

DOI: 10.26693/jmbs02.04.199

УДК 616.127:616.39-056-02 «46»:615.387:57.086.13]:[611.018.5:618.48

Чернявская Е. А., Бабийчук В. Г.

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ МИОКАРДА СТАРЫХ КРЫС С МОДЕЛЬЮ АЛИМЕНТАРНОГО ОЖИРЕНИЯ НА ФОНЕ ВВЕДЕНИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ЯДРОСОДЕРЖАЩИХ КЛЕТОК КОРДОВОЙ КРОВИ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины,
Харьков

elena_chernyavskaya@ukr.net

На сегодняшний день накоплено большое количество данных, свидетельствующих о положительном влиянии препаратов, полученных из кордовой крови, как на разные органы, системы, так и на организм в целом. На экспериментальной модели алиментарного ожирения изучены гистологические особенности состояния тканей и сосудов сердца, проведена гистохимическая оценка состояния коллагеновых и эластических волокон миокарда старых крыс до и после введения криоконсервированных ядросодержащих клеток кордовой крови человека. Установлено, что на фоне введения препарата отмечалась тенденция к нормализации гистологической структуры сердца старых животных с моделью алиментарного ожирения. Положительное влияние сохранялось и в отдаленные сроки экспериментальных исследований.

Ключевые слова: алиментарное ожирение, ядросодержащие клетки кордовой крови, кардиомиоциты, кардиосклероз, липидоз.

Связь работы с научными программами, планами, темами. Данная работа выполнена в рамках научной темы ИПК и К НАН Украины «Формування адаптаційних реакцій організму експериментальних тварин в умовах дії штучного охолодження та криоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові при старінні і патологічних станах», шифр 2.2.6.103, 2016-2020 гг.

Введение. В последние годы ожирение является одной из самых актуальных проблем современного здравоохранения. За несколько последних десятилетий распространенность ожирения и избыточной массы тела резко увеличилась как в развитых, так и в развивающихся странах [5]. Наиболее распространенной формой является ожирение с первичным (алиментарным) фактором патогенеза [7]. Главную причину развития и прогрессирования алиментарного ожирения (АО) ученые видят в нарушении энергетического баланса

между потребляемыми и расходуемыми калориями, что связано с высококалорийным питанием, нарушением пищевого поведения, повышенным содержанием в пище жиров и сахаров, низким содержанием витаминов, минералов и других микроэлементов [6]. Другим важным патогенетическим фактором развития АО считают сидячий образ жизни, низкую физическую активность и прогрессирующую гипокинезию во всех сферах жизни современного человека. При АО происходят метаболические, дисгормональные, гемодинамические изменения в организме, которые влияют на сердечную мышцу, вызывая ее структурные и функциональные изменения [1].

В настоящее время продолжается поиск новых концептуальных подходов к патогенетической терапии ожирения [1, 6]. Научные исследования последних лет подтверждают высокий потенциал применения в медицине кордовой крови, содержащей гемопоэтические стволовые клетки [4]. Кордовая кровь является важным источником биологически активных веществ и стволовых клеток, которые успешно используются при лечении различного рода патологических состояний, в том числе и заболеваний сердечно-сосудистой системы [2], часто сопровождающих АО.

На сегодняшний день исследования, касающиеся изучения механизмов действия препаратов, полученных из кордовой крови на адаптационно-компенсаторные резервы организма экспериментальных животных при АО, отсутствуют. Поэтому большой теоретический и практический интерес представляет возможность коррекции структурно-функциональных нарушений тканей и сосудов миокарда экспериментальных животных при АО с помощью введения криоконсервированных ядросодержащих клеток кордовой крови (ЯСК КК).

Цель исследования – оценка морфологического состояния тканей и сосудов миокарда у экспериментальных старых животных с моделью АО

до и после введения криоконсервированных ЯСК КК.

Объект и методы исследования. Исследования были выполнены на белых старых 24-месячных нелинейных крысах-самцах.

Эксперименты проведены в соответствии с «Общими принципами работы на животных», одобренными V Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2013) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Животные были разделены на три группы (n = 7 в каждой): 1 – интактная; 2 – крысы с моделью АО; 3 – животные с АО на фоне введения криоконсервированных ЯСК КК.

