

УДК: 611.127:616-005.4:57.083.3]-08

DOI: <https://doi.org/10.25040/aml2020.01.011>

## ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ СЕРЦЕВОГО М'ЯЗА ЩУРА ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ІШЕМІЇ

**Надрага Б.О., Струс Х.І., Яценко А.М., Луцик О.Д.**

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького  
Кафедра гістології, цитології та ембріології (зав. - професор О.Д. Луцик)

### Реферат

Ішемічна хвороба серця найчастіше обумовлює розвиток серцевої недостатності. Поряд із тим, морфологічні та імуногістохімічні зміни у міокарді на ранніх етапах розвитку ішемічної хвороби серця залишаються маловивченими.

**Мета** - дослідити особливості локалізації імуногістохімічних маркерів у структурних компонентах міокарда на ранніх етапах розвитку його експериментальної ішемії

**Матеріал і методи.** Досліди проводили на 20 статевозрілих щурах-самцях лінії Вістар масою 180-220 г (5 контрольних і 15 дослідних). Ішемію міокарда викликали підшкірним введенням 0,1% розчину адреналіну (епінефрину гідротартрату) в дозі 0,2 мл на 100 г маси тіла. Через 48 годин після введення адреналіну щурів піддавали евтаназії шляхом передозування етилового ефіру. Гістологічний матеріал (проби серцевого м'яза з ділянки передсердь і шлуночків) фіксували у 4 % нейтральному формаліні і заливали у парафін. Імуногістохімічні дослідження проводили з використанням первинних моноклональних антитіл до Ki-67, VEGF, CD34 та поліклональної Casp3. Продукти реакції ідентифікували з використанням в якості хромогену 3,3'-діамінобензидину тетрагідрохлориду.

**Результати й обговорення.** Проведені імуногістохімічні дослідження міокарда за умов гострої ішемії продемонстрували явища апоптозу з руйнуванням міофібрил і накопиченням у цитоплазмі продуктів їхньої деградації у формі імунореактивної зернистості. Порушення скоротливої функції кардіоміоцитів поєднувалося зі змінами морфології та імунореактивності ендотелію судин мікроциркуляторного русла, появою у периваскулярному просторі VEGF-позитивних макрофагів. Мастоцити як в умовах контролю, так і досліду демонстрували Casp3/Ki-67-імунореактивність.

**Висновки.** За умов гострої ішемії міокарда в експерименті, з використанням методів імуногістохімії, на тлі модифікації імунореактивності ендотеліоцитів мікроциркуляторного русла виявлена дрібнозерниста дистрофія міофібрил кардіоміоцитів, що веде до порушення їх функціональної активності.

**Ключові слова:** щури, гостра експериментальна ішемія міокарда, імуногістохімія

NADRAGA B.A., STRUS Kh.I., YASHCHENKO A.M., LUTSYK A.D.

The Danylo Halytsky National Medical University in Lviv

Ischemic heart disease is currently the most common cause of heart failure development. Nevertheless, morphological and immunohistochemical changes in myocardium in early stages of ischemic heart disease require further studies.

**The aim** was to study redistribution of immunohistochemical markers in structural components of myocardium in early stages of ischemia development.

**Material and methods.** The study was carried out on 20 adult male Wistar rats weighing 180-220 g (5 control and 15 experimental animals). Myocardial ischemia was induced by subcutaneous administration of a 0.1% solution of adrenaline (epinephrine hydrotartrate) at a dose of 0.2 ml per 100 g of body weight. Forty-eight hours after the adrenaline injection, the rats were euthanized by ethyl ether overdose. Samples of the heart muscle excised from the atria and the ventricles were fixed in 4% neutral formalin and embedded in paraffin. Immunohistochemical studies were performed using primary monoclonal antibodies to Ki-67, VEGF, CD34, and polyclonal Casp3. The reaction products were visualized using 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride as chromogen.

**Results and Discussion.** Acute ischemia induced apoptotic processes in the cardiomyocytes accompanied by destruction of myofibrils with the accumulation of damaged myofibrillary proteins in the form of cytoplasmic granularity; these changes apparently led to impaired cardiomyocyte contractility. The above changes were combined with increased immunoreactivity of vascular bed endothelium, and emergence of VEGF-positive macrophages in perivascular spaces. The mast cells in both groups of rats showed Casp3/Ki-67-reactivity.

