

А.В.Трофимова
Н.А.Чиж
И.В.Белочкина
В.В.Волина
Б.П.Сандомирский

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

Ключевые слова: терапевтическая гипотермия, мезенхимальные стромальные клетки, экспериментальный инфаркт миокарда.

Надійшла: 21.08.2016

Прийнята: 12.09.2016

УДК 616.12:615.832.9:611.018.2/6

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СЕРДЦА ПОСЛЕ ИНДУКЦИИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ГИПОТЕРМИИ И ВВЕДЕНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В ТЕРАПИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИНФАРКТА МИОКАРДА

Реферат. Исследовали морфологические особенности развития некроза и ремоделирования сердца крыс после терапевтической гипотермии и введения аллогенных плацентарных мезенхимальных стромальных клеток на фоне экспериментального инфаркта миокарда, вызванного лигированием *a. coronaries sinistra*. Было установлено, что комбинированное использование терапевтической гипотермии и трансплантации мезенхимальных стромальных клеток при инфаркте миокарда ускоряет репаративные процессы в сердце и снижает степень ремоделирования миокарда левого желудочка.

Morphologia. – 2016. – Т. 10, № 3. – С. 288-292.

© А.В.Трофимова, Н.А.Чиж, И.В.Белочкина, В.В.Волина, Б.П.Сандомирский, 2016

✉ ibelochkina@ukr.net

Trofimova A.V., Chizh N.A., Belochkina I.V., Volina V.V., Sandomirskiy B.P. Morphological characteristics of heart after induction of therapeutic hypothermia and the introduction of mesenchymal stromal cells in therapy of experimental myocardial infarction.

ABSTRACT. Background. Diseases of cardiovascular system still occupy the first place among the causes of death and disability of population. Currently the new methods for stimulating the regeneration of damaged myocardium are actively developing. It is assumed that the transplantation of mesenchymal stromal cells (MSCs) can promote the replacement of necrotic areas by newly formed cardiomyocytes and stimulate angiogenesis in the ischemic area. In the last decade the method of application of therapeutic hypothermia in order to protect heart and brain cells from oxygen starvation in acute coronary and cerebral insufficiency has become widespread. **Objective.** The purpose of this work was to study the morphological features of necrosis development and cardiac remodeling in myocardial infarction in rats after the induction of therapeutic hypothermia and injection of MSCs. **Methods.** The experiment was carried out in 60 white outbred male rats. All the animals were divided into 4 groups after modeling of infarction by ligation of *a. coronaries sinistra*: 1 – control (myocardial infarction), 2 – myocardial infarction and induction of hypothermia for 60 min, 3 – myocardial infarction and once intravenous injection of allogeneic placental MSCs (concentration 1.2×10^6 cells/ml), 4 – myocardial infarction and combined use of hypothermia and injection of MSCs. Heart tissue for morphological studies was taken on 7th, 14th and 30th days of experiment. Morphometric studies of myocardial infarction area was performed using BioVision 4,0 program. The relative area of connective tissue, the vessel relative area and the number of vessels were assessed. **Results.** In group 4, in contrast to other groups with myocardial infarction, on 7th day of the experiment the reparative processes in myocardium prevailed over destructive ones. Reparation of myocardium was manifested in the stimulation of angiogenesis, the development of collateral circulation and also in the recovery of contractile elements of cardiomyocytes of the peri-infarction zone. The data of morphometric study in group 4 showed the smallest area of connective-tissue scar on the 30th day of the experiment. **Conclusion.** Transplantation of MSCs, and especially, combination of therapeutic hypothermia and MSC transplantation lead to a significant improvement in vascularization in the infarcted zone and reduces the connective tissue scar square surface.

Key words: therapeutic hypothermia, mesenchymal stromal cells, experimental myocardial infarction.

Citation:

Trofimova AV, Chizh NA, Belochkina IV, Volina VV, Sandomirskiy BP. [Morphological characteristics of heart after induction of therapeutic hypothermia and the introduction of mesenchymal stromal cells in therapy of experimental myocardial infarction]. *Morphologia*. 2016;10(3):288-92. Russian.

Введение

Несмотря на прогресс в развитии современ-

ной медицины, заболевания сердечно-сосудистой системы по-прежнему занимают пер-

вое место среди причин смертности и инвалидизации населения в большинстве развитых стран мира. Ежегодно в Украине регистрируется около 50 тыс. новых случаев инфаркта миокарда (ИМ) с высоким уровнем летальности. В настоящее время в лечении острого коронарного синдрома при ишемической болезни сердца используется ряд консервативных и хирургических методов, которые не всегда бывают достаточно эффективными [1]. В связи с этим разрабатываются и внедряются новые методы лечения ИМ. Так в последнее десятилетие большую популярность приобрел метод применения терапевтической гипотермии (ТГ) с целью защиты клеток сердца и головного мозга от кислородного голодания в условиях острой коронарной и мозговой недостаточности [2,3]. На основании ряда исследований, в том числе и клинических, подтверждающих эффективность данного метода, главные медицинские организации мира внесли ТГ в протоколы сердечно-легочной реанимации при острых ишемических состояниях [4]. Как один из альтернативных методов ревазуляризации миокарда рассматривается использование клеточной терапии, а именно трансплантации мезенхимальных стромальных клеток (МСК). В основе такого подхода лежит усиление репаративной регенерации миокарда и стимуляция неоангиогенеза в ишемизированной зоне, что приводит к ограничению области и глубины инфаркта [5-7]. Терапевтические возможности сочетания двух указанных методов, ТГ и трансплантации МСК, при ИМ до настоящего времени не исследованы.

Цель работы - исследование морфологических особенностей развития некроза и ремоделирования сердца с экспериментальным ИМ после индукции ТГ и введения аллогенных МСК.

Материалы и методы

Эксперимент проведен на 60 белых беспородных крысах-самцах, содержащихся в стандартных условиях вивария, массой 250-300 г и возрастом 6 месяцев. Работа выполнена в соответствии с принципами биоэтики, изложенными в Хельсинской декларации и «Законі України «Про захист тварин від жорсткого поводження»» (№ 1759 от 15.12.2009). Методики утверждены комиссией по биоэтике ИПКиК НАН Украины (г. Харьков).

Моделирование ИМ проводили путем перевязки нисходящей ветви *a. coronaries sinistra* на границе верхней и средней трети сосуда [8]. Терапевтическую гипотермию проводили в холодной камере течение 60 мин. Локальная температура воротниковой зоны поддерживалась на уровне +4°C, при этом ректальная и тимпаническая температура снижалась до +25°C. Суспензию аллогенных криоконсервированных МСК плаценты [9] вводили через большую поверхностную вену бедра однократно с концентрацией $1,2 \times 10^6$ клеток/мл. Все животные после модели-

рования ИМ были разделены на 4 группы по 15 крыс в каждой: 1 – контроль, животные с экспериментальным ИМ без лечения; 2 – животные, которым сразу после моделирования ИМ проводили индукцию ТГ; 3 – крысы, которым в течение первых суток после моделирования ИМ вводили МСК; 4 – животные с ИМ и сочетанным использованием ТГ и МСК.

Образцы ткани левого желудочка сердца для гистологического исследования брали на 7, 14 и 30 сутки эксперимента. Ткань фиксировали в 10% нейтральном формалине с последующей проводкой и заливкой в парафин. Гистологические срезы толщиной 5-7 мкм окрашивали пикрофуксином по Ван Гизон, гематоксилином и эозином [10]. Гистологические препараты исследовали с помощью микроскопа «Granum R 4003» и камеры «EГес DCM 510». Морфометрические исследования зоны инфаркта миокарда проводили на 30 сутки с помощью программы BioVision 4,0 и в соответствии с общими принципами морфометрического анализа [11]. Оценивали площадь соединительной ткани относительно общей площади препарата, относительную площадь сосудов и количество сосудов на 100000 кв. мкм. Статистические данные оценивали по универсальному критерию достоверности Манна-Уитни с помощью программы *SPSS Statistics 17.0*.

Результаты исследований

Лигирование левой коронарной артерии у крыс приводило к появлению последовательных изменений в миокарде, сходных с картиной у острого ИМ у человека.

В группе 1 (контроль) наблюдали классическую воспалительную реакцию в виде инфильтрации зоны повреждения тканевыми макрофагами, лейкоцитами и лимфоцитами. К 14 суткам по периферии зоны инфаркта появлялась неспецифическая грануляционная ткань. Наблюдались начальные этапы формирования соединительной ткани в зоне повреждения (рис. 1А). К 30 суткам в контрольной группе в зоне повреждения происходило активное формирование и структуризация рубцовой соединительной ткани. В миокарде, окружающем зону некроза, отмечали истончение кардиомиоцитов с нечетким рисунком миофибрилл, светлыми ядрами, слабо выраженной поперечной исчерченностью и клеточным инфильтратом между ними (рис. 1Б).

Динамика морфологических изменений в сердце в группе 2 (применение гипотермии при ИМ) по срокам не отличалась от группы контроля.

При качественном морфологическом исследовании зоны поражения миокарда в группе 3 (трансплантация МСК) отмечали отличия морфологической картины в поврежденном участке по сравнению с группами 1 и 2. На периферии зоны инфаркта к 14 суткам обращало на себя внимание развитие полноценной грануляцион-

ной ткани, переходящей в нежную рубцовую ткань, с большим количеством кровеносных ка-

пилляров, что является признаком репаративных процессов (рис. 2).

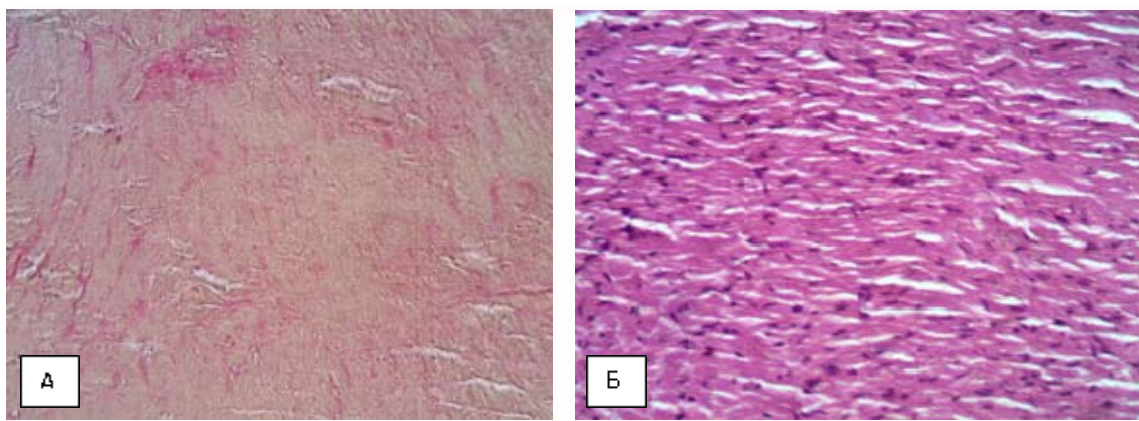


Рис.1. Миокард крыс группы 1 (контроль, ИМ). 14 сутки после операции, зона инфаркта. Появление тонких соединительнотканых волокон в направлении погибших мышечных волокон. Окраска пикрофуксином по Ван-Гизон, $\times 200$ (а). 30 сутки после операции, периферия зоны инфаркта. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$ (б).

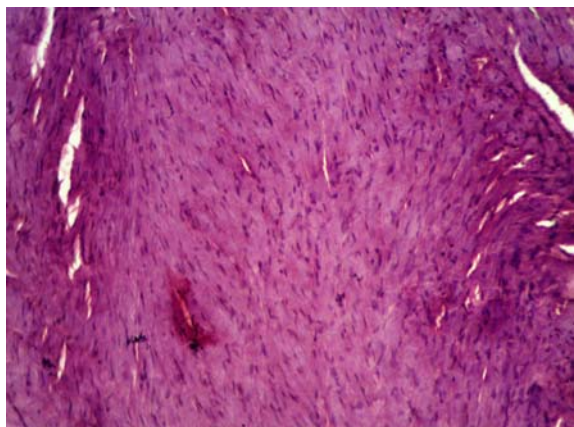


Рис. 2. Миокард крыс группы 3 (ИМ+МСК). 14 сутки после операции, зона инфаркта. Замещение погибшей мышечной ткани в зоне некроза новообразованной рыхлой соединительной тканью с кровеносными сосудами и капиллярами. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$.

В группе 4 (ТГ и трансплантация МСК на фоне ИМ) развитие зрелой грануляционной ткани с прорастающими в ней капиллярами на периферии зоны некроза наблюдали уже к 7 суткам (рис. 3). К 14 суткам в миокарде крыс группы 4 в зоне некроза отмечалась новообразованная рыхлая соединительная ткань, представленная зрелыми коллагеновыми волокнами (рис. 4А), а также кровеносными сосудами и капиллярами. Встречалось небольшое количество макрофагов, лимфоцитов, а также фибробластов и фиброцитов. Микроскопическая картина на периферии зоны инфаркта свидетельствовала о репаративных процессах, выражающихся в развитии полноценной грануляционной ткани, переходящей в

нежную рубцовую ткань, с большим количеством кровеносных капилляров соматического типа (рис. 4Б).

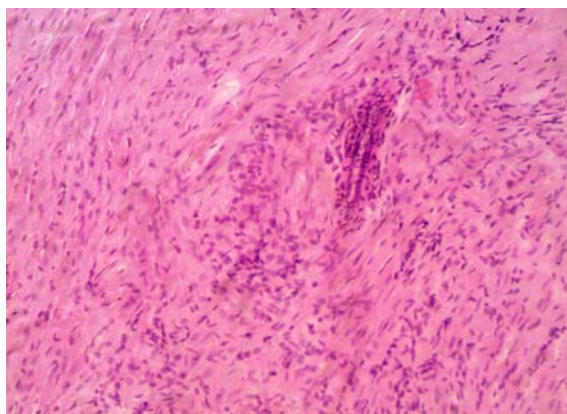


Рис. 3. Миокард крыс группы 4 (ИМ+МСК+ТГ). 7 суток после операции, периферия зоны некроза. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$.

К 30 сут в группе 4 в зоне инфаркта определялась нежная рубцовая ткань, пронизанная многочисленными капиллярами соматического типа, свидетельствующих о восстановлении микроциркуляции в этой зоне (рис. 18). Визуально зона поражения после инфаркта была значительно меньше, чем в других группах. В окружающей зону поражения ткани кардиомиоциты были равномерной величины, с умеренной поперечной исчерченностью.

Для объективизации различий между группами животных проводили морфометрические исследования гистологических препаратов миокарда, взятого на 30 сут эксперимента. Как видно из таблицы, в группе 4 (с ТГ и трансплантацией МСК) по всем изученными показателями были

получены лучшие результаты в сравнении с нелеченым ИМ (группа контроля) и, частично, с группами 2 и 3. Если по относительной площади сосудистого русла в зоне инфаркта различия между группами были незначительными, то по среднему количеству сосудов на 100 тыс. кв. мкм ткани рубца были получены наиболее убедительные результаты. Видно, что трансплантация МСК (группы 3 и 4) способствовала существенному повышению этого показателя (в 4 и 5 раз

соответственно), что согласуется с данными литературы [5,6,12]. Сочетание МСК с ТГ было более результативным. Благоприятная динамика со стороны сосудов сопровождалась уменьшением объема соединительной ткани в зоне ИМ. В группе 4 (сочетание МСК и ТГ) площадь соединительной ткани была почти в 2 раза ниже, чем в контроле (ИМ), и значимо ниже, чем в группах 2 и 3.

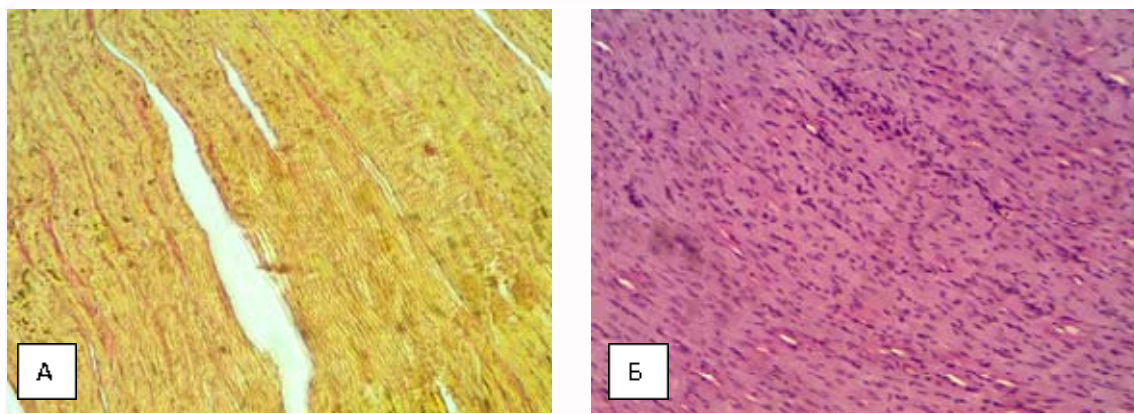


Рис. 4. Миокард крыс группы 4 (ИМ+МСК+ТГ). А. 14 суток после операции. Зрелые (фуксинофильные) коллагеновые волокна в новообразованной рыхлой соединительной ткани в зоне некроза. Б. Зрелая грануляционная ткань, переходящая в нежную рубцовую ткань, с большим количеством кровеносных капилляров соматического типа на периферии зоны инфаркта. Окраска пикрофуксином по Ван-Гизон (А) и гематоксилином и эозином (Б), $\times 200$.

Таблица 1
Морфометрические характеристики зоны инфаркта миокарда на 30 сут

Экспериментальные группы			
1 (контроль, ИМ)	2 (ИМ + ТГ)	3 (ИМ + МСК)	4 (ИМ + МСК + ТГ)
Относительная площадь соединительной ткани, % (M \pm m)			
29,65 \pm 2,08	26,34 \pm 2,45	20,15 \pm 1,78*	16,22 \pm 1,35*#
Относительная площадь сосудов, % (M \pm m)			
7,04 \pm 0,58	8,56 \pm 0,94	10,24 \pm 0,45*	11,39 \pm 0,78*
Количество сосудов на 100000 кв. мкм (M \pm m)			
7,35 \pm 1,08	12,25 \pm 2,16*	29,17 \pm 2,14*	34,65 \pm 2,28*#

Примечания: * - достоверно относительно группы контроля ($p < 0,05$); # - достоверно относительно группы 3 ($p < 0,05$).

Заключение

Самостоятельное применение ТГ в течение 60 мин не позволяет улучшить динамику морфологических изменений в миокарде, развивающихся после перевязки а. coronariae sinistra. Трансплантация МСК и, в большей степени, сочетание терапевтической гипотермии и трансплантации МСК приводит к значительному улучшению васкуляризации в зоне инфаркта, которая, очевидно, приводит к снижению ишемического повреждения кардиомиоцитов в в пограничных с инфарктом зонах, что в результате способствует уменьшению площади соединительнотканного рубца. Таким образом, ТГ может

рассматриваться как вспомогательное средство, повышающее эффективность клеточной терапии при инфаркте миокарда.

Перспективы дальнейших исследований связаны с изучением возможностей эффективного сочетания факторов клеточной терапии инфаркта миокарда с физическими и химическими, в том числе наномолекулярного уровня, агентами.

