

Влияние имплантации криоконсервированной ткани плаценты на морфологию миокарда при экспериментальном атеросклерозе

UDC 611.13.018.74:616.3-004.6.092.9

I.I. KONDAKOV*, T.N. YURCHENKO, T.M. SHARLAY

Effect of Cryopreserved Placenta Tissue Implantation on Myocardium Morphology Under Experimental Atherosclerosis

Показано, что введение аллогенной криоконсервированной ткани плаценты (АКТП) на фоне отмены атерогенной диеты ускоряло регресс атеросклероза в магистральных ветвях коронарных артерий и приводило к неангиогенезу интрамуральных сосудов миокарда, что подтверждено достоверным увеличением их количества на единицу площади сердечной мышцы.

Ключевые слова: атеросклероз, плацента, миокард.

Показано, що введення алогенної криоконсервованої тканини плаценти (АКТП) на тлі відміни атерогенної дієти прискорювало регрес атеросклерозу у магистральних гілках коронарних артерій та викликало неангіогенез інтрамуральних судин міокарда, що підтверджено вірогідним збільшенням їх кількості на одиницю площі серцевого м'яза.

Ключові слова: атеросклероз, плацента, міокард.

Administration of allogeneic cryopreserved placenta tissue (ACP) on the background of termination of atherogenic diet has been shown to accelerate the atherosclerosis regression in the great branches of coronary arteries and resulted in neoangiogenesis of myocardium intramural vessels, which was confirmed by the statistically significant rise in their number per unit of cardiac muscle area.

Key words: atherosclerosis, placenta, myocardium.

Известно, что аллогенная криоконсервированная ткань плаценты (АКТП) применяется для лечения акушерской и гинекологической патологии, сахарного диабета и ишемической болезни сердца [2, 3, 5]. Описано позитивное влияние введения препаратов плаценты, подтвержденное клиническими методами исследования (показатели липидного обмена, данные ЭКГ, улучшение качества жизни пациентов и т. д.). Морфологический анализ миокарда после введения препаратов плаценты не проводился.

Цель работы – установить на модели атеросклероза и при введении АКТП морфологические изменения в миокарде экспериментальных животных.

Материалы и методы

Эксперимент проводили на 12-месячных кроликах-самцах породы “Шиншилла” массой 3500–4200 г. Животные в течение 6 месяцев находились на холестериновой диете (5 дней в неделю им вводили холестерин (Россия) в дозе 200 мг/кг массы тела *per os*) [1]. Экспериментальные животные были распределены на группы: I – контрольная (интактные $n = 5$), II – модель атеросклероза

Allogeneic cryopreserved placenta tissue (ACPT) is known to be applied to treat obstetrical and gynecological pathology, *Diabetes mellitus* and ischemic heart disease [2, 3, 5]. There has been described a positive effect of the administration of placental preparations, confirmed with clinical research methods (indices of lipid exchange, ECG data, improvement of life quality of the patients *etc.*). No morphological analysis of myocardium after introduction of placental preparations has been performed yet.

The research aim is to examine in atherosclerosis model and during ACPT administration the morphological changes in myocardium of experimental animals.

Materials and methods

The experiment was performed in 12 month-old male Chinchilla rabbits of 3,500–4,200 g. The animals during 6 months had a cholesterol diet (5 days in a week they were administered with cholesterol (Russia) in a dose of 200 mg/kg of body mass *per os*) [1]. Experimental animals were divided into the groups: I – control (intact animals $n = 5$), II – animals with model atherosclerosis ($n = 23$); all the animals were kept in standard conditions of vivarium. After achieving the peak of the model (6 months of feeding with choleste-

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-30-34, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта:
seldsan@rambler.ru

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

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373 3034, fax: +380 57 373 3084, e-mail: seldsan@rambler.ru

($n = 23$), животные содержались в стандартных условиях вивария. После достижения пика модели (6 месяцев кормления холестерином) животные группы II были разделены на подгруппы: 1 – спонтанный регресс экспериментального атеросклероза ($n = 10$); 2 – введение АКТП на фоне регресса атеросклероза ($n = 10$); 3 – пик модели ($n = 3$).

После прекращения нагрузки холестерином животным подгруппы 2 в подкожный карман (на спине) вводили криоконсервированную плаценту в дозе 130 мг/кг массы тела.

Эксперименты проведены в соответствии с “Общими принципами экспериментов на животных”, одобренными III Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2007) и согласованными с положениями “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1986).

Гистологические срезы тканей после парафиновой проводки окрашивали гематоксилином-эозином, по Ван-Гизон и Вейгерту [3]. Количество сосудов в миокарде определяли на 1 мм^2 в 10 полях зрения на каждом микропрепарате.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы Statgraph 2.1, использовали непараметрический критерий Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение

Гистологически миокард кроликов контрольной группы образован кардиомиоцитами, среди которых выявлялись интрамуральные сосуды, представленные артериолами и капиллярами. Строма миокарда содержит небольшое количество фибробластов и нежные прослойки коллагеновых волокон. Под эпикардом определяется умеренное количество жировой ткани, в которой располагаются ветви магистральных коронарных артерий, имеющих тонкую стенку. Просвет коронарных артерий спавшийся. Стенка образована эндотелием, который непосредственно расположен на внутренней эластической мембране.

На пике моделирования экспериментального атеросклероза вокруг интрамуральных ветвей коронарных артерий отмечается разрастание фиброзной ткани. Кардиомиоциты большей частью гипертрофированы. Строма отечна, содержит умеренное количество соединительной ткани, с очагами круглоклеточной инфильтрации. В эпикарде отмечается избыточное количество жировой ткани. Гиперплазия жировой ткани приводит к тому, что ее часть из эпикарда прорастает в миокард по ходу интрамуральных сосудов. Стенка ветвей коронарных артерий утолщена за счет гиперплазии глад-

роль) the animals of group II were divided into sub-groups: 1 – with spontaneous regression of experimental atherosclerosis ($n = 10$); 2 – with administered ACPT on the background of atherosclerosis regression ($n = 10$); 3 – peak of the model ($n = 3$).

After terminating the cholesterol loading the animals of subgroup 2 underwent the implantation of cryopreserved placenta tissue into subcutaneous pocket (on a back) in a dose of 130 mg/kg of body mass.

The experiments were carried-out in accordance with General Principles of Experiments in Animals, approved by the 1st International Congress in Bioethics (Kiev, 2001) and coordinated with the statements of European Convention on the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

Histological sections of tissues after paraffin embedding were stained with hematoxylin-eosin and according to Van Gieson and Weigert [3]. The number of the vessels in myocardium was examined *per* 1 mm^2 in 10 vision fields in each micropreparation.

The data were statistically processed using Statgraph 2.1 software, there was used non-parametric Mann-Whitney test.

Results and discussion

Histologically the rabbit myocardium of the control group is formed with cardiomyocytes, among those intramural vessels are revealed, represented by arterioles and capillaries. The myocardium stroma contains a small number of fibroblasts and smooth interlayers of collagen fibers. Under epicardium a moderate amount of adipose tissue, wherein the branches of thin wall great coronary arteries were located. The wall was formed by epithelium, directly located on inner elastic membrane.

On the peak of modeling of experimental atherosclerosis around intramural branches of coronary arteries the fibrous tissue overgrowing is noted. Major part of cardiomyocytes is hypertrophied. The stroma is edematous, contains a moderate number of connective tissue with round-cell infiltration foci. In epicardium there is found a surplus amount of adipose tissue. Hyperplasia of adipose tissue results in the expansion of its part from epicardium into myocardium along intramural vessels. The wall of branches of coronary arteries is thickened due to hyperplasia of smooth muscle cells of middle membrane and formation of aorta neointima (Fig. 1). In adventitia of vessels there was found a fibrous tissue overexpansion.

During spontaneous regression of experimental atherosclerosis a decreased amount of adipose tissue is noted, both in epicardium and myocardium stroma. Neointimal thickenings in large branches of coronary arteries are absent. The middle wall of aorta was still hypertrophied. In artery media there is found either

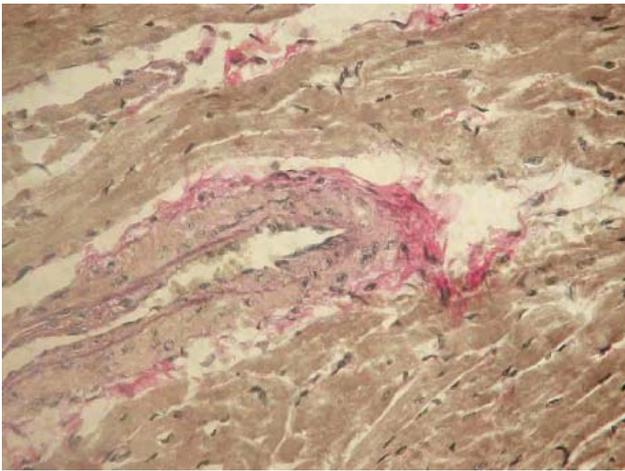


Рис. 1. Морфологическая характеристика миокарда и ветви магистральной коронарной артерии на пике развития модели экспериментального атеросклероза. Окраска по Ван-Гизон, $\times 400$.

Fig. 1. Morphological characteristics of myocardium and branch of the great coronary artery on the peak of development of model atherosclerosis, Van-Gieson's staining, $\times 400$.

комышечных клеток средней оболочки и образования неоинтимы аорты (рис. 1). В адвентиции сосудов отмечалось разрастание фиброзной ткани.

При спонтанном регрессе экспериментального атеросклероза отмечается уменьшение количества жировой ткани как в эпикарде, так и строме миокарда. Неоинтимальные утолщения в крупных ветвях коронарной артерии отсутствуют. Средняя стенка аорты по-прежнему гипертрофирована. В средней оболочке артерии отмечается очаговый либо тотальный некроз гладкомышечных клеток с их замещением фиброзной тканью. В периваскулярном пространстве интрамуральных сосудов выявлялась фиброзная ткань (рис. 2).

При отмене холестериновой диеты на фоне введения АКТП отмечены морфологические изменения в миокарде, а также в стенке магистральных и интрамуральных сосудов. При этом в миокарде отсутствовали дистрофические и некротические изменения. Кардиомиоциты представлены плотно упакованными клеточными элементами без признаков отека стромы. Стенка магистральных ветвей коронарных артерий тонкая, в периваскулярном пространстве жировая ткань отсутствовала (рис. 3). В интерстиции миокарда вокруг интрамуральных сосудов выявлены сосудистые почки, представленные 2–3 ответвлениями, образованными молодыми эндотелиальными клетками (рис. 4).

Как видно из представленных данных, при моделировании атеросклероза достоверно умень-

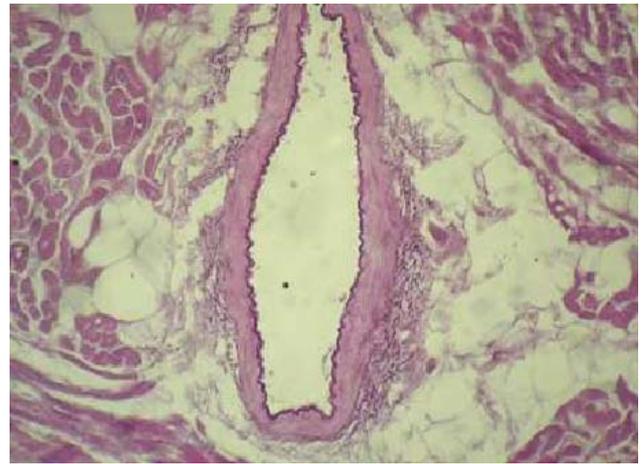


Рис. 2. Морфологическая характеристика магистральной ветви коронарной артерии при регрессе экспериментального атеросклероза. Отсутствие неоинтимы. Мощный периваскулярный футляр жировой ткани. Окраска по Вейгерту, $\times 200$.

Fig. 2. Morphological characteristics of branch of the great coronary artery during regression of experimental atherosclerosis. Absence of neo-intima. Powerful perivascular case of adipose tissue. Weigert's staining, $\times 200$.

focal or total necrosis of smooth muscle cells with their substitution by fibrous tissue. In perivascular space of intramural vessels the fibrous tissue was revealed (Fig. 2).

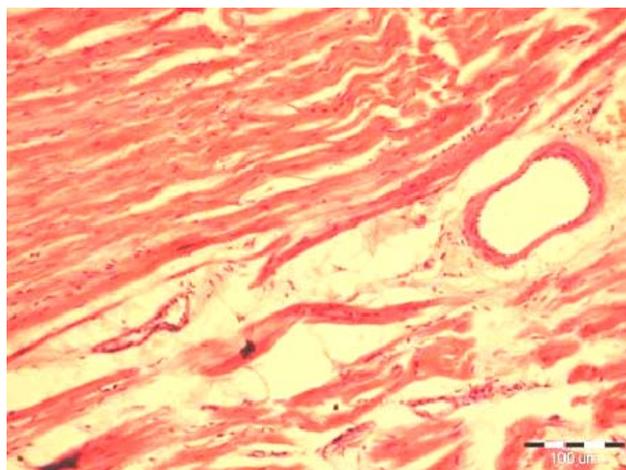
After termination of the cholesterol diet on the background of ACPT administration there were noted morphological changes in myocardium as well as in the wall of great and intramural vessels. Herewith in myocardium no dystrophic and necrotic alterations were found. Cardiomyocytes were presented with tightly packed cell elements with no signs of stroma oedema. The wall of great branches of coronary arteries is thin, there was no adipose tissue in perivascular space (Fig. 3). In myocardium interstitium around intramural vessels the vascular buds were revealed, represented with 2–3 rami formed with young endothelial cells (Fig. 4).

As the presented data show, under model atherosclerosis the number of intramural vessels reduced statistically and significantly per unit of myocardium area, it makes 2.5 ± 1.5 unit/ mm^2 versus the control 4.5 ± 0.5 ($p < 0.05$).

After termination of the feeding of animals with cholesterol the number of intramural vessels in myocardium was not increased and even was somewhat reduced (2.36 ± 0.36). However, during atherosclerosis regression on the background of ACPT implantation the number of intramural vessels in myocardium increased up to 5.0 ± 1.0 , even exceeding the control values.

Рис. 3. Морфологическая характеристика миокарда при регрессе экспериментального атеросклероза на фоне введения АКП. Отсутствие некробиотических изменений в кардиомиоцитах. Стенка ветви магистральной артерии тонкая, сосуд спавшийся. Отсутствие жировой ткани в периваскулярном пространстве. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 200$.

Fig. 3. Morphological characteristics of myocardium during regression of experimental atherosclerosis on the background of ACP administration. Absence of necrobiotic changes in cardiomyocytes. Thin wall of the branch of great artery, collapsed vessel. Absence of fat tissue in perivascular space. Hematoxylin and eosin staining, $\times 200$.



шается количество интрамуральных сосудов на единицу площади миокарда ($2,5 \pm 1,5$ ед/мм²) по сравнению с контролем ($4,5 \pm 0,5$, $p < 0,05$).

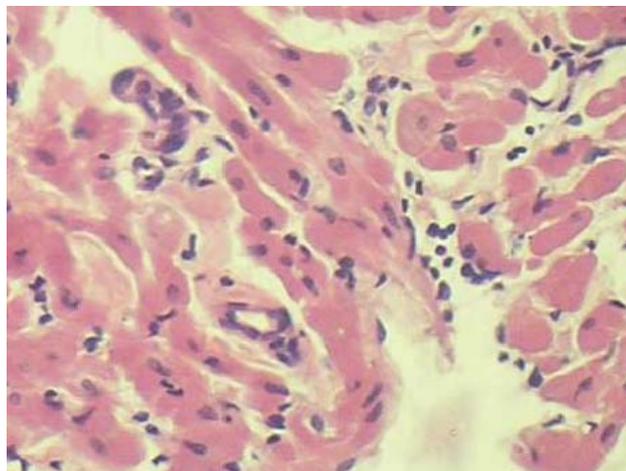
На фоне прекращения кормления животных холестерином количество интрамуральных сосудов в миокарде не увеличивалось и даже несколько уменьшалось ($2,36 \pm 0,36$ ед/мм²). Однако при регрессе атеросклероза на фоне введения АКП количество интрамуральных сосудов в миокарде увеличивалось ($5,0 \pm 1,0$), даже превышая контрольные значения.

Полученные данные свидетельствуют о том, что развитие экспериментального атеросклероза в аорте и магистральных артериях миокарда животных приводит к утолщению интимы за счет миграции гладкомышечных клеток из меди и их превращению в пенистые клетки. При уменьшении диаметра артерий наблюдается редукция кровотока в бассейне интрамуральных сосудов миокарда, что приводило к дистрофическим изменениям в кардиомиоцитах. Кроме того, гиперплазия жировой ткани эпикарда и ее вращение в интерстиций сопровождалась разрастанием соединительной ткани с очаговой круглоклеточной инфильтрацией. Очевидно, эти морфологические изменения в миокарде не способствовали его неоангиогенезу на фоне редукции кровенаполнения интрамуральных ветвей коронарных артерий. Однако через 6 недель после прекращения кормления холестерином полный регресс изменений в миокарде не произошел и количество интрамуральных сосудов не увеличивалось. В результате введения АКП от-

Thus the findings testify to the fact that the development of experimental atherosclerosis in aorta and great arteries of animal myocardium leads to the thickening of intima due to migration of smooth muscle cells from media and their transformation into foam cells. During decreasing the diameter of arteries there is observed the reduced blood stream in the basin of intramural vessels of myocardium, resulted in dystrophic changes in cardiomyocytes. In addition, hyperplasia of epicardium adipose tissue and its expansion into interstitium were accompanied with focal round-cell infiltration. These morphological changes in myocardium likely did not contribute to its angiogenesis on the background of reduction of blood filling of intramural branches of coronary arteries. However, 6 weeks later the termination of feeding with cholesterol no complete regression of alterations in myocardium took place and the number of intramural vessels did not increase. As the result of ACP administration there were found the increased regression of atherosclerosis in great branches of coronary arteries and neoangiogenesis of intramural vessels of myocardium, which was confirmed

Рис. 4. Неоангиогенез миокарда при спонтанном регрессе на фоне введения АКП. Формирование “сосудистых почек” в миокарде, состоящих из “молодого” эндотелия. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$.

Fig. 4. Neovascularization of myocardium during spontaneous regression on the background of ACP administration. Formation of “vascular buds” in myocardium, consisting of young endothelium. Hematoxylin and eosin staining, $\times 400$.



мечены ускоренный регресс атеросклероза в магистральных ветвях коронарных артерий и неоангиогенез интрамуральных сосудов миокарда, что подтверждено достоверным увеличением их количества на единицу площади сердечной мышцы.

Выводы

Полученные данные указывают на то, что введение АКТП способствует неоангиогенезу и ускоренному обратному развитию экспериментального атеросклероза в магистральных артериях.

Литература

1. *Аничков Н.Н.* Труды общества русских врачей.— СПб, 1913.— 90 с.
2. *Курильская Т.Е.* Патогенетическое обоснование фетальной терапии в профилактике и комплексном лечении ишемической болезни сердца: Автореф. дис... доктора мед. наук.— Иркутск, 1999.— 35 с.
3. *Марченко В.И., Садах В.В., Зубарева Л.Д. и др.* Влияние трансплантации фетальных тканей человека на систему гемостаза больных ишемической болезнью сердца // Бюл. эксперим. биологии и медицины.— 1998.— С. 195–196.
4. *Меркулов Г.А.* Курс патогистологической техники.— М.: Медгиз, 1961.— 341 с.
5. *Шепітько К.В., Гаєвський С.О., Потяженко М.М., Шепітько В.І.* Лікування стабільної стенокардії із застосуванням кріоконсервованої фетоплацентарної тканинної трансплантації // Проблеми криобіології.— 2001.— №3.— С. 43.

*Поступила 05.07.2011
Рецензент Н.А. Чиж*

with statistically significant rise in their number per unit of cardiac muscle unit.

Conclusions

The findings point to the fact that the administration of ACPT contributes to neoangiogenesis, and accelerated reverse development of experimental atherosclerosis in great arteries.

References

1. *Anichkov N.N.* Proceedings of Society of Russian Physicians.— Saint-Petersburg, 1913.— 90 p.
2. *Kuril'skaya T.Ye.* Pathogenetic substantiation of fetal therapy in prophylaxis and complex treatment of ischemic heart disease: Author's abstract of the thesis for doctor of medical sciences degree.— Irkutsk, 1999.— 35 p.
3. *Marchenko V.I., Sadakh V.V., Zubareva L.D. et al.* Effect of transplantation of human fetal tissues on system of hemostasis of patients with ischemic heart disease// *Bul. Exp. Biol. Med.*— 1988.— P. 195–196.
4. *Merkulov G.A.* Course of pathohistological technique.— Moscow: Medgiz, 1961.— 341 p.
5. *Shepitko K.V., Gayevskiy S.O., Potyazhenko M.M., Shepitko V.I.* Treatment of stable stenocardia using transplantation of cryopreserved fetoplacental tissue // *Problems of Cryobiology.*— 2001.— N3.— P. 138.

Accepted 05.07.2011