

УДК 611.127–002.4.085:612.59

МОДЕЛИРОВАНИЕ НЕКРОЗА МИОКАРДА С ПОМОЩЬЮ КРИОТЕХНОЛОГИИ

И. В. Слета
Н. А. Чиж
С. Е. Гальченко
Б. П. Сандомирский

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, Харьков

E-mail: cryo@online.kharkov.ua

Ежегодно в нашей стране регистрируется около 50 тыс. новых случаев инфаркта миокарда. Совершенствование способов профилактики и лечения этой патологии должно базироваться на адекватных экспериментальных моделях.

В работе рассмотрены биотехнологические этапы воспроизведения некроза миокарда у крыс с использованием криомедицинских методов. Изучена зависимость полученных результатов от оперативного доступа, диаметра криоапликатора и длительности криовоздействия. Установлена зависимость величины зоны крионекроза миокарда от параметров криовоздействия.

Показана высокая точность воспроизведения топографии и размеров зоны некроза миокарда с использованием гистологических и ЭКГ-методов, а также возможность формирования субэпикардального и трансмурального некроза миокарда, что чрезвычайно важно для доклинического изучения различных методов лечения.

Исследования патологических изменений сердца в динамике показали, что в зоне криовоздействия в миокарде развивалась воспалительная реакция, которая в свою очередь сменялась процессами фибротизации с формированием соединительнотканного рубца.

Ключевые слова: некроз миокарда, моделирование, криодеструкция.

Ежегодно в нашей стране регистрируется около 50 тыс. новых случаев инфаркта миокарда [1]. Инфаркт миокарда (ИМ) — одна из форм некроза миокарда, вызванная нарушением притока крови через пораженные артерии. Совершенствование способов профилактики и лечения ИМ может базироваться на адекватных экспериментальных моделях [2–4].

В экспериментальных исследованиях в качестве моделей ИМ для создания «коронарогенных» некрозов выполняют эмболизацию или перевязку коронарных артерий [2], для формирования «некоронарогенных» некрозов вводят химические или гормональные препараты, а также проводят электрокоагуляцию [3] или криодеструкцию сердца [5, 6].

Высокая летальность и отсутствие точной повторяемости повреждения сердца при использовании существующих моделей ИМ побуждают исследователей искать новые варианты моделирования ИМ, позволяющие стандартизировать зону поражения.

Цель настоящей работы — разработать биотехнологический метод получения прогнозируемой зоны некроза миокарда (НМ) методом локальной криодеструкции.

Материалы и методы

Исследования выполнены в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными II Национальным конгрессом по биоэтике (20.09.04, Киев) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1985).

Эксперименты проведены на 106 беспородных крысах-самках массой 180–250 г. Модель НМ создавали хирургическим способом на животных под эфирным наркозом на спонтанном дыхании. Перед вхождением в грудную полость накладывали 2 провизорных шва (рис. 1), что позволяло быстро ее ушить после криовоздействия и таким образом снизить риск послеоперационных осложнений, включая пневмоторакс.

Криовоздействие на сердце производили азотным криоинструментом с температурой рабочей поверхности аппликатора $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (рис. 2). После криодеструкции сердца грудную полость быстро и герметично ушивали. С целью профилактики пневмоторакса шприцем удаляли воздух из грудной полости.

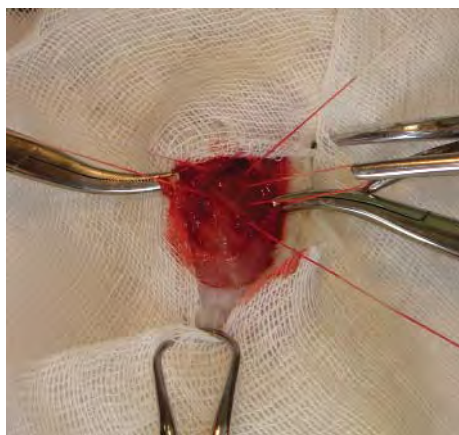


Рис. 1. Наложение провизорных швов перед криовоздействием на сердце

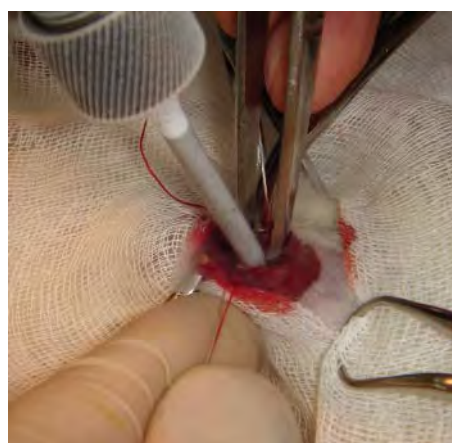


Рис. 2. Проведение криовоздействия на сердце

Отработку параметров криовоздействия проводили в 2 этапа.

1-й этап — выбор диаметра аппликатора (15 крыс). Животные были разделены на 3 группы, по 5 крыс в каждой, с использованием криоаппликаторов диаметром 7 мм, 5 мм и 3 мм. Длительность криовоздействия на сердце составляла 10 с, а оперативный доступ осуществляли в 4–5-м межреберьях. Критерием оценки выбора диаметра криоаппликатора служил показатель летальности животных.

2-й этап — определение зависимости функциональных и морфологических изменений сердца от локализации и экспозиции криовоздействия (91 крыса). Для получения НМ в различных топографических областях сердца оперативный доступ осуществляли в 4–5-м или в 5–6-м межреберьях.

При проведении 2-го этапа эксперимента животные были разделены на 3 группы:

1-я группа (контроль) — животные с торакотомией без криовоздействия на сердце при оперативном доступе в 4–5-м межреберьях;

2-я группа — животные после криовоздействия на левый желудочек при оперативном доступе в 4–5-м межреберьях;

3-я группа — животные после криовоздействия на верхушку сердца при оперативном доступе в 5–6 межреберьях.

Животные 2-й и 3-й групп по длительности криовоздействия на сердце разделили на 3 подгруппы: А — 10 с; Б — 15 с; В — 30 с.

Группа интактных животных (норма) — 7 крыс.

Функциональную способность миокарда исследовали электрокардиографически. Электрокардиограммы (ЭКГ) животных регистрировали на аппаратно-программном комплексе «Поли-Спектр» («Нейрософт»,

Россия) до операции, в первые минуты после операции и через 1, 7, 14 и 30 сут после операции. Амплитуду устанавливали на 20 мм, а скорость записи — на 50 мм/с. По ЭКГ определяли частоту сердечных сокращений (ЧСС) в 1 мин, оценивали ритм и проводили анализ комплекса QRS–T.

Морфологическую картину миокарда изучали на 1-, 7-, 14- и 30-е сут после криовоздействия по гистологическим срезам, окрашенным гематоксилином и эозином. Визуально определяли степень воспалительной реакции и формирования соединительнотканного рубца в зоне криовоздействия. Глубину очагов криодеструкции миокарда рассчитывали с помощью компьютерной программы Bio Vision 4.0.

Статистическую обработку результатов проводили параметрическим методом Стьюдента–Фишера с использованием t-критерия и непараметрическим методом ANOVA. Количественные данные представлены в средних величинах и средних квадратичных отклонениях. Расчет показателей выполняли с помощью SPSS 17.0 для Windows.

Результаты и обсуждение

На 1-м этапе эксперимента крионекроз, полученный при воздействии на сердце криоаппликатором диаметром 7 мм, приводил к 100% -й летальности животных, а при диаметре 5 мм летальность крыс составляла 60%. Применение криоаппликатора диаметром 3 мм способствовало образованию зоны криоповреждения сердца с отсутствием летальности животных во всей группе. В связи с этим дальнейшие эксперименты по моделированию НМ осуществляли с помощью криоаппликатора диаметром 3 мм.

На 2-м этапе эксперимента исследование ЭКГ у интактных крыс и крыс перед операцией по моделированию НМ (норма) показало, что у всех животных был правильный синусовый ритм с ЧСС 420 ± 25 в 1 мин, отсутствовали нарушения проводимости и изменения в комплексе QRS-T (рис. 3).