АО моделировали по методике В.Г. Баранова путем содержания животных на гиперкалорийном рационе [3]. Наличие ожирения определяли по достоверному увеличению весо-ростового показателя – индекса Ли, который является точным математическим показателем степени ожирения у крыс и рассчитывается по формуле:

$$\frac{\sqrt[3]{\text{вес тела (в граммах)}}}{\text{длина от носа до анального отверстия, (в см)}} \times 1000.$$

Величина индекса более 300 свидетельствует о наличии ожирения.

Крысам с АО вводили готовый препарат криоконсервированных ЯСК КК, полученный в ИПК и К НАН Украины, который представляет собой взвесь криоконсервированных ЯСК КК в аутоплазме с концентрацией стволовых CD34⁺ клеток 2 – 4 × 10⁵ в 1мл. Размороженные ЯСК КК вводили однократно внутривентриально, в дозе 3×10⁵ CD34⁺-клеток в расчете на килограмм массы тела животного.

Животных всех групп выводили из эксперимента путем декапитации на 7-е и 30-е сутки после введения ЯСК КК. Сразу после этого сердце животного разрезали в поперечном направлении по венечной борозде, выделенную каудальную часть (желудочки) исследовали гистологическими и гистохимическими методами [8].

Материал фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина, обезжовивали в спиртах возрастающей концентрации (от 50° до 100°), пропитывали смесью спирта и ксилола (1:1), ксилолом, смесью ксилола и парафина (1:1), парафином после чего заключали в парафиновый блок.

С помощью санного микротомы «Reichert» (Австрия) изготавливали гистологические срезы (толщиной 5-7 мкм) в плоскости, перпендикулярной длинной оси сердца. После депарафинирования в ксилоле срезы окрашивали гематоксилином

Ганзена и эозином, помещали в полистирол под покровное стекло.

Окрашку соединительной ткани выполняли по методу Ван Гизон с использованием красителя пикрофуксина (насыщенный раствор пикриновой кислоты и 1 % раствор кислого фуксина в соотношении 1:10). При этом докраску клеточных ядер проводили железным гематоксилином Вейгерта, после чего срезы помещали в полистирол под покровное стекло.

Кроме стандартных гистологических исследований, для выявления липидов, проводили окрашивание поперечных срезов желудочков сердца гистохимическим методом с использованием красителя масляного красного (судан красный 5В). Методика окрашивания липидов выполнена в соответствии с рекомендациями изготовителя набора «Масляный красный О» (Bio-Optica Milano SpA, Италия, № 04-220923). Для сохранения фосфолипидов выделенные фрагменты сердца экспериментальных животных фиксировали в кальций-формоловом растворе по Бейкеру (10 мл 40% формалина, 90 мл дистиллированной воды, 1 г хлорида кальция). Срезы толщиной 5 мкм получали на замораживающем микротоме с использованием крио-спрея (Bio-Optica Milano SpA, Италия, 08-SPRAY), и помещали в желатин под покровное стекло. Нейтральные триглицериды и липиды окрашивались в красный цвет.

Исследования и микрофотографирование гистологических срезов проводили в световом микроскопе AxioStar Plus (Carl Zeiss, Германия) с использованием цифровой фотокамеры Canon Power Shot A610 и компьютерной программы AxioVision Rel. 4.6 (Carl Zeiss Imaging Solution GmbH, Германия), а также в исследовательском микроскопе Olympus BX63 (Olympus Corporation, Япония) с использованием цифровой фотокамеры Olympus DP73 и компьютерной программы CellSens Dimension (Olympus Soft Imaging Solution GmbH, Германия). Разрешение полученных изображений 898×673 и 1600×1200 пикселей при увеличениях микроскопов ×200, ×400 (окуляр 10^x, объективы 20^x, 40^x).

Результаты исследований и их обсуждение.

Результаты гистологического исследования тканей миокарда интактных животных подтвердили адекватность применяемых методик. Структурная организация сердечной мышцы соответствовала норме.

В срезах ткани миокарда старых крыс с моделью АО между группами мышечных клеток наблюдалось скопление большого количества жировых клеток, имеющих вид прозрачных пузырьков. В местах разрастания жировой клетчатки миокардиоциты были истончены и атрофированы

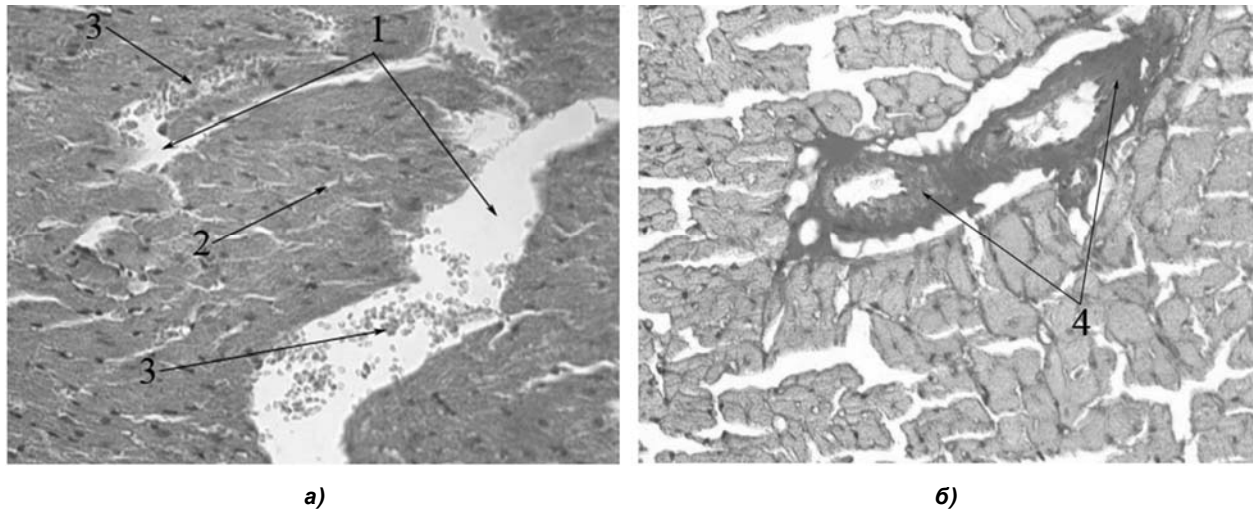


Рис. 1. Участки миокарда левого желудочка старых крыс с моделью АО:
а) разрастание жировой клетчатки (1) между атрофированными миокардиоцитами (2), диапедезные кровоизлияния (3). Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$; **б)** разрастание волокнистых структур стромы (4). Окраска пикрофуксином по Ван Гизон, $\times 400$

(рис. 1, а). Определялись также диапедезные кровоизлияния и повсеместное разрастание волокнистых структур стромы (кардиосклероз), особенно вокруг крупных кровеносных сосудов (рис. 1, б).

При окраске масляным красным в срезах ткани миокарда старых крыс с моделью АО обнаруживалось мелкодисперсное распределение жировых капель в набухших кардиомиоцитах, цитоплазма которых на отдельных участках была полностью замещена ними. На этом фоне встречались редкие крупные жировые капли красного цвета, свидетельствующие о крупнокапельном ожирении (рис. 2, а, б).

Таким образом, морфологическая картина сердечной мышцы старых животных с АО свидетельствовала о наличии признаков развития нарушенного кровообращения: полнокровие и тромбоз сосудов, диапедезные кровоизлияния, гипертрофия миокарда, интерстициальный и периваскулярный отеки, разрастание волокнистых структур стромы (очаговый кардиосклероз). Степень выраженности АО, выявляемого при помощи специфической окраски на нейтральные жиры масляным красным, у старых животных была высокой. Это проявлялось крупнокапельным ожирением на фоне пылевидного и мелкокапельного ожирения.