Благодарность

Выражаем благодарность Анне Свитиной, научному сотруднику Института клеточной терапии, г. Киев, за помощь в получении культуры плацентарных мезенхимальных стромальных

Литературные источники References

1. Sokolov YuM. [New Indications for myocardial revascularization in Modern Cardiology]. *Sertse i sudyny*. 2012;(2):24–7. Russian.
2. Schneider A, Popp E, Böttiger BW. Therapeutic hypothermia after cardiac arrest. *Emergency Medicine & Critical Care*. 2006;2:1–4.
3. Holzer M, Bernard SA, Hachimi-Idrissi S, Roine RO, Sterz F, Müllner M; Collaborative Group on Induced Hypothermia for Neuroprotection After Cardiac Arrest. Hypothermia for neuroprotection after cardiac arrest: systematic review and individual patient data meta-analysis. *Crit Care Med*. 2005 Feb;33(2):414-8.
4. The Hypothermia after Cardiac Arrest Study Group. Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest. *N Engl J Med*. 2002;346(8):549-56.
5. Noort WA, Feye D, Van Den Akker F, Stecher D, Chamuleau SA, Sluijter JP, Doevendans PA. Mesenchymal stromal cells to treat cardiovascular disease: strategies to improve survival and therapeutic results. *Panminerva Med*. 2010 Mar;52(1):27-40.
6. Maureira P, Marie PY, Yu F, Poussier S, Liu Y, Groubatch F, Falanga A, Tran N. Repairing chronic myocardial infarction with autologous mesenchymal stem cells engineered tissue in rat promotes angiogenesis and limits ventricular remodeling. *J Biomed Sci*. 2012;19: 93.
7. Lai RC, Chen TS, Lim SK. Mesenchymal stem cell exosome: a novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease. *Regen Med*. 2011 Jul;6(4):481-92. doi: 10.2217/rme.11.35.
8. Babaeva GG, Chyzh MO, Galchenko SE, Sandomirsky BP, inventors; IPC&C NAS of Ukraine, assignee. Method of modeling of myocardial infarction. Ukrainian patent UA 65535. 2011 Dec 12. Int. Cl. G09B 23/28. Ukrainian.
9. Shablii V, Kuchma M, Kyryk V, Onishchenko G, Tsupykov O, Klymenko P, Kuchuk O, Gabrielyan A, Domanskiy T, Onishchenko V, Lukash L, Lobyntseva G. Mesenchymal stromal cells from native and cryopreserved human placenta: phenotype, multipotency and in vivo migration potential. *Problems of Cryobiology*. 2012;22(2):157-60.
10. Sarkisov DS, Perov YuL, editors. [Microscopic technique: a guide]. Moscow: Meditsina; 1996. 544 p. Russian.
11. Avtandilov GG. [Medical morphometry]. Moscow: Meditsina; 1990. 384 p. Russian.
12. Grin VK, Mikhailichenko VY, Gnilorybov AM, Popandopulo AG, Estrin SI. [Cellular cardiomyoplasty in experimental myocardial infarction: a monograph]. Donetsk: Yugo-Vostok; 2014. 248 p. Russian.

Трофімова А.В., Чиж М.О., Белочкіна І.В., Воліна В.В., Сандомирський Б.П. Морфологічні характеристики серця після індукції терапевтичної гіпотермії і введення мезенхімальних стромальних клітин в терапії експериментального інфаркту міокарда.

Реферат. Досліджували морфологічні особливості розвитку некрозу і ремоделювання серця щурів після терапевтичної гіпотермії і введення аlogenних плацентарних МСК на тлі експериментального інфаркту міокарда, викликаного лігуванням *a. coronaries sinistra*. Було встановлено, що комбіноване використання терапевтичної гіпотермії і трансплантації МСК при інфаркті міокарда прискорює репаративні процеси в серці і знижує ступінь ремоделювання міокарда лівого шлуночка.

Ключові слова: терапевтична гіпотермія, мезенхімальні стромальні клітини, експериментальний інфаркт міокарда.