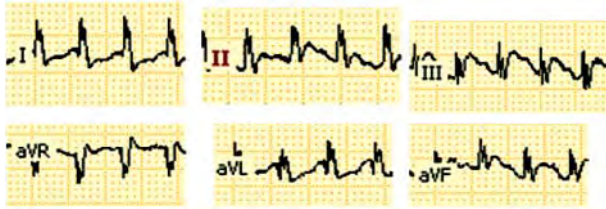


Рис. 3. ЭКГ крысы в норме

В ранние сроки после операции у животных 1-й группы (контроль) наблюдали увеличение зубца Т. Ритм синусовый правильный, ЧСС составляла $402 \pm 16,0$ в 1 мин (таблица). Во все остальные сроки наблюдения существенных нарушений в электрокардиограммах у животных этой группы выявлено не было (рис. 4, а, б).

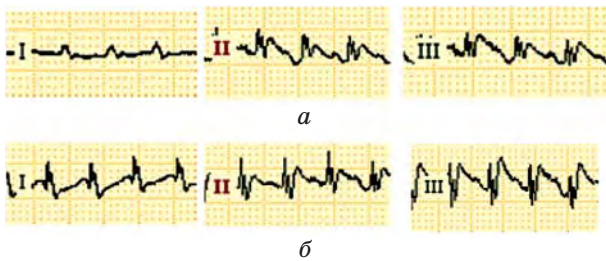


Рис. 4. ЭКГ крыс после торакотомии (контроль) в 4–5-м межреберьях:
а — непосредственно после криовоздействия;
б — через 1 сут после криовоздействия

Криовоздействие на сердце при оперативном доступе в 4–5-м межреберьях (2-я группа) с экспозицией 10 с (подгруппа А) и 15 с (подгруппа Б) приводило к образованию на боковой поверхности левого желудочка сердца зон оледенения, диаметр которых

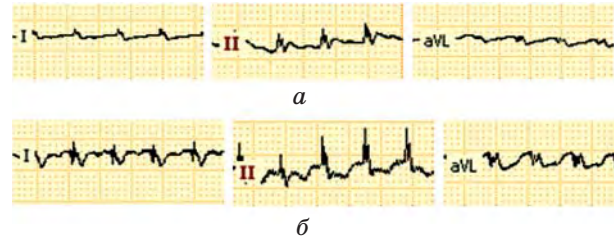


Рис. 5. ЭКГ крыс после 10 с криовоздействия на сердце при оперативном доступе в 4–5-м межреберьях:
а — непосредственно после криовоздействия;
б — через 1 сут после криовоздействия

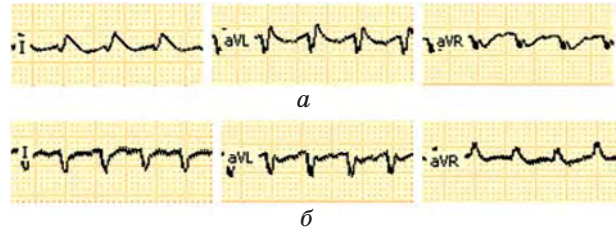


Рис. 6. ЭКГ крыс после 30 с криовоздействия на сердце при оперативном доступе в 4–5-м межреберьях:
а — непосредственно после криовоздействия;
б — через 1 сут после криовоздействия

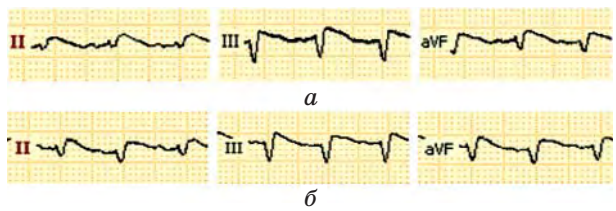


Рис. 7. ЭКГ крыс после 30 с криовоздействия на сердце при оперативном доступе в 5–6-м межреберьях:
а — непосредственно после криовоздействия;
б — через 1 сут после криовоздействия

соответствовал размерам криоапликатора (3 мм). Глубина криоповреждения сердца животных подгруппы А достигала $0,18 \pm 0,03$ мм, а Б — $0,28 \pm 0,02$ мм. При исследовании ЭКГ сразу после окончания оперативного вмешательства в подгруппах А и Б частота сердечных сокращений была на 16% и 19% меньше нормы (с достоверностью $P < 0,05$, таблица).