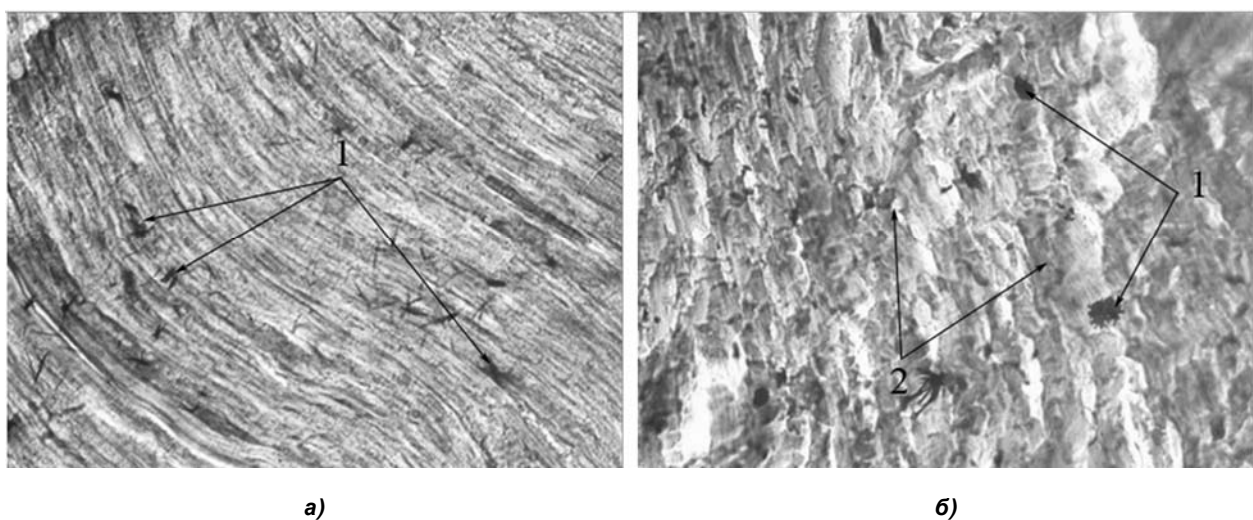


Рис. 2. Участки миокарда левого желудочка старых крыс с моделью АО.
а), б) крупные жировые капли (1) красного цвета на фоне мелкодисперсного распределения жировых капель в набухших кардиомиоцитах (2); **б)** крупнокапельное ожирение. Окраска масляным красным, $\times 400$

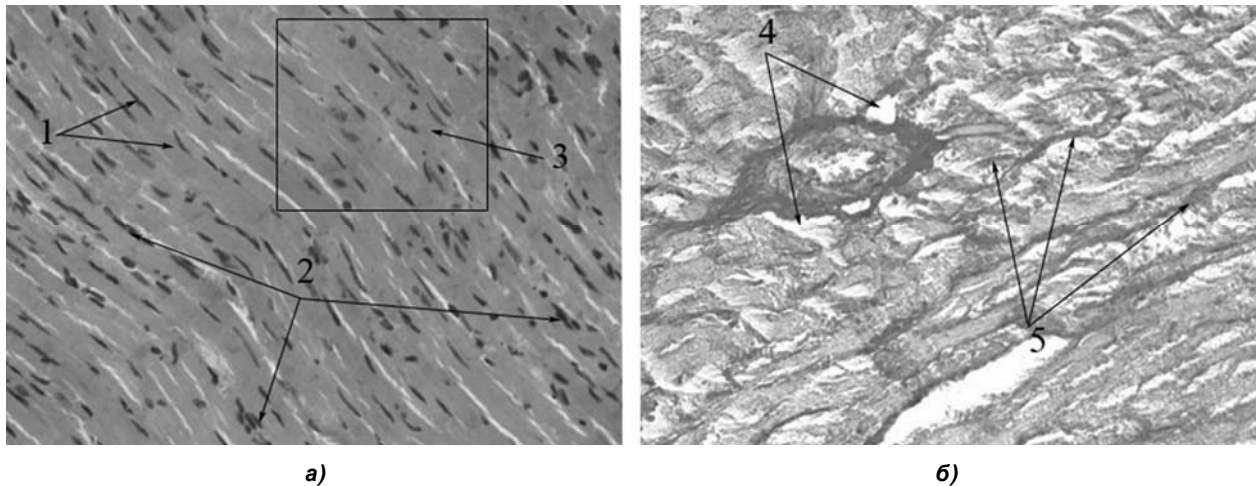


Рис. 3. Участки миокарда левого желудочка старых крыс с моделью АО на 7 сутки после введения криоконсервированных ЯСК КК:

а) между пучками кардиомиоцитов фибробласты (1) и вновь сформированные капилляры (2), гипертрофия мышечных волокон (3), снижение количества ядер кардиомиоцитов. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$; **б)** слабый периваскулярный отек (4) и умеренный кардиосклероз (5). Окраска пикрофуксином по Ван Гизон, $\times 400$

Гистологическое исследование сердечной мышцы старых крыс с моделью АО на 7 сутки после введения ЯСК КК показало, что в кардиомиоцитах имела место гипертрофия мышечных волокон, местами отсутствовала поперечная исчерченность. Отмечались очаги периваскулярного отека, однако лимфо-гистиоцитарных инфильтратов в ткани миокарда в отличие от предыдущей группы животных не наблюдалось. Выявлялась тенденция к снижению количества ядер кардиомиоцитов (рис. 3, а). Все крупные сосуды были полнокровны, характеризовались нормальной формой просвета, равномерно утолщенными стенками. Вокруг

сосудов обнаруживались слабый периваскулярный отек и умеренный кардиосклероз (рис. 3, б).

Выявленная при окраске масляным красным жировая дистрофия миокарда (липидоз), свидетельствующая о нарушении обмена триглицеридов (нейтральных жиров), обнаруживалась в виде пылевидного и мелкокапельного очагового накопления липидов в цитоплазме кардиомиоцитов по ходу венозных капилляров и мелких вен. Включения липидов были розовато-красного цвета.

В гистологической картине миокарда старых крыс с моделью АО на 30 сутки после введения ЯСК КК относительно предыдущего срока наблю-

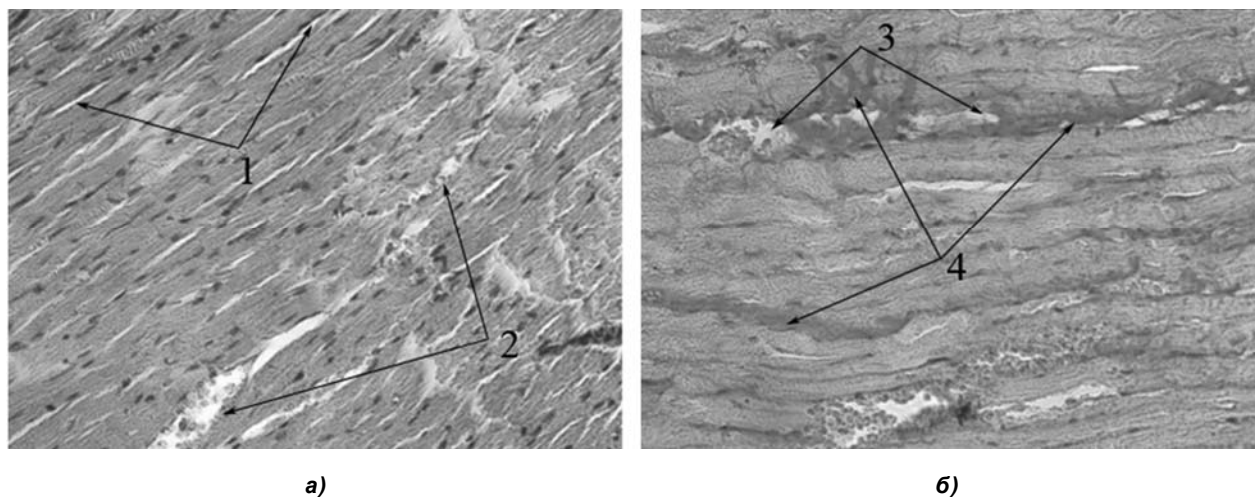


Рис. 4. Участки миокарда левого желудочка старых крыс с моделью АО на 30 сутки после введения криоконсервированных ЯСК КК:

а) между пучками кардиомиоцитов фибробласты (1) и вновь сформированные капилляры (2), заполненные кровью. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$; **б)** умеренный периваскулярный отек (3) и кардиосклероз (4). Окраска пикрофуксином по Ван Гизон, $\times 400$

денія виявлена тенденція к снижению количества ядер кардиомиоцитов и менее выраженные изменения, связанные с состоянием капилляров, которые были лишь местами несколько расширены и заполнены эритроцитами (рис. 4, а). Отмечались очаги периваскулярного отека, однако лимфо-гистиоцитарных инфильтратов выявлено не было. Все крупные сосуды были полнокровны, характеризовались нормальной формой просвета, равномерно утолщенными стенками. Вокруг сосудов обнаруживались умеренный периваскулярный отек и кардиосклероз (рис. 4, б).

При окраске масляным красным, обнаруживалось накопление липидов в цитоплазме кардиомиоцитов в виде пылевидного, мелко- и среднекапельного очагового включения по ходу венозных капилляров и мелких вен, что свидетельствовало о наличии жировой дистрофии миокарда. Включения липидов при окраске масляным красным были розовато-красного цвета (рис. 5).

Таким образом, после введения ЯСК КК в миокарде старых крыс с моделью АО в кардиомиоцитах наблюдалась гипертрофия мышечных волокон, местами отсутствовала поперечная исчерченность. Менее выраженные изменения в миокарде животных после введения ЯСК КК связаны с состоянием капилляров, которые были лишь местами несколько расширены и заполнены эритроцитами. Лимфо-гистиоцитарных инфильтратов выявлено не было. Все крупные сосуды были полнокровны, характеризовались нормальной формой просвета, равномерно утолщенными стенками. Вокруг сосудов обнаруживались умеренный периваскулярный отек и кардиосклероз.

При окраске гистологических препаратов масляным красным имело место снижение степени выраженности жировой дистрофии сердечной мышцы.

Выводы.

1. При гистологическом исследовании миокарда старых крыс с моделью АО обнаруживались

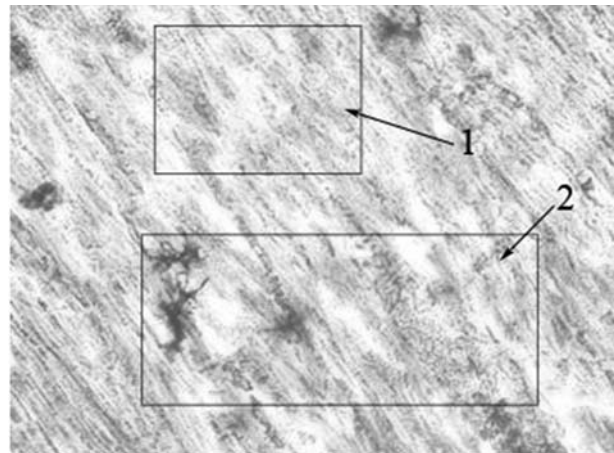


Рис. 5. Участки миокарда левого желудочка старых крыс с моделью АО на 30 сутки после введения криоконсервированных ЯСК КК. Жировая дистрофия в виде пылевидного (1) и капельного очагового накопления липидов (2) в цитоплазме кардиомиоцитов. Окраска масляным красным, $\times 400$

признаки, свидетельствующие о нарушении кровообращения, что подтверждалось полнокровием и тромбозом сосудов, очаговым кардиосклерозом, диапедезными кровоизлияниями, гипертрофией миокарда, а также интерстициальным и периваскулярным отеками.

2. На фоне введения ЯСК КК отмечалась тенденция к нормализации гистологической структуры сердца старых животных с моделью АО. Крупные сосуды были полнокровны с нормальной формой просвета и равномерно утолщенными стенками. Лимфо-гистиоцитарных инфильтратов в ткани миокарда обнаружено не было, вокруг сосудов выявлялся умеренный периваскулярный отек и кардиосклероз.

Перспективы дальнейших исследований. В дальнейших исследованиях, по нашему мнению, перспективным представляется изучить состояние биохимических показателей сыворотки крови старых крыс с моделью АО до и после введения криоконсервированных ядросодержащих клеток кордовой крови.

References

1. Anisimova EV, Kozlova IV, Volkov SV, et al. Pathology of digestive organs at adiposity (review). *Saratov Journal of Medical Scientific Research*. 2011; 7 (4): 851–6. [Russian].
2. Babijchuk LV, Koval SN, Babijchuk GA. Structure of myocardium of young hypertensive rats after injection of cryopreserved human cord blood nucleated cells. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2016; 26 (3): 271–87. [Russian].
3. Baranov VG, Baranov NF, Belovintseva MF. Sensitivity to insulin, glucose tolerance and insulin activity of blood in rats with alimentary obesity. *Problems of endocrinology*. 1972; 6: 52–8. [Russian].
4. Belenkov YuN, Privalov EV, Chekneva IS. Cell therapy of chronic heart failure: types of stem cells used the results of recent clinical studies. *Cardiovascular Surgery*. 2008; 5: 4–18. [Russian].
5. Berezina MV, Mihaleva OG, Bardymova TP. The obesity: mechanisms of development. *Siberian Medical Journal*. 2012; 7: 15–8. [Russian].
6. Kondakov IK, Koval SN, Snegurskaya IA, et al. To the problem of metabolic syndrome pathogenesis. Adipose tissue and markers of acute inflammation phase. *Arterial hypertension*. 2009; 3 (5): 39–43. [Russian].

7. Sarkisov DS, Petrov DS. *Mykroskopicheseskaya technics*. M: Medicine, 1996. 544 p. [Russian].
8. Vasilkova TN, Baklaeva TB, Mataev SI, Rybina YuA. Significance of obesity in cardiovascular pathology. *Practical Medicine*. 2013; 7 (56): 117–22. [Russian].

УДК 616.127:616.39-056-02«46»:615.387:57.086.13]:[611.018.5:618.48

**ОСОБЛИВОСТІ СТРУКТУРНОЇ ОРГАНІЗАЦІЇ МІОКАРДА СТАРИХ ЩУРІВ
З МОДЕЛЛЮ АЛІМЕНТАРНОГО ОЖИРІННЯ НА ТЛІ ВВЕДЕННЯ
КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ЯДРОВІСНИХ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ**

Чернявська О. О., Бабійчук В. Г.

Резюме. На сьогоднішній день накопичено велику кількість даних, які свідчать про позитивний вплив препаратів, отриманих із кордової крові, як на різні органи, системи, так і на організм в цілому. На експериментальній моделі аліментарного ожиріння вивчені гістологічні особливості стану тканин і судин серця, проведена гістохімічна оцінка стану колагенових і еластичних волокон міокарда старих щурів до і після введення кріоконсервованих ядровісних клітин кордової крові людини. Встановлено, що на тлі введення препарату відзначалася тенденція до нормалізації гістологічної структури серця старих тварин з моделлю аліментарного ожиріння. Позитивний вплив зберігався і в віддалені терміни експериментальних досліджень.

Ключові слова: аліментарне ожиріння, ядровісні клітини кордової крові, кардіоміоцити, кардіосклероз, ліпідоз.

UDC 616.127:616.39-056-02«46»:615.387:57.086.13]:[611.018.5:618.48

Peculiarities of Structural Organization of Myocardium in Old Rats with Simulated Alimentary Obesity at the Background of Cryopreserved Cord Blood Nucleated Cell Administration
Chernyavskaya E. A., Babijchuk V. G.

Abstract. Alimentary obesity is a chronic disease with a multifactorial nature, being largely stipulated by a lack of motor activity and hypercaloric nutrition. The obesity increases the morbidity and mortality risks because of various complications and requires an interdisciplinary approach in designing therapeutic and preventive methods.

A successful development of cell and tissue therapy is extremely promising for medical purposes. The interest in cord blood, as an alternative source of hematopoietic stem cells, suitable for application in practical medicine, has significantly increased. The use of cord blood is currently indicated in therapy of more than 70 diseases. In this context this *research* was aimed to evaluate the morphological state of myocardial tissues and blood vessels in experimental old animals with simulated alimentary obesity prior to and after administering the cryopreserved cord blood nucleated cells.

Materials and methods. The studies were performed in 24-month-old male rats, which were divided into 3 groups: intact animals, rats with a simulated alimentary obesity, and those with alimentary obesity at the background of cryopreserved cord blood nucleated cells administration. The obesity was simulated according to the V.G. Baranov's technique by keeping animals on a hypercaloric diet. The frozen-thawed human cord blood nucleated cell preparation was once injected intraperitoneally in a dose of 3×10^5 of CD34+ cells per kilogram of animal weight. The animals of all the groups were sacrificed via decapitation to days 7 and 30 after administering cord blood nucleated cells. Right after that the animal's heart was cut transversely along the coronary groove, the isolated caudal part (ventricles) was examined histologically and histochemically.

Results. During the study a structural organization of cardiac muscle of intact animals was revealed to correspond to the norm. Morphological picture of myocardium in old animals with a simulated alimentary obesity testified to the presence of signs of circulatory disorders, confirmed by vascular congestion and thrombosis, focal cardiosclerosis, diapedetic hemorrhages, myocardial hypertrophy, as well as interstitial and perivascular edema. Large fat drops at the background of small ones were revealed in old animals by means of a specific staining for neutral fats.

There was observed a tendency to normalization of histological structure of heart in old animals with simulated alimentary obesity even after cryopreserved cord blood nucleated cell administration. The large vessels were full-blooded with a normal lumen shape and uniformly thickened walls. There were no lymphohistiocytic infiltrates in myocardial tissue, a moderate perivascular edema and cardiosclerosis were revealed around the vessels. When staining histological preparations with oily red, the manifestation rate of fatty degeneration of cardiac muscle decreased. A positive effect was kept even in the more distant periods of experimental research.

Keywords: alimentary obesity, cord blood nucleated cells, cardiomyocytes, cardiosclerosis, lipidosis.

Стаття надійшла 25.08.2017 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування