diseases, when the leading pathogenetic link is the disorder of cardiovascular system functioning [4, 14, 15].

The expediency of using the human placental blood serum (HPBS) is based on the presence in its of a wide range of biologically active substances, synthesized by placenta during pregnancy (hormones, enzymes, interleukins, growth factors, *etc.*), implementing a combined biological effect under various pathologies [1, 2, 11, 17].

The aim of this research was to study the HPBS effect on lipid metabolism and aorta of animals with experimental atherosclerosis.

### Materials and methods

The experiment was performed in breedless 24-month-old male rabbits weighing 3500–5000 g ( $n = 29$ ). To model atherosclerosis by the method proposed by Anichkov N.N. and Khalatov S.S. [5], the animals received *per os* by 200 mg/kg of cholesterol (St. Petersburg Plant of Medicine Products, Russia) per day 6 times a week for 6 months.

To monitor the state of animal organism starting from the first month of experiment and then monthly throughout the whole experiment, we investigated the indices of lipid metabolism in animal blood serum such as: total cholesterol (TC), triglycerides (TG), cholesterol of high density lipoprotein (HDLP, antiatherogenic fraction), using the biochemical diagnostic reagent kits (Diakon-DS, Russia). Cholesterol of low density lipoprotein (LDLP, atherogenic fraction) and atherogenic index (AI) were calculated by the formula: LDLP = TC – (HDLP + (TG /2.18)); AI = TC – HDLP/HDLP. [4]

To determine the manifestation rate of aortic atherosclerotic lesions there was performed a planimetric evaluation of the degree and spread of lipoidosis foci in intimal membrane of thoracic aorta. For this purpose the aortic fragments of animals were isolated in the area from the arc to bifurcation onto the femoral arteries, then fixed in 10% formalin solution, and stained with Sudan III by the method [12]. The area of lipoidosis foci was counted and expressed in percentage of total area of damage. Morphometric software Biovision 3.0 was used for the area calculation. The aortas were imaged with a digital camera Nikon D-101 (Germany).

For morphological study of endothelium the aortic fragments after animal removal from the experiment

рвали в 10%-м растворе формалина, после чего окрашивали суданом III [12]. Подсчитывали площадь очагов липоидоза и выражали ее в процентах от общей площади аорты. Для подсчета площади использовали морфометрическую программу Bio-vision 3.0. Фотосъемку аорты проводили цифровым фотоаппаратом Nikon D-101 (Япония).

Для морфологического исследования эндотелия фрагменты аорты после выведения животного из эксперимента выделяли на расстоянии 10 мм ниже дуги аорты, так как известно, что преимущественная локализация атеросклеротических поражений отмечается там, где особенно выражено действие таких гемодинамических факторов, как артериальное давление, турбулентность тока крови, удар пульсовой волны, способствующих повреждению эндотелия [6].

Фрагменты аорты после префиксации и отсепа-рования адвентиции импрегнировали азотнокислым серебром по стандартной методике [8]. Для изготовления препаратов импрегнированные серебром фрагменты аорты заключали в глицерин-желатиновую смесь и изучали в проходящем свете под световым тринокулярным микроскопом XSP-139 Тр (Япония). При таком методе исследования межклеточные границы в эндотелиальном моно-слое выглядят как тонкие, черно-серого цвета линии, отграничивающие смежные клетки одну от другой.

Плацентарную кровь получали из родильного отделения роддома № 1 г. Харькова на основании письменного информированного согласия рожениц. После получения кровь находилась при комнатной температуре не более 4 ч, затем ее помещали в холодильник при температуре 4–6°C на 6–8 ч для максимального сжатия образовавшегося сгустка и отделения жидкой фракции крови. После центрифугирования образцов при 2500 об/мин (центри-фуга ОС-6М, Кыргызская республика) в течение 15 мин СПКЧ отделяли и помещали в криопробирки («Corning», Мексика) объемом 1 мл. Замораживали образцы в морозильной камере при неконт-ролируемом медленном понижении температуры в образце (со скоростью 1–2 град/мин) до –20°C [20]. Размораживали образцы СПКЧ на водяной бане при температуре 37°C, после чего ее вводили животным в дозе 0,3 мл в течение 10 дней. Дозу вводимой СПКЧ рассчитывали согласно методике О.В. Стефанова [16].

После достижения пика модели (6 месяцев хол-лестериновой диеты) животные были разделены на следующие группы: 1-я – интактные животные (конт-роль),  $n = 8$ ; 2-я – животные с моделью атероскле-роза (пик модели),  $n = 7$ ; 3-я – животные с само-

were isolated at 10 mm distance below aortic arch, since the primary localization of atherosclerotic lesions was known as being observed where the effect of such hemodynamic factors as blood pressure, blood flow turbulence, pulse wave beat, contributing to endo-thelial damage, was especially pronounced [6].

The aortic fragments after pre-fixation and adventitia separation were impregnated with silver nitrate according to the standard procedure [8]. To prepare the preparations the impregnated with silver aortic fragments were placed into glycerol-gelatin mixture and studied with transmitted light under light trinocular microscope XSP-139 Тр (Japan). With this method of study the intercellular boundaries in endothelial mono-layer appear as thin, black and gray lines, separating the adjacent cells from one another.

Placental blood was obtained from the Labour Department of Kharkov Maternity Hospital №1, with written informed consent of women in labour. After procurement the blood was kept at room temperature up to 4 hours, then placed into refrigerator at 4–6°C for 6–8 hrs for maximum compression of the formed clot and liquid blood fraction separation. After centri-fugation of the samples at 2,500 rpm (centrifuge OS-6M, Kyrgyz Republic) for 15 min the HPBS was sepa-rated and placed into 1 ml cryovials (Corning, Mexico). The samples were frozen in a freezer under uncont-rolled slow temperature decrease in the sample (with 1–2 degree/min rate) down to –20°C [20]. The HPBS samples were thawed in a water bath at 37°C, after that it was introduced to animals in 0.3 ml dose during 10 days. The dose of the introduced HPBS was calcu-lated according to the method of Stefanov O.V. [16].

After achieving the model peak (6 months of cholesterol diet) the animals were divided into the following groups: the group 1 comprised the intact ani-mals (control),  $n = 8$ ; the group 2 consisted of the ani-mals with atherosclerosis model (the model peak),  $n = 7$ ; in the group 3 were the animals with spontaneous regression,  $n = 7$ ; the group 4 comprised the animals, received HPBS in the mentioned dose after reaching the atherosclerosis model peak,  $n = 7$ .

The animals of groups 3 and 4 were removed from the experiment in 6 months after cholesterol diet termination.

The experiments in animals were done according to the General Principles of Experiments in Animals, approved by the 3<sup>rd</sup> National Congress in Bioethics (Kiev, 2007) and agreed to the statements of the Euro-pean Convention for the Protection of Vertebrate Ani-mals Used for Experimental and Other Scientific Pur-poses (Strasbourg, 1986).

The experimental data were statistically processed using the Mann-Whitney test and Excel software [3].

произвольным регрессом,  $n = 7$ ; 4-я – животные, которым после достижения пика модели атеросклероза вводили СПКЧ в указанной дозе,  $n = 7$ .

Животных групп 3 и 4 выводили из эксперимента через 6 месяцев после отмены холестериновой диеты.

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 [3].

### Результаты и обсуждение

Проведенные биохимические исследования показали, что кормление животных холестерином на протяжении 6 месяцев приводило к гиперхолестеринемии (табл. 1).

К пику модели уровень общего холестерина увеличивался более чем в 20 раз, триглицеридов – в 10–16 раз и ЛПНП – почти в 40 раз по отношению к интактным животным. При этом уровень антиатерогенной фракции липопротеидов высокой плотности на протяжении всего срока моделирования атеросклероза превышал исходные значения не более чем в 2 раза, что может указывать на повреждающее действие высокого уровня холестерина в крови на функциональную активность печени животных, в которой главным образом происходит синтез ЛПВП [6]. Показатель ИА увеличился в 20 раз, что указывает на выраженность изменений в организме животных, вызванных гиперхолестеринемией.

В первый месяц наблюдения после достижения пика модели и отмены холестериновой диеты было показано, что у животных групп 3 и 4 происходило снижение уровня ОХ, ТГ и ЛПНП. Концентрация антиатерогенной фракции липопротеидов высокой плотности в группе 3 по-прежнему оставалась низкой, введение СПКЧ повышало уровень ЛПВП, который сохранялся до 3-х месяцев приводя к снижению ИА, что указывало на нормализацию соотношения между атерогенными и антиатерогенными фракциями липопротеидов (табл. 2).

### Results and discussion

The performed biochemical studies demonstrated the animal feeding with cholesterol within 6 months as resulting to hypercholesterolemia (Table 1).

By the model peak the levels of total cholesterol, triglycerides and LDLP increased by more than 20, 10-16 and almost 40 times, correspondingly, compared to the intact animals. In this case the level of antiatherogenic fraction of high density lipoproteins throughout the whole term of atherosclerosis modeling exceeded the initial values by no more than twice, that might indicate the damaging effect of high cholesterol level on functional activity of animal liver, where HDLP synthesis mostly occurred [6]. The AI index augmented by 20 times, that indicated the intensity of changes in animal organism, caused by hypercholesterolemia.

Within the first month of observation after achieving the model peak and cholesterol diet cancellation there was shown a decrease in TC, TG and LDLP levels in the animals of groups 3 and 4. The concentration of antiatherogenic fraction of high density lipoproteins in group 3 continued to be low, the HPBS introduction increased the HDLP level, that was kept up to 3 months, by resulting in AI reduction, that suggested to the normalization of relations between atherogenic and antiatherogenic lipoprotein fractions (table 2).

Thus, in 1 month after HPBS introduction there was a redistribution of lipoproteins in rabbit blood serum towards an increase in their antiatherogenic fraction, that, we believed, could stipulate one of the mechanisms of HPBS antiatherogenic effect.

Some scientists believe a local disorder in the integrit and permeability of aortic endothelial layer as

**Таблица 1.** Показатели липидного обмена в процессе моделирования экспериментального атеросклероза у кроликов

**Table 1.** Indices of lipid metabolism during experimental atherosclerosis modeling in rabbits

Срок введения холестерина, месяц Term of cholesterol introduction, months	ОХ, моль/л TC, mol/l	ЛПВП, моль/л HDLP, mol/l	ТГ, моль/л TG, mol/l	ЛПНП, моль/л LDLP, mol/l	ИА, усл. ед AI, arb. units
Интактные животные Intact animals	0,6 ± 0,08	0,3 ± 0,05	0,4 ± 0,11	0,12 ± 0,05	1,0
1	0,7 ± 0,11	0,3 ± 0,02	0,4 ± 0,13	0,22 ± 0,08	1,3
2	1,0 ± 0,10	0,4 ± 0,06	0,8 ± 0,17	0,24 ± 0,07	1,5
5	5,0 ± 0,13*	0,5 ± 0,04	5,2 ± 0,20*	2,14 ± 0,14*	9,0
6 (пик модели/ peak of the model)	14,7 ± 1,34*	0,7 ± 0,10	6,4 ± 0,15*	11,09 ± 1,21*	20,0

**Примечание:** \* – достоверность отличий ( $p \leq 0,05$ ) по отношению к группе интактных животных.

**Note:** \* denotes statistical significance of the differences ( $p \leq 0.05$ ) in respect of the group of intact animals.



**Таблица 2.** Динамика показателей липидного обмена у животных с экспериментальным атеросклерозом  
**Table 2.** Dynamics of lipid metabolism indices in animals with experimental atherosclerosis

Период наблюдения Observation term	ОХ, моль/л TC, mol/l		ЛПВП, моль/л HDL, mol/l		ТГ, моль/л TG, mol/l		ЛПНП, моль/л LDLP, mol/l		ИА AI	
	Группа 3 Group 3	Группа 4 Group 4	Группа 3 Group 3	Группа 4 Group 4	Группа 3 Group 3	Группа 4 Group 4	Группа 3 Group 3	Группа 4 Group 4	Группа 3 Group 3	Группа 4 Group 4
Пик модели Peak of the model	14,7 ± 1,34		0,7 ± 0,10		6,4 ± 0,15		11,09 ± 1,21		20,0	
1 мес. после пика 1 month post peak	9,3 ± 0,8*	8,3 ± 0,48*	0,5 ± 0,08	3,4 ± 0,05*	2,5 ± 0,07*	3,3 ± 0,13*	7,7 ± 0,22*	3,4 ± 0,35*	17,6	1,4*
3 мес. после пика 3 months post peak	5,2 ± 0,07*	4,2 ± 0,12*	0,5 ± 0,09	2,7 ± 0,09*	1,7 ± 0,03*	1,9 ± 0,14*	3,9 ± 0,25*	0,64 ± 0,28*	9,4*	0,5*
6 мес. после пика 6 months post peak	0,6 ± 0,07*	0,6 ± 0,08*	0,3 ± 0,07	0,4 ± 0,04	0,3 ± 0,08*	0,3 ± 0,19*	0,16 ± 0,08*	0,06 ± 0,04*	1,0*	0,5

**Примечание:** \* – достоверность отличий ( $p \leq 0,05$ ) по отношению к данным для пика модели.

**Note:** \* denotes statistical significance of the differences ( $p \leq 0.05$ ) in respect of the model peak.

Таким образом, через 1 месяц после введения СПКЧ происходило перераспределение липопротеидов в сыворотке крови кроликов в сторону увеличения их антиатерогенной фракции, что, по нашему мнению, и могло обусловить один из механизмов антиатерогенного действия СПКЧ.

По мнению ряда исследователей, процессам, инициирующим и (или) ускоряющим атерогенез, способствует локальное нарушение целостности и проницаемости эндотелиального слоя аорты [21–24]. Эндотелий артерий, являющийся единственным клеточным барьером на пути транспорта липопротеидов в интиму, играет важную роль в формировании атеросклеротических бляшек. Гипотеза о «реакции в ответ на повреждение» была экспериментально доказана [9, 25–27]. Согласно этой гипотезе в местах повреждений эндотелия происходят массивное оседание тромбоцитов, их разрушение с выходом тромбоцитарного фактора роста, вызывающего пролиферацию гладкомышечных клеток (ГМК) стенки сосуда с последующим их перерождением, и формирование атеросклеротической бляшки.

В качестве адекватной прогностической характеристики, с помощью которой можно оценить морфологическое состояние эндотелиального слоя аорты, а также его пролиферативный потенциал, нами был выбран метод подсчета смежности клеток эндотелия аорты кроликов при экспериментальном атеросклерозе в гистологических препаратах. Поскольку эндотелий сосудов является типичным представителем двухмерной ткани, к нему можно

вносящий вклад в процессы, которые инициируют и (или) ускоряют атерогенез [21–24]. Эндотелий артерий, являющийся единственным клеточным барьером на пути транспорта липопротеина к интиме, играет важную роль в формировании атеросклеротической бляшки. Гипотеза о «реакции на повреждение» была экспериментально доказана [9, 25–27]. Согласно этой гипотезе в местах повреждений эндотелия происходят массивное оседание тромбоцитов, их разрушение с выходом тромбоцитарного фактора роста, вызывающего пролиферацию гладкомышечных клеток (ГМК) стенки сосуда с последующим их перерождением, и формирование атеросклеротической бляшки.

As an adequate prognostic feature, which may be used to assess a morphological state of aortic endothelial layer, as well as its proliferative potential, we have chosen the method of calculating the adjacency of aortic endothelial cells of rabbits under experimental atherosclerosis in histological preparations. Since the vascular endothelium is a typical representative of two-dimensional tissue, the principle of adjacency counting may be applied to it. The cell adjacency, *i.e.* a number of neighboring cells, to which this cell is in a contact independently on its geometric shape and size, is one of the main parameters used in analyzing the tissue structure. The difference of cells by the adjacency is known to be limited by the interval from 4 to 8, *i.e.* the cells with the adjacency  $< 4$  and  $> 8$  are almost never seen in undamaged tissues. An average adjacency of cells in tissue with a high accuracy equals to that in cells, being the most numerous (50%) among those of the studied tissue [10].

применить принцип подсчета смежности. Смежность клеток – число соседних клеток, с которыми данная клетка имеет контакт независимо от ее геометрической формы и размеров, – является одним из основных параметров, которые используются при анализе структуры ткани. Известно, что различие клеток по смежности ограничивается интервалом от 4 до 8, т. е. клетки со смежностью меньшей 4 и большей 8 практически не встречаются в неповрежденных тканях. Средняя смежность клеток в ткани с большой точностью равна той, которую имеют клетки наиболее многочисленные (около 50%) среди клеток исследуемой ткани [10].

Принцип смежности состоит в том, что контакты между соседними клетками не могут полностью исчезать, а новые контакты появляются только между дочерними клетками в процессе деления. Данные о распределении делящихся клеток по смежности свидетельствуют о том, что большинство делящихся клеток составляют клетки со смежностью, равной 7 (около 50% клеток). Механизм сохранения однородности ткани при делении состоит в следующем: 1) вероятность поделиться для клетки пропорциональна ее смежности; 2) клетки со смежностью меньшей 6 «притягивают на себя» плоскости деления от соседних делящихся клеток [10].

У интактных животных в препаратах аорты, импрегнированной серебром, эндотелиальные клетки имели полигональную форму, были однотипны и однородны по морфологическому строению. На обширных просмотренных площадях преобладал пласт вытянутых однотипных клеток, ориентированных по длиннику сосуда, с четкими равномерными аргирофильными контурами, без повреждений (в норме допустимо небольшое количество стигмат в виде округлых темных образований между клетками), тромбов или адгезированных клеток крови (рис. 1). Средняя смежность клеток в эндотелиальном монослое составляла 6.

Стигматы и кратеры представляют собой каналцы, имеющие клапаноподобные отверстия на границе эндотелиальных клеток, через которые осуществляется питание бессосудистых слоев стенки артерий путем диффузии компонентов плазмы. Увеличение числа стигмат и кратеров, количества аргирофильных клеток и очагов десквамации можно расценивать как проявление морфологической дисфункции эндотелиоцитов.

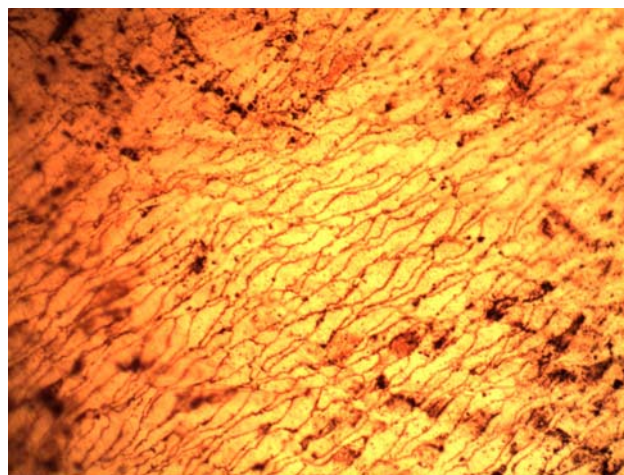
У животных группы 2 (пик модели) на препаратах аорты, импрегнированной серебром, обнаруживались обширные участки десквамации эндотелия. В сохранившихся эндотелиальных клетках наблюдалась гетерогенность по площади, имела место потеря ориентации по длиннику сосуда, обнаруживались микродефекты клеток и межклеточных

The adjacency principle consists in the fact, that the contacts between neighboring cells can not completely disappear, and new contacts appear only between the daughter cells during division. The data about distribution of dividing cells by adjacency suggest that the majority of dividing cells are those with the adjacency, equal to 7 (about 50% of cells). The mechanism of tissue uniformity preservation during fission is the following: 1) the probability for a cell to divide is proportional to its adjacency; 2) the cells with adjacency  $< 6$  'attract upon themselves' the division planes from the adjacent dividing cells [10].

In intact animals in aortic preparations impregnated with silver, the endothelial cells were of a polygonal shape, had similar uniform morphological structure. The layer of elongated similar cells, oriented in longitudinal axis of vessel, with distinct uniform argyrophil boundaries without damages (normally allowed a small amount of stigma in the form of rounded dark formations between cells), blood clots or adherent blood cells, predominated in the vast viewed areas (Fig. 1). The average cell adjacency in endothelial monolayer was 6.

Stigmas and craters represent the tubules with valve-like holes on the boundary of endothelial cells, through which the nutrition of nonvascular layers of arterial wall is implemented via diffusion of plasma components. An increased number of stigmas, craters and argyrophil cells and desquamation foci may be envisaged as the manifestation of morphological dysfunction in endotheliocytes.

In the animals of group 2 (model peak) in the silver-impregnated aortic preparations, there were found the large sites of endothelial desquamation. In the preser-



**Рис. 1.** Препарат грудной аорты интактных животных. Эндотелий участка неповрежденной интимы аорты. Импрегнация серебром. Световая микроскопия,  $\times 400$ .

**Fig. 1.** Preparation of thoracic aorta in intact animals. Endothelium of the site in undamaged aortic intima. Silver impregnation. Light microscopy,  $\times 400$ .



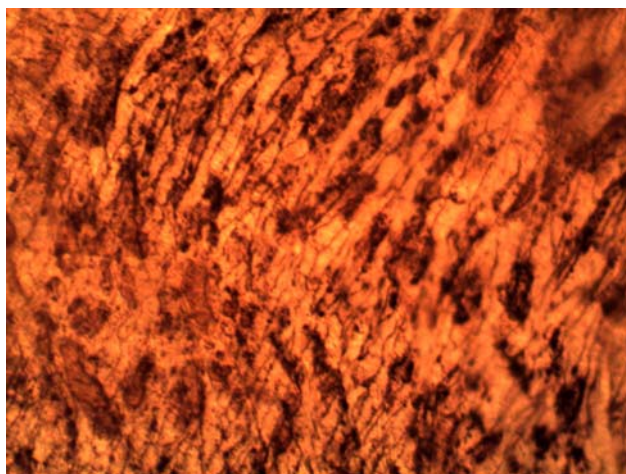
контактов, а также полиморфизм клеток. Наблюдались множество аргирофильных клеток, кратеров, стигматов и стоматов (рис. 2). Средняя смежность клеток в эндотелиальном монослое составляла 3.

У животных с самопроизвольным регрессом атеросклероза после отмены холестериновой диеты на препаратах аорты, импрегнированной серебром, обнаруживались обширные участки с полной десквамацией эндотелия. На больших просмотренных площадях наблюдались слабоаргирофильные ГМК с многочисленными адгезированными клетками крови (рис. 3).

У животных группы 4 через 6 месяцев после введения СПКЧ на препаратах аорты, импрегнированной серебром, обнаруживались обширные участки с полностью восстановившимся эндотелием (рис. 4).

Следует отметить, что морфологические характеристики восстановленных участков эндотелиального слоя аорты в этой группе отличались от таковых в группе интактных животных. Эндотелиоциты более вытянуты, имеют большую площадь и извилистые межэндотелиальные границы, что может указывать на пролиферативный потенциал готовых к делению эндотелиоцитов [9, 20]. Встречались единичные слабоаргирофильные ГМК.

Показателем, с помощью которого можно определить степень повреждения аорты при экспериментальном атеросклерозе, а также оценить интен-



**Рис. 3.** Препарат грудного отдела аорты животных с самопроизвольным регрессом экспериментального атеросклероза (6 мес. после пика модели). Десквамация эндотелия аорты. Импрегнация серебром. Световая микроскопия,  $\times 400$ .

**Fig. 3.** Preparation of thoracic aorta of animals with spontaneous regression (6 month after peak of model). Desquamation of aortic endothelium. Silver impregnation. Light microscopy,  $\times 400$ .



**Рис. 2.** Эндотелий грудного отдела аорты животных на пике модели атеросклероза. Импрегнация серебром. Световая микроскопия,  $\times 400$ .

**Fig. 2.** Endothelium of thoracic aorta in animals at atherosclerosis model peak. Silver impregnation. Light microscopy,  $\times 400$ .

ved endothelial cells there was observed the heterogeneity by the area, there was present a loss of orientation by longitudinal axis of the vessel, the microdefects of cells and intercellular contacts, as well as cell polymorphism were revealed. Many argyrophil cells, craters, stigmas and stomas were observed (Fig. 2). The average cell adjacency in endothelial monolayer was equal to 3.

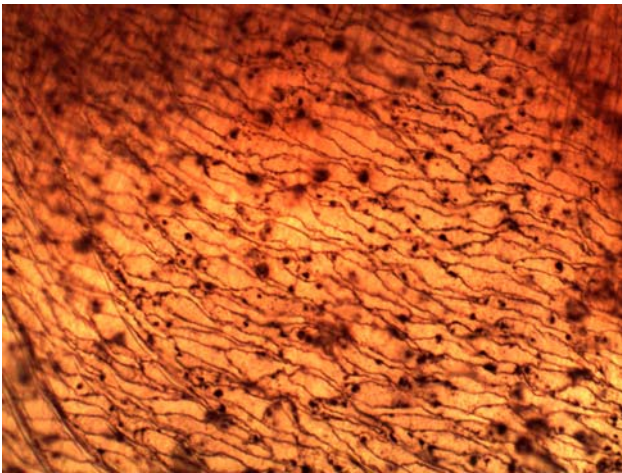
The large areas with complete endothelial desquamation were revealed on the aortic preparations impregnated with silver in animals with spontaneous atherosclerosis regression after cholesterol diet cancellation. Slightly argyrophil SMCs with numerous adherent blood cells were observed in large viewed areas (Fig. 3).

In the animals of groups 4 in 6 months after HPBS introduction the large sites with completely recovered endothelium were observed on the silver-impregnated aortic preparations (Fig. 4).

Of note is the fact, the the morphological characteristics of recovered sites of endothelial aortic layer in this group differed from those in the group of intact animals. Endothelial cells were more elongated, with higher area and twisting interendothelial boundaries, that might indicate the proliferative potential of endothelial cells ready to divide [9, 20]. There were single slightly argyrophil SMCs.

The lipidosis area is the index, by means of which one may determine the extent of aorta damage in experimental atherosclerosis, and assess the intensity sanogenetic mechanisms as well.

When studying aorta in intact animals a light pink smooth shiny surface was determined, while neither



**Рис. 4.** Препарат грудного отдела аорты животных с экспериментальным атеросклерозом после введения СПКЧ (6 мес. после пика модели). Восстановившиеся участки эндотелия аорты. Импрегнация серебром. Световая микроскопия,  $\times 400$ .

**Fig. 4.** Preparation of thoracic aorta of animals with experimental atherosclerosis after HPBS administration (6 months after peak of model). Reco-vered sites of aortic endothelium. Silver impregnation. Light microscopy,  $\times 400$ .

сивность саногенетических механизмов, является площадь липоидоза.

Интима аорты интактных животных имела бледно-розовую гладкую блестящую поверхность (рис. 5, А).

Исследование аорты на пике развития модели выявило наличие очагов липоидоза. Площадь поражения грудного отдела аорты составила 65–70% (рис. 5, В). Через 6 месяцев после отмены холестериновой диеты распространенность очагов липоидоза у животных с самопроизвольным регрессом составляла 40%, т. е. ниже, чем у животных на пике модели (рис. 5, С). Через 6 месяцев после введения СПКЧ распространенность липоидоза составила 12%, что почти в 3 раза меньше, чем в группе самопроизвольного регресса (рис. 5, D).

Возможным механизмом, при помощи которого можно объяснить снижение степени липидной инфильтрации паренхимы надпочечников и степени липоидоза аорты после введения СПКЧ, является увеличение уровня антиатерогенной фракции липопротеидов в крови животных с экспериментальным атеросклерозом, что могло приводить к так называемому обратному транспорту холестерина с мест его откладывания в кровеносное русло [6].

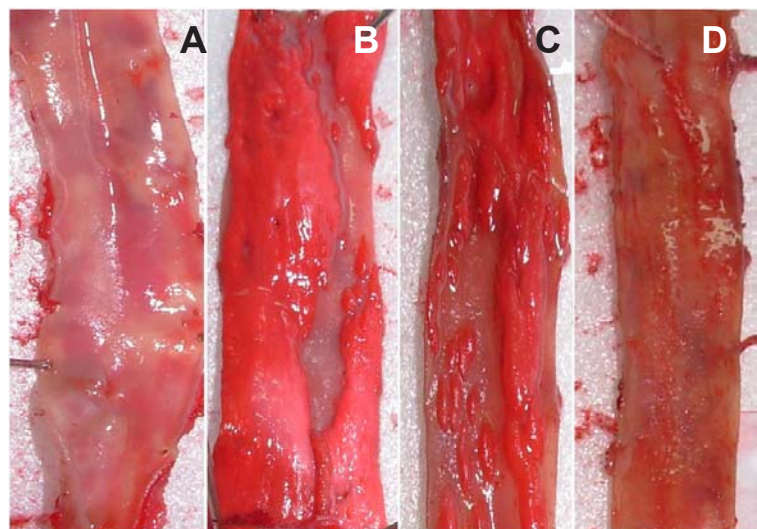
lipidosis foci nor other damages were present (Fig. 5A).

The study of aorta at the peak of model development revealed the presence of lipidosis foci. The damage area of thoracic aorta was 65–70% (Fig. 5B). Six months after cholesterol diet canceling the spread of lipidosis foci in animals with spontaneous regression was 40%, *i. e.* lower than in those at the model peak (Fig. 5C). Six months after HPBS introduction the lipidosis spread was 12%, that was almost thrice lower than in the group with spontaneous regression (Fig. 5D).

A possible mechanism by means of which we can explain a decrease in a degree of lipid infiltration of adrenal parenchyma and that of aortic lipidosis after HPBS administration is the augmentation of level of antiatherogenic lipoprotein fractions in blood of animals with experimental atherosclerosis, that might result in a so-called reverse cholesterol transport from the sites of its deposition in bloodstream [6].

Previously the HPBS introduction into laboratory animals was demonstrated to cause the strengthening of vascularity and reparation processes in tissues [1, 15, 17]. It is known that the reparation inhibition of vascular wall elements plays a significant role in atherogenesis maintenance [7, 9, 18]. The obtained effects of HPBS action under experimental atherosclerosis in rabbits are possibly realized by increasing the intensity of reducing processes in the tissue structure of target organs.

The mentioned above enables suggesting that SPBS has a corrective potential in respect of disorder in lipid



**Рис. 5.** Распределение очагов липоидоза в аорте кроликов; А – интакт (группа 1); В – пик модели (группа 2); С – самопроизвольный регресс (группа 3); D – введение СПКЧ (группа 4).

**Fig. 5.** Spread of lipidosis foci in rabbit aorta: A – intact (group 1); B – the model peak (group 2); C – spontaneous regression (group 3); D – HPBS introduction (group 4).



Ранее было показано, что введение СПКЧ лабораторным животным вызывает усиление процессов васкуляризации и репарации в тканях [1, 15, 17]. Известно, что в поддержании атерогенеза значительную роль играет угнетение репарации элементов сосудистой стенки [7, 9, 18]. Полученные эффекты действия СПКЧ при экспериментальном атеросклерозе у кроликов, возможно, реализуются за счет усиления интенсивности восстанавливающих процессов в структуре ткани органов мишеней.

Вышеизложенное позволяет предположить, что СПКЧ обладает корригирующим потенциалом в отношении нарушения липидного спектра и состояния аорты у животных с экспериментальным атеросклерозом. Однако изучение механизма действия СПКЧ при атеросклерозе требует дальнейших исследований.

### Выводы

1. Введение сыворотки плацентарной крови человека кроликам с экспериментальным атеросклерозом приводит к перераспределению липопротеидов в сыворотке крови животных в сторону увеличения антиатерогенной фракции липопротеидов (ЛПВП).

2. Установлено, что через 6 месяцев после введения СПКЧ животным с экспериментальным атеросклерозом наблюдается восстановление целостности эндотелиального слоя аорты.

3. Обнаружено, что введение СПКЧ кроликам с моделью атеросклероза приводит к значительному снижению площади очагов липоидоза в аорте в сравнении с группой самопроизвольного регресса атеросклероза.

*Автор выражает благодарность заведующей виварием ИПК и К Бацуновой Л.В., сотрудникам отдела НТББО с.н.с. Волиной В.В., с.н.с. Литиной О.В., заведующей отдела НТББО с.н.с. Прокопюк О.С. за помощь, оказанную при проведении работы.*

### Литература

1. Васильюк М.Д., Шевчук С.І., Романишин С.І. та ін. Трансплантація кріоплацентарних тканин у лікуванні та попередженні виникнення синдрому діабетичної стопи // Трансплантологія. – 2003. – Т. 4, №1. – С. 134–135.
2. Волина В.В., Липина О.В., Фалько О.В. и др. Патогенетическое значение криоконсервированной сыворотки плацентарной крови при экспериментальном атеросклерозе // Аллергология и иммунология. – 2011. – Т. 4, №1. – С. 55.
3. Глянц Е.В. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
4. Грищенко В.И., Юрченко Т.Н. Плацента: криоконсервирование, структура, свойства, перспективы клинического применения. – Харьков, 2011. – 292 с.
5. Зайков Н.Н., Быць Ю.В., Атаман А.В. и др. Патологическая физиология. – Киев, 1996. – 644 с.

spectra and aortic state in animals with experimental atherosclerosis. However, the study of HPBS effect mechanism under atherosclerosis requires further research.

### Conclusions

1. The introduction of human placental blood serum into rabbits with experimental atherosclerosis results in a redistribution of lipoproteins in animal blood serum towards an increase of antiatherogenic lipoprotein fraction (HDLP).

2. It was established, that 6 months later HPBS administration into the animals with experimental atherosclerosis the recovery of integrity in aortic endothelial layer was observed.

3. The HPBS introduction into the rabbits with atherosclerosis model was revealed as resulting in a significant reduction in the area of lipidosis foci in aorta, compared with the group of spontaneous regression of atherosclerosis.

*The author is grateful to Batsunova L.V., Head of the vivarium of the Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, to colleagues of the Department of Low Temperature Bank of Biological Objects: Volina V.V., senior research fellow; Lipina O.V., senior research fellow; and Prokopyuk O.S., senior research fellow, Head of the Department of Low Temperature Bank of Biological Objects, for the assistance provided during the work performance.*

### References

1. Vasylyuk M.D., Shevchuk S.I., Romanishin S.I. et al. Transplantation of cryoplacental tissues in treatment and prevention of diabetic foot syndrome occurrence // Transplantologiya. – 2003. – Vol. 4, N1. – P.134–135.
2. Volina V.V., Lipina O.V., Falko O.V. et al. Pathogenetic value of cryopreserved serum of placental blood in experimental atherosclerosis // Allergology and immunology. – 2011. – Vol.4, N1. – P.55.
3. Glantz E.V. Medical and biological statistics. – Moscow: Praktika, 1998. – 459p.
4. Grischenko V.I., Yurchenko T.N. Placenta: cryopreservation, structure, properties, perspectives for clinical application. – Kharkov: Sole Proprietor Brovin A.V., 2011. – 292p.
5. Zaikov N.N., Byts Yu.V., Ataman A.V. et al. Pathological physiology. – Kiev: Logos, 1996. – 644p.
6. Klimov A.N., Nikulcheva N.G. Lipid and lipoprotein metabolism and its disorders. – St.-Petersburg: Piter Kom, 1999. – 512p.
7. Kovalenko V.N. Manual on cardiology. – Kiev: Morion, 2008. – 1424 p.
8. Kondakov I.K., Yakovtsova A.F., Gavrish A.S. Ways to estimate the morphofunctional state of vascular endothelium. Methodical recommendations. – Kharkiv–Kyiv. – 2000. – 19p.
9. Lutay M.I. Atherosclerosis: current view on pathogenesis // Ukrainian Journal of Cardiology. – 2004. – N1. – P.22–34.
10. Mathematic biology of development / Ed. by Zotin A.I., Presnov E.V. – Moscow: Nauka, 1982. – 256p.
11. Milovanov A.P. Pathology of mother-placenta-fetus system. – Moscow: Meditsina, 1999. – 448p.

6. Климов А.Н., Никульчева Н.Г. Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения. – СПб, 1999. – 512 с.
7. Коваленко В.Н. Руководство по кардиологии. – Киев: Морион, 2008. – 1424 с.
8. Кондаков И.К., Яковцова А.Ф., Гавериш А.С. Способи оцінки морфофункціонального стану ендотелію судин. Методичні рекомендації. – Харків-Київ, 2000. – 19 с.
9. Лутай М.И. Атеросклероз: современный взгляд на патогенез // Укр. кардиологический журнал. – 2004. – №1. – С. 22–34.
10. Математическая биология развития / Под ред. А.И. Зотина, Е.В. Преснова. – М.: Наука, 1982. – 256 с.
11. Милованов А.П. Патология системы мать-плацента-плод. – М.: Медицина, 1999. – 448 с.
12. Непряхин Г.Г. Новый метод окраски Суданом красным липидов клеток и тканей различных органов // Архив патологии. – 1979. – Т. XII, Вып. 8. – С. 57–58.
13. Писаржевский С.А. Проницаемость эндотелия и атеросклероз // Кардиология. – 2005. – №12. – С. 27–42.
14. Прокопюк О.С., Черемской А.К., Липина О.В. и др. Электрические и гемореологические показатели состояния сердечно-сосудистой системы крыс после введения экстракта плаценты на фоне общего охлаждения // Світ медицини та біології. – 2005. – №2. – С. 41–45.
15. Саюк Ю.М., Чепіль І.В., Кравчук М.Є. та ін. Досвід комплексного лікування хворих на гострий панкреатит // Шпитальна хірургія. – 2004. – №4. – С. 172–175.
16. Стефанов О.В. Доклінічні дослідження лікарських засобів. – Київ: Авіцена, 2001. – 528 с.
17. Трифонов В.Ю., Прокопюк В.Ю., Прокопюк О.С. и др. Экспериментальное обоснование возможности прегравидарной профилактики антифосфолипидного синдрома // Таврический медико-биологический вестник. – 2010. – Т. 13, №4(52). – С. 188–192.
18. Рагино Ю.И., Чернявский А.М., Полонская Я.В. и др. Уровни воспалительных и деструктивных биомаркеров в крови при коронарном атеросклерозе разной степени выраженности // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – Т. 149, №5. – С. 520–524.
19. Фалько О.В., Волина В.В., Кондаков И.И. и др. Особенности эндотелия аорты кроликов при экспериментальном атеросклерозе в импрегнированных серебром препаратах // Международный журнал по иммунореабилитации. – 2009. – Т. 11, №1. – С. 30.
20. Патент № 42454, МПК А61К35/16, А61Р31/00. Україна. Біостимулюючий препарат «Кріокорд-С» та спосіб лікування хронічних сальпінгофоритів з його використанням / В.І. Грищенко, О.В. Липіна, О.С. Прокопюк та ін.; Заявлено 05.03.2011; Опубл. 15.12.2004. Бюл. №12.
21. Davignon J., Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis // Circulation. – 2004. – Vol. 109, №23. – P. 27–32.
22. Koba S., Hirano T. Dyslipidemia and atherosclerosis // Clinical Medicine. – 2011. – Vol. 69, №1. – P. 138–143.
23. Mudau M., Genis A., Lochner A., Strijdom H. Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis // Cardiovascular. J. Afr. – 2012. – Vol. 23, №4. – P. 222–231.
24. Oh Y.K., Bachar A.R., Zacharias D.G. et al. Humanin preserves endothelial function and prevents atherosclerotic plaque progression in hypercholesterolemic Apo.E deficient mice // Atherosclerosis. – 2011. – Vol. 219, №1. – P. 65–73.
25. Sitia S., Tomasoni L., Atzeni F. et al. From endothelial dysfunction to atherosclerosis // Autoimmun. Rev. – 2010. – Vol. 9, №12. – P. 830–834.
26. Su Y., Liu X.M., Sun Y.M., Wang Y.Y. et al. Endothelial dysfunction in impaired fasting glycemia, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetes mellitus // Am. J. Cardiol. – 2008. – Vol. 102, №4. – P. 497–498.
27. Walshe T.E., Dole V.S., Maharaj A. et al. Inhibition of VEGF or TGF signaling activates endothelium and increases leucocyte rolling // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2009. – Vol. 29, №8. – P. 1185–1192.
12. Nepryakhin G.G. New method for staining with Sudan red of cell and tissue lipids from different organs // Arkhiv Patologii. – 1979. – Vol. XII, Issue 8. – P. 57–58.
13. Piszarszewsky S.A. Endothelium permeability and atherosclerosis // Kardiologiya. – 2005. – N12. – P. 27–42.
14. Prokopyuk O.S., Cheremskoy A.K., Lipina O.V. et al. Electric and haemorrheologic indices of cardiovascular system state of rats after placental extract introduction at the background of general cooling // World of Medicine and Biology. – 2005. – N1. – P. 41–45.
15. Sayuk Yu.M., Chepil I.V., Kravchuk M.E. et al. Experience of combined treatment of patients with acute pancreatitis // Shpytalna Khirurgiia. – 2004. – N4. – P. 172–175.
16. Stefanov O.V. Preclinical research for medicines. – Kiev: Avicenna, 2001. – 528p.
17. Trifonov V.Yu., Prokopyuk V.Yu., Prokopyuk O.S. et al. Experimental substantiation of possibility for pregravid prevention of phospholipid syndrome // Tavricheskiy Mediko-Biologicheskiy Vestnik. – 2010. – Vol. 13, N4(52). – P. 188–192.
18. Ragino Yu.I., Chernyavskiy A.M., Polonskaya Ya.V. et al. Levels of inflammatory and destructive biomarkers in blood under coronary atherosclerosis with different manifestation rate // Bul. Experimentalnoy Biologii i Meditsyny. – 2010. – Vol. 149, N5. – P. 520–524.
19. Falko O.V., Volina V.V., Kondakov I.I. et al. Peculiarities of aortic endothelium of rabbits under experimental atherosclerosis in silver-impregnated preparations // Mezhdunarodnyy Zhurnal po Immunoreabilitatsii. – 2009. – Vol. 11, N1. – P. 30.
20. Patent N42454, IPC A61K35/16, A61P31/00. Ukraine. Biostimulating preparation Cryocord-C and the treatment way for chronic salpingoophoritis with its application / V.I. Grischenko, O.V. Lipina, O.S. Prokopyuk et al. Applied 05.03.2011; Published 15.12.2004. Bull. N12.
21. Davignon J., Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis // Circulation. – 2004. – Vol. 109, N23. – P. 27–32.
22. Koba S., Hirano T. Dyslipidemia and atherosclerosis // Clinical Medicine. – 2011. – Vol. 69, N1. – P. 138–143.
23. Mudau M., Genis A., Lochner A., Strijdom H. Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis // Cardiovascular. J. Afr. – 2012. – Vol. 23, N4. – P. 222–231.
24. Oh Y.K., Bachar A.R., Zacharias D.G. et al. Humanin preserves endothelial function and prevents atherosclerotic plaque progression in hypercholesterolemic Apo.E deficient mice // Atherosclerosis. – 2011. – Vol. 219, N1. – P. 65–73.
25. Sitia S., Tomasoni L., Atzeni F. et al. From endothelial dysfunction to atherosclerosis // Autoimmun. Rev. – 2010. – Vol. 9, N12. – P. 830–834.
26. Su Y., Liu X.M., Sun Y.M., Wang Y.Y. et al. Endothelial dysfunction in impaired fasting glycemia, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetes mellitus // Am. J. Cardiol. – 2008. – Vol. 102, N4. – P. 497–498.
27. Walshe T.E., Dole V.S., Maharaj A. et al. Inhibition of VEGF or TGF signaling activates endothelium and increases leucocyte rolling // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2009. – Vol. 29, N8. – P. 1185–1192.

Accepted 27.03.2012

Поступила 27.03.2012