

УДК 612.44.014.086.3:616.127-002:612.649.011.87.014.3

Л.В. Бабийчук^{1*}, С.Н. Коваль², Г.А. Бабийчук¹

Структура миокарда молодых гипертензивных крыс после введения криоконсервированных ядросодержащих клеток кордовой крови человека

UDC 612.44.014.086.3:616.127-002:612.649.011.87.014.3

L.V. Babijchuk^{1*}, S.N. Koval², G.A. Babijchuk¹

Structure of Myocardium of Young Hypertensive Rats after Injection of Cryopreserved Human Cord Blood Nucleated Cells

Реферат: В настоящее время клеточная терапия рассматривается как новый перспективный метод лечения различных заболеваний сердечно-сосудистой системы. На экспериментальной модели стресс-индуцированной артериальной гипертензии (АГ) изучены гистологические особенности состояния тканей и сосудов сердца, проведена гистохимическая и поляризационно-оптическая оценка состояния коллагеновых и эластических волокон миокарда молодых крыс до и после введения криоконсервированных ядросодержащих клеток кордовой крови (ЯСК КК) человека. Установлено, что в структурной организации миокарда молодых крыс на 30-е сутки после развития АГ произошли выраженные патологические изменения. Выявлены дистрофические и деструктивные изменения в мышечных волокнах, спазм артериальных сосудов, парез венозных сосудов и капилляров, периваскулярный отек и кардиосклероз. На 3-и сутки после применения ЯСК КК увеличивались количество и площадь ядер кардиомиоцитов. Данные компенсаторные изменения сопровождались выраженным неоангиогенезом. Через месяц после введения ЯСК КК в сердечной мышце гипертензивных крыс повышалась плотность фибробластов (количество фибробластов на единицу площади) в интерстициальной соединительной ткани и вокруг кровеносных сосудов; отсутствовали участки с признаками очаговой ишемии и кардиосклероза; был менее выражен периваскулярный и интерстициальный отек.

Ключевые слова: артериальная гипертензия, криоконсервированные ядросодержащие клетки кордовой крови, кардиомиоциты, ишемия миокарда, кардиосклероз, фиброз.

Реферат: На даний час клітинна терапія розглядається як новий перспективний метод лікування різних захворювань серцево-судинної системи. На експериментальній моделі стрес-індукованої артеріальної гіпертензії (АГ) вивчено гістологічні особливості стану тканин і судин серця, проведено гистохімічну та поляризаційно-оптичну оцінку стану колагенових і еластичних волокон міокарда молодих щурів до та після введення криоконсервованих ядерних клітин кордової крові (ЯСК КК). Встановлено, що у структурній організації міокарда молодих щурів на 30-ту добу після розвитку АГ відбулися значні патологічні зміни. Виявлено дистрофічні та деструктивні зміни м'язових волокон, спазм артеріальних судин, парез венозних судин і капілярів, периваскулярний набряк та кардіосклероз. На 3-ю добу після застосування ЯСК КК збільшувалися кількість та площа ядер кардіоміоцитів. Дані компенсаторні зміни супроводжувалися вираженням неоангіогенезом. Через місяць після введення ЯСК КК у серцевому м'язі гіпертензивних щурів збільшувалася кількість фібробластів в інтерстиціальній сполучній тканині й навколо кровеносних судин; були відсутні ділянки з ознаками ішемії й кардіосклерозу; спостерігався менш виражений периваскулярний та інтерстиціальний набряк.

Ключові слова: артеріальна гіпертензія, ядерні клітини кордової крові, кардіоміоцити, ішемія міокарда, кардіосклероз, фіброз.

Abstract: Nowadays cell therapy is considered as a promising new method to treat various diseases of cardiovascular system. Experimental model of stress-induced arterial hypertension (AH) was used to study the histological features of heart tissues and blood vessels: we have performed histochemical and polarization-optical assessment of collagen and elastic fibers of myocardium of young rats before and after introduction of human cryopreserved cord blood nucleated cells (cCBNCs). It has been found that myocardium structure of young rats to day 30 after the hypertension onset had pathological changes. We have established the changes in muscle fibers, spasm of blood vessels, paresis of the veins and capillaries, perivascular edema and cardiosclerosis. To day 3 after application of cCBNCs the number and area of cardiomyocyte nuclei increased. These compensatory changes were accompanied with a pronounced neoangiogenesis. One month later the administration of cCBNCs the density of fibroblasts in cardiac muscle of hypertensive rats increased (number of fibroblasts per area unit) in interstitial connective tissue and around the blood vessels; no areas with signs of focal ischemia and cardiosclerosis were noted. Perivascular and interstitial edemas were less pronounced.

Key words: arterial hypertension, cryopreserved cord blood nucleated cells, cardiomyocytes, myocardial ischemia, cardiosclerosis, fibrosis.

¹Отдел криофизиологии, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²Национальный институт терапии имени Л.Т. Малой НАМН Украины, г. Харьков

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52,
электронная почта: lyda2014902@gmail.com

Поступила 06.05.2016

Принята в печать 10.06.2016

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2016. – Т. 26, №3. – С. 271–287.
© 2016 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

¹Department of Cryophysiology, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

²L.T. Malaya Institute of Therapy of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkiv

*To whom correspondence should be addressed:
23, Pereyaslavskaya str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 3737435, fax: +380 57 373 5952,
e-mail: lyda2014902@gmail.com

Received May, 06, 2016

Accepted June, 10, 2016

Probl Cryobiol Cryomed 2016; 26(3): 271–287.

© 2016 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

В настоящее время отмечается рост численности населения с патологией сердечно-сосудистой системы (ССС) [5]. Одним из наиболее распространенных хронических заболеваний ССС является артериальная гипертензия (АГ), основное клиническое проявление которой – длительное и стойкое повышение артериального давления (АД) [9].

В основе развития гипертонической болезни лежит нарушение функционального состояния центральной нервной системы и других систем организма, регулирующих тонус сосудов. В результате изменяется сосудистый тонус, происходит спазм мелких артерий и повышается артериальное давление. Длительное спастическое состояние артериол приводит к плазматическому пропитыванию сосудистой стенки и склерозу. В результате развивается гипертония и, как следствие, нарушается питание тканей и органов [6].

Гипертензия часто сопровождается структурно-функциональными перестройками тканей и сосудов сердца [3], оценка состояния которых необходима для определения степени риска развития сердечно-сосудистых заболеваний [8].

В процессе формирования «гипертензивного сердца» происходит структурная ресистематизация компонентов стенки нормального желудочка, что проявляется гипертрофией кардиомиоцитов, пролиферацией фибробластов и фиброзом, а также может приводить к клеточной смерти [19].

При длительном течении АГ происходят ремоделирование левого желудочка, прогрессирующее увеличение массы миокарда, дилатация полостей и поражение коронарных артерий [1, 12].

Отмечается пролиферация фибробластов и развитие дисбаланса в процессе синтеза и деградации коллагена экстрацеллюлярного матрикса с избыточным его накоплением. В результате повышается жесткость миокарда, что приводит к возникновению его диастолической дисфункции [8].

Осложнения, возникающие после поражения ССС, являются одной из главных причин инвалидности и смертности [4].

Несмотря на очевидные успехи в лечении заболеваний ССС наблюдаются случаи, при которых традиционные фармакологические методы неэффективны. Альтернативным терапевтическим подходом для больных данной категории может быть клеточная терапия [2].

Для лечения кардиологических заболеваний в регенеративной медицине широко применяют как собственные клетки пациента, так и стволовые клетки донора или клеточные культуры, а также специфические факторы роста, которые стимулируют выход стволовых клеток в периферический кровоток [10, 15].

Currently, the population suffering from cardiovascular system (CVS) pathologies is constantly growing [11]. One of the most common chronic diseases of CVS is an arterial hypertension (AH), the main clinical manifestation of which is long-term and stable rise in blood pressure (BP) [9].

Dysfunction of the central nervous system and other body systems, regulating the tone of vessels underlies hypertonic disease development. This results in vascular tone changes, appearance of the small arteries spasm and blood pressure increase. Long spastic state of arterioles leads to plasmatic impregnation of vascular wall and sclerosis. Finally the hypertension develops and leads to the impaired trophism of tissues and organs [13].

Hypertension is often accompanied with structural and functional re-arrangements of heart tissues and vessels [8], and their state should be assessed for accounting the risk of developing cardiovascular diseases [14].

During formation of ‘hypertensive heart’ the structural re-systematization of the components of normal ventricle wall occurs, that is manifested by hypertrophy of cardiomyocytes, proliferation of fibroblasts and fibrosis, as well as may also lead to cell death [6].

Long-term course of hypertension is accompanied with left ventricle remodeling, a progressive increase in myocardial mass, and dilatation of the cavities and coronary artery damage [4, 19].

The proliferation of fibroblasts and development of an imbalance occur during the synthesis and degradation of extracellular matrix of collagen and its excessive accumulation. This increases the rigidity of the myocardium leading to a diastolic dysfunction [14].

The complications arising after the CVS injury are among the main causes of disability and mortality [10].

Despite the apparent successful treatment of CVS diseases, there are the cases wherein the traditional pharmacological methods are not effective. An alternative therapeutic approach for these patients could be the cell based therapy [5].

Both patient’s own cells and donor’s stem cells or cell cultures have been widely used to treat cardiac diseases in regenerative medicine, as well as specific growth factors stimulating the yield of stem cells into peripheral blood [15, 18].

Study of the influence of biologically active products, derived from cord blood, on structural and functional parameters of the myocardium tissue during AH may be helpful in more profound exploring the mechanisms of their action in treatment of this pathology.

The research aim was to investigate morphologically the heart tissues and vessels in experimental animals



Изучение влияния биологически активных препаратов, полученных из кордовой крови, на структурно-функциональное состояние тканей миокарда при АГ может помочь более глубоко исследовать механизмы их действия при данной патологии.

Цель работы – оценка морфологического состояния тканей и сосудов сердца у экспериментальных животных на фоне неврогенной стресс-индуцированной артериальной гипертензии и после введения криоконсервированного препарата ядро-содержащих клеток кордовой крови человека.

Материалы и методы

Исследования выполняли на белых молодых 6-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 неврогенной стресс-индуцированной АГ; 3 – животные с АГ после введения криоконсервированных ЯСК КК.

Неврогенную стресс-индуцированную АГ моделировали в течение 7 суток по разработанному нами методу [18] до получения стойких повышенных цифр АД: ($161,98 \pm 5,47$) мм рт. ст. при норме ($99,72 \pm 3,57$) мм рт. ст. путем комплексного периодического воздействия на организм животных различными видами раздражителей (световой, звуковой, электрический). Гипертензию контролировали по стабильно высокому (по сравнению с интактными животными) АД, которое измеряли непрямым методом по принципу медицинской тонометрии с помощью электрокардиографа «Поли-Спектр» («Нейрософт», Россия), используя специальные прижимные манжетки и датчики пульса кровеносных сосудов хвоста животного. Точкой отсчета было артериальное давление контрольных крыс в покое. Каждый день эксперимента до и после раздражения измеряли АД, отмечая изменение показателей. Через 7 суток эксперимента добивались максимально повышенных цифр АД [18].

Подтвердив стойкую АГ (в течение 5 суток гипертензия стабильно сохранялась и не было тенденции к снижению), животным вводили криоконсервированный препарат ЯСК КК, полученный в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины [16, 17]. Биологический материал получали согласно требованиям Хельсинской декларации.

on the background of neurogenic stress-induced hypertension and after administration of human cryopreserved cord blood nucleated cells as a drug.

Materials and methods

The investigations were performed in white young 6-month breedless male rats.

Experiments were carried out in accordance with the General Principles of Experiments in Animals, approved by the 5th National Congress in Bioethics (Kyiv, 2013) and consistent with the statements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

The animals were divided into three groups ($n = 7$ in each), the first one comprised intact animals; the second one had the rats with neurogenic stress-induced hypertension and the third one included the animals with hypertension after administration of cryopreserved CBNCs.

Neurogenic stress-induced hypertension was simulated during 7 days according to the method developed by us [3], up to approaching the stable elevated blood pressure numbers of (161.98 ± 5.47) *versus* the norm of (99.72 ± 3.57) mm Hg by means of the combined periodic influences on animal organism with different kinds of stimuli (light, sound, electrical). Hypertension was confirmed with consistently high (compared to intact animals) blood pressure, which was indirectly measured on the basis of medical tonometry by means of electrocardiograph Poly-Spectrum (Neurosoft, Russia), using special clamping cuffs and gauges of pulse of the blood vessels on an animal's tail. The point of reference was the pressure of the control rats in a quiescent state. Daily during the experiment, before and after stimulation, the blood pressure was measured, recording the change in the indices. After 7 days of the experiment the maximal numbers of blood pressure were achieved [3].

When confirming a stable hypertension (hypertension was kept for 5 days and there was no recovery), the animals were injected with cryopreserved preparation of CBNCs obtained at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of NAS of Ukraine [1, 2]. Biological material was prepared as required by the Declaration of Helsinki.

The fraction of nucleated cells was isolated from cord blood by sedimentation in a dextran solution, D-60 (Yuriya Pharm, Ukraine). As a cryoprotectant we have used DMSO at a final concentration of 5%. The phenotype of cells $CD45^+$, $CD45^+CD34^+$ and their viability ($CD45^+7AAD^-$, $CD34^+7AAD^-$) were found by flow cytometry (FACS Calibur, Becton Dickinson, USA) using BD reagents according to the protocol of International Society for Hematotherapy and Graft Engineering.



Выделяли фракцию ядродержащих клеток из кордовой крови методом седиментации в растворе декстрана Д-60 (ООО «Юрия-Фарм», Украина). В качестве криопротектора использовали ДМСО в конечной концентрации 5%. Фенотип клеток CD45⁺, CD45⁺CD34⁺, а также их жизнеспособность (CD45⁺7AAD⁻, CD34⁺7AAD⁻) определяли с помощью проточного цитофлуориметра («FACS Calibur» («Becton Dickinson», США) с использованием реагентов «Becton Dickinson» по протоколу Международного общества гематотерапии и трансплантационной инженерии (International Society for Hematotherapy and Graft Engineering).

Препарат представляет собой взвесь криоконсервированных ЯСК КК в аутоплазме с концентрацией стволовых CD34⁺-клеток 2–4×10⁵ в 1 мл.

Размороженные ЯСК КК вводили однократно внутрибрюшинно в дозе 1×10⁵ CD34⁺-клеток на килограмм массы животного. Перед введением клетки от криопротектора не отмывали.

Животных всех групп выводили из эксперимента путем декапитации на 3-и, 7-е и 30-е сутки.

После эвтаназии сердце животного разрезали в поперечном направлении по венечной борозде, выделенную каудальную часть (желудочки) исследовали гистологическими методами [11].

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

С помощью санного микротомы «Reichert» (Австрия) изготавливали гистологические срезы (толщина 5–7 мкм) в плоскости, перпендикулярной длинной оси сердца. После депарафинирования в ксилоле срезы окрашивали гематоксилином Ганзена и эозином и помещали в полистирол под покровное стекло.

Наличие в тканях коллагеновых и эластических волокон выполняли гистохимическими методами. Для оценки коллагеновых волокон использовали краситель пикросириус красный – насыщенный раствор пикриновой кислоты и 0,1%-й раствор сириуса красного F3BA («Direct Red 80», США); в соотношении 9:1. Клеточные ядра окрашивали гематоксилином Ганзена. Ткани помещали в канадский бальзам под покровное стекло. Методику окрашивания эластических волокон выполняли в соответствии с рекомендациями изготовителя набора «Орсеин» («Bio-Optica Milano SpA», Италия).

Исследование и микрофотографирование гистологических срезов проводили на световом микроскопе «AxioStar Plus» («Carl Zeiss», Германия)

The preparation was a suspension of cryopreserved CBNCs in autoplasm with concentration of CD34⁺ stem cells of 2–4×10⁵ per 1 ml.

Frozen-thawed CBNCs were administered once intraperitoneally in a dose of 1×10⁵ CD34⁺ cells per kilogram of body weight. Before the injection the cells were not washed from cryoprotectant. The animals of all the groups were sacrificed by decapitation to days 3, 7 and 30.

After euthanasia, the animal hearts were transversely cut along a coronal sulcus and the isolated caudal part (the ventricles) was examined histologically [16].

The material was fixed in a 10% neutral formalin solution, dehydrated in alcohols of increasing concentration (50 to 100°), impregnated with a mixture of alcohol and xylene (1:1), xylene, xylene and paraffin mixture (1:1), paraffin and embedded into paraffin block.

Using a Reichert sledge microtome (Austria) the histologic sections were prepared (5–7 microns thick) in a plane perpendicular to the long axis of the heart. After dewaxing in xylene, the sections were stained with Hansen hematoxylin and eosin and placed in a polystyrene under a coverslip.

The presence of collagen and elastic fibers in tissues was examined by histochemical methods. To assess the collagen fibers we have used Pikrosirius Red dye, which was a saturated solution of picric acid and 0.1% solution of Sirius Red F3BA (Direct Red 80, USA); in a ratio of 9:1. Cell nuclei were stained with Hansen hematoxylin. Tissues were placed in Canada balsam under the cover glass. The elastic fibers were stained in accordance with the Orcein kit manufacturer recommendations (Bio-Optica Milano SpA, Italy).

Studying and microphotography of histological sections were performed with light microscope AxioStar Plus (Carl Zeiss, Germany) using a digital camera (Canon Power Shot A610, Japan) and the software AxioVision Rel. 4.6 (Carl Zeiss Imaging Solution GmbH, Germany), as well as an research microscope Olympus BX63 (Olympus Corporation, Japan) with a digital camera Olympus DP73 and computer program CellSens Dimension (Olympus Soft Imaging Solution GmbH, Germany). The resolutions of the obtained images were 898×673 and 1600×1200 pixels at a magnification of 100, 200, 400.

Morphometric data were statistically processed using the software Statistica 6.0 (StatSoft, USA) with Mann-Whitney nonparametric test ($p \leq 0.05$), data are mean ± SD (standard deviation).

Results and discussion

The results of histological examination of intact animal heart tissue have confirmed the adequacy of



с использованием цифровой фотокамеры («Canon Power Shot A610», Япония) и компьютерной программы «AxioVision Rel. 4.6» («Carl Zeiss Imaging Solution GmbH», Германия), а также на исследовательском микроскопе «Olympus BX63» («Olympus Corporation», Япония) с помощью цифровой фотокамеры «Olympus DP73» и компьютерной программы «CellSens Dimension» («Olympus Soft Imaging Solution GmbH», Германия). Разрешение полученных изображений составляло 898×673 и 1600×1200 пикселей при увеличениях микроскопов 100, 200, 400.

Статистическую обработку морфометрических данных проводили с помощью программы «Statistica 6.0» («StatSoft», США) и использованием непараметрического критерия Уитни-Манна \pm SD (стандартное отклонение) ($p \leq 0,05$).

Результаты и обсуждение

Результаты гистологического исследования тканей сердца интактных животных подтвердили адекватность применяемых методик. Структурная организация миокарда соответствовала норме [13].

При морфометрическом исследовании установлено, что в миокарде интактных крыс количество капилляров составляло (720 ± 120) на мм^2 , размеры ядер кардиомиоцитов – ($15,3 \pm 5,8$) $\mu\text{м}^2$, а их количество – (7600 ± 1200) на мм^2 (таблица).

На 3-и сутки после развития АГ при гистологическом исследовании в миокарде были обнаружены участки с истонченными мышечными волокнами извилистой формы (рис. 1), а также неравномерно гипертрофированные волокна. Поперечная исчерченность мышечных волокон местами отсутствовала. Отмечался полиморфизм кардиомиоцитов и их ядер, визуализировались единичные кардиомиоциты с пикнотичным ядром.

Большинство капилляров были расширены и переполнены эритроцитами, особенно в субэпикардальных участках. Наблюдались очаги периваскулярного отека и единичные клеточные инфильтраты, состоящие из лимфоидно-гистоцитарных элементов. Вокруг отдельных сосудов, а также на небольших участках сердечной мышцы в интерстициальной соединительной ткани отмечалась повышенная плотность фибробластов с крупным зухромным ядром (рис. 2).

В интерстициальной соединительной ткани (вдоль мышечных волокон) визуализировались тонкие коллагеновые волокна, которые в поляризованном свете проявляли желтое свечение. Вокруг сосудов концентрировались крупные пучки коллагеновых волокон (рис. 3, А, В).

При окрашивании орсеином определялись изменения в сосудах, связанные с выраженным периваскулярным отеком, неравномерным утолще-

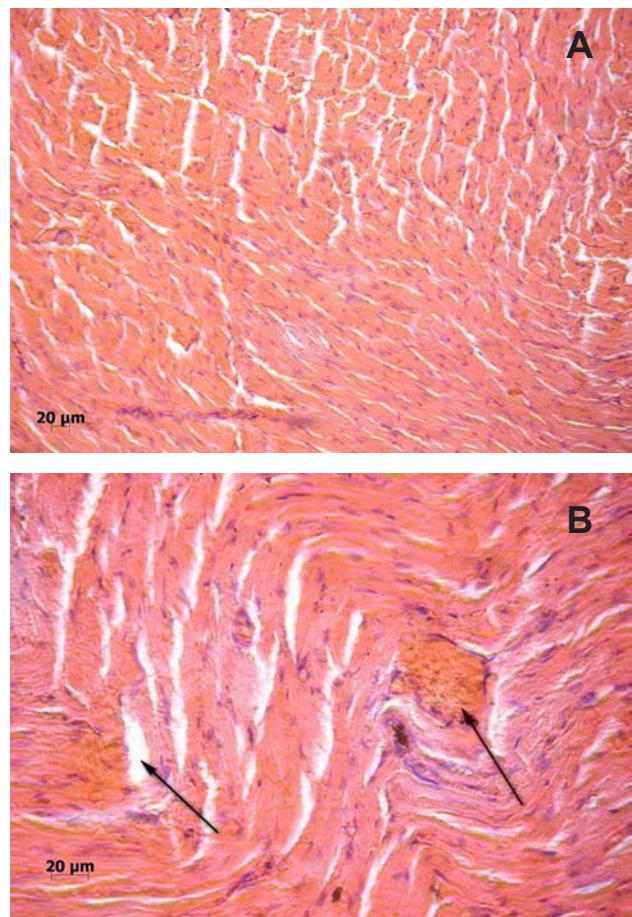


Рис. 1. Участки миокарда левого желудочка молодых крыс на 3-и сутки после развития АГ: **А** – продольно- и поперечно-срезанные мышечные волокна, разделенные соединительной тканью; **В** – неравномерно гипертрофированные кардиомиоциты, интерстициальный отек, полнокровие сосудов. Окрашивание гематоксилином и эозином, $\times 100$.

Fig. 1. Sites of left ventricle myocardium in young rats to day 3 after hypertension development: **A** – longitudinally and transversely cut muscle fibers separated with connective tissue; **B** – irregularly hypertrophied cardiomyocytes, interstitial oedema, vascular congestion. Hematoxylin and eosin staining, $\times 100$.

the procedures used [20]. The myocardial structure corresponded to the norm.

During morphometric study it has been found that the myocardium of intact rats contained (720 ± 120) per mm^2 capillaries, the sizes of cardiomyocyte nuclei were (15.3 ± 5.8) μm^2 , and their number was (7.600 ± 1.200) per mm^2 (Table).

Histological examination to day 3 after the AH development showed in myocardium the areas with thinned muscle fibers of tortuous shape (Fig. 1), as well as unevenly hypertrophied fibers. The cross-striation of muscle fibers was somewhere absent. Polymorphism of cardiomyocytes and their nuclei were noted, individual cardiomyocytes with pyknotic nucleus were visualized.

Морфометрические показатели миокарда левого желудочка молодых крыс с АГ до и после введения криоконсервированных ЯСК КК ($n = 7$)

Morphometric indices of left ventricle myocardium of young rats with AH prior to and after injection of cryopreserved CBNCs ($n = 7$)

Группа Group	Срок наблюдения, сутки Observation term, days	Количество ядер кардиомиоцитов на мм ² Number of cardiomyocytes' nuclei per mm ²	Размеры ядер кардиомиоцитов, мкм ² Sizes of cardiomyocytes' nuclei, μm ²	Количество капилляров в мм ² Number of capillaries in mm ²
Интактные крысы Intact rats	–	7600 ± 1200	15,3 ± 5,8	720 ± 120
Крысы с моделью АГ Rats with modeled AH	3	6900 ± 720	19,8 ± 3,9 ¹	750 ± 80
	7	6500 ± 720 ¹	15,5 ± 5 ²	1100 ± 106 ^{1,2}
	30	6500 ± 580 ¹	12,5 ± 4 ¹	900 ± 112 ¹
Крысы с АГ после применения ЯСК КК Rats with AH after application of CBNCs	3	8400 ± 1200 ^{1,2}	20,2 ± 4,2 ¹	720 ± 86
	7	8600 ± 872 ¹	29,1 ± 7,8 ^{1,2}	1000 ± 123 ^{1,2}
	30	7800 ± 886	17,5 ± 5 ²	800 ± 83 ²

Примечание: отличия статистически значимы по сравнению с контрольной группой (¹) и относительно предыдущего срока наблюдения (²), $p \leq 0,05$.

Note: significant differences if compared with the control (¹), significant differences if compared with previous observation term (²), $p \leq 0.05$.

нием и нарушением целостности сосудистой стенки. Для артериальных сосудов был характерен суженный просвет неправильной или щелевидной формы. Внутренняя эластическая мембрана сосуда имела извилистую форму и прерывистые контуры.

Результаты морфометрических исследований показали, что на 3-и сутки после развития АГ у крыс количество капилляров составляло (750 ± 80) на мм² (приблизительно как у интактных животных), однако отмечалось значимое уменьшение количества ядер кардиомиоцитов относительно нормы с (7600 ± 1200) до (6900 ± 720) на мм², что, вероятно, компенсировалось увеличением их площади с ($15,3 \pm 5,8$) до ($19,8 \pm 3,9$) мкм².

По сравнению с 3-ми сутками на 7-е сутки после развития АГ выявлялись более выраженные изменения структурной организации миокарда, вызванные отеком, кровенаполнением сосудов и деструкцией мышечных волокон. Среди мышечных волокон равномерной толщины располагались группы истонченных волокон извилистой формы, окруженных интерстициальной соединительной

Most of the capillaries were enlarged and filled with red blood cells, particularly in subepicardial areas. There were the foci of perivascular edema and single cell infiltrates consisting of lymphoid-histocytic elements. Around the individual vessels and in small sites of the cardiac muscle in interstitial connective tissue we observed an increased density of fibroblasts with large euchrome nucleus (Fig. 2).

In an interstitial connective tissue (along the muscle fibers) there were visualized thin collagen fibers, which were yellow in polarized light. The vessels were surrounded with large bundles of collagen fibers (Fig. 3A, B).

Staining with Orcein had revealed the changes in blood vessels, associated with a marked perivascular edema, irregular thickening and impaired vascular integrity. The arteries were featured with the narrowed lumen either of irregular or split-like shapes. The vessel inner elastic membrane was of a tortuous shape and discontinuous contours.

The results of morphometric studies showed that to day 3 after the AH development in rats the number of capillaries was (750 ± 80) per mm² (nearly as in intact animals), but there was a significant decrease in the number of cardiomyocyte nuclei relative to the norm from (7.600 ± 1.200) down to (6.900 ± 720) per mm², that was likely compensated by an increased area from (15.3 ± 5.8) up to (19.8 ± 3.9) mm².

Comparing with day 3 the 7th day after the AH development was characterized with more pronounced changes in the myocardium structure caused by edema, filling of blood vessels and destruction of muscle fibers. Among the muscle fibers of uniform thickness we observed the groups of thinned fibers of winding shape, surrounded by interstitial connective tissue with the signs of edema (Fig. 4A, B). All the layers of myocardium had the congestion of blood vessels and capillaries [16], disordered integrity of the walls of some vessels and diapedetic hemorrhages (Fig. 5B).

There were found the foci of myocardial injury with fragmentation of the bundles of muscle fibers (Fig. 5A). In subepicardial areas there were identified the muscle fibers with the sites of mild eosinophilia with missing cross-striation and absent nuclei, indicating the presence of necrosis (Fig. 5B). In a demarcation zone the edema dominated, single macrophages and lymphocytes were diffusely located.



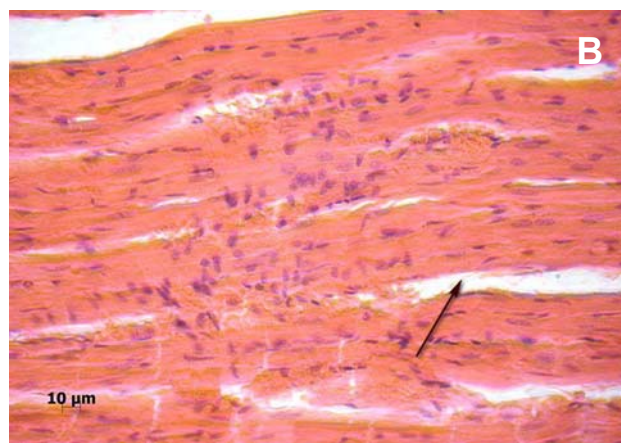
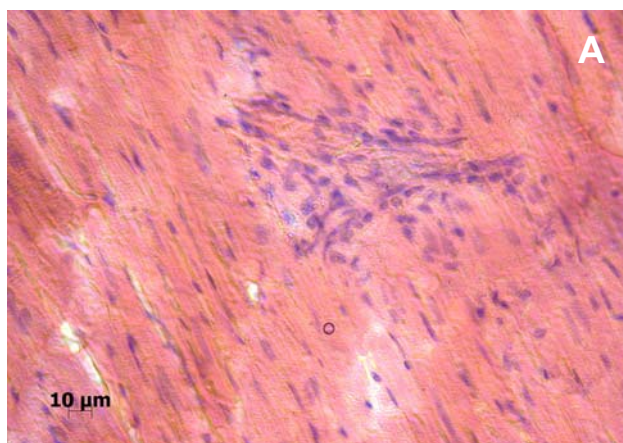


Рис. 2. Участки миокарда левого желудочка молодых крыс на 3-и сутки после развития АГ. Повышенная плотность фибробластов и пролиферация эндотелиоцитов: **А** – периваскулярная локализация фибробластов; **В** – разрастания интерстициальной соединительной ткани. Окрашивание гематоксилином и эозином, $\times 200$.

Fig. 2. Sites of left ventricle myocardium in young rats to day 3 after hypertension development. Increased density of fibroblasts and proliferation of endothelial cells: **A** – perivascular localization of fibroblasts; **B** – proliferation of interstitial connective tissue. Hematoxylin and eosin stain, $\times 200$.

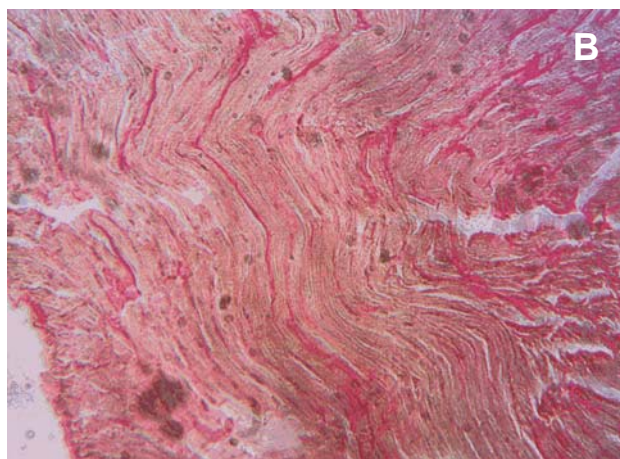


Рис. 3. Участки миокарда левого желудочка молодых крыс на 3-и сутки после развития АГ: **А** – умеренный периваскулярный отек и периваскулярная локализация коллагеновых волокон; пикросириус красный, световая микроскопия, $\times 200$; **В** – кардиосклероз; окрашивание гематоксилином и эозином, $\times 200$.

Fig. 3. Sites of left ventricle myocardium in young rats to day 3 after hypertension development: **A** – mild perivascular oedema and perivascular localization of collagen fibers; picosirius red, light microscopy, $\times 200$; **B** – cardiosclerosis; hematoxylin and eosin stain, $\times 200$.

тканью с признаками отека (рис. 4, А, В). Во всех слоях миокарда отмечались полнокровные сосудов и капилляров [13], нарушение целостности стенок отдельных сосудов и диапедезные кровоизлияния (рис. 5, В).

Наблюдались очаги повреждения миокарда с фрагментацией пучков мышечных волокон (рис. 5, А). В субэпикардальных зонах выявлялись мышечные волокна с участками слабовыраженной эозинофилии, на которых отсутствовала поперечная исчерченность и не визуализировались ядра, что свидетельствовало об их некрозе (рис. 5, В). В демаркационной зоне преобладал отек, имели место единичные, диффузно расположенные мак-

Near the necrosis sites the muscle fibers were hypertrophied, in the interstitial connective tissue a low density of fibroblasts was observed.

Staining with Picosirius Red revealed in the cardiac muscle the sites of tightly arranged muscle fibers with narrow interlayers of connective tissue that contained thin collagen fibers (Fig. 6A). In subepicardial myocardial layer around large plethoric vessels we have found the interlayers of connective tissue with bundles of collagen fibers, indicating the perivascular cardiosclerosis [10]. Close to these vessels the signs of diffuse cardiosclerosis were found (Fig. 6B).

All large vessels were characterized with a modified vascular lumen shape, irregularly thickened walls,

рофаги и лимфоциты. Возле участков некроза мышечные волокна были гипертрофированы, в интерстициальной соединительной ткани отмечалась низкая плотность фибробластов.

При окраске пикросириумом красным в сердечной мышце выявлялись участки плотнорасположенных мышечных волокон с узкими прослойками соединительной ткани, которая содержала тонкие коллагеновые волокна (рис. 6, А). В субэпикардальном слое миокарда вокруг крупных полнокровных сосудов обнаруживались широкие прослойки соединительной ткани со скоплением пучков коллагеновых волокон, что свидетель-

tortuous and broken contours of internal elastic membrane. Perivascular edema was formed around them (Fig. 7).

Analysis of morphometric parameters at this stage of experiment showed even stronger reduction in the number of nuclei from (7.600 ± 1.200) down to (6.500 ± 720) per mm^2 with a tendency to a significant decrease in the area of the cardiomyocyte nuclei down to $(15.5 \pm 5) \text{mm}^2$ (see Table). The number of capillaries in the myocardium was significantly increased compared to both the control and previous observation period.

To day 30 after the AH development in cardiac muscles of young rats there we observed the sites with

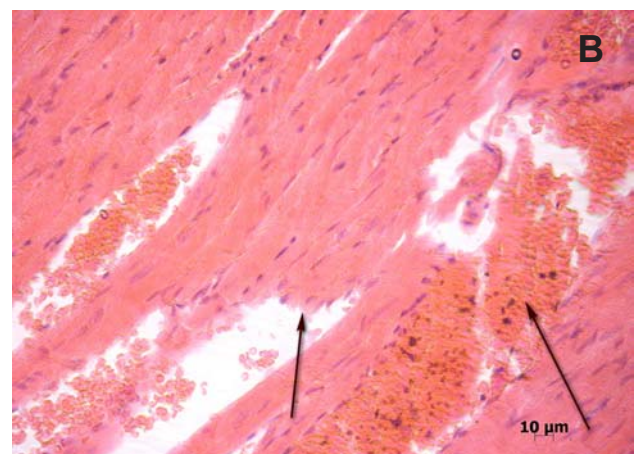
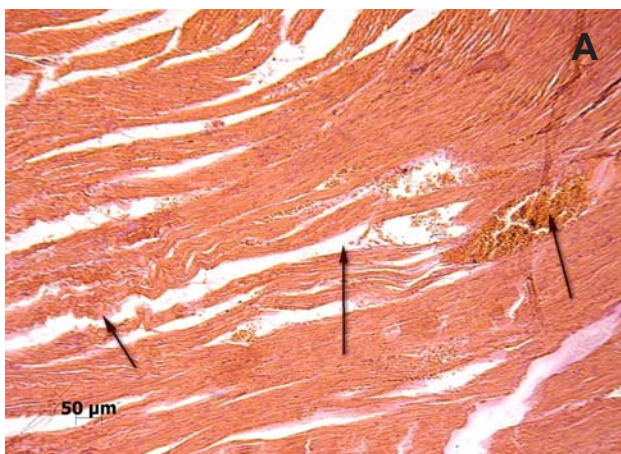


Рис. 4. Участки миокарда межжелудочковой перегородки молодых крыс на 7-е сутки после развития АГ: **А** – неравномерная толщина мышечных волокон с извилистыми контурами; выраженный отек интерстициальной соединительной ткани; расширенный полнокровный сосуд, $\times 100$; **В** – венозный застой; фрагментация мышечных волокон; окрашивание гематоксилином и эозином, $\times 200$.

Fig. 4. Myocardium areas of ventricular septum in young rats to day 7 after hypertension development: **A** – heterogeneous width of muscle fibers with tortuous contours; pronounced oedema of interstitial connective tissue, enlarged full-blooded vessel, $\times 100$; **B** – venous stasis; fragmentation of muscle fibers; hematoxylin and eosin stain, $\times 200$.

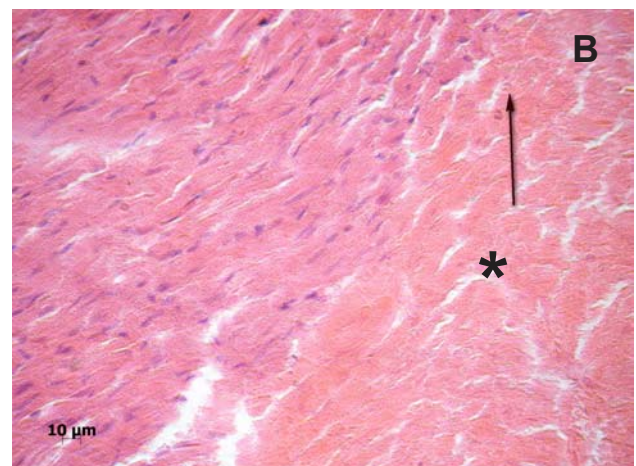
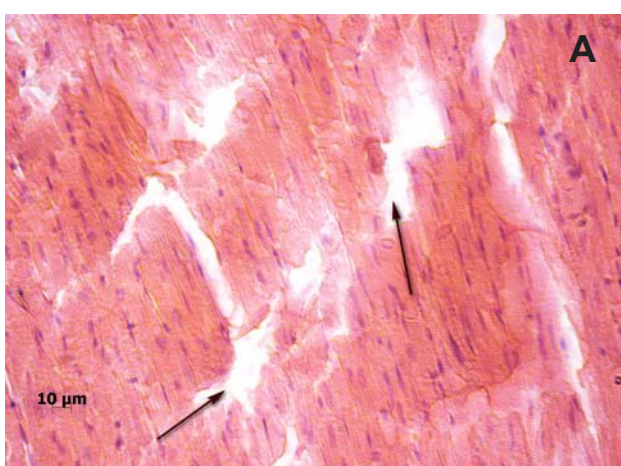


Рис. 5. Участки миокарда левого желудочка молодых крыс на 7-е сутки после развития АГ: **А** – фрагментированные мышечные волокна; **В** – очаг ишемически измененных мышечных волокон (*), отек интерстициальной соединительной ткани. Окрашивание гематоксилином и эозином, $\times 200$.

Fig. 5. Sites of left ventricle myocardium in young rats to day 7 after hypertension development: **A** – fragmented muscle fibers; **B** – area of ischemically changed muscle fibers (*), oedema of interstitial connective tissue. Hematoxylin and eosin stain, $\times 200$.



ствовало о периваскулярном кардиосклерозе [4]. Вблизи таких сосудов отмечались признаки диффузного кардиосклероза (рис. 6, В).

Для всех крупных сосудов были характерны измененная форма сосудистого просвета, неравномерно утолщенные стенки, извилистые и прерывистые контуры внутренней эластической мембраны. Вокруг них формировался периваскулярный отек (рис. 7).

Анализ морфометрических показателей на данном этапе исследований выявил еще большее уменьшение количества ядер с (7600 ± 1200) до (6500 ± 720) на мм^2 с тенденцией к значимому уменьшению площади ядер кардиомиоцитов до $(15,5 \pm 5)$ мкм^2 (таблица). Количество капилляров в миокарде значительно увеличивалось по сравнению как с контролем, так и предыдущим сроком наблюдения.

На 30-е сутки после развития АГ в сердечной мышце молодых крыс наблюдались участки с выраженными структурными изменениями (рис. 8). В тканях миокарда сохранялись периваскулярный отек, кардиосклероз и полнокровие крупных сосудов (рис. 9, А). Часть сосудов имела утолщенные стенки, расширенные капилляры, переполненные форменными элементами крови. Обнаруживались признаки перикапиллярного отека и очаги диапедезных кровоизлияний. Сосудистый просвет имел характерную неправильную форму, эндотелиальные клетки располагались в виде «частокола», что свидетельствовало о развитии спазма сосудов (рис. 9, В) [13].

При анализе морфометрических данных установлено, что количество ядер по сравнению с предыдущим сроком исследований не изменилось, однако резко и значимо уменьшилась площадь ядер кардиомиоцитов до $(12,5 \pm 4)$ мкм^2 (таблица). При этом количество капилляров оставалось выше нормальных значений $((900 \pm 112) \text{мм}^2)$.

Таким образом, у молодых крыс в течение месяца после развития АГ наблюдали прогрессирующее нарушение кровообращения, дистрофические и деструктивные изменения мышечных волокон миокарда. Повышение АД сопровождалось плазматическим пропитыванием стенок артерий и артериол, затем развивалось мукоидное набухание (разновидность стромально-сосудистой дистрофии), которое к 30-м суткам после возникновения АГ трансформировалось в фибриноидное набухание и фибриноидный некроз стенок сосудов с последующими кровоизлияниями. Выявлялись морфологические признаки очаговой ишемии миокарда, а также спазма артериальных сосудов, пареза венозных сосудов и капилляров, периваскулярного отека и склероза. Способность миокарда компенсировать сократительную функцию сердца в усло-

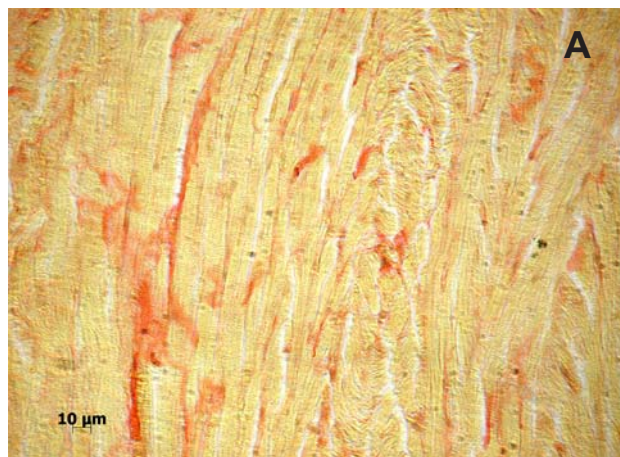


Рис. 6. Участки миокарда левого желудочка молодых крыс на 7-е сутки после развития АГ: **А** – тонкие коллагеновые волокна (окрашены красным цветом) в узких прослойках интерстициальной соединительной ткани, расположенные вдоль мышечных волокон; **В** – периваскулярный и диффузный кардиосклероз. Окрашивание пикросириусом красным, $\times 100$.

Fig. 6. Sites of left ventricle myocardium in young rats to day 7 after hypertension development: **A** – thin collagen fibers (stained in red) in the narrow between-layers of interstitial connective tissue, located along the muscle fibers; **B** – perivascular and diffusive cardiosclerosis. Picrosirius red stain, $\times 100$.

significant structural changes (Fig. 8). Myocardial tissues preserved perivascular edema, cardiosclerosis and plethora of large vessels (Fig. 9A). Some vessels had thickened walls, dilated capillaries, overfilled with blood corpuscles. There were the signs of pericapillary edema and foci of diapedetic hemorrhages. The vascular lumen was of a characteristic irregular shape, endothelial cells were arranged as a ‘picket fence’, that was an evidence of the developing vasospasm (Fig. 9B) [20].

The analysis of the morphometric data revealed that the number of nuclei in comparison with the previous period of study did not change, however, there was sharp and significant decrease in cardiomyocyte



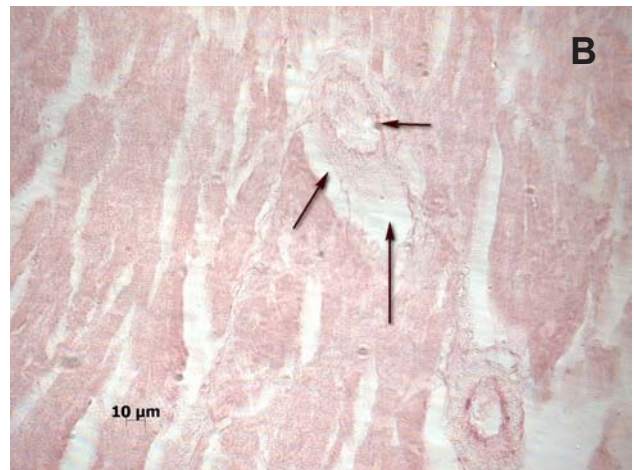
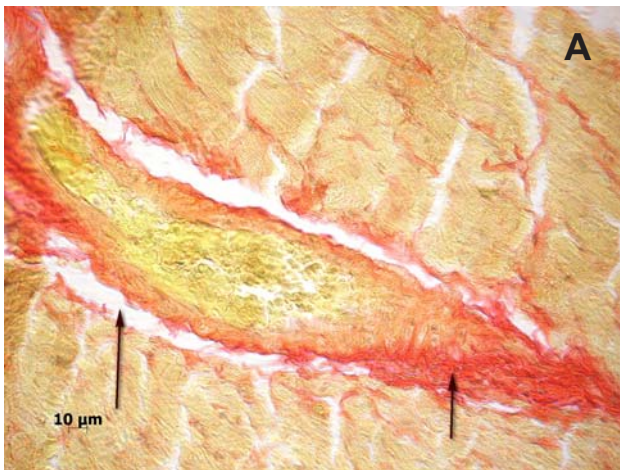


Рис. 7. Участки миокарда левого желудочка молодых крыс на 7-е сутки после развития АГ: **А** – пучки коллагеновых волокон, сконцентрированных вокруг полнокровного сосуда, периваскулярный отек; окрашивание пикросириусом красный, $\times 100$; **В** – неравномерно утолщенные стенки сосудов, извилистые контуры внутренней эластической мембраны, периваскулярный отек; окрашивание орсеином, $\times 100$.

Fig. 7. Sites of left ventricle myocardium in young rats to day 7 after hypertension development: **A** – bundles of collagen fibers, located around a full-blooded vessel, perivascular oedema; picosirius red stain, $\times 100$; **B** – unevenly thickened vessel walls, tortuous contours of internal elastic membrane, perivascular oedema; orcein stain, $\times 100$.

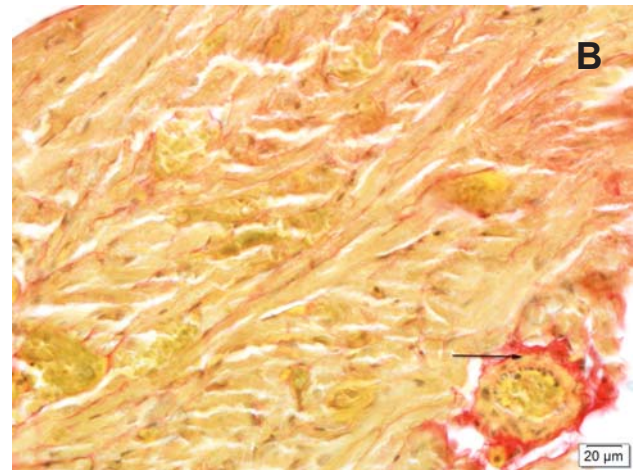
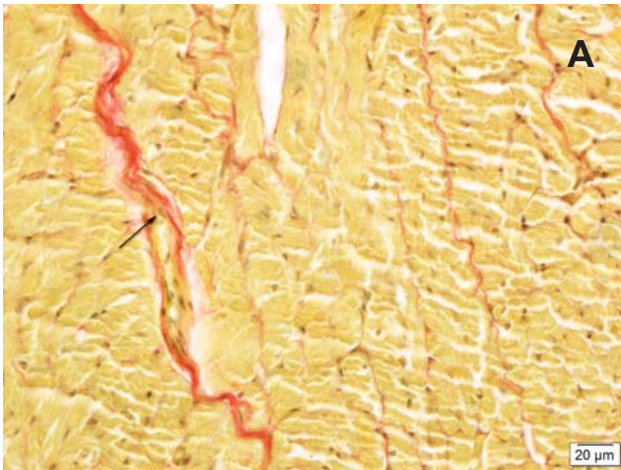


Рис. 8. Участки миокарда левого желудочка молодых крыс на 30-е сутки после развития АГ: **А** – периваскулярный кардиосклероз; **В** – полнокровие артериального сосуда, выход эритроцитов в периваскулярное пространство. Периваскулярный и интерстициальный отек. Окрашивание пикросириусом красным, $\times 400$.

Fig. 8. Sites of left ventricle myocardium in young rats to day 30 after hypertension development: **A** – perivascular cardiosclerosis; **B** – arterial vessel plethora, release of erythrocytes into perivascular space. Perivascular and interstitial oedemas. Picosirius red stain, $\times 400$.

виях плохой трофики путем внутриклеточной гипертрофии (увеличение размера ядер кардиомиоцитов) к 30-м суткам после развития АГ усугубляла развитие патологического процесса.

В группе экспериментальных животных с АГ на 3-и сутки после введения криоконсервированных ЯСК КК существенных структурных перестроек миокарда не отмечалось по сравнению с крысами группы 2 (моделированная стресс-индуцированная АГ). Мышечные волокна (интрамуральная часть) располагались плотными пучками, разделенными узкими прослойками интерстициальной соединительной ткани с низкой плотностью клеток (рис. 10, А).

nuclei area down to (12.5 ± 4) mm^2 (see Table). Herewith the number of capillaries was above normal values $((900 \pm 112)$ mm^2).

Thus, in young rats during a month after the AH development the progressive disordered blood circulation, degenerative and destructive changes of myocardial muscle fibers were observed. Elevated blood pressure was accompanied with plasmatic impregnation of the walls of arteries and arterioles, later there was developed a mucoid swelling (a type of stromal-vascular dystrophy) which to day 30 after the AH onset was transformed into fibrinoid swelling and fibrinoid necrosis of the vessel walls with following bleeding.



Определялась поперечная исчерченность сократительных волокон и полиморфные эухромные ядра кардиомиоцитов. В субэпикардиальной зоне обнаруживались участки мышечных волокон с неравномерной гипертрофией и извилистой формой, в интерстициальной соединительной ткани определялись тонкие коллагеновые волокна и небольшое количество фибробластов с плотным базофильным ядром (рис. 10, В).

В субэпикардиальной зоне выявлялись расширенные полнокровные венозные сосуды с периваскулярным отеком и отеком интерстициальной соединительной ткани (рис. 11, А). Кардиомиоциты характеризовались выраженной эозинофилией, что свидетельствует о дистрофических изменениях в них.

Вокруг крупных сосудов миокарда был выражен отек, однако в отличие от животных группы 2, которым не вводили ЯСК КК, в периваскулярной зоне возле поврежденных мышечных волокон определялись макрофаги (гистиоциты), расположенные диффузно или небольшими группами. Отмечалась повышенная плотность фибробластов с крупным ядром (рис. 11, В). Данный клеточный состав характерен как для асептического воспаления в начале пролиферативной (продуктивной) фазы, так и для процесса неангиогенеза [13].

Обнаруживались артериальные сосуды с утолщенной сосудистой стенкой и эндотелиальными клетками, «выпирающими» в просвет сосуда. При окрашивании орсеином визуализировалась извилистая, с прерывистыми контурами внутренняя эластическая мембрана сосуда.

Результаты морфометрического анализа данных показали значимое увеличение количества ядер кардиомиоцитов как у интактных животных, так и у крыс с АГ (таблица). Площадь ядер кардиомиоцитов увеличивалась, при этом количество капилляров не изменялось.

На 7-е сутки после введения животным с АГ криоконсервированных ЯСК КК структурные повреждения сердечной мышцы и патологический процесс были менее выражены по сравнению с гипертензивными крысами.

Интрамуральная зона миокарда характеризовалась плотно расположенными мышечными волокнами, определялись кардиомиоциты с дистрофическими изменениями. Некоторые из них имели участки с повышенной эозинофилией, на которых не визуализировались ядра и поперечная исчерченность кардиомиоцитов (рис. 12). Отмечалось увеличение количества и размеров ядер кардиомиоцитов (рис. 13, А), сохранялась их гипертрофия [13]. Ядра кардиомиоцитов обладали полиморфизмом – округлые, палочковидные, зна-

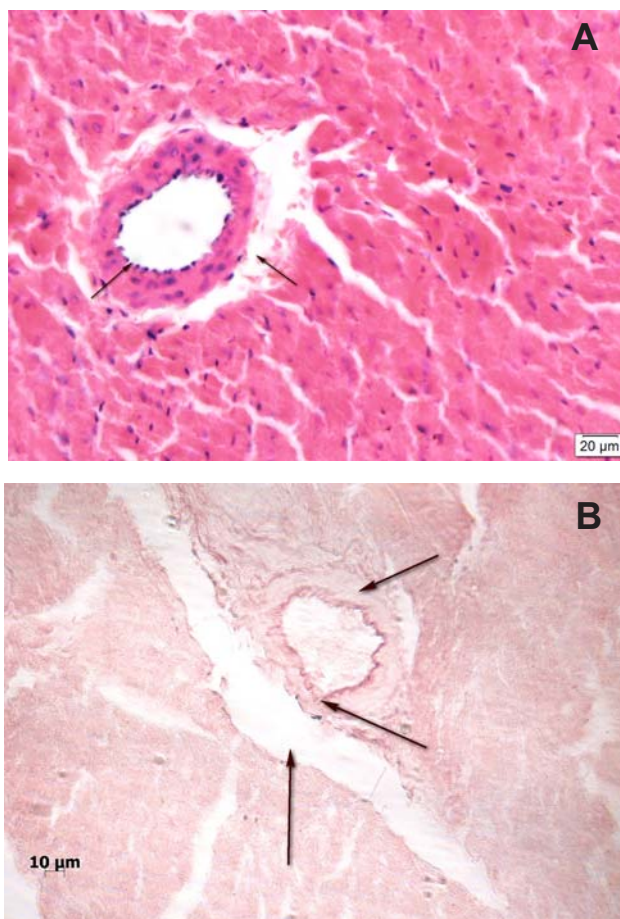


Рис. 9. Участки миокарда левого желудочка молодых крыс на 30-е сутки после развития АГ. Артериальные сосуды с суженными просветами: **А** – периваскулярный отек, утолщение сосудистой стенки; окрашивание гематоксилином и эозином, $\times 400$; **В** – неравномерно утолщенные стенки сосуда, извилистые контуры внутренней эластической мембраны, просвет сосуда неправильной формы; окрашивание орсеином, $\times 200$.

Fig. 9. Sites of left ventricle myocardium in young rats to day 30 after hypertension development. Arterial vessels with stenosed lumens: **A** – perivascular edema, thickening of vascular wall; hematoxylin and eosin stain, $\times 400$; **B** – unevenly thickened vessel walls, tortuous contours of internal elastic membrane, irregularly shaped lumen of vessel; orcein stain, $\times 200$.

We have found the morphological features of myocardium focal ischemia as well as the spasm of arteries, paresis of the veins and capillaries, perivascular edema and sclerosis. The ability of myocardium to compensate a contractile function of the heart under poor trophism conditions by means of intracellular hypertrophy (rise in the cardiomyocytes' nuclei size) to the 30th day after the AH development aggravated the pathological process.

In the group of experimental animals with AH to day 3 after the administration of cryopreserved CBNCs no significant structural rearrangements of myocardium were observed as compared to the rats of Group 2

чительно вытянутые (полиплоидные). Большинство ядер были эухромными, однако определялись и мелкие пикнотично измененные ядра (рис. 13, А).

В интерстициальной соединительной ткани (возле поврежденных участков мышечных волокон) обнаруживались расположенные диффузно или небольшими группами макрофаги, а также большое количество фибробластов. В инстириции миокарда вокруг интрамуральных сосудов определялись сосудистые почки, представленные 2–3 ответвлениями, образованными молодыми эндотелиальными клетками (рис. 13, В) [13].

В эндокардиальной зоне были выявлены участки извилистого расположения мышечных волокон. Вены и капилляры расширены и полнокровны.

Артериальные сосуды были сужены и имели утолщенные стенки с повышенной плотностью фибробластов, некоторые из них полнокровны, периваскулярный отек менее выражен (рис. 13).

Результаты морфометрического исследования показали значимое увеличение количества (с 8400 ± 1200) до (8600 ± 872) на мм^2 и площади (до $29,1 \pm 7,8$ мкм^2) ядер кардиомиоцитов по сравнению с группой контроля и группой крыс на 7-е сутки после введения ЯСК КК (таблица). Количество капилляров в ткани этих животных было больше по сравнению с интактной группой и животными, которых исследовали на 3-и сутки после введения ЯСК КК.

На 30-е сутки после введения ЯСК КК в миокарде животных с АГ отмечались плотно расположенные мышечные волокна и тонкие прослойки интерстициальной соединительной ткани. Морфологические признаки интерстициального отека и кардиосклероза были слабо выражены. Наблюдались участки с фрагментированными мышечными волокнами, а также отдельные волокна с повышенной эозинофилией, однако в данный срок исследования они встречались реже, чем у гипертензивных крыс (рис. 14, А). Отмечалась повышенная плотность фибробластов как в интерстициальной соединительной ткани, так и вокруг кровеносных сосудов, что является морфологическим признаком неангиогенеза как путем почкования, так и аутологическим путем (рис. 14, В) [13].

В эндокардиальной зоне отмечались расширенные полнокровные венозные сосуды и капилляры, единичные очаги диапедезных кровоизлияний. Морфологические признаки очаговой ишемии мышечных волокон в субэпикардиальной зоне отсутствовали. В интерстициальной ткани определялись клетки с плотными базофильными ядрами и умеренный отек.

При окрашивании пикросириусом было обнаружено, что коллагеновые волокна концентри-

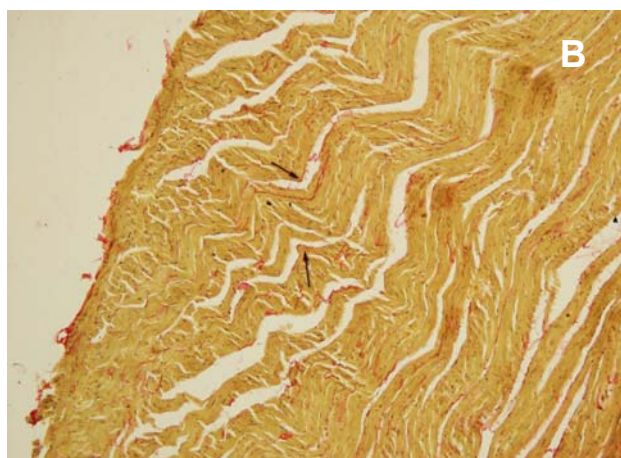
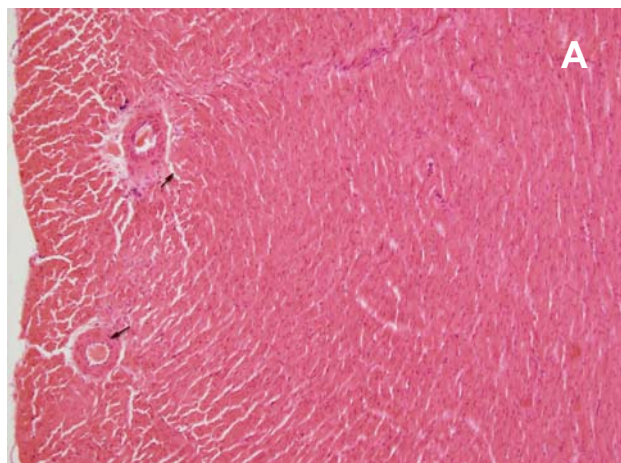


Рис. 10. Участки миокарда левого желудочка молодых крыс с АГ на 3-и сутки после введения ЯСК КК: **А** – плотное расположение интрамуральных мышечных волокон, периваскулярный и интерстициальный отек в субэпикардиальной зоне; окрашивание гематоксилином и эозином, $\times 100$; **В** – извилистое расположение пучков мышечных волокон; окрашивание пикросириусом красным, $\times 100$.

Fig. 10. Sites of left ventricle myocardium in young rats with hypertension to day 3 after administration of CBNCs **A** – dense arrangement of intramural muscle fibers, perivascular and interstitial oedema in subepicardial zone; hematoxylin and eosin stain, $\times 100$; **B** – tortuous arrangement of muscle fibers bundles; picrosirius red stain, $\times 100$.

(simulated stress-induced hypertension). Muscle fibers (intramural part) appeared as tight bundles separated by narrow layers of interstitial connective tissue with low cell density (Fig. 10A). There was a cross-striation of contractile fibers and polymorphic euchrome nuclei of cardiomyocytes. In subepicardial zone we observed the sites of muscle fibers with uneven hypertrophy and winding shape, in interstitial connective tissue the thin collagen fibers and small number of fibroblasts with a dense basophilic nucleus were observed (Fig. 10B).

In subepicardial zone the enlarged full-blooded venous vessels with perivascular edema and the one



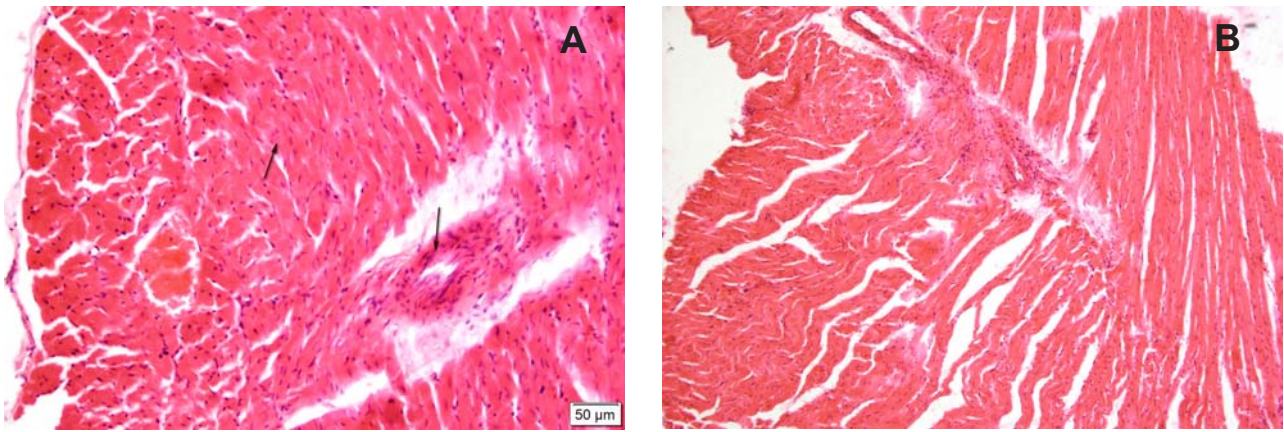


Рис. 11. Участки миокарда левого желудочка молодых крыс с АГ на 3-и сутки после введения ЯСК КК: **А** – выраженный периартериальный отек. Дистрофически измененные кардиомиоциты, отек и выраженная базофилия ядер клеток интерстициальной соединительной ткани субэпикардальной зоны; **В** – периваскулярная пролиферация фибробластов и диффузно расположенные макрофаги. Окрашивание гематоксилином и эозином, $\times 200$.

Fig. 11. Sites of left ventricular myocardium in young rats with hypertension to day 3 after administration of CBNCs: **A** – pronounced periarterial oedema. Dystrophic changes in cardiomyocytes, oedema and pronounced basophilia of cell nuclei of interstitial connective tissue in subepicardial zone; **B** – perivascular proliferation of fibroblasts and diffusely arranged macrophages. Hematoxylin and eosin stain, $\times 200$.

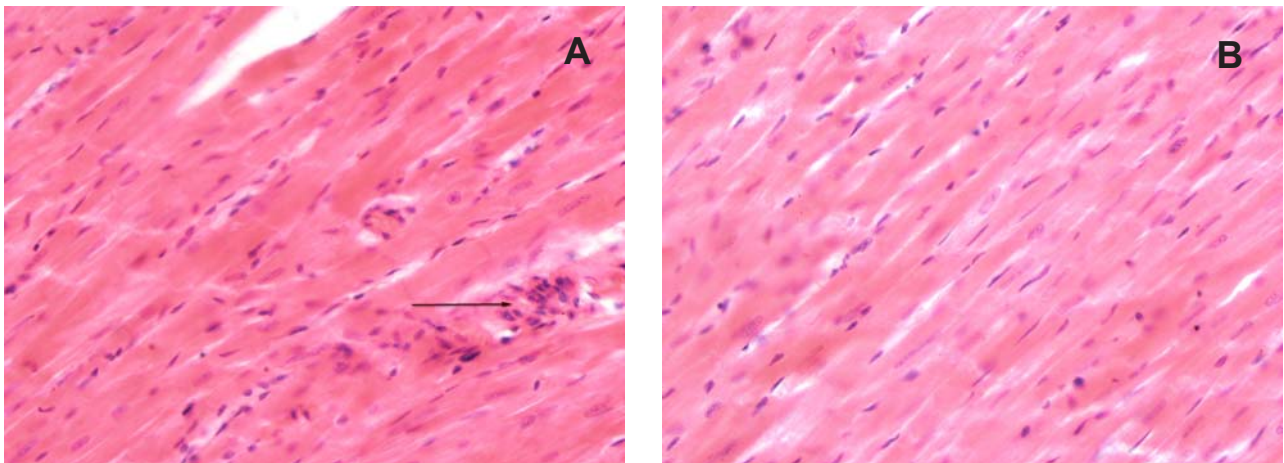


Рис. 12. Участки миокарда левого желудочка молодых крыс с АГ на 7-е сутки после введения ЯСК КК: **А** – отдельные дистрофически измененные мышечные волокна; **В** – полиморфизм ядер кардиомиоцитов. Окрашивание гематоксилином и эозином, $\times 200$.

Fig. 12. Sites of left ventricular myocardium in young rats with hypertension to day 7 after administration of CBNCs: **A** – single degeneratively changed muscle fibers; **B** – polymorphism of cardiomyocyte nuclei. Hematoxylin and eosin stain, $\times 200$.

ровались толстыми пучками вокруг артериальных сосудов, тогда как вокруг мелких артерий и венозных сосудов толщина слоя коллагеновых волокон была значительно меньше, склероз интерстициальной соединительной ткани был еще менее выражен. Внутренние эластические мембраны большинства кровеносных сосудов имели непрерывный контур и разную степень извитости.

Анализ морфометрических данных на 30-е сутки после введения молодым крысам с АГ криоконсервированных ЯСК КК показал значимое

of interstitial connective tissue were identified (Fig. 11A). Cardiomyocytes were characterized by severe eosinophilia, indicating degenerative changes in the cells.

The myocardium large vessels were surrounded with the edema sites, however, unlike the animals of Group 2, which was not injected with CBNCs, the macrophages (histiocytes) were found in the perivascular zone near the damaged muscle fibers, located diffusely or in small groups. There was an increased number of fibroblasts with large nuclei (Fig. 11B). Such a cellular composition is characteristic for both aseptic

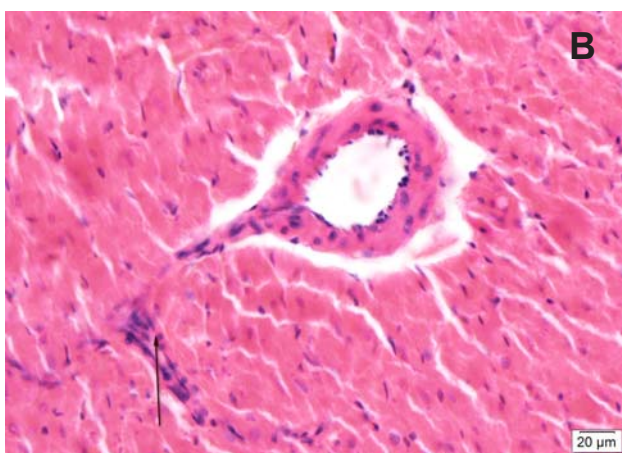
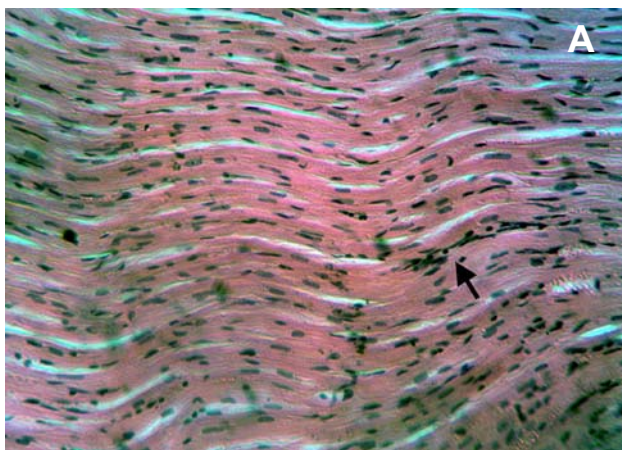


Рис. 13. Участки миокарда левого желудочка молодых крыс с АГ на 7-е сутки после введения ЯСК КК: **А** – увеличение количества и размеров ядер кардиомиоцитов; **В** – периваскулярный отек, стенка сосуда утолщена; визуализируется сосудистая почка, состоящая из пролиферирующих эндотелиоцитов. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$.

Fig. 13. Sites of left ventricle myocardium in young rats with hypertension to day 7 after administration of CBNCs: **A** – rise in number and size of cardiomyocyte nuclei; **B** – perivascular oedema, vessel wall is thickened; vascular bud, consisting of proliferating endothelial cells is observed. Hematoxylin and eosin stain, $\times 400$.

уменьшение количества ядер кардиомиоцитов и их площади (таблица) до показателей интактных животных (7800 ± 886) на мм^2 и ($17,5 \pm 5$) мкм^2 соответственно. Количество капилляров соответствовало норме – (800 ± 83) на мм^2 .

Таким образом, на 30-е сутки после введения ЯСК КК в миокарде молодых гипертензивных крыс наблюдался менее выраженный периваскулярный и интерстициальный отек по сравнению с контрольной группой и крысами на 7-е сутки после введения ЯСК КК. Повышалась плотность фибробластов в интерстициальной соединительной ткани и вокруг кровеносных сосудов, отсутствовали участки с признаками очаговой ишемии миокарда и кардиосклероза. В отличие от молодых живот-

inflammation in the early proliferative (productive) phase and for neoangiogenesis process [20].

There were found the arterial vessels with a thickened vascular wall and endothelial cells, ‘bulging’ into the vessel lumen. Staining with Orcein visualized tortuous internal elastic membrane of the vessel with discontinuous contours.

The results of morphometric analysis showed a significant increase in the number of cardiomyocyte nuclei both in intact animals and in the rats with AH (Table). The area of the nuclei of cardiomyocytes increased, while the number of capillaries was not changed.

To day 7 after the introduction of cryopreserved CBNCs to the animals with AH the structural damages of heart muscle and pathological process were less pronounced if compared to hypertensive rats.

Intramural zone of myocardium was characterized by tightly arranged muscle fibers, the cardiomyocytes with degenerative changes were found. Some of them had sites with an increased eosinophilia, whereon the nuclei and cross-striation of cardiomyocytes were not visualized (Fig. 12). There was noted an increase in the number and size of the nuclei of cardiomyocytes (Fig. 13A), their hypertrophy was kept [20]. The nuclei of cardiomyocytes were polymorphic: spherical, rod-shaped, substantially elongated (polyploid). Most nuclei were euchrome, but there were also the modified small pyknotic nuclei as well (Fig. 13A).

In interstitial connective tissue (near the damaged sites of muscle fibers) we have found the macrophages arranged diffusely or in small groups, as well as a large number of fibroblasts. In myocardial interstitium around the intramural vessels we observed the vascular buds represented by 2–3 branches, formed by young endothelial cells [20] (Fig. 13B).

In endocardial zone the sites of tortuous arrangement of muscle fibers were found. Veins and capillaries were dilated and congested.

Arterial vessels were narrowed and had thickened walls with high density of fibroblasts, some of them were congested, perivascular edema was less pronounced (Fig. 13).

The morphometric findings demonstrated a significant increase in the number from (8.400 ± 1.200) up to (8.600 ± 872) per мм^2 and area up to (29.1 ± 7.8) мм^2 of cardiomyocyte nuclei compared with the control group and the group of rats to day 7 after the administration of the CBNCs (Table). The number of capillaries in tissue of these animals was higher than in Group 1, and those, which were examined to day 3 after the administration of CBNCs.

To day 30 after the injection of CBNCs in the myocardium of animals with AH we have observed tightly arranged muscle fibers and thin interlayers of



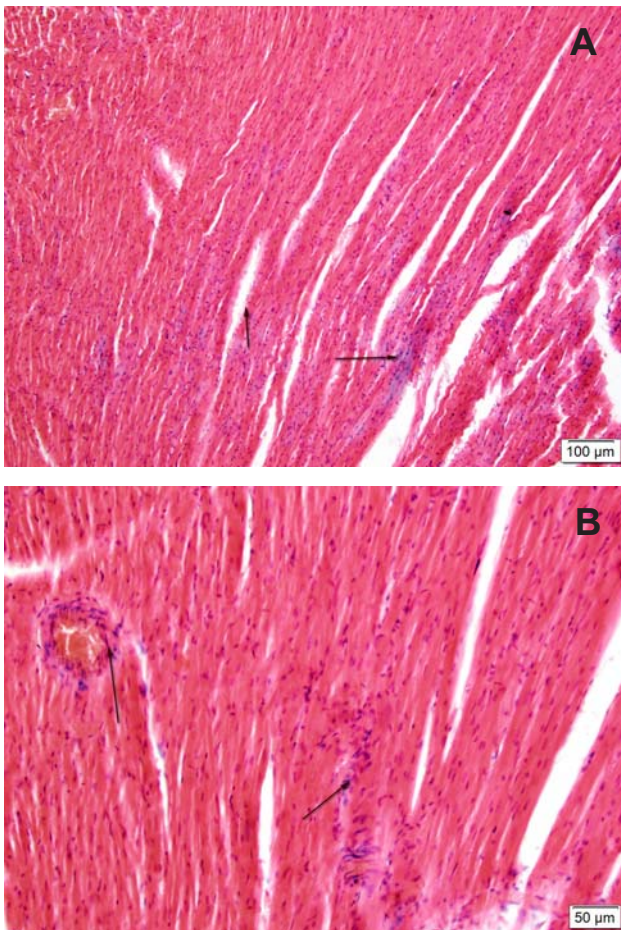


Рис. 14. Участки миокарда левого желудочка молодых крыс с АГ на 30-е сутки после введения ЯСК КК: **А** – отек и повышенная плотность клеток в интерстициальной соединительной ткани, в зоне разрушения мышечных волокон; окрашивание гематоксилином и эозином, $\times 100$; **В** – повышенная плотность фибробластов в стенке полнокровного сосуда и в интерстициальной соединительной ткани; окрашивание гематоксилином и эозином, $\times 200$.

Fig. 14. Sites of left ventricle myocardium in young rats with hypertension day 30 after administration of CBNCs: **A** – oedema and increased cell density in interstitial connective tissue and destruction zone of muscle fibers; hematoxylin and eosin stain, $\times 100$; **B** – high density of fibroblasts in full-blooded vascular wall and interstitial connective tissue; hematoxylin and eosin stain, $\times 200$.

ных с моделью АГ количество ядер кардиомиоцитов и их площадь увеличивались уже на 3-и сутки после применения препарата. Эти компенсаторные процессы сопровождалась неоангиогенезом как путем почкования, так и аутогенным путем.

В современной зарубежной и отечественной литературе [7, 10, 15, 20] широко обсуждается вопрос применения клеточной терапии при лечении различных заболеваний. Результаты проведенных нами экспериментальных исследований согласуются с данными других авторов [7, 14], при этом они более широко раскрывают механизм развития стресс-

interstitial connective tissue. Morphological signs of interstitial edema and cardiosclerosis were slightly manifested. There were observed the sites with fragmented muscle fibers as well as single fibers with increased eosinophilia, but they were less common if compared with hypertensive rats in the study period (Fig. 14A). Increasing density of fibroblasts was observed both in interstitial connective tissue and surrounding blood vessels, being a morphological feature of neoangiogenesis both by budding and autologous way (Fig. 14B) [20].

In endocardial zone there were found enlarged full-blooded venous vessels and capillaries, single foci of diapedetic hemorrhages. Morphological signs of focal ischemia of the muscle fibers in the subepicardial zone were absent. In interstitial tissue there were determined the cells with dense basophil nuclei and moderate edema.

Staining with Pikrosirius revealed the assembling of collagen fibers as thick bundles around the arterial vessels, while around the small arteries and veins the width of collagen fiber layer was significantly less, the sclerosis of interstitial connective tissue was much less pronounced. Internal elastic membranes of the majority of the blood vessels had a continuous contour and various extent of tortuosity.

Morphometric data analysis to day 30 after the introduction to young rats with AH of cryopreserved CBNCs showed a significant decrease in the number of cardiomyocytes and their area (Table) down to the values of intact animals ((7.800 ± 886) per mm^2) and ((17.5 ± 5) mm^2) respectively. The number of capillaries was in line with the norm (800 ± 83) mm^2 .

Thus, to day 30 after the administration of CBNCs in the myocardium of young hypertensive rats there was observed less pronounced perivascular and interstitial edema compared with the control group and the rats to day 7 after the administration of CBNCs. The density of fibroblasts in interstitial and connective tissue and around the blood vessels was increased, no sites with the signs of focal ischemia and cardiosclerosis were found. In contrast to young animals with experimental AH the number of nuclei of cardiomyocytes and their area increased to day 3 after application of the preparation. These compensatory processes were accompanied by neoangiogenesis both by budding and autogenic way.

There are a lot of foreign and ukrainian reports [7, 12, 15, 18] discussing the application of cell based therapy when treating various diseases. The results of our experimental studies are consistent with the findings of other authors [12, 17], moreover they allow us to approach closer to the revealing of mechanism of stress-induced AH and the impact of the injected preparation of cryopreserved cord blood on its course.

индуцированной АГ и влияния на него введенного препарата криоконсервированной кордовой крови.

Гистологические проявления морфофункциональных нарушений, наблюдаемые у молодых крыс с моделированной артериальной гипертензией, полностью подтверждают классическую модель стойкой АГ.

На фоне введения криоконсервированного ядро-содержащего препарата кордовой крови структура миокарда восстанавливается. Улучшается трофика тканей, исчезают дистрофические и деструктивные изменения как в результате неангиогенеза (увеличения количества капилляров миокарда и ядер кардиомиоцитов), так и репаративных процессов.

Выводы

При гистологическом исследовании миокарда молодых крыс со стресс-индуцированной АГ наблюдались дистрофические и деструктивные изменения мышечных волокон миокарда, свидетельствующие о нарушении коронарного кровообращения. Выявлялись морфологические признаки очаговой ишемии миокарда, спазма артериальных сосудов, пареза венозных сосудов и капилляров, периваскулярного отека и склероза.

В условиях плохой трофики миокарда, несмотря на компенсаторный механизм (увеличение размеров ядер кардиомиоцитов), к 30-м суткам после развития АГ приводила к декомпенсации сократительной функции сердца.

На фоне введения молодым гипертензивным крысам криоконсервированных ЯСК КК в интерстициальной соединительной ткани миокарда отмечалась повышенная плотность фибробластов, отсутствовали участки с признаками очаговой ишемии. Морфофункциональные признаки гипертрофии миокарда, кардиосклероза и фиброза тканей и сосудов отсутствовали за счет компенсаторного развития процессов неангиогенеза. По данным морфометрических исследований установлено, что на 30-е сутки после введения ЯСК КК количество ядер кардиомиоцитов и их площадь значительно уменьшались до показателей интактных животных, а количество капилляров также возвращалось к норме.

Литература

1. Белая В.Н. Механизмы ремоделирования миокарда при артериальной гипертензии // *Международ. мед. журнал.* – 2006. – Т. 12, №2. – С. 15–18.
2. Беленков Ю.Н., Привалова Е.В., Чекнева И.С. Клеточная терапия в лечении хронической сердечной недостаточности: виды применяемых стволовых клеток, результаты последних клинических исследований // *Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия.* – 2008. – Т. 15, №5. – С. 4–18.

Histological manifestations of morphofunctional disorders in young rats with experimental arterial hypertension fully confirm the classical model of resistant AH.

Introduction of cryopreserved cord blood nucleated preparation was accompanied with recovery of the myocardial structure. The trophic of tissues was improved, dystrophic and destructive changes disappeared both in the result of neoangiogenesis (rise in the number of myocardial capillaries and cardiomyocyte nuclei) and reparative processes.

Conclusions

Histological examination of the myocardium of young rats with stress-induced AH allowed to observe dystrophic and destructive changes of myocardial muscle fibers, indicating the disordered coronary blood circulation. There were the morphological features of myocardial focal ischemia, spasm of arterial vessels, paresis of the veins and capillaries, perivascular edema and sclerosis.

Poor myocardial trophicity was accompanied with the decompensation of cardiac contractile function to day 30 after the AH development, despite the signs of compensation (increase in the sizes of cardiomyocytes nuclei).

Introduction of cryopreserved CBNCs to young hypertensive rats resulted in an increased density of fibroblasts in interstitial connective tissue of the myocardium, absence of sites with the signs of focal ischemia. Morphofunctional features of myocardial hypertrophy, cardiosclerosis and fibrosis of tissues and vessels were absent due to compensatory development of neoangiogenesis processes. According to the morphometric study it has been found that to day 30 after the administration of CBNCs the number of cardiomyocyte nuclei and their areas were significantly decreased down to the levels of intact animals and the number of capillaries returned to the norm as well.

References

1. Babiychuk L.A., Grishchenko V.I., Ryazantsev V.V. et al., inventors. The method of isolation of nucleated cord blood cells. Patent of Ukraine Nr. 234999, IPC C 12 N 5/00, 2007 May. 25.
2. Babiychuk L.A., Grishchenko V.I., Gurina T.N. et al., inventors. The method of cryopreservation of cord blood nucleated cells, including hematopoietic stem cells. Patent of Ukraine Nr. 92227, IPC A 01 N 1/02, 2010 Oct. 11.
3. Babiychuk L.V., Babiychuk V.H., Kozlov A.V. et al., inventors. Method of simulation of stress-induced hypertension. Patent of Ukraine Nr. 67199, IPC G 09 B 23/28, 2012 Jan. 10.
4. Belaya V.N. Myocardium remodeling mechanisms in arterial hypertension. *International Medical Journal* 2006; 12(2): 15–18.
5. Belenkov Yu.N., Privalov E.V., Chekneva I.S. Cell therapy of chronic heart failure: types of stem cells used, the results of recent clinical studies. *Cardiovascular Surgery* 2008; 5: 4–18.



3. Гаврилюк В.А. Структурно-функциональное ремоделирование сердца и сосудов у больных с эссенциальной артериальной гипертензией с различной массой тела // *Международ. мед. журнал.* – 2012. – Т. 18, №1. – С. 38–41.
4. Коваленко В.Н. Руководство по кардиологии. – К.: Морион, 2008. – 1424 с.
5. Коваленко В.М., Сиренко Ю.М., Радченко Г.Д. Стрес та виникнення артеріальної гіпертензії: що відомо // *Артеріальна гіпертензія.* – 2014. – Т. 36, №4. – С. 9–20.
6. Куловский В.И., Сероухова О.П. Расстройство микроциркуляции у больных артериальной гипертензией // *Вестник Витебского гос. мед. ун-та.* – 2008. – Т. 7, №11. – С. 1–11.
7. Кондаков И.И. Антиатерогенные эффекты криоконсервированного препарата фетоплацентарного комплекса при экспериментальном атеросклерозе // *Проблемы криобиологии.* – 2005. – Т. 15, №3. – С. 435–439.
8. Копаца Н.П., Белая Н.Б., Титаренко Н.В. Методы диагностики миокардиального фиброза у больных артериальной гипертензией // *Артеріальна гіпертензія.* – 2008. – Т. 2, №2. – С. 10–15.
9. Кочегура Т.Н., Ефименко А.Ю., Акопян Ж.А. и др. Клеточная терапия сердечной недостаточности: клинический опыт, проблемы и перспективы // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.* – 2010. – Т. 5, №2. – С. 11–18.
10. Насадюк Х.М. Стовбурові клітини пуповинної крові в регенеративній терапії хвороб серцево-судинної системи // *Жіночий лікар.* – 2009. – №6. – С. 12–15.
11. Саркисов Д.С., Петров Д.С. Микроскопическая техника. – М.: Медицина, 1996. – 544 с.
12. Сиренко Ю.Н. Диагностика, профилактика и лечение артериальной гипертензии // *Ліки України.* – 2004. – Т. 79, №3. – С. 6–9.
13. Струков А.И., Серов В.В. Патологическая анатомия. – М.: Медицина, 1993. – 688 с.
14. Шепітько В.І., Козлова В.П., Юрченко Т.М. Морфологічні аспекти дії нативних і криоконсервованих трансплантатів плаценти в експерименті // *Трансплантологія.* – 2000. – Т. 1, №1. – С. 294–295.
15. Шепітько К.В., Гаевский С.О., Потяженко М.М. та ін. Лікування стабільної стенокардії із застосуванням криоконсервованої фетоплацентарної тканинної трансплантації // *Проблемы криобиологии.* – 2001. – №3. – С. 43.
16. Пат. 234999, Україна, МПК С 12 N 5/00. Спосіб виділення ядровмісних клітин кордової крові / Л.О. Бабійчук, В.І. Грищенко, В.В. Рязанцев та ін.; заявл. 22.01.07; опубл. 25.05.07, Бюл. №7.
17. Пат. 92227, Україна, МПК А 01 N 1/02. Спосіб криоконсервування ядровмісних клітин кордової крові, у тому числі стовбурових гемопоетичних клітин / Л.О. Бабійчук, В.І. Грищенко, Т.М. Гуріна та ін.; заявл. 05.12.2008; опубл. 11.10.2010, Бюл. №19.
18. Пат. 67199, Україна, МПК G09B 23/28. Спосіб моделювання стрес-індукованої артеріальної гіпертензії / Л.В. Бабійчук, В.Г. Бабійчук, О.В. Козлов та ін.; заявл. 29.06.11; опубл. 10.02.12, Бюл. №3.
19. Berk C., Fujjwara S., Lehoux S. ECM remodeling in hypertensive heart disease // *J. Clin. Invest.* – 2007. – Vol. 117, №3. – P. 568–575.
20. Eirin A., Zhu X.Y., Ferguson C.M. et al. Intra-renal delivery of mesenchymal stem cells attenuates myocardial injury after reversal of hypertension in porcine renovascular disease // *Stem Cell Res. Ther.* – 2015. – Vol. 6, №1. – P. 7.
6. Berk C., Fujjwara S., Lehoux S. ECM remodeling in hypertensive heart disease. *J Clin Invest* 2007; 117(3): 568–575.
7. Eirin A., Zhu X.Y., Ferguson C.M. et al. Intra-renal delivery of mesenchymal stem cells attenuates myocardial injury after reversal of hypertension in porcine renovascular disease. *Stem Cell Res Ther* 2015; 6(1): 7.
8. Gavriulik V.A. Structural functional remodeling of the heart and vessels in patients with essential arterial hypertension with different body mass. *International Medical Journal* 2012; 18(1): 38–41.
9. Kohegura T.N., Efimenko A.Y., Akopyan Zh. A. et al. Stem cell therapy of heart failure: clinical trials, problems and perspectives. *Cellular Transplantation and Tissue Engineering* 2010; 5(2): 11–18.
10. Kovalenko V.N. Guide to Cardiology. Kyiv: Morion, 2008.
11. Kovalenko V.M., Sirenko Y.M., Radchenko G.D. The stress and the occurrence of hypertension: what is known. *Arterialnaya Hypertensiya* 2014; 36(4): 9–20.
12. Kondakov I.I. Anti-atherogenic effects of the drug cryopreserved fetoplacental complex in experimental atherosclerosis. *Problems of Cryobiology* 2005; 15(3): 435–439.
13. Kulovskyy V.I., Seroukhova A.P. Microcirculation disorders in patients with arterial hypertension. *Vestnik Vitebskogo Gosudarstvennogo Meditsinskogo Universiteta* 2008; 7(11): 1–11.
14. Kopica N.P., Belaya N.B., Titarenko N.V. Methods of diagnosis of myocardial fibrosis in patients with arterial hypertension. *Arterialnaya Hypertensiya* 2008; 2(2): 10–15.
15. Nasadyuk H.M. Cord blood stem cells in regenerative therapy of diseases of the cardiovascular system. *Zhinochyi Likar* 2009; 6: 12–15.
16. Sarkisov D.S., Petrov D.S. Microscopical technics. Moscow: Meditsina, 1996.
17. Shepitko V.I., Kozlova V.P., Yurchenko T.M. Morphological aspects of action of native and cryopreserved placenta transplants in experiment. *Transplantologiya* 2000; 1(1): 294–295.
18. Shepitko K.V., Gayewsky S.O., Potyazhenko M.M. Treatment of stable stenocardia using transplantation of cryopreserved fetoplacental tissue. *Problems of Cryobiology* 2001; (3): 138.
19. Sirenko Y.N. Diagnosis, prevention and treatment of arterial hypertension. *Liky Ukrainy* 2004; 79(3): 6–9.
20. Strukov A.I., Serov V.V. Pathological anatomy, Moscow: Meditsina, 1993.