

# Дослідження початкових етапів атерогенезу на тлі жирової дієти

Н.С. Турчина, С.І. Савосько

Національний медичний університет імені О.О.Богомольця, м. Київ; e-mail: nlturchina12@ukr.net

*Описано власний спосіб моделювання дієтоіндукованого атерогенезу за допомогою запропонованого складу продуктів, який включає тваринний жир, маргарин, холестерин, карбонат кальцію і мерказоліл та досліджено його вплив на структурні зміни у печінці, серці, аорті та головному мозку мишей. За результатами гістологічного дослідження виявлено ліпідні включення субендотеліального простору в судинах міокарда, цибуліні аорти та меншою мірою у ендокарді 28,8 % тварин після 14-тижневої жирової «атерогенної» дієти. Ультроструктурний аналіз засвідчив порушення на рівні внутрішньої та м'язової оболонок судин у 100 % зразків. Зміни в ендотеліоцитах полягали у вакуолізації, деструкції мітохондрій, редукції органел, фокальній десквамації від базальної мембрани. Ліпідні включення виявлено у інтерстиційному просторі та клітинах субінтимального простору (середній діаметр 600-1200 нм). У м'язовій оболонці аорти спостерігалися загиблі клітини, набухання та кристалізація мітохондрій у цитоплазмі непосмугованих клітин, що вказує на її ураження. Виявлені ознаки стеатозу печінки з дистрофічними змінами гепатоцитів та фокальної запальної реакції навколо судин головного мозку (інфільтрація моноцитів, лімфоцитів, базофілів). Встановлені структурні зміни в органах вважаємо за потрібне розглядати як ініціацію атерогенезу.*

*Ключові слова: атерогенна дієта; холестерин; аорта; серце; печінка; головний мозок; миші.*

## ВСТУП

Атеросклероз – поліетіологічне хронічне захворювання, яке характеризується накопиченням ліпідних включень у стінках артерій, що може обмежувати просвіт судин. Патогенетичні основи розвитку структурних порушень при атеросклерозі описані у багатьох наукових працях, серед яких значний вклад мають експериментальні дослідження. Моделі на тваринах гіперліпідемії, гіперхолестеринемії і атеросклероза значно розширили наше розуміння про особливості розвитку цього хронічного захворювання і стали одним із методів дослідження патогенезу та способів впливу на його розвиток.

Нині запропоновано різні експериментальні моделі відтворення атеросклерозу у лабораторних тварин (миші, щури, кролі). Миші (*Mus musculus*) є одним з тих видів, який найбільш часто використовується для вивчення порушень ліпідного і вуглеводного

обміну, атеросклероза [1-4]. Зручність роботи з мишами полягає у простоті розмноження, швидкому рості, відносно низькій вартості виконання дослідницької роботи, а також здатності контролювати експеримент за певним терміном. Проте особливості розвитку змін у судинній стінці, їх характер та локалізація мають деякі особливості. Так, якщо у людини вогнища атерогенезу частіше виникають у коронарних, сонних артеріях і периферичних судинах, таких як клубова артерія, то у мишей це частіше корінь та дуга аорти [5,6]. Для експериментальних моделей мишей нехарактерний розвиток волокнистої капсули навколо атерогенних ділянок, як це часто відмічають у змінених атеросклерозом судинах людини. Крім того, деякі видові особливості будови аорти гризунів, зокрема товщина її стінки, число еластичних мембран у інтактній середній оболонці (*tunica media*) і судин в адвентиційній оболонці (*vasa*

vasorum) менші за кількістю порівняно з іншими видами лабораторних тварин (щури, кролі) [7].

Проблема моделювання атеросклерозу у мишей також пов'язана з високим ступенем пристосування до змін у інтактних тварин, тому більшість сучасних наукових праць виконуються із залученням інбредних (нокаутних) ліній з різною чутливістю до холестерину. Проте не завжди використання саме цих мишей є доцільним з огляду на труднощі їх утримання або обмеження, які пов'язані із задачами експерименту. Насамперед це зумовлено їх низькою доступністю для широкого застосування у великих за обсягами дослідженнях.

Метою нашого дослідження була розробка моделі атеросклерогенезу у інтактних лабораторних мишей за допомогою використання модифікованої жировмісної (холестеринової) атерогенної дієти.

## МЕТОДИКА

Експеримент проведено на мишах лінії Valb/C масою 20-23г. До контрольної групи ввійшли 10 інтактних тварин, яких годували стандартним гранульованим комбікормом, до дослідної – 76 тварин, які були переведені на жирову дієту з додаванням гранульованого комбікорму впродовж 14 тиж [8, 9]. Доступ до води в тварин був вільний. Щільність розміщення: 15 мишей на клітку (площа клітки  $\frac{3}{4}$  аркуша А4). Виводили тварин із експерименту швидкою декапітацією на 14-й тиждень. Досліди проводили згідно з вимогами Європейської Конвенції із захисту тварин (Страсбург, 1986).

Жирова (атерогенна) дієта у перерахунку на 100 г готового продукту включала: 1) термічно оброблені тваринні жири: свинячий жир/сало, вершкове масло – 30-45 г; 2) термічно оброблені рослинні жири (маргарин) – 15-20 г; 3) холестерин – 1,5-2 г; 4) карбонат кальцію – 1 г; 5) мерказоліл (1-метил-2-меркаптоїмідазол з додаванням

картопляного крохмалю, стеарату Са, цукру рафінаду, тальку) – 10 мг (у перерахунку на добову дозу тваринам – 10 мг/кг, що не є токсичною дозою), який прискорює метаболізм та елімінацію різних лікарських засобів [10,11]; 6) стандартний гранульований комбікорм – (32-52 г), відношення жир/корм становило 1:1/2:1 на один прийом, з подальшим додаванням стандартного комбікорму. Миші дослідної групи отримували зранку жирову дієту (3-4 г на 1 мишу), після обіду їх догодували стандартним гранульованим комбікормом із додаванням залишку запропонованої дієти.

По завершенні терміну спостереження мишам обох груп проводили функціональну пробу загального соматичного стану, використовуючи тест «перевернутий екран» (Inverted screen test), який дав змогу оцінити сумарно силу передніх і задніх кінцівок тварин. Для цього мишей розміщували на металевій сітці з клітинками 1×1 см, а потім перевертали над пінопластовою підкладкою. Час утримання тварини у перевернутому стані вимірювали у секундах. Таким чином, оцінювали середній рівень соматичного стану.