Динамика частоты сердечных сокращений крыс после криовоздействия на сердце

Группы	Срок наблюдения, сут				
	После операции	1	7	14	30
Норма	420±25				
Контроль	402±16,0	412±15,7	408±19,5	417±10,9	415±14,5
Подгруппа А	354±9,0 ^{1,2}	427,5±9,9	420±19,9	420±10,6	417±16,3
Подгруппа Б	348±12,2 ^{1,2}	416±14,5	418±15,5	429±19,6	429±19,3
Подгруппа В	325±10,7 ^{1,2}	389±19,9	401±16,2	400±15,3	407±13,4

Примечание: ¹ — различие достоверно относительно нормы, $P < 0,05$; ² — различие достоверно относительно контроля, $P < 0,05$.

Отмечали снижение амплитуды зубцов R, появление q-зубца и отрицательных зубцов T в I и avL-отведениях, что свидетельствовало о развитии у животных этих подгрупп субэпикардального ИМ (рис. 5). При увеличении времени криовоздействия на сердце до 30 с (подгруппа В) увеличивалась и глубина криоповреждения сердца — до $0,42 \pm 0,05$ мм. При этом ЭКГ соответствовала картине трансмурального ИМ в тех же топографических областях со снижением ЧСС до $325 \pm 10,7$ [4]. Появление зубца Q в I и avL-отведениях сопровождалось увеличением сегмента ST (рис. 5, а).

Криовоздействие на сердце при оперативном доступе в 5–6-м межреберьях (3-я группа) с экспозицией 10 с (подгруппа А), 15 с (подгруппа Б) и 30 с (подгруппа В) приводило к образованию зон криоповреждения на верхушке сердца, объемы которых аналогичны зонам соответствующих подгрупп 2-й группы. ЭКГ во II, III и avF-отведениях показали, что у животных подгрупп А и Б сразу же после операции появлялись признаки ишемического повреждения сердца, а у животных подгруппы В — изменения, характерные для трансмурального инфаркта миокарда с появлением Q-зубца в этих отведениях (рис. 7, а).

Через 1 сут после криовоздействия зоны криоповреждения сердца макроскопически у животных всех групп имели четкие границы, были отечны, с синюшным оттенком. Исследование гистологических препаратов сердца крыс показало, что применяемое криовоздействие привело к образованию трех биологически значимых зон: I — зона криоповреждения, в которой отмечали участки некроза и паранекроза сердечной мышцы с выраженными дистрофическими явлениями; II — пограничная зона, окружающая зону криоповреждения, в которой уже заметны признаки воспалительной реакции; III — периферические участки сердца, морфологическая картина которых практически не отличалась от нормы.

Изменения электрокардиограмм, отмеченные непосредственно после операции, сохранялись и через 1 сут. Данные ЭКГ свидетельствовали о развитии ишемических повреждений в переднебоковой поверхности сердца подгрупп А и Б животных 2-й группы (рис. 5, б), в заднедиафрагмальных областях и верхушке сердца подгрупп А и Б животных 3-й группы. ЧСС у животных 2-й и 3-й групп имела одинаковую динамику. Через 1 сут после оперативного вмешательства сохранялся правильный синусовый ритм,

а ЧСС восстанавливалась до показателей нормы (таблица).

У животных подгруппы В 2-й и 3-й групп электрокардиографические изменения подтверждали наличие трансмурального ИМ в тех же топографических областях, т. е. в переднебоковой поверхности сердца животных 2-й группы (рис. 6, б) и заднедиафрагмальных областях и верхушке сердца животных 3-й группы (рис. 7, б). Особенностью ЭКГ животных 2-й группы подгруппы В было появление на 1-е сут отрицательных зубцов T и реципрокных изменений в avR-отведении (рис. 6, б.).

Исследование ЭКГ животных на 7-, 14- и 30-е сут после операции показало, что электрокардиографическая картина, зарегистрированная на 1-е сут, сохранялась на протяжении всего срока наблюдения во всех экспериментальных группах (рис. 8). Появление аритмий и экстрасистолий не отмечали. Частота сердечных сокращений варьировала в пределах значений нормы. При этом амплитуды Q-зубцов после 30 с криовоздействия (подгруппы В во 2-й и 3-й группах) сохранялись на одном уровне.

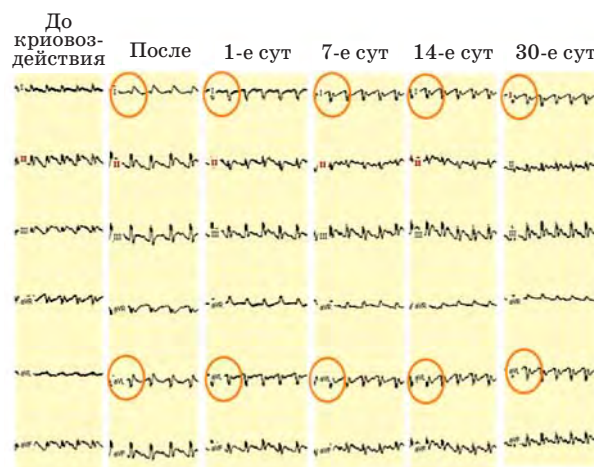


Рис. 8. Динамика ЭКГ в течение 30 сут после 30 с криовоздействия на сердце при оперативном доступе в 4–5-м межреберьях

Исследование гистологических препаратов сердца крыс после криовоздействия дает основания утверждать, что ремоделирование миокарда проходило по классическому пути — от асептического воспаления до формирования соединительнотканного рубца (1–30-е сут) [4]. Объемы зон крионекроза, пограничных зон миокарда и морфологические изменения в них у животных подгрупп А, Б и В 2-й группы были аналогичны объемам зон и морфоструктурным изменениям миокарда у животных 3-й группы соответст-

вующих подгрупп. Гистологические картины сердца животных подгрупп А, Б и В отличались вовлечением в воспалительный процесс различных по глубине слоев миокарда.

Через 7 сут после 10 и 15 с криовоздействия наблюдали зоны реактивного воспаления, сопровождавшиеся развитием лейкоцитарной инфильтрации. Очаги деструкции и воспалительной реакции характеризовались разрушением пучков кардиомиоцитов, дилатацией сосудов и скоплением нейтрофилов (рис. 9).

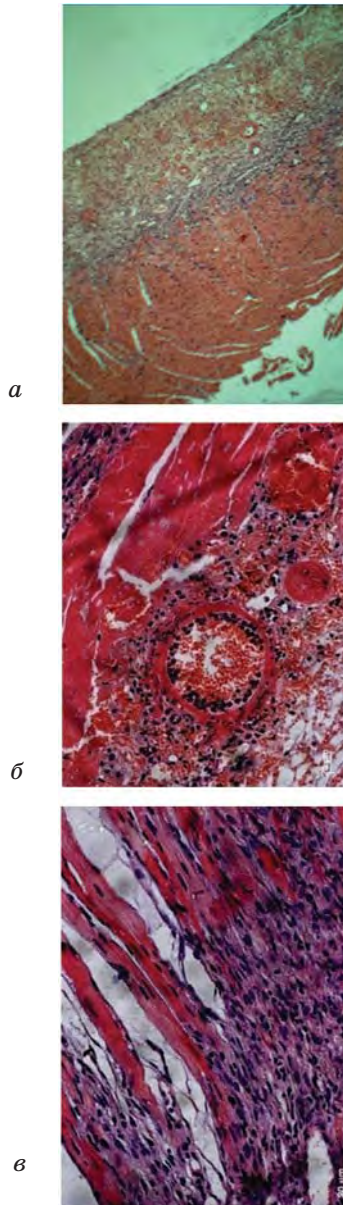


Рис. 9. Очаг некроза миокарда после 15 с криовоздействия на сердце, 7 сут:
а — формирование четкой зоны крионекроза миокарда, об. $\times 10$, ок. $\times 10$;
б — стаз и тромбоз микрососудов;
в — расслоение пучков кардиомиоцитов, об. $\times 40$, ок. $\times 10$. Гематоксилин-эозин

После 30 с криовоздействия сердца наблюдали формирование трансмурального некроза миокарда. На рис. 10 представлены участки полной деструкции миокарда с геморрагиями и клеточной инфильтрацией всего поперечника боковой стенки левого желудочка.

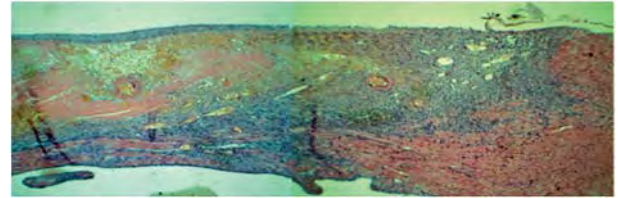


Рис. 10. Очаг некроза миокарда после 30 с криовоздействия на сердце, 7 сут.
 Полная деструкция миокарда боковой стенки левого желудочка.
 Гематоксилин-эозин. Об. $\times 10$, ок. $\times 10$

Благоприятным исходом НМ является организация соединительнотканного рубца. В наших исследованиях на 14-е сут в зоне криовоздействия воспалительная реакция сменялась процессами фибротизации с формированием рыхлой соединительной ткани. На месте погибших кардиомиоцитов начал формироваться соединительнотканый каркас с большим количеством фибробластов в стадии коллагенообразования. Сохранялось полнокровие микрососудов. В отдельных участках отмечались диапедез и скопление макрофагов вокруг сосудов микроциркуляторного русла (рис. 11).

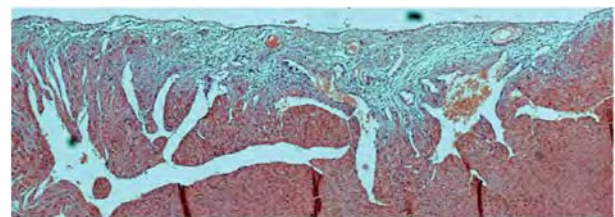


Рис. 11. Формирование соединительнотканного рубца в зоне 15 с криовоздействия на сердце, 14 сут.
 Гематоксилин-эозин. Об. $\times 10$, ок. $\times 10$

Продолжение реконструктивной фазы отмечали и через 30 сут после криовоздействия. Имели место признаки прогрессирующего фиброза с формированием соединительнотканых тяжей по ходу поврежденных артериальных сосудов. Фиброзная ткань состояла из созревших коллагеновых волокон, которые формировали соединительнотканый рубец (рис. 12).

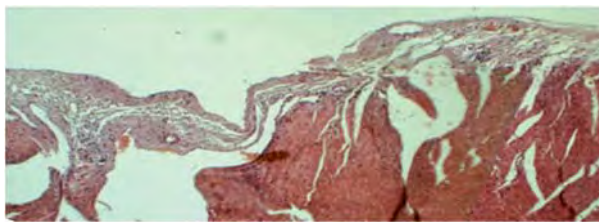


Рис. 12. Формирование соединительнотканного рубца в зоне 15 с криовоздействия на сердце, 30 сут. Гематоксилин-эозин. Об. x10, ок. x10

Следовательно, во всех группах после криодеструкции сердца развивались признаки острого некроза миокарда, которые имели отчетливую и закономерную динамику на протяжении всего срока наблюдения.

Моделирование некроза миокарда криохирургическим методом не может претендовать на точное воспроизведение развития клинических событий при ИМ у человека. Поскольку в наших исследованиях было проведено криовоздействие на миокард здоровых животных, атеросклеротический процесс в коронарных артериях и ишемическая стадия, предшествующие возникновению некроза миокарда в клинике, при этом отсутствовали. Предлагаемая модель ИМ может вызывать интерес у исследователей и врачей в тех случаях, когда развитие острого ИМ происходит без явного атеросклеротического процесса в коронарных сосудах, в частности

при спазме участка венечной артерии или на этапе терапии после применения реканализирующих препаратов.

Таким образом, установлено, что при криохирургическом методе моделирования некроза миокарда наблюдается минимальное количество осложнений и высокая повторяемость повреждения сердечной мышцы при заданных параметрах криовоздействия.

Определены параметры криовоздействий, при которых формируется субэпикардальный и трансмуральный некроз миокарда.

Крионекроз миокарда с прогнозируемой зоной повреждения сердечной мышцы может быть моделью для доклинических испытаний фармакологических препаратов кардиотропного действия и исследований, направленных на изучение ремоделирования миокарда при применении клеточной терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабушкина А. В. Инфаркт миокарда: от фундаментальных исследований — к практическим достижениям (по материалам X Национального конгресса кардиологов Украины) // Укр. мед. часопис. — 2009. — Т. 53, № 5. — С. 10–13.
2. Давыденко В. В., Матюков А. А., Цупкина Н. В. и др. Влияние аутотрансплантации различных клеток костного мозга на функциональное состояние миокарда кролика после инфаркта // Клет. трансплантол. и ткан. инж. — 2007. — Т. 11, № 2. — С. 52–61.
3. Дремина Н. Н., Шурыгина И. А., Лушников Е. Л. и др. Влияние эндотелиального фактора роста на постинфарктное ремоделирование миокарда крыс // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 2009. — Т. 148, № 9. — С. 330–336.
4. Шилов А. М. Инфаркт миокарда (Патофизиологические и клинические аспекты). — М.: Миклош, 2009. — 164 с.
5. Bos E. J., Mees B. E., Waard M. C. et al. A novel model of cryoinjury-induced myocardial infarction in the mouse: a comparison with coronary artery ligation // J. Physiol. Heart Circ. Physiol. — 2005. — V. 289. — P. 1291–1300.
6. Murry C. E., Wiserman R. W., Schwartz S. M. et al. Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis // J. Clin. Invest. — 1996. — V. 98. N 11. — P. 2512–2523.

МОДЕЛЮВАННЯ НЕКРОЗУ МІОКАРДА ЗА ДОПОМОГОЮ КРІОТЕХНОЛОГІЇ

*I. В. Слета
М. О. Чиж
С. Є. Гальченко
Б. П. Сандомирський*

Інститут проблем кріобіології
та кріомедицини
НАН України, Харків

E-mail: cryo@online.kharkov.ua

Щорічно в нашій країні реєструється близько 50 тис. нових випадків інфаркту міокарда. Удосконалення способів профілактики і лікування цієї патології має базуватися на адекватних експериментальних моделях.

У роботі розглянуто біотехнологічні етапи відтворення некрозу міокарда у щурів з використанням кріомедичних методів. Вивчено залежність отриманих результатів від оперативного доступу, діаметра кріоаплікатора і тривалості кріодії. Встановлено залежність величини зони кріонекрозу міокарда від параметрів кріодії.

Показано високу точність відтворення топографії і розмірів зони некрозу міокарда з використанням гістологічних та ЕКГ-методів, а також можливість формування субепікардіального і трансмурального некрозу міокарда, що вкрай важливо для доклінічного вивчення різних методів лікування.

Дослідження патологічних змін серця в динаміці показало, що в зоні кріодії в міокарді розвивалася запальна реакція, яка, у свою чергу, змінювалася процесами фібротизації з формуванням сполучнотканинного рубця.

Ключові слова: некроз міокарда, моделювання, кріодеструкція.

MYOCARDIUM NECROSIS MODELING BY CRIOTECHNOLOGY

*I. V. Sleta
N. A. Chizh
S. Ye. Galchenko
B. P. Sandomirsky*

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

E-mail: cryo@online.kharkov.ua

About 50 thousand of new cases of myocardial infarction are registered in our country annually. Perfection of methods of prophylaxis and treatment of this pathology should be based on adequate experimental models.

In the paper the technological stages of myocardium necrosis simulation in rats using cryomedical methods were reviewed. The influence of the obtained results on surgery access, diameter of cryoapplicator and cryoeffect duration was studied. The dependence of the myocardium cryonecrosis zone volume on the cryoeffect parameters was established.

Reproducing with high accuracy of topography and dimensions of myocardium necrosis zone using histological and ECG methods was shown and the possibility of formation of subepicardial and transmural myocardium necrosis was demonstrated as it is extremely important for pre-clinical study of different treatment methods.

Investigations of heart pathological changes in dynamics shown that an inflammatory reaction was developed in the zone of cryoeffect in myocardium, which in its turn was changed under the fibrotization processes with formation of connective tissue cicatrix.

Key words: myocardium necrosis, modeling, cryodestruction.