

## Особенности развития некроза миокарда и ремоделирования сердца после перевязки коронарной артерии и локальной криодеструкции левого желудочка

UDC 616.127-002.4:612.17.085

N.A. CHIZH\*, A.G. BABAYEVA, I.V. SLETA, S.E. GALCHENKO, B.P. SANDOMIRSKY

## Peculiarities of Myocardial Necrosis Development and Heart Remodeling After Coronary Artery Ligation and Left Ventricle Local Cryodestruction

Изучали деструктивно-восстановительные процессы после повреждения миокарда, вызванного перевязкой левой коронарной артерии и локальной криодеструкцией левого желудочка. Показана зависимость глубины поражения миокарда от длительности криовоздействия. После перевязки коронарной артерии стенка левого желудочка повреждалась на всю глубину. Наиболее выраженные различия в состоянии микроциркуляторного русла в центральных и пограничных зонах повреждения миокарда после перевязки коронарной артерии и локальной криодеструкции выявлены на 14-е сутки. Восстановление показателей микроциркуляторного русла в периферических областях сердца отмечены в более ранние сроки после перевязки левой коронарной артерии по сравнению с криоповреждением. Гистологические исследования сердца показали, что в зоне повреждения миокарда развилась воспалительная реакция, которая сменилась процессом фиброза с формированием соединительнотканного рубца. При криохирургическом методе повреждения сердца образование соединительнотканного рубца происходило в более ранние сроки.

**Ключевые слова:** миокард, перевязка коронарной артерии, криодеструкция, некроз, ремоделирование.

Вивчали деструктивно-відновні процеси після пошкодження міокарда внаслідок перев'язки лівої коронарної артерії та локальної криодеструкції лівого шлуночка. Показана залежність глибини ураження міокарда від тривалості криовпливу. Після перев'язки коронарної артерії стінка лівого шлуночка пошкоджувалася на всю глибину. Найбільш виражені відмінності в стані мікроциркуляторного русла в центральних і пограничних зонах пошкодження міокарда після перев'язки коронарної артерії і локальної криодеструкції спостерігали на 14-у добу. Відновлення показників мікроциркуляторного русла в периферичних ділянках серця відзначали в більш ранні строки після перев'язки лівої коронарної артерії порівняно з криоповшкодженням. Гістологічні дослідження серця показали, що в зоні пошкодження міокарда розвивалася запальна реакція, яка змінювалася процесом фіброзу з формуванням сполучнотканинного рубця. При криохірургічному методі пошкодження серця утворення сполучнотканного рубця відбувалося в більш ранні строки.

**Ключові слова:** міокард, перев'язка коронарної артерії, криодеструкція, некроз, ремоделювання.

There were studied the destructive and reparative processes after myocardium injury, induced by left coronary artery ligation and local cryodestruction of left ventricle. The dependency of myocardium injury depth on cryoinjury duration was shown. After coronary artery ligation the left ventricle wall was damaged over the entire thickness. The most pronounced differences in microvasculature state in central and boundary areas of myocardium injury after both coronary artery ligation and local cryodestruction were revealed to the 14<sup>th</sup> day. The recovery of microvasculature indices in cardiac peripheral areas was noted in earlier terms after left coronary artery ligation if compared to the cryoinjury. Histological studies of the heart tissue revealed in the area of injured myocardium the development of inflammatory response, alternated with fibrosis process with connective tissue scar formation. Application of cryosurgical method for heart injury resulted in formation of the connective tissue scar in earlier terms.

**Key words:** myocardium, coronary artery ligation, cryodestruction, necrosis, remodeling.

Ежегодно в Украине регистрируется более 50 тысяч случаев первичного инфаркта миокарда (ИМ). Несмотря на разнообразие терапевтических и хирургических методов лечения этого заболевания, уровень смертности от ИМ остается достаточно высок (около 15 тысяч летальных исходов в год) [1].

More than 50 thousands cases of primary myocardial infarction (MI) are recorded in Ukraine annually. Despite a variety of therapeutic and surgical methods in treatment of this disease, MI mortality remains at quite a high level (about 15 thousands deaths annually) [1].

For a correct understanding of MI pathogenetic mechanisms, development of preventive and therapeutic

Институт проблем криобиологии и криомедицины  
НАН Украины, г. Харьков

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

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:  
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 372-74-35, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта:  
chiz.kol@mail.ru

\* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373 7435, fax: +380 57 373 3084, e-mail: chiz.kol@mail.ru

Для правильного понимания патогенетических механизмов ИМ, разработки методов профилактики и лечения необходимо его экспериментальное воспроизведение. В качестве моделей ИМ используют “коронарогенные” и “некоронарогенные” некрозы миокарда, которые вызывают как консервативными, так и хирургическими методами. К консервативным методам относят введение различных химических веществ, в том числе гормонов [4], к хирургическим – нарушение проходимости коронарных артерий (эмболизация или перевязка сосуда) и деструкция сердечной мышцы (электрокоагуляция или криодеструкция) [2, 3, 5–7].

Цель работы – изучение деструктивно-восстановительных процессов после повреждения миокарда, вызванного перевязкой левой коронарной артерии и локальной криодеструкцией левого желудочка.

### Материалы и методы

Эксперименты проводили 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, которые используются для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1986).

Работа проведена на беспородных крысах-самцах массой 180–250 г. Оперативные вмешательства проводили под эфирным масочным наркозом на спонтанном дыхании.

Ишемический некроз миокарда (ИМ) моделировали путем перевязки лигатурой левой коронарной артерии. Для последующей быстрой герметизации грудной полости накладывали провизорные швы на 4, 5 и 6-е ребро слева. После Т-образного разреза с пересечением 5-го ребра выводили сердце в операционную рану и перевязывали нисходящую ветвь левой коронарной артерии на границе верхней и средней трети проленовой нитью № 6.0 (рис. 1, А).

Криовоздействие на стенку левого желудочка производили азотным криоинструментом с диаметром аппликатора 3 мм при температуре рабочей поверхности аппликатора  $-196^{\circ}\text{C}$ . Оперативный доступ осуществляли в 4–5-м межреберье слева по среднеключичной линии с предварительным накладыванием провизорных швов на ребра, не выводя сердце в операционную рану (рис. 1, В).

В обоих случаях для профилактики закрытого пневмоторакса при восстановлении целостности грудной клетки шприцем откачивали воздух.

Животные были разделены на 4 опытные группы по 35 крыс в каждой: 1 (контроль) – крысы после пробной торакотомии; 2 – животные после перевязки левой коронарной артерии; 3 и 4 – крысы после

techniques, its experimental simulation is indispensable. As MI models there are used the “coronarogenic” and “non-coronarogenic” myocardial necroses, induced by both conservative and surgical methods. Conservative methods comprise the introduction of various chemical substances, including hormones [4], the surgical ones comprise the interruption in coronary artery patency (vascular embolization or ligation) and cardiac muscle destruction (electric coagulation and cryodestruction) [2, 3, 5–7].

The research was aimed to study the destructive and reparative processes after myocardium injury, induced by left coronary artery ligation and local cryodestruction of left ventricle.

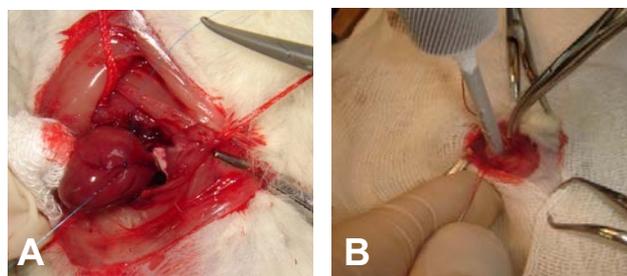
### Materials and methods

The experiments were done according to the General Principles of Experiments in Animals, approved by the 3<sup>rd</sup> National Congress in Bioethics (Kiev, 2007) and agreed to the statements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

The research was done in breadless male rats of 180–250 g weight. Surgeries were carried-out under ether mask narcosis with spontaneous respiration.

Ischemic myocardial necrosis (MN) was modeled via left coronary artery ligation. For the following rapid sealing of thoracic cavity we put the retention sutures on the 4<sup>th</sup>, 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> ribs leftwards. After T type incision with crossing 5<sup>th</sup> rib the heart was exteriorized through the surgical wound and a descending branch of left coronary artery was ligated with prolene thread N6 at the boundary of upper and middle third (Fig. 1A).

Cryoexposure on left ventricle wall was performed using a nitrogen cryogenic device with 3 mm applicator and the operating temperature of applicator surface of  $-196^{\circ}\text{C}$ . Surgery was done through the 4<sup>th</sup>–5<sup>th</sup> intercostal space leftwards on midclavicular line with preliminary retention suturing on ribs without exteriorizing heart through the surgical wound (Fig. 1B).



**Рис. 1.** Моделирование некроза миокарда у крыс: А – перевязка левой коронарной артерии; В – криодеструкция миокарда левого желудочка.

**Fig. 1.** Myocardial necrosis modeling in rats: A – left coronary artery ligation; B – cryodestruction of left ventricle myocardium.

криодеструкции ткани сердца в течение 15 и 30 с соответственно. Группу нормы составили 10 животных.

Функциональную способность миокарда исследовали электрокардиографически. Электрокардиограммы (ЭКГ) регистрировали и анализировали с использованием аппаратно-программного комплекса "Полиспектр-8/В" ("Нейрософт", Россия).

Прижизненную микроскопию сердца проводили с помощью контактного микроскопа ЛЮМАМ К-1 ("ЛОМО", Россия) в режиме люминесценции после внутривенного введения уранина. Диаметр капилляров и площадь сосудистого русла миокарда рассчитывали с помощью компьютерной программы Bio Vision 4.0. Морфологическую картину миокарда оценивали по гистологическим срезам, окрашенным гематоксилином и эозином.

Результаты статистически обрабатывали параметрическим методом Стьюдента-Фишера с использованием t-критерия и непараметрическим методом MANOVA. Количественные данные представлены в средних величинах и средних квадратичных отклонениях. Показатели рассчитывали с помощью программ SPSS 17.0 для Windows.

## Результаты и обсуждение

Моделирование ишемического некроза миокарда путем перевязки левой коронарной артерии представляет собой травматическую операцию. В наших экспериментах интраоперационная смертность животных достигала 30%. В большинстве случаев причиной летальных исходов был открытый пневмоторакс.

При криодеструкции миокарда не требуется большого разреза грудной клетки (оперативный доступ осуществляли только по межреберному промежутку) и выведения сердца в операционную рану. Время оперативного вмешательства при этом сокращается, чем обусловлена 100%-я выживаемость животных в этих группах.

Исследование ЭКГ у крыс из группы нормы и крыс перед операцией показало, что у них был правильный синусовый ритм, отсутствовали нарушения проводимости и изменения в комплексе QRS-T (рис. 2, А).

На 1-е сутки после операции у животных группы 1 (контроль) наблюдали увеличение амплитуды зубца Т во II отведении относительно нормы. Ритм синусовый. Во все остальные сроки наблюдения грубых нарушений в ЭКГ животных этой группы выявлено не было (рис. 2, В).

На ЭКГ животных в 1-е сутки после перевязки левой коронарной артерии (группа 2) и после 30-секундного криовоздействия на сердце (группа 4) выявили наличие зубца Q с элевацией сегмента ST в отведениях I и avL, что свидетельствовало о

In both cases the air was evacuated with syringe to prevent a closed pneumothorax during thoracic reconstructing.

The animals were divided into 4 experimental groups of 35 rats each: group 1 (control) were rats after trial thoracotomy; group 2 comprised the animals after left coronary artery ligation; in groups 3 and 4 were rats after heart tissue cryodestruction within 15 and 30 sec, correspondingly. The norm group consisted of 10 animals.

Function of myocardium was studied using electrocardiography. Electrocardiograms (ECGs) were recorded and analyzed with hardware-software complex Polyspectrum-8/V (Neurosoft, Russia).

Vital microscopy of the heart was performed using a contact microscope LUMAM K-1 (LOMO, Russia) in luminescent mode after intravenous introduction of uranine. The capillary diameter and the area of myocardial vascular bed were calculated with BioVision 4.0 software. Morphology of myocardium was assessed in histological sections, stained with hematoxylin and eosin.

The results were statistically processed with both Student-Fisher's t-test and MANOVA non-parametric method. Quantitative data are presented as means and standard deviations. The indices were calculated using the SPSS 17.0 for Windows.

## Results and discussion

The modeling of ischemic myocardial necrosis via left coronary artery ligation is a traumatic operation. In our experiments the intraoperative mortality in animals reached 30%. In most cases the lethal outcomes resulted from an open pneumothorax.

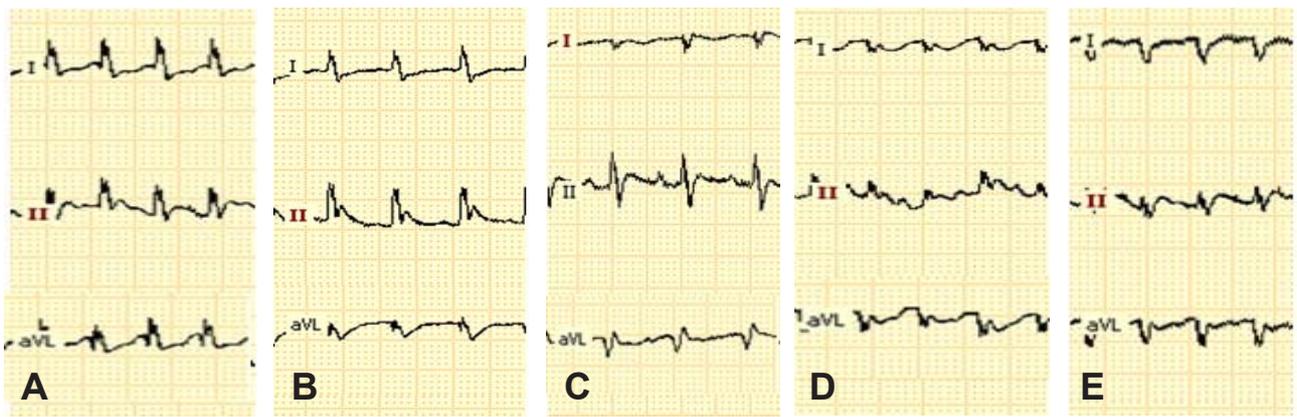
Myocardial cryodestruction does not require a large incision of chest (an operative access was done only by intercostals space) and heart exteriorizing through a surgical wound. Herewith the surgery time is reduced, that stipulated 100% animal survival in these groups.

ECGs study in rats from the norm group and animals before surgery demonstrated a regular sinus rhythm, and no disorders in conductivity and no changes in QRS-T complex (Fig. 2A).

To the 1<sup>st</sup> day after surgery in animals of group 1 (control) we observed an increased T wave amplitude in II lead in regard to the norm. The rhythm was sinus. No rough disorders in ECGs of animals in this group were revealed in other observation terms (Fig. 2B).

ECGs of animals in 1 day after left coronary artery ligation (group 2) and after 30 sec of cryoexposure of the heart tissue (group 4) comprised the Q wave with ST segment elevation in I and avL leads, testifying to the formation of anterolateral transmural MN in animals (Fig. 2C and E, Table 1).

After a 15 sec of cryoexposure onto the heart tissue we noted a decreased R wave amplitude, appear-



**Рис. 2.** Электрокардиограммы крыс на 1-е сутки после операции: А – норма; В – пробная торакотомия (контроль); С – перевязка левой коронарной артерии; D – криодеструкция 15 с; Е – криодеструкция 30 с.

**Fig. 2.** Electrocardiograms of rats to the 1<sup>st</sup> day after surgery: А – norm; В – trial thoracotomy (control); С – left coronary artery ligation; D – cryodestruction 15 sec; Е – cryodestruction 30 sec.

формировании у животных переднебокового трансмурального НМ (рис. 2, С, Е; табл.1).

После 15-секундного криовоздействия на сердце отмечали снижение амплитуды зубцов R, появление зубца  $q \leq 1/4 R$  и отрицательных зубцов T в I и avL отведениях. Зарегистрированные изменения на ЭКГ указывали на наличие у животных этой группы субэпикардального НМ (рис. 2, D).

Электрокардиографические изменения в опытных группах, отмеченные через сутки после операций, сохранялись и на 7-е сутки наблюдений. Однако у животных групп 2 и 4 элевация сегмента ST сменялась отрицательным зубцом T при сохранении глубокого зубца Q. Других изменений в ЭКГ во всех группах на протяжении 30-ти суток не наблюдалось (табл. 1).

Таким образом, регистрация зубца Q на ЭКГ у животных после перевязки коронарной артерии свидетельствует, что данный метод моделирования НМ приводит к формированию некроза всей толщи стенки левого желудочка. Вариация длительности локального криовоздействия на сердце дает возможность получать различную глубину поражения миокарда от субэпикардального до трансмурального некроза, что подтверждается наличием зубцов q и Q после 15- и 30-секундной криодеструкции левого желудочка.

Исследование микрогемодиализаторного русла путем прижизненной контактной люминесцентной микроскопии позволило наблюдать кровообращение на поверхности сердца. В литературе нами не было найдено данных о таком исследовании. Появление флуоресцирующей метки (урана) регистрировали на 2-й минуте после ее внутривенного введения в виде желто-зеленого свечения интактной поверхности сердца. В зоне повреждения люминесценция отсутствовала (рис. 3).

range of  $q \leq 1/4 R$  wave and negative T waves in I and avL leads. The changes recorded in ECGs indicated to the presence of subepicardial MN in this animal group (Fig. 2D).

Electrocardiographic changes in experimental groups, noted in a day after surgeries were kept even to the 7<sup>th</sup> observation day. However, in animals of groups 2 and 4 the ST segment elevation was alternated with a negative T wave, while a deep Q wave was kept. No other changes in ECGs in all the groups within 30 days were observed (Table 1).

Thus, the Q wave revealing in ECGs of animals after coronary artery ligation confirms this method for MN modeling as resulting in necrosis formation through the whole thickness of left ventricle wall. Varying the duration of local cryoexposure onto the heart tissue allows to obtain a different depth of myocardium injury from a subepicardial necrosis to transmural one, that is confirmed by the q and Q waves presence after 15 and 30 sec cryodestruction of left ventricle.

The study of microhemocirculatory bed using the vital contact luminescent microscopy enabled to observe blood circulation in the heart surface. We did not manage to find any data on such a trial in the literature. The appearance of fluorescent label (uranine) was recorded to the 2<sup>nd</sup> minute after its intravenous introduction as yellow-green fluorescence of intact heart surface. No luminescence was present in injured area (Fig. 3).

Microvessels of heart surface represented the system of capillaries, formed as a result of afferent arterial vessels divergence. In the norm the myocardial capillaries were located along muscle fibers. Blood flow in capillaries was rapid, streaming and homogenous.

As a result of coronary artery ligation and heart local cryodestruction there were formed the central and boundary injury areas. In the central ones we ob-

**Таблица 1.** Параметры ЭКГ крыс после оперативного вмешательства (в отведениях I и avL)

**Table 1.** ECG parameters in rats after surgery (in I and avL leads)

Параметры Parameters	Период наблюдения, сутки Observation period, days	Группы Groups			
		Пробная торакотомия (контроль) Trial thoracotomy (control)	Перевязка коронарной артерии Coronary artery ligation	Криодеструкция 15 с Cryodestruction 15 sec	Криодеструкция 30 с Cryodestruction 30 sec
Наличие зубца q или Q Presence of q or Q wave	1	q < 1/4 R	Q 1/4 R	q ≤ 1/4 R	Q 1/4 R
	7	q < 1/4 R	Q 1/4 R	q ≤ 1/4 R	Q 1/4 R
	14	q < 1/4 R	Q 1/4 R	q ≤ 1/4 R	Q 1/4 R
	30	q < 1/4 R	Q 1/4 R	q ≤ 1/4 R	Q 1/4 R
Сегмент ST и зубец T ST segment and T wave	1	T ≤ 1/2 R (II отведение) (II lead)	Элевация ST ST elevation	Отрицательный T Negative T	Элевация ST ST elevation
	7	T ≤ 1/3 R	Отрицательный T Negative T	Отрицательный T Negative T	Отрицательный T Negative T
	14	T ≤ 1/3 R	Отрицательный T Negative T	Отрицательный T Negative T	Отрицательный T Negative T
	30	T ≤ 1/3 R	Отрицательный T Negative T	Отрицательный T Negative T	Отрицательный T Negative T

Микрососуды поверхности сердца представляют собой систему капилляров, которые образуются в результате деления приносящих артериальных сосудов. В норме капилляры миокарда проходят вдоль мышечных волокон параллельно друг другу. Кровоток в капиллярах быстрый струйный и гомогенный.

В результате перевязки коронарной артерии и локальной криодеструкции сердца образовались центральные и пограничные зоны повреждения. В центральных зонах повреждения наблюдали разрушение микроструктуры органа, в микрососудах – гемостаз и выход форменных элементов крови за пределы капилляров.

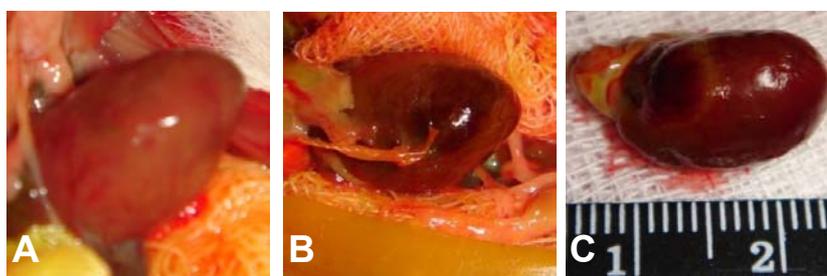
Макроскопически через 7 суток после операции на сердце размеры зон повреждения у всех групп животных не отличались от размеров, зафиксированных через 1 ч наблюдений. Биомикроскопически в этих зонах установлено нарушение структурной организации микроциркуляторного русла сердца, которое свидетельствовало о развитии некроза миокарда.

Более выраженные различия между зонами криоповреждения и ишемического некроза наблюдали на 14-е сутки после операции. В центральной зоне некроза миокарда после перевязки коро-

сerved the destruction in organ microstructure, in microvessels we found hemostasis and blood cell release out of the capillaries.

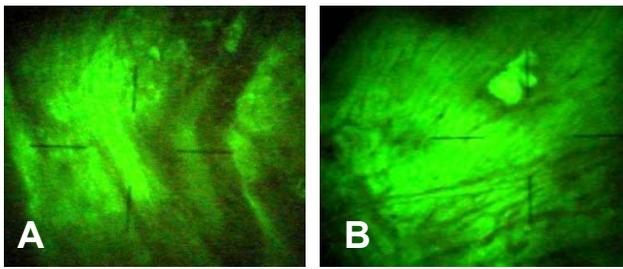
Macroscopically in 7 days after heart surgery the size of injured areas in all the animal groups did not differ from that, recorded in 1 hour of observation. The disorders in a structural organization of cardiac microvasculature, testifying to myocardial necrosis development were biomicroscopically established in these areas.

More pronounced differences between the areas of cryoinjury and those of ischemic necrosis were observed to the 14<sup>th</sup> day after the procedure. In a central area of myocardial necrosis after coronary artery ligation the microhemocirculation was still absent. In a boundary area the most myocardial vessels preserved



**Рис. 3.** Сердце крысы после внутривенного введения уранина (1 сутки после оперативного вмешательства): А – норма; В – перевязка коронарной артерии; С – криодеструкция 15 с.

**Fig. 3.** Rat heart after intravenous introduction of uranine (1<sup>st</sup> day after surgery): А – norm; В – coronary artery ligation; С – cryodestruction 15 sec.



**Рис. 4.** Микроциркуляторное русло сердца крыс на 14-е сутки после перевязки коронарной артерии: А – центральная зона; В – переходная зона. Об.  $\times 10$ , ок.  $\times 7$ .

**Fig. 4.** Rat heart microvasculature to the 14<sup>th</sup> day after coronary artery ligation: А – central area; В – transition area. Objective  $\times 10$ , ocular  $\times 7$ .

нарной артерии микрогемоциркуляция по-прежнему отсутствовала. В пограничной зоне большая часть микрососудов миокарда сохраняла обычную архитектуру, хотя их диаметр был меньше, чем в норме (рис. 4). В зоне крионекроза отмечали единичные сосуды небольшого диаметра, образующие нетипичный для сердца рисунок. По периметру зона крионекроза была окружена крупными микрососудами (рис. 5).

Структурные изменения в сердечной мышце при НМ распространялись дальше зоны нарушенного коронарного кровотока и зоны криовоздействия. На периферических участках миокарда в области правого желудочка диаметр капилляров уменьшался по сравнению с нормой, а на 14-е сутки у животных после перевязки коронарной артерии диаметр микрососудов и относительная площадь сосудистого русла возвращались к исходным значениям (табл. 2).

Таким образом, в структуре микрососудистого русла сердечной мышцы в очаге повреждения через 1 ч как после перевязки коронарной артерии, так и после локальной криодеструкции сердца отмечены однотипные изменения с выраженными явлениями деструкции миокарда. На 14-е сутки различия микроциркуляторного русла в центральных и пограничных зонах повреждения миокарда после перевязки коронарной артерии и локальной криодеструкции были максимальными. Более раннее восстановление показателей микроциркуляторного русла в периферических областях сердца отмечали после перевязки левой коронарной артерии.

Область и степень деструктивно-воспалительных изменений в миокарде при моделировании различными способами НМ также определялись гистологически. Установлено, что через 1 ч после перевязки коронарной артерии в сердечной мышце развивались дистрофические изменения мышечных волокон и их некроз. После воздействия на

their usual architectonics, although their diameter was smaller than normal ones (Fig. 4). In cryonecrotic area we noted the single vessels of small diameter, forming a pattern atypical for the heart. The cryonecrotic area was surrounded with large microvessels (Fig. 5).

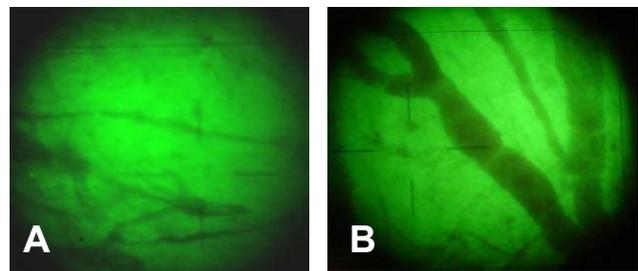
Structural changes in a cardiac muscle under MN were spread beyond the area of disordered coronary blood flow and zone of cryoexposure. In myocardium peripheral sites of right ventricle area the capillary diameter reduced as compared to the norm, but to the 14<sup>th</sup> day the microvessel diameter and a relative area of vascular bed returned to their initial values in animals after coronary artery ligation (Table 2).

Thus, we observed the similar changes with pronounced signs of myocardial destruction in cardiac muscle microvasculature structure in the lesion in 1 hr after both coronary artery ligation and local cryodestruction. To the 14<sup>th</sup> day the differences in microvasculature in central and boundary areas of myocardium injury after coronary artery ligation and local cryodestruction were the largest. Earlier recovery of microvasculature indices in heart peripheral areas were noted after left coronary artery ligation.

The area and extent of destructive and inflammatory changes in myocardium under conditions of experimental MN obtained by both ways were determined histologically as well. Dystrophic changes in muscle fibers and their necrosis were established to be developed in cardiac muscle in 1 hr after coronary artery ligation. The area of reactive inflammation with leukocyte infiltration in the lesion was formed right after low temperature exposure on the heart tissue.

To the 7<sup>th</sup> day after coronary artery ligation the area of inflammatory process was spread over the entire thickness of left ventricle myocardium, a necrotized tissue underwent an active resorption with macrophages.

After a 30 sec cryoeffect the foci of destruction and those of inflammatory reaction were characteri-



**Рис. 5.** Микроциркуляторное русло сердца крыс на 14-е сутки после криодеструкции миокарда в течение 15 с: А – центральная зона; В – переходная зона. Об.  $\times 10$ , ок.  $\times 7$ .

**Fig. 5.** Rat heart microvasculature to the 14<sup>th</sup> day after 15 seconds of myocardium cryodestruction: А – central area; В – transition area. Objective  $\times 10$ , ocular  $\times 7$ .

сердце низкими температурами сразу формировалась зона реактивного воспаления с лейкоцитарной инфильтрацией очага повреждения.

На 7-е сутки после перевязки коронарной артерии зона воспалительного процесса распространялась на всю толщину миокарда левого желудочка, некротизированная ткань подвергалась активной резорбции макрофагами.

После 30-секундного криовоздействия очаги деструкции и воспалительной реакции характеризовались разрушением пучков сердечной поперечно-полосатой мышцы, дилатацией и стазом сосудов, скоплением нейтрофилов. После 15-секундного криовоздействия при вовлечении в воспалительный процесс более поверхностных слоев миокарда формировалась четкая зона некроза, отделенная демаркационной линией.

На 14-е сутки в зоне криовоздействия воспалительная реакция сменялась процессом фиброза с формированием рыхлой соединительной ткани (рис. 6). На месте погибших кардиомиоцитов формировался соединительнотканый каркас с большим количеством фибробластов.

После перевязки коронарной артерии к этому сроку наблюдения отмечали лишь небольшие очаги коллагенообразования с ярко выраженной воспалительной реакцией. Процесс формирования соединительнотканного рубца отмечали и через 30 суток после операций. Имели место признаки про-

**Таблица 2.** Показатели микроциркуляторного русла сердца крыс в периферической зоне на 14-е сутки после оперативного вмешательства  
**Table 2.** Microvasculature indices in rat heart in peripheral area to the 14<sup>th</sup> day after surgery

Группы Groups	Диаметр капилляров, мкм Capillary diameter, μm			Относительная площадь сосудистого русла Relative area of vascular bed		
	1 ч 1 hr	7 суток 7 days	14 суток 14 days	1 ч 1 hr	7 суток 7 days	14 суток 14 days
Перевязка коронарной артерии Coronary artery ligation	7,04 ± 0,32 <sup>1</sup>	6,29 ± 0,12 <sup>1</sup>	8,01 ± 0,42	0,41 ± 0,11	0,44 ± 0,09	0,48 ± 0,11
Криодеструкция 15 с Cryodestruction 15 sec	5,37 ± 0,28 <sup>1</sup>	6,34 ± 0,18 <sup>1</sup>	6,44 ± 0,15 <sup>1</sup>	0,32 ± 0,10	0,36 ± 0,14	0,39 ± 0,12
Норма Norm	8,49 ± 0,29			0,49 ± 0,13		

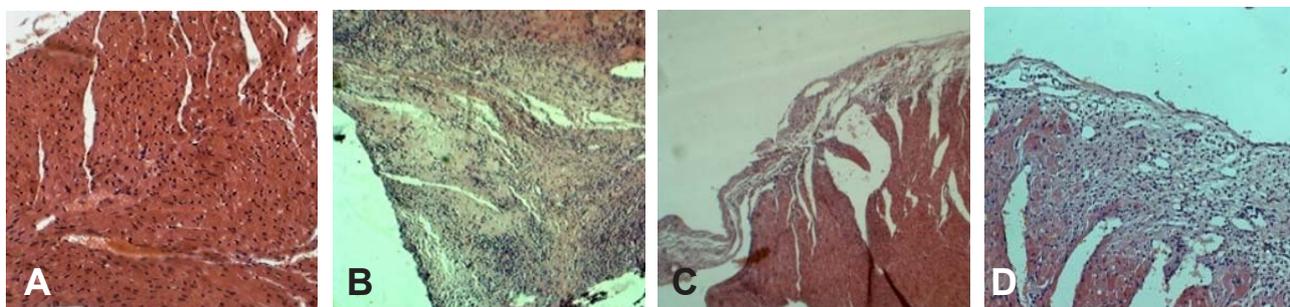
**Примечание:** <sup>1</sup> – достоверно относительно нормы, p < 0,05.

**Notes:** <sup>1</sup> – statistical significance with respect to the norm, p < 0.05.

zed with destruction of cardiac striated muscle bundles, dilatation and stasis of vessels, accumulation of neutrophiles. Distinct necrotic area separated with demarcation line was formed after a 15 seconds of cryoexposure with involvement into inflammatory process of more superficial myocardium layers.

To the 14<sup>th</sup> day in the area of cryoexposure the inflammatory reaction was alternated with fibrosis process accompanied by formation of porous connective tissue (Fig. 6). The connective tissue scaffold with a bulk of fibroblasts was formed instead of dead cardiomyocytes.

After coronary artery ligation only small foci of collagen formation with pronounced inflammatory reaction were noted to this observation term. The process of connective tissue scar formation was noted even in 30 days after surgery. There were the signs of progressing fibrosis with connective tissue band formation.



**Рис. 6.** Ткани сердца крысы через 14 суток после операции: А – норма; В – перевязка коронарной артерии; С – криодеструкция 15 с; D – криодеструкция 30 с. Окраска гематоксилином и эозином. Об. ×10, ок. ×10.

**Fig. 6.** Rat heart tissue in 14 days after surgery: A – norm; B – coronary artery ligation; C – cryodestruction 15 sec; D – cryodestruction 30 sec. Staining with hematoxylin and eosin. Objective ×10, ocular ×7.

грессирующего фиброза с формированием соединительнотканых тяжей.

Таким образом, по данным гистологических исследований при некрозе миокарда, вызванного низкими температурами, формировалась зона реактивного воспаления без фазы ишемического повреждения. Организация соединительнотканного рубца после локальной криодеструкции сердца происходила на 7 суток раньше, чем после перевязки коронарной артерии.

### Выводы

Криохирургический метод позволяет получать разную глубину повреждения сердечной мышцы с формированием как субэпикардального, так и трансмурального некроза миокарда.

Проведенное исследование микрогемодинамики коронарного русла сердца показало выраженные различия гемодинамики и микроструктуры в центральных и пограничных зонах повреждения миокарда на 14-е сутки при изученных способах моделирования некроза сердечной мышцы. Показатели микроциркуляторного русла в периферических областях сердца после перевязки левой коронарной артерии восстанавливались быстрее по сравнению с криоповреждением сердца.

После применения криохирургического метода зона некроза и соединительнотканного рубца формируются в более ранние сроки по сравнению с лигированием коронарной артерии.

Локальная криодеструкция левого желудочка наряду с "классическим" способом формирования некроза миокарда (перевязка коронарной артерии) дает возможность воспроизвести субэпикардальный и трансмуральный некроз сердечной мышцы, поэтому может использоваться в качестве модели для доклинических испытаний препаратов кардиотропного действия и исследований, направленных на изучение ремоделирования сердца с использованием различных лечебных подходов, в том числе тканевой и клеточной терапии, при которых важна глубина поражения миокарда.

*Выражаем благодарность директору Харьковского тубного завода Л.М. Фильштинскому за оказание спонсорской помощи в приобретении электрокардиографа.*

### Литература

1. Бабушкина А.В. Инфаркт миокарда: от фундаментальных исследований – к практическим достижениям (по материалам X Национального конгресса кардиологов Украины) // Украинский медицинский часопис.– 2009.– Т. 53, №5.– С. 10–13.

Thus, according to the data of histological studies under myocardial necrosis induced by low temperatures the area of reactive inflammation with no phase of ischemic damage was formed. The organization of connective tissue scar after local heart cryodestruction occurred 7 days earlier, than after coronary artery ligation.

### Conclusions

Cryosurgical method enables to obtain a different depth of injury in cardiac muscle with formation of both subepicardial and transmural myocardium necroses.

The performed research of cardiac microhemodynamic bed demonstrated the manifested differences in hemodynamics and microstructure in central and boundary areas of myocardium injury to the 14 day under studied ways of cardiac muscle necrosis modeling. The microvasculature indices in peripheral areas of heart after left coronary artery ligation recovered more rapidly than those after heart cryoinjury.

After applying cryosurgical method the necrotic area and connective tissue scar zone were formed earlier as compared to the case of coronary artery ligation.

Local cryodestruction in left ventricle along with the "classical" method for myocardium necrosis formation (coronary artery ligation) makes it possible to reproduce both subepicardial and transmural necroses of cardiac muscle, so it may be used as a model for preclinical trials of drugs with cardiotropic action and in research, aimed to study cardiac remodeling using different therapeutic approaches, including tissue and cell therapy, when of importance is the depth of myocardium injury.

*We acknowledge Mr. Filshinsky L.M., Director of Kharkov Tube Plant for sponsored purchasing of electrocardiograph.*

### References

1. Babushkina A.V. Myocardium infarction: from fundamental research to practical achievements (compendium of the X National Congress of Cardiologists of Ukraine) // Ukrainian Medical Journal.– 2009.– Vol. 53, N5.– P. 10–13.
2. Davydenko V.V., Matyukov A.A., Tsupkina N.V. et al. Effect of autotransplantation of different cells of bone marrow on functional state of rabbit's myocardium after infarction // Cellular Transplantation and Tissue Engineering.– 2007.– Vol. 11, N2.– P. 52–61.
3. Dremina N.N., Shurygina I.A., Lushnikova E.L. et al. Effect of endothelial growth factor on postinfarction remodeling of rat's myocardium // Bull. Exp. Biol. Med.– 2009.– Vol. 148, N9.– P. 330–336.
4. Chekman I.S., Kolesnik Yu.M., Mazur I.A. et al. Some aspects of cardioprotective effect of potential antianginal preparation "MT" under modeling acute myocardial ischemia // Zaporozhskiy Meditsinskiy Zhurnal.– 2010.– Vol. 12, N5.– P. 198–202.

2. *Давыденко В.В., Матюков А.А., Цупкина Н.В. и др.* Влияние аутотрансплантации различных клеток костного мозга на функциональное состояние миокарда кролика после инфаркта // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.– 2007.– Т. 11, №2.– С. 52–61.
3. *Дреммина Н.Н., Шуригина И.А., Лушникова Е.Л. и др.* Влияние эндотелиального фактора роста на постинфарктное ремоделирование миокарда крыс // Бюл. эксперим. биологии и медицины.– 2009.– Т. 148, №9.– С. 330–336.
4. *Чекман И.С., Колесник Ю.М., Мазур И.А. и др.* Некоторые аспекты кардиопротективного действия потенциального антиангинального препарата "МТ" при моделировании острой ишемии миокарда // Запорожский медицинский журнал.– 2010.– Т. 12, №5.– С. 198–202.
5. *van den Bos E.J., Mees B.E., de Waard M.C. et al.* A novel model of cryoinjury-induced myocardial infarction in the mouse: a comparison with coronary artery ligation // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.– 2005.– Vol. 289, N3.– P. H1291–1300.
6. *Zornoff L.A., Paiva S.A., Minicucci M.F., Spadaro J.* Experimental myocardium infarction in rats: analysis of the model // Arq. Bras. Cardiol.– 2009.– Vol. 93, N4.– P. 434–440.
7. *Robey T.E., Murry C.E.* Absence of regeneration in the MRL/MpJ mouse heart following infarction or cryoinjury // Cardiovasc. Pathol.– 2008.– Vol. 17, N1.– P. 6–13.

*Accepted 03.08.2011*

*Поступила 03.08.2011  
Рецензент В.В. Волина*