Зразки печінки, серця, аорти мишей обох груп були відібрані для гістологічного дослідження для виявлення структурних змін і ліпідних включень. Досліджувані зразки промивали фосфатним буфером (рН 7,4) і фіксували у 10%-му нейтральному формаліні (на фосфатному буфері). Кріозрізи товщиною 15 мкм фіксували на предметних скельцях з адгезивним покриттям і профарбовували суданом III, для диференціації ядер клітин їх дофарбовували гематоксиліном. Гістологічні препарати клали під покривне скельце у гліцерин-желатинову суміш. Досліджували зміни стінки печінки, аорти, ендокарда серця, судин міокарда. При проведенні морфометрії вивчали локалізацію та розміри суданофільних ліпідних включень, щільність ліпідних включень у полі зору (на мікрофотографії 160×210 мкм). Морфометричний аналіз проводили за допомогою мікроскопа Olympus BX 51 та програмного забезпечення CarlZeiss

(AxioVision SE64 Rel.4.9.1) при збільшенні у 400 і 1000 разів.

Частина зразків аорти тварин дослідної групи (n=9) та декілька контрольних (n=3) були відібрані для електронно-мікроскопічного дослідження. Фрагменти аорти фіксували 2,5%-м розчином глутарового альдегіду на фосфатному буфері з дофіксацією у 1%-му забуференому розчині чотириокису осмію. Зневоднення проводили у спиртах зростаючої концентрації (70, 80, 90, 100°) та ацетоні. Зразки просочували та заливали у суміш аралдит-епон. Ультратонкі зрізи (60-70 нм) контрастували у 2 %-му розчині уранілацетату й цитрату свинця. Препарати досліджували та фотографували під електронним мікроскопом Tescan Mira 3 LMU (Чехія) при збільшеннях в 10-95 тис. разів [12].

Статистичну обробку результатів проводили із застосуванням програми Origin Lab, версія 8.0. Їх представлено у вигляді середнього значення (M) та стандартної похибки середнього арифметичного (m). Нормальність розподілення результатів оцінено за критерієм Колмогорова-Смирнова. Міжгрупові розбіжності між групами вибірок оцінювали за допомогою непараметричного тесту Крускала-Уолліса.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

З 76 мишей дослідної групи атерогенну або «жирову дієту» успішно перенесли протягом 1 міс усі тварини, з яких після 60-70 діб більш довготривалого терміну годування жировою дієтою померли 24 (27,9 %) та залишилося 52, серед яких починаючи з 8,5-10-го тижня (60-70-ї доби) годування у 15 (24,2 %) реєстрували випадіння шерсті, зниження поведінкової активності, у 3 (4,8 %) монопарез задньої кінцівки та ознаки неврологічного дефіциту.

Час утримання мишей на «перевернутому екрані» у контрольній групі становив  $144,8 \pm 5,8$  с, а у дослідній –  $64,5 \pm 8,3$  с ( $P < 0,05$ ). Результати функціональної проби за тестом засвідчили суттєве зменшення витривалості

тварин дослідної групи, що вказує саме на погіршення соматичного здоров'я. Неврологічні розлади у вигляді парезу лівої задньої кінцівки у 15 тварин, імовірно, були результатом пошкодження пірамідального тракту внаслідок ішемічних змін, які спричинило відкладання ліпідних включень у судинах кортикальних відділів головного мозку, що постачають кров'ю певні ділянки, і це було підтверджено гістологічно.

За результатами електронно-мікроскопічного дослідження спостерігали розвиток структурних змін у серці, печінці та головному мозку тварин дослідної групи, додатково підтвердили наявність ультраструктурних порушень у клітинних утвореннях стінки аорти. Загальна морфологічна організація досліджуваних органів була без змін. У ділянці клапана і ендокарді лівого шлуночка виявлено фокальні осередки клітин з суданофільними цитоплазматичними ліпідними включеннями (рис. 1). Внутрішньоклітинні включення були і у клітинах стінки клапана. Навколо цибулини аорти було істотно збільшення елементів жирової тканини, реєстрували деструкцію окремих жирових клітин та вихід ліпідних включень в інтерстиційний простір. У цибуліні виявлено структурні зміни, які проявлялися від нерівностей поверхні ендотелію та його втрати, фокальної дезорганізації у субінтимальній ділянці та в непосмугованих клітинах м'язової оболонки, адгезії лейкоцитів у ній, до появи фагоцитів з ліпідними включеннями у адвентиційній оболонці.

Ультраструктурні зміни засвідчили прояви деструкції клітин та інтерстиційних утворень у ділянках внутрішньої та м'язової оболонок у всіх 9 досліджуваних зразках (100 %; рис. 2).

Адлюмінальна поверхня аорти характеризувалась ознаками деструкції ендотеліоцитів: появою вакуолізації, змінами мітохондрій, редукцією органел, фокальною десквамацією від базальної мембрани. Цілісність внутрішньої еластичної мембрани не пору-

шувалась, але у інтерстиційному просторі субінтимальної ділянки виявлялися фрагменти загиблих клітин. У інтерстиційному просторі спостерігалися ліпідні включення діаметром від 200 нм до 4 мкм (у середньому 600-1200 нм). У цитоплазмі непосмугованих клітин встановлено набухання та кристоліз мітохондрій (рис. 3).

Результати морфометричної оцінки виявлених у досліджуваних органах ліпідних включень наведено. Описані ультраструктурні зміни у стінці аорти тварин дослідної групи. Середній діаметр одиниці ліпідних включень у дослідній групі тварин з жировою дією:

цибулина аорти -  $1,13 \pm 0,07$ ;  
 ендокард лівого шлуночка -  $1,04 \pm 0,02$ ;  
 судини міокарда -  $1,16 \pm 0,05$ ;  
 головний мозок - 0;  
 печінка  $2,65 \pm 0,11$ .

За результатами гістологічного дослідження кори великих півкуль головного мозку, мозолистого тіла, гіпокампа, судинних сплетень бічних шлуночків і довгастого мозку реєстрували морфологічні ознаки запальної реакції на 14-му тижні експерименту. Так, у 9 тварин (14,5 %) відмічено фокальну інфільтрацію мононуклеарних лейкоцитів (моноцитів, лімфоцитів) у навколосудинній м'якій оболонці великого мозку та судин

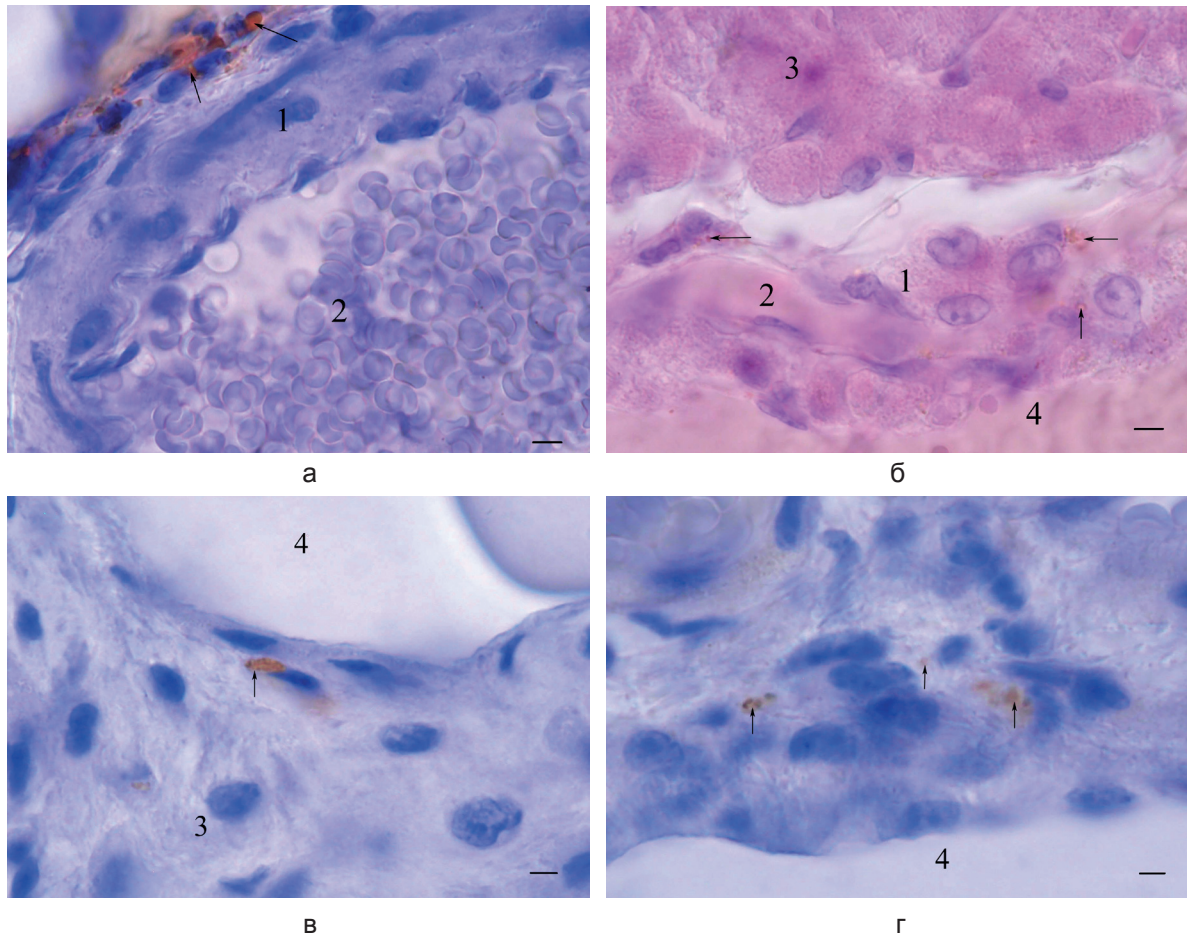


Рис. 1. Ліпідні включення у серці тварин дослідної групи: а – артерії на рівні адвентиції; б – стінка судин міокарда; в – ділянка ендокарда; г – ділянка формування клапана лівого шлуночка; 1 – стінка артерії; 2 – просвіт судини змінена стінка аорти; 3 – міокард; 4 – просвіт шлуночка; ← суданофільні ліпідні включення. Кріозрізи профарбовані суданом III та гематоксиліном, шкала 10 мкм



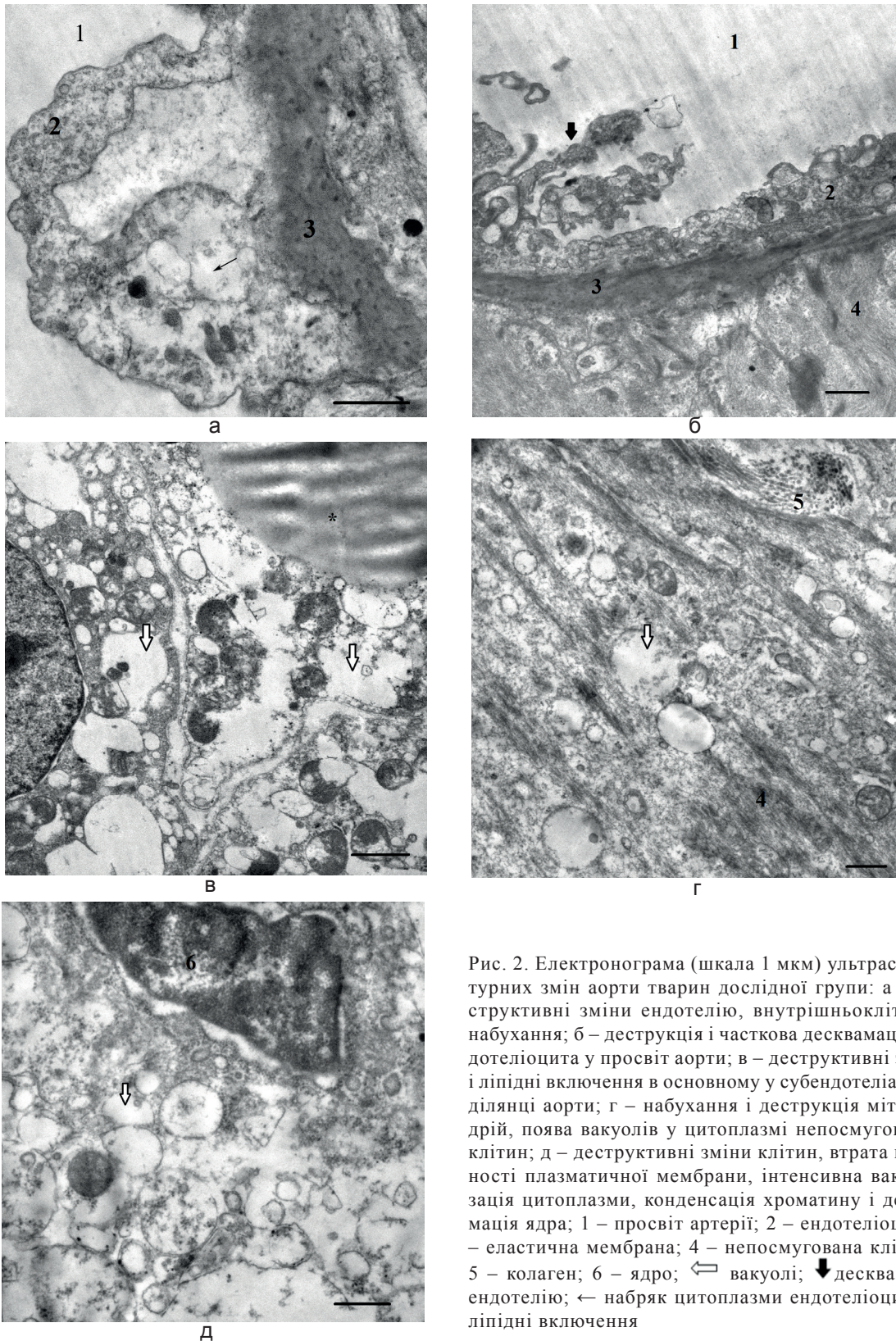


Рис. 2. Електроннограма (шкала 1 кмк) ультраструктурних змін аорти тварин дослідної групи: а – деструктивні зміни ендотелію, внутрішньоклітинне набухання; б – деструкція і часткова десквамація ендотеліоцита у просвіт аорти; в – деструктивні зміни і ліпідні включення в основному у субендотеліальній ділянці аорти; г – набухання і деструкція мітохондрій, поява вакуолів у цитоплазмі непосмугованих клітин; д – деструктивні зміни клітин, втрата цілісності плазматичної мембрани, інтенсивна вакуолізація цитоплазми, конденсація хроматину і деформація ядра; 1 – просвіт артерії; 2 – ендотеліоцит; 3 – еластична мембрана; 4 – непосмугована клітина; 5 – колаген; 6 – ядро; ◁ вакуолі; ↓ десквамація ендотелію; ← набряк цитоплазми ендотеліоцита; \* ліпідні включення



кори, мозолистого тіла і підкіркових структур (від 2 до 6 вогнищ на фронтальній зріз великого мозку). Також у 11 (17,7 %) тварин навколо окремих судин реєстрували скупчення тканинних базофілів (від 3 до 16 клітин), дегрануляцію поодиноких клітин (див. рис. 3). У 5 (8,1 %) зразках кори великого мозку спостерігали ішемічно ушкоджені гіперхромні нейрони, що може свідчити про ймовірне порушення мозкового кровообігу на тлі атерогенної дієти. Саме це пояснює причини виникнення парезу у тварин дослідної групи,

про що говорилося вище.

Так, у 100 % мишей дослідної групи виявлено осередки поодиноких або групових ліпідних включень у печінці. Суданофільні ліпідні включення були внутрішньо- та позаклітинними (рис. 4). З огляду на морфологію клітин, у цитоплазмі яких реєстрували поодинокі або групові ліпідні включення, їх накопичення відбувалося не лише у гепатоцитах, але і в стромі органа (в тому числі інтерстиції макрофагами і фібробластами). Для гепатоцитів була характерна вакуолізація

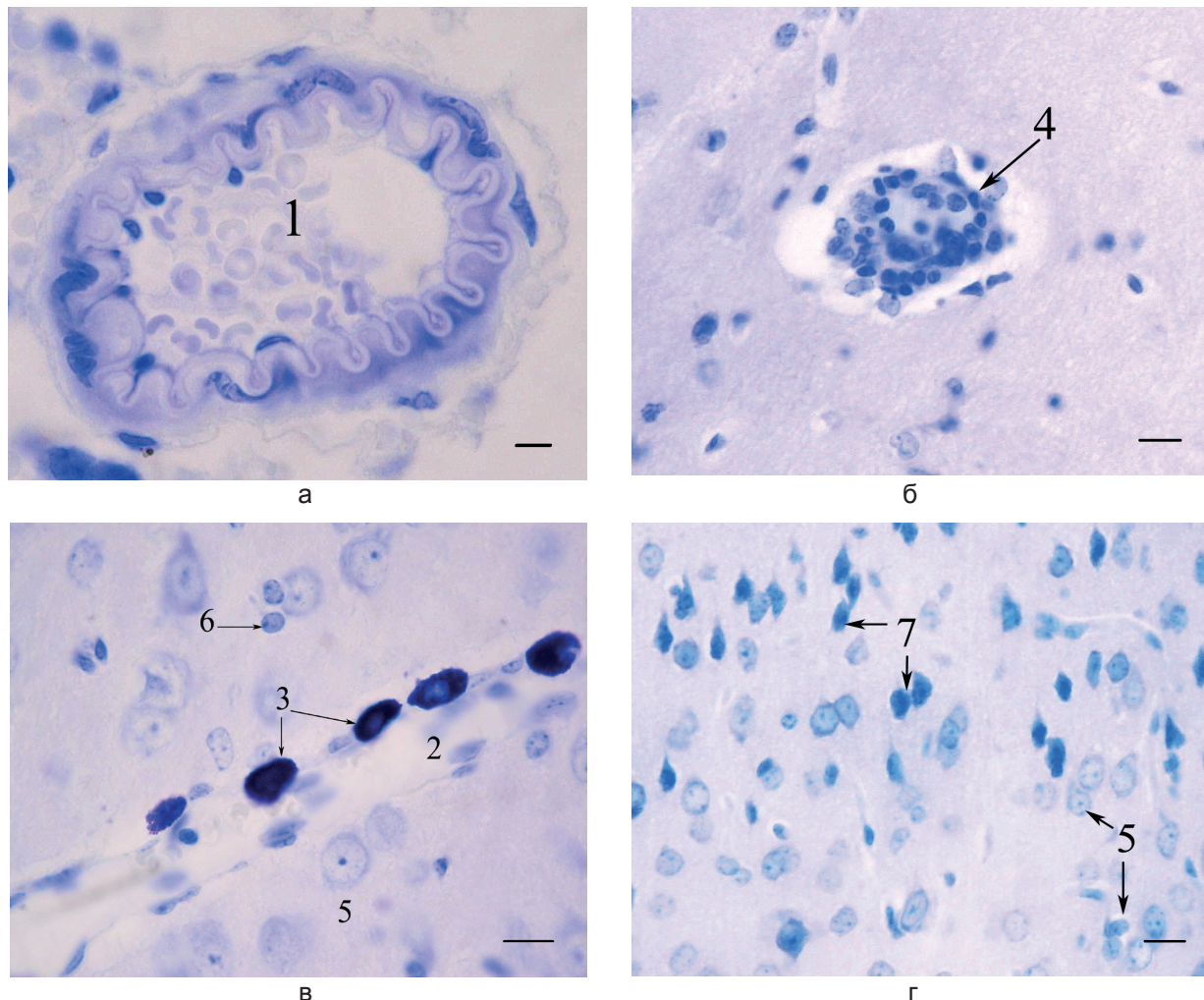


Рис. 3. Структурні зміни судин головного мозку тварин дослідної групи: а – структурно незмінена артерія головного мозку; б – інфільтрація мононуклеарними лейкоцитами стінки судин кори великих півкуль головного мозку; в – скупчення базофілів навколо венули у ділянці гіпокампа; г – ділянки ішемічного ураження кори мозку; 1 – артерія; 2 – вена; 3 – тканинні базофіли; 4 – мононуклеарні лейкоцити; 5 – неушкоджений нейрон; 6 – гліоцит; 7 – ішемізовані гіперхромні нейрони. Кріозрізи профарбовані толуїдиновим синім, а,б,г  $\times 1000$ ; в,д,е  $\times 400$ , шкала 20 мкм

цитоплазми, дистрофічні зміни та некроз клітин. Діаметр ліпідних включень у печінці був статистично значимо більшим, ніж у інших досліджуваних зразках ( $P < 0,05$ ).

Результати гістологічних досліджень вказують на системні дисліпідемічні розлади в мишей на тлі тривалого вживання жирової дієти. Метод електронної мікроскопії підтвердив порушення ультраструктурних утворень стінки аорти, які в сукупності з виявленими змінами в ендокарді, міокарді та печінці дали змогу розглядати їх як ініціальний етап атерогенезу.

Відомо декілька науково обґрунтованих

поглядів на розвиток атеросклерозу, серед яких гіперхолестеринемія, зміна співвідношення вмісту ліпопротеїдів низької та високої густини (ЛПНГ, ЛПВГ відповідно), запалення судин, а також дисфункції ендотелію [13]. Водночас більшість науковців схиляється до думки про комплексну дію зазначених змін, підкреслюючи, що визначальну роль у накопиченні ліпідних відкладень має патологічна проникність ендотелію [14,15]. Відомо, що ендотеліальні клітини у стінці судин експресують молекули адгезії та продукують фактори росту. На тлі змін ліпідного обміну відбувається [16] адгезія моноцитів до клітин

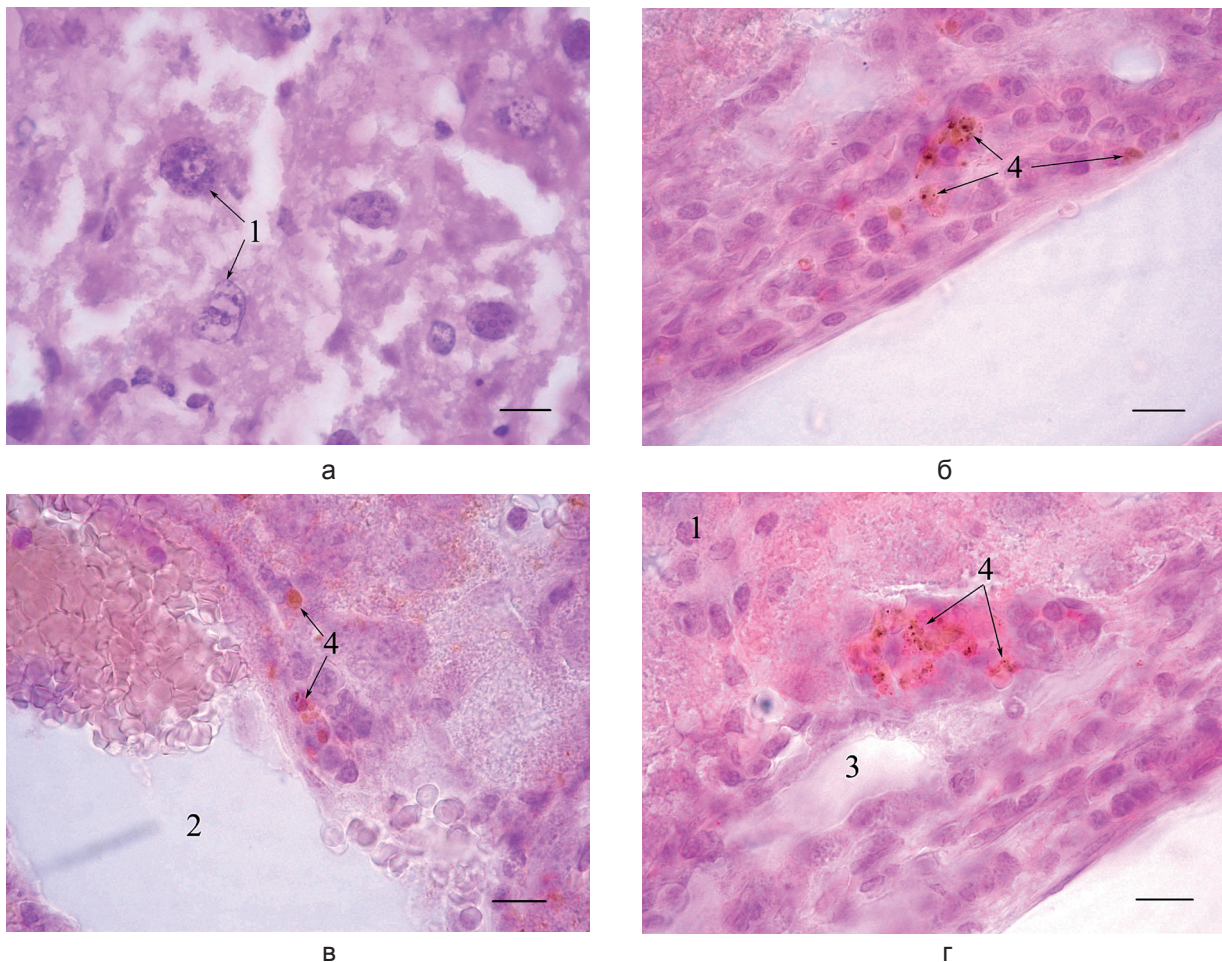


Рис. 4. Ліпідні включення у печінці тварин дослідної групи: а – дистрофічні зміни, вакуолізація цитоплазми гепатоцитів (кріозріз після дегідратації у етанолі та профарбований гематоксиліном); б,в,г – ліпідні включення у гепатоцитах та стромі печінки; 1 – ядро гепатоцита; 2 – просвіт вени; 3 – жовчна протока; 4 – суданофільні ліпідні включення, кріозрізи профарбовані суданом III та гематоксиліном шкала 20 мкм



ендотелію, їхня міграція в субендотеліальний простір від інтими до м'язової оболонки з подальшою активацією непосмугованих клітин, а також перетворенням в активні макрофаги. Захоплення макрофагами окислених або модифікованих ЛПНГ з накопиченням в цитоплазмі перетворює їх у пінисті клітини, наявність яких у стінці судини - інтими є ознакою атеросклерозу.

Виявлені нами дрібнодисперсні ліпідні включення в клітинах та інтерстиційному просторі органів та судин підтверджують основні закономірності розвитку атеросклерозу. Зареєстровані на гістологічному рівні ліпідні включення мали різний діаметр та тінкторіальні властивості (ступінь профарбовування суданом III від оранжевого до коричневого), що свідчить про їх біохімічну неоднорідність. Появу ліпідних включень у субендотеліальному просторі можна вважати наслідком ендотеліальної дисфункції. На ендотелії експресуються рецептори до холестерину та ліпопротеїнів, але якщо вони блокуються жирними кислотами, це призводить до порушення транспорту та метаболізму останніх [17]. Ці дані використовують при розробці атерогенних дієт.

У літературних джерелах описано значну кількість стандартизованих моделей атерогенезу. Єдиним підходом у таких роботах є переведення тварин із стандартного раціону на тривалу атерогенну дієту, головним компонентом якої є продукти з високим вмістом рослинних і тваринних тригліцеридів, холестерину та інших компонентів, які підвищують їх засвоєння або порушують обмін, викликають ендотеліальну дисфункцію. Додаткове включення у модифікований раціон мінеральних компонентів (зокрема карбонату кальцію) розглядається як чинник пришвидшення темпів розвитку ендотеліальної дисфункції (надлишок кальцію викликає апоптоз), але для ще більш «швидкої та значимої» дисфункції авторами запропоновано пригнічувати загальний метаболічний статус додатковим застосуванням мерказолілу [18].

Нині показана досить значна варіабельність структурних змін у серці та судинах мишей при різних атерогенних дієтах. Gabriels і співавт. [19] на основі результатів гістологічного дослідження довели, що розвиток атеросклерозу у мишей асоційований зі структурними змінами у серці, забезпечується зокрема запальними реакціями. Одночасно Janssen і співавт. [20] встановили розвиток на тлі атерогенної дієти запальних реакцій у головному мозку, зокрема у гіпокампі. Згідно з цими даними є підстави вважати, що ініціальний етап атерогенезу починається із запальних та дистрофічних змін у стінках судин, що в нормі є основою для виникнення ліпідних включень достатнього об'єму для того, щоб їх можна було виявити гістологічним методом. Метод електронної мікроскопії у цих дослідженнях дає значні переваги для доведення ініціаторного етапу розвитку структурних змін. Тому в низці публікацій автори, не очікуючи структурних змін в аорті, досліджували дію лікарських засобів на моделі атерогенної гіперліпідемії. Такий підхід також загальноновизнаний для вивчення дії препаратів, які регулюють ліпідний обмін, оскільки при його порушенні підтверджують накопичення ліпідних включень, в тому числі холестерину у печінці [21,22]. Показано розвиток стеатозу печінки мишей на тлі атерогенної дієти (вакуолізація, утворення гомогенно профарбованих ліпідів), таким чином гістологічне дослідження печінки також дає додаткові результати для аналізу особливостей розвитку метаболічних порушень, структурного пошкодження судин та серця [23-25].

У таблиці представлено порівняння складу атерогенних дієт та деяких даних щодо гістологічного підтвердження структурних змін у клапанах серця, судинах міокарда, цибуліні аорти та печінці мишей. Автори зазначають, що ненюкаутні миші (тобто інтактні) обох статей також можуть бути вдалою моделлю для вивчення змін ліпідного обміну в плазмі крові і атерогенності



жирових дієт, хоча прояви ступеня їх вираженості за деякими генами є більш помітними, ніж у нокаутних. Деякі особливості існують також у лабораторних тварин як і в людини з будь-яким захворюванням системи органів. Урахування цих відмінностей у лабораторних тварин є важливим при інтерпретації одержаних під час експерименту результатів для дослідження патогенезу атерогенезу у людини. Наприклад, лише застосування раціону, наближеного до того, який використовується в дієтах людей, в експерименті є недостатнім для формування спонтанного атерогенезу і тому в харчові суміші додають екзогенний

холестерин або холат натрію. Наведені у таблиці атерогенні дієти не мають суттєвих відмінностей за вмістом холестерину та базуються головним чином на комбінуванні тваринних і рослинних жирів.

Застосування лише аліментарного холестерину не завжди призводить до очікуваного результату в експерименті. Це підтверджує, що він не є критичним та визначальним чинником для розвитку біохімічних порушень, які лежать в основі атерогенезу. Суттєвою є розбіжність в описаних термінах, проведених авторами досліджень (від 7 до 36 тиж), що не дає можливості достовірно визначитись

#### Порівняльна характеристика атерогенних дієт для моделювання атеросклерозу в лабораторних мишей

№	Протокол дієти (на 100 г продукту харчування)	Стать, лінії тварин	Термін дієти	Морфологічні прояви атерогенезу
1	Склад дієти: насичені жири (вершкове масло, какао-олія, пальмова олія) – 35 %; холестерин – ~0,5-1 %; холева кислота – ~0,1-0,5 %	Самці, C57BL/6J	12 тиж	Пінисті клітини (макрофаги), жирові відкладення об'ємом 420-3220 мкм <sup>2</sup> на зріз аорти [2]
2	Склад дієти: казеїн – 20 %, гідрогенізовані рослинні жири (кокосова, соєва, пальмова олія, какао-олія); тваринний жир (сало/вершкове масло) – 15 %, мінеральні домішки – 5 %; холестерин – 1,25 %, кукурудзяна олія – 1 %, хлорид холіну – 1 %, вітаміни – 1 %; холева кислота – 0,5 %,	Самиці B6, C3H	14 тиж	Аорта, печінка [26]
3	Склад дієти: жир – 15,8 % (50 % кокосової олії); холестерин – 1,25 %; натрію холат – 0,5 %	Самці, C57BL/6 wild-type	12 тиж	Ендокард і синус аорти [27]
4	Склад дієти: жир – 21 % (18 % кокосової олії, 3 % жиру); холестерин – 0,15 %; казеїн – 7 %; сахароза – 7 %, мальтодекстрин – 3 %	Самці, Ldlr-/-	12-36 тиж	Ліпідні включення синуса аорти від 1 до 20% стінки [28]
5	Власна модель Склад дієти: термічно оброблені тваринні жири (свинячий жир/сало, вершкове масло) – 30-45 %; термічно оброблені рослинні жири (маргарин) – 15-20 %; холестерин – 1,5-2 %; карбонат кальцію – 1 %; мерказоліл – 10 мг/кг; стандартний гранульований комбікорм – 32-52 %	Самці, самиці, Balb/C	14 тиж	Ліпідні включення у аортальному клапані, цибулинні аорти, судин міокарді, стеатоз та дистрофічні зміни печінки

із початком ініціації атерогенезу в органах дослідних тварин. Крім того, частота відтворення експериментальної моделі атерогенезу та обсяг структурних змін описаних жирових дієт наводиться рідко. Автори схиляються до єдиної думки, що необхідної частоти відтворення атерогенезу можна досягти при тривалому веденні експерименту, яке можливо та доцільно не так часто.

Враховуючи аналіз описаних у літературних джерелах атерогенних дієт, їх ефективність щодо відтворення структурних змін у серці та аорті лабораторних тварин, було розроблено патогенетично обґрунтовану експериментальну модель жировмісної (холестеринової) атерогенної дієти у лабораторних інтактних мишей. На підставі результатів гістологічних досліджень зроблено висновок, що 14-тижневе споживання тваринами жирової дієти з холестерином викликало розвиток структурних змін у вигляді дрібнодисперсної пенетрації субендотеліального простору у цибуліні аорти та меншою мірою у ендокарді, які розглядаються як ініціаторний етап атерогенезу.

*The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.*

**Н.С. Турчина, С.І. Савосько**

### **ИССЛЕДОВАНИЯ НАЧАЛЬНЫХ ЭТАПОВ АТЕРОГЕНЕЗА НА ФОНЕ ЖИРОВОЙ ДИЕТЫ**

Национальный медицинский университет имени О.О.Богомольца, г. Киев Резюме: Описано собственный способ моделирования диетиндуцированного атерогенеза при помощи предложенного состава продуктов, который включает животный жир, маргарин, холестерин, карбонат кальция, мерказолил и исследовано его влияние на структурные изменения в печени, сердце, аорте, головном мозге мышей. По результатам гистологического исследования выявлено липидные включения субэндотелиального пространства в

сосудах миокарда, луковице аорты и в меньшей степени в эндокарде – у 28,8 % животных после 14-недельной жировой «атерогенной» диеты. Ультраструктурный анализ свидетельствует о нарушениях на уровне внутренней и мышечной оболочек сосудов у 100 % образцов. Изменения в эндотелиоцитах заключались в вакуолизации, деструкции митохондрий, редукции органелл, фокальной десквамации от базальной мембраны. Липидные включения выявлены в интерстициальном пространстве и клетках субинтимального пространства (средний диаметр 600-1200 нм). В мышечной оболочке аорты наблюдались погибшие клетки, набухание и кристоллиз митохондрий в цитоплазме гладкомышечных клеток, что указывало на их поражение. Выявлены признаки стеатоза печени с дистрофическими изменениями гепатоцитов и фокальной воспалительной реакцией вокруг сосудов головного мозга (инфильтрация моноцитов, лимфоцитов, базофилов). Установленные структурные изменения в органах считаем необходимым рассматривать как инициацию атерогенеза. Ключевые слова: атерогенная диета; холестерин; аорта; сердце; печень; головной мозг; мыши.

**N.S. Turchina, S.I. Savosko**

### **THE STUDY OF THE INITIAL STAGES OF ATHEROGENESIS AGAINST HIGH-FAT DIET**

The signs of initial atherogenesis against high-fat diet were described in article. he proposed diet composition includes animal fat, margarine, cholesterol, calcium carbonate and mercazolil. The effect of high-fat diet on structural changes in the liver, heart, aorta and brain of mice were studied. According to the results of the histological study, the lipid drops in the subendothelial space in the myocardium vessels, the aorta bulb and lesser in the endocardium were identified in 28,8% of the animals after a 14-week fatty "atherogenic" diet. The results of ultrastructural study were showed a violation in the intima and muscular layer of the aorta in 100% of the samples. The changes in endothelial cells were characterized by vacuolation and degradation of mitochondria, organelles reduction, focal cells desquamation from the basement membrane into lumen. Lipid inclusion was detected in the interstitial space and cells of the subintimal space (mean diameter 600-1200 nm). The dead cells, mitochondrial swelling and cristolysis in the cytoplasm of smooth muscle cells were observed in the tunica media of the aorta. The hepatic steatosis with dystrophic changes in hepatocytes was revealed in the liver and the signs of focal inflammatory reactions around the vessels (infiltration of monocytes, lymphocytes, basophils) was identified in the brain. The established structural changes in the organs we were consider as the initiation of atherogenesis.

Key words: atherogenic high-fat diet; cholesterol; aorta; heart; liver; brain; mouse

*Bogomolets National Medical University, Kyiv; e-mail: ntlurchina12@ukr.net*



## REFERENCES

- Kennedy AJ, Ellacott KL, King VL, Hasty AH. Mouse models of the metabolic syndrome. *Dis Model Mech*. 2010 Mar-Apr;3(3-4):156-66.
- Nishina PM, Lowe S, Verstuyft J, Naggert JK, Kuypers FA, Paigen B. Effects of dietary fats from animal and plant sources on diet-induced fatty streak lesions in C57BL/6J mice. *J Lipid Res*. 1993 Aug;34(8):1413-22.
- Schreyer SA, Wilson DL, LeBoeuf RC. C57BL/6 mice fed high fat diets as models for diabetes-accelerated atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1998 Jan;136(1):17-24.
- Zhou AX, Tabas I. The UPR in atherosclerosis. *Semin Immunopathol*. 2013 May;35(3):321-32.
- Getz GS, Reardon CA. Animal models of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012 May;32(5):1104-15.
- Gonzalez L, Yu P, Trigatti BL. Mouse models of coronary artery atherosclerosis. *J Cardiovasc Disord*. 2016;3:1021.
- Zaragoza C, Gomez-Guerrero C, Martin-Ventura JL, Blanco-Colio L, Lavin B, Mallavia B, et al. Animal models of cardiovascular diseases. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:497841.
- Turchina NS, Savosko SI. Bogomolets national medical university. Model of atherosclerosis damages of the aorta in mices. *Patent Ukrainy № 117425*. 2017 Cher 26.
- Turchina NS, Savosko SI. Bogomolets National medical university. The high-fat diet in mices with model of atherosclerosis damages of the aorta. *Patent Ukrainy № 117423*. 2017 Cher 26.
- Rakov OV. Comparison characteristics of mercazolium and thyrozol in treatment of patients with diffuse toxic goiter. *Endocrinol*. 2016;21(2):137-42.
- Cooper DS. Antithyroid drugs. *N Engl J Med*. 2005 Mar 3;352(9):905-17.
- Melnyk N, Dovgan I, Savosko S. Sciatic nerve injury at intracerebral hemorrhage in internal capsule in rats. *Modern Science-Moderní věda*. 2016;(1):136-41.
- Pellizzon MA. Diet-induced atherosclerosis/hypercholesterolemia in rodent models: Brief scientific literature review [Internet]. [cited 2018 Jan 30]. Available from: [www.researchdiets.com/.../atherosclerosis\\_3%20page.pdf](http://www.researchdiets.com/.../atherosclerosis_3%20page.pdf).
- Renard C, Van Obberghen E. Role of diabetes in atherosclerotic pathogenesis. What have we learned from animal models? *Diabetes Metab*. 2006 Feb;32(1):15-29.
- Sary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1995 Sep 1;92(5):1355-74.
- Zhuhua Z, Zhiqian W, Zhen Y, Yixin N, Weiwei Z, Xiaoyong L, et al. A novel mice model of metabolic syndrome: the high-fat-high-fructose diet-fed ICR mice. *Exp Anim*. 2015;64(4):435-42.
- Hassan HH, Denis M, Krimbou L, Marcil M, Genest J. Cellular cholesterol homeostasis in vascular endothelial cells. *Can J Cardiol*. 2006 Feb;22 Suppl B:35B-40B.
- Savitskiy IV, Sliusar AA, Miastkovskaja IV. Multifactorial modeling of atherosclerosis in rats. *J Educ Health Sport*. 2016;6(3):233-40.
- Gabriels K, Hoving S, Seemann I, Visser NL, Gijbels MJ, Pol JF, et al. Local heart irradiation of ApoE(-/-) mice induces microvascular and endocardial damage and accelerates coronary atherosclerosis. *Radiother Oncol*. 2012 Dec;105(3):358-64.
- Janssen CI, Jansen D, Mutsaers MP, Dederen PJ, Geenen B, Mulder MT, et al. The effect of a high-fat diet on brain plasticity, inflammation and cognition in female ApoE4-knockin and ApoE-knockout mice. *PLoS One*. 2016 May 12;11(5):e0155307.
- Matsuzawa N, Takamura T, Kurita S, Misu H, Ota T, Ando H, et al. Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology*. 2007 Nov;46(5):1392-403.
- Okada K, Warabi E, Sugimoto H, Horie M, Gotoh N, Tokushige K, et al. Deletion of Nrf2 leads to rapid progression of steatohepatitis in mice fed atherogenic plus high-fat diet. *J Gastroenterol*. 2013 May;48(5):620-32.
- Côté I, Ngo Sock ET, Lévy É, Lavoie JM. An atherogenic diet decreases liver FXR gene expression and causes severe hepatic steatosis and hepatic cholesterol accumulation: effect of endurance training. *Eur J Nutr*. 2013 Aug;52(5):1523-32.
- Van der Heijden RA, Sheedfar F, Morrison MC, Hommelberg PP, Kor D, Kloosterhuis NJ, et al. High-fat diet induced obesity primes inflammation in adipose tissue prior to liver in C57BL/6j mice. *Aging*. 2015 Apr;7(4):256-68.
- VanSaun MN, Lee IK, Washington MK, Matrisian L, Gordon DL. High fat diet induced hepatic steatosis establishes a permissive microenvironment for colorectal metastases and promotes primary dysplasia in a murine model. *Am J Pathol*. 2009 Jul;175(1):355-64.
- Nishina PM, Verstuyft J, Paigen B. Synthetic low and high fat diets for the study of atherosclerosis in the mouse. *J Lipid Res*. 1990 May;31(5):859-69.
- Chen S, Shimada K, Zhang W, Huang G, Crother TR, Arditi M. IL-17A is proatherogenic in high-fat diet-induced and Chlamydia pneumoniae infection-accelerated atherosclerosis in mice. *J Immunol*. 2010 Nov 1;185(9):5619-27.
- Ma Y, Wang W, Zhang J, Lu Y, Wu W, Yan H, et al. Hyperlipidemia and atherosclerotic lesion development in Ldlr-deficient mice on a long-term high-fat diet. *PLoS One*. 2012;7(4):e35835.
- Skibo GG. Experimental ischemia of brain. *Kyiv: Nauk. dumka*; 2016.

*Матеріал надійшов до редакції 05.10.2017*