**Conclusion.** The rat heart myocardium, subjected to experimental adrenalin-induced ischemia, demonstrated significant changes in microcirculatory bed endothelial cells immunoreactivity, which was accompanied by fine-grained dystrophy of contractile cardiomyocytes myofibrillary content, both signs including impairments of these cells functional activities.

**Key words:** rats, myocardial acute experimental ischemia, immunohistochemistry

### Abstract

IMMUNOHISTOCHEMICAL INVESTIGATION OF RAT CARDIAC MUSCLE IN EXPERIMENTAL ISCHEMIA

### Вступ

За даними ВООЗ причиною виникнення сер-

цевої недостатності найчастіше є ішемічна хвороба серця (ІХС) [3]. Щороку від ІХС помирає більш як сім мільйонів людей, що у світовому вимірі складає 12,8% всіх смертей. У Європі від інфаркту міокарда помирає кожний шостий чоловік і кожна сьома жінка [12, 13]. В Україні за даними МОЗ серцево-судинна патологія посідає перше місце в структурі захворюваності, зумовлюючи майже дві третини всіх випадків смерті та третину причин інвалідизації [10].

Відповідно до даних Європейського кардіологічного товариства (ESC), щонайменше 15 мільйонів населення континенту страждає на серцеву недостатність. В останні роки при вивченні патогенетичних механізмів розвитку гострого інфаркту міокарда все більшу увагу дослідників привертає проблема ендотеліальної дисфункції [5]. Разом із тим, маловивченими залишаються морфологічні та імуногістохімічні прояви змін структурних компонентів міокарда на ранніх етапах розвитку ішемічної хвороби серця.

Мета роботи - дослідити особливості експресії імуногістохімічних маркерів міокарда за умов експериментальної ішемії на ранніх етапах її розвитку.

## Матеріал і методи

Досліди проводили на 20 статевозрілих щурах-самцях лінії Вістар масою 180-220 г (5 контрольних і 15 дослідних). Тварин утримували на стандартному раціоні харчування віварію, відповідно до санітарно-гігієнічних вимог. Усі експериментальні дослідження проводили згідно етичних принципів експериментів на тваринах (Україна, 2001), що узгоджується з положеннями "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються з експериментальними цілями та іншою науковою метою" (Страсбург, 1986), Закону України № 3447-IV "Про захист тварин від жорстокого поводження" від 21.02.2006. Комісією з питань біоетики Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького порушень морально-етичних норм при проведенні науко-

во-дослідної роботи не виявлено (протокол №2 від 15.02.2016).

Ішемію міокарда викликали підшкірним введенням 0,1% розчину адреналіну (епінефрину гідротартрату) в дозі 0,2 мл на 100 г маси тіла. Через 48 годин після введення адреналіну щурів піддавали евтаназії шляхом передозування етилового ефіру. Для моніторингу розвитку інфаркту/ішемії міокарда у щурів нами проведене визначення рівня активностей аспартатамінотрансферази (АСТ), лактатдегідрогенази (ЛДГ) та креатинфосфокінази МВ-фракції (КФК-МВ) в сироватці крові контрольних та експериментальних тварин [4]. Дослідження виконувались на базі медичної лабораторії ПП "ДіаВітаМед", м.Львів, (ліцензія МОЗ АЕ № 638768 від 11.06.2015). Гістологічний матеріал (проби серцевого м'яза з ділянки передсердь і шлуночків) фіксували у 4% нейтральному формаліні і заливали у парафін. Оглядові препарати зафарбовували гематоксиліном та еозином. Огляд та фотографування гістологічних препаратів проводили на мікроскопі "Granum", обладнаним камерою "Echoo-Imager 502000" з використанням програми "ToupView 3.2".

Імуногістохімічні дослідження проводили з використанням первинних моноклональних антитіл до Ki-67, VEGF, CD34 та поліклональної Casp3 (ThermoScientific, США) (табл. 1). Титр антитіл підбирався згідно рекомендацій виробника з використанням у якості розчинника спеціального розчину Antibody Diluent (ThermoScientific, США). Для ідентифікації продуктів реакції використовували систему візуалізації Quanto (ThermoScientific, США) із застосуванням в якості хромогену 3,3'-діамінобензидину тетрагідрохлориду.

Зрізи товщиною 5 мкм наносили на адгезивні предметні скельця SuperFrostPlus.

Таблиця 1

Панель первинних антитіл

Антитіло	Клон	Титр	Виробник
Ki-67	клон SP6	1:100	ThermoScientific
Caspase 3	клон Ab-4	1:50	ThermoScientific
VEGF	VG1	1:100	ThermoScientific
CD34	клон QBEnd/10	1:400	ThermoScientific

Таблиця 2

Інтенсивність реакції моноклональних антитіл зі структурними компонентами міокарда

Антитіла	Групи тварин	Структурні компоненти міокарда			
		Кардіоміоцити		Стромальні елементи	Судини (ендотелій)
		Ядра	Цитоплазма		
Casp3	К	+++	–	Мастоцити +++	+
	Д	–	++	Мастоцити +++	+++
Ki-67	К	–	+++	Мастоцити ++	+++
	Д	–	+++	Мастоцити +++	+++
CD34	К	–	–	Фібробласти ++	+++
	Д	–	–	Фібробласти +	+++
VEGF	К	–	+++	–	++
	Д	++	+++	Макрофаги ++	+++

Інтенсивність реакції: – відсутня, + слабка, ++ помірна, +++ значна

Після депарафінізації та регідратації зрізів проводили температурне демаскування антигенів: зрізи поміщали в цитратний буфер з рН 6.0 і підігрівали в автоклаві при температурі +121°C протягом 8 хвилин. Активність ендогенної пероксидази пригнічували шляхом інкубації зрізів у 3 % розчині перекису водню протягом 20 хвилин. Відтак проводили інкубацію зрізів з первинними антитілами у вологих камерах при температурі 23-25°C упродовж 30 хвилин згідно з рекомендаціями виробника.

Для виокремлення ареаєктивних структур зрізи додатково обробляли гематоксиліном Майєра. Після дегідратації у спиртах висхідної концентрації та просвітлення в трьох порціях ксилолу препарати заключали в полістирол. Місця зв'язування антитіл визначали за наявністю коричневого осаду. Інтенсивність реакції оцінювалась напівкількісно двома незалежними спостерігачами з розрахунку: – відсутня, + слабка, ++ помірна, +++ значна.

### Результати й обговорення

Попередньо проведені нами біохімічні дослідження ферментів АСТ, ЛДГ та КФК у сироватці крові показали, що після введення щуром розчину адреналіну у відповідності з поданим вище протоколом спостерігалось достовірне підвищення рівня досліджуваних ферментів. Так, активність АСТ зростала у 3,5 разів, ЛДГ – у 2,7 разів, КФК – у 2,3 рази порівняно з показниками контрольної групи [6].

При дослідженні оглядових препаратів міокарда дослідних тварин через 2 доби

після введення адреналіну ідентифікували локальні дистрофічні зміни кардіоміоцитів, набряк окремих клітин, дезагрегацію міофібрил та деструктивні зміни вставних дисків; у артеріолах задокументовано агрегацію формених елементів крові та їх адгезію до ендотелію. В окремих кардіоміоцитах мав місце пікноз ядер [6]. Подібні зміни при експериментальній ішемії міокарда після введення адреналіну та на інших моделях спостерігали також інші дослідники [1, 8, 11].

Дослідження стінки серця з використанням моноклональних антитіл (табл. 2) показало, що у міокарді контрольних тварин експресія Casp3 локалізована головним чином в ядрах кардіоміоцитів (рис. 1А, В, Д), а також у цитоплазмі поодиноких мастоцитів з периваскулярною локалізацією (рис. 1В). У тварин з модельованою ішемією міокарда спостерігалася підвищена експресія Casp3 ендотеліоцитами судин мікроциркуляторного русла у поєднанні з появою дрібних Casp3-позитивних гранул у цитоплазмі скоротливих кардіоміоцитів (рис. 1Б, Г, Е). Ми розцінюємо означений феномен як один із проявів апоптозу, в основі якого лежить розпад міофібрил з наступною трансформацією деградованих білкових компонентів останніх у цитоплазматичну зернистість.

Вищенаведена інтерпретація виявлених змін ґрунтується на спостереженнях Жебель В.М. та співавт. [15], які задокументували здатність Casp3 до розщеплення білкових компонентів серцевих міофібрил, наслідком чого є порушення взаємодії "сила-каль-



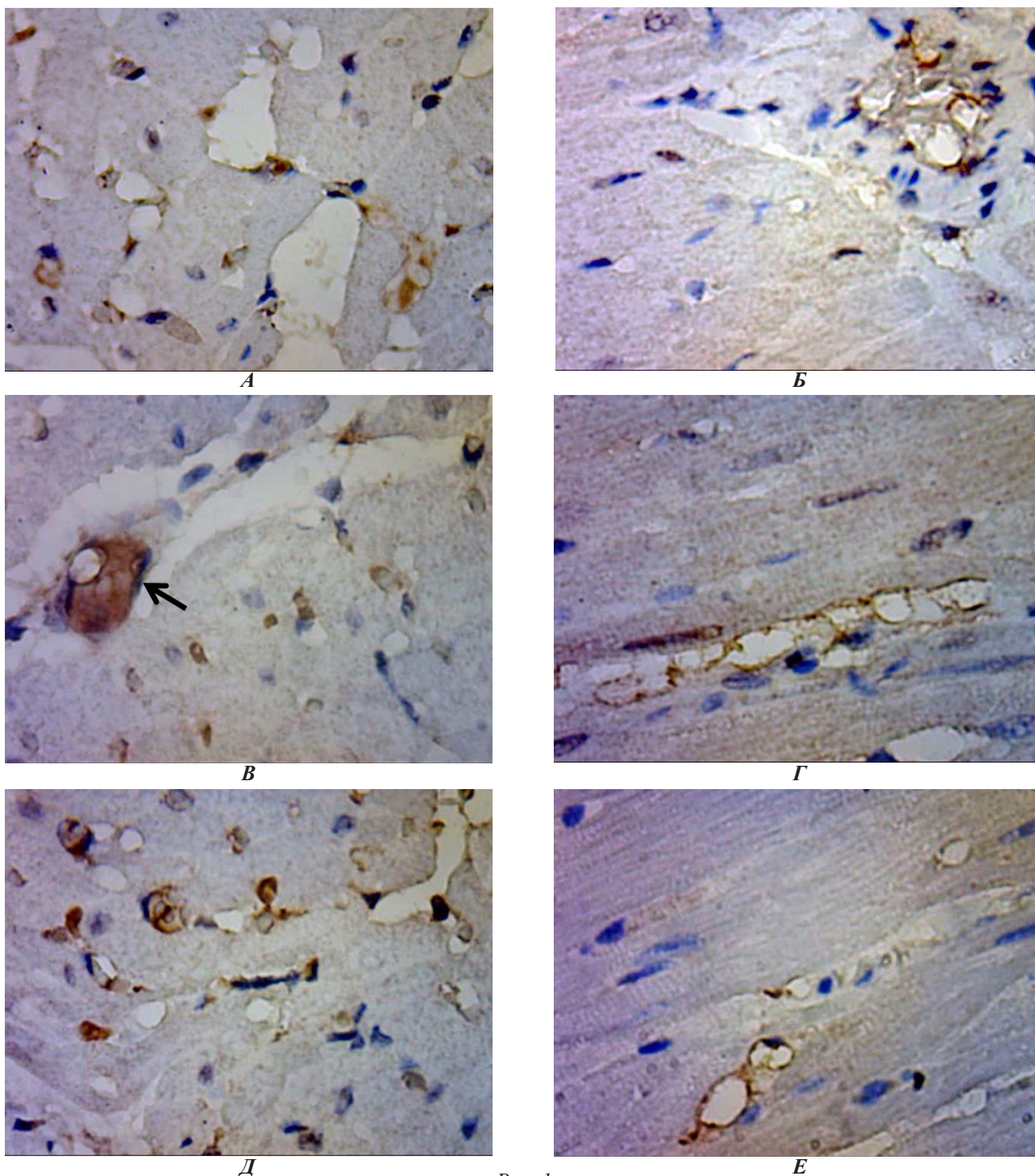


Рис. 1

Імуногістохімічна реакція Casp3 у міокарді інтактних щурів (А, В, Д) та щурів з експериментальною ішемією міокарда (Б, Г, Е). Окрім ядер скоротливих кардіоміоцитів імунореактивність виявлена у цитоплазмі мастоцита (фрагмент В, мастоцит позначений стрілкою). Зб. х600

цій" та АТФ-азної активності останніх. Окрім того, вивільнення з мітохондрій цитохрому С під час апоптозу може порушувати окисне фосфорилювання та продукцію АТФ, що веде до нестачі енергії і порушення функціональної здатності кардіоміоцитів. Із іншого боку,

Залесский В.Н. та співавт. [14] сформулювали гіпотезу, згідно з якою індукований ішемією апоптоз кардіоміоцитів обумовлений підвищенням рівня  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозолі, виходом у цитоплазму цитохрому С разом з фактором Араф-1 і прокаспазою 9, з відповідною акти-



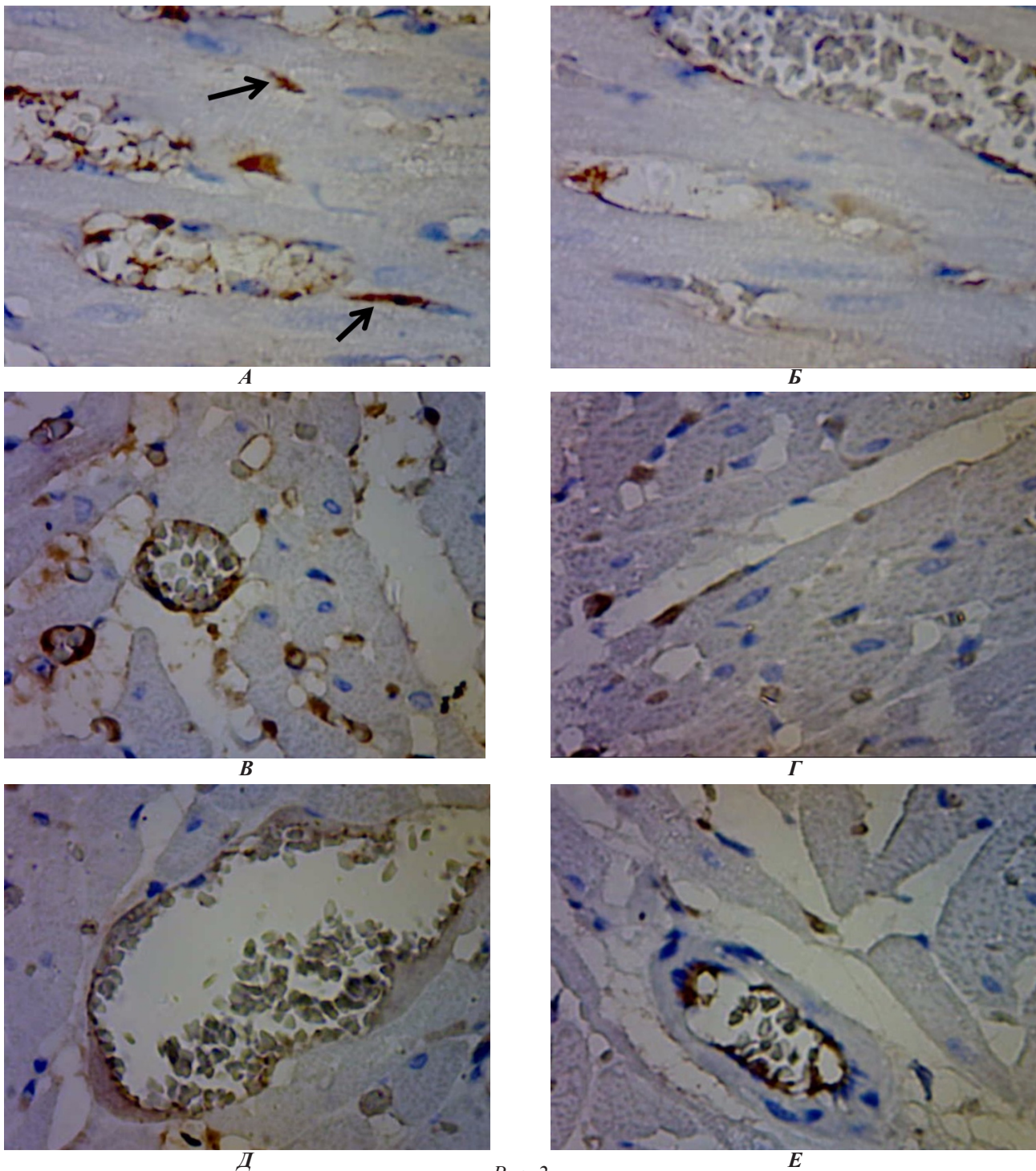


Рис. 2

Імуногістохімічна реакція CD34 у міокарді інтактних щурів (А, В, Д) та щурів з експериментальною ішемією міокарда (Б, Г, Е). Фібробласти позначені стрілками. Зб. х600

вацією Casp3 і наступних етапів апоптозу.

Експресія CD34 (клон QBEnd/10) у міокарді контрольних тварин задокументована у цитоплазмі і ядрах ендотеліоцитів гемокapілярів та інших ланок мікроциркуляторного русла, а також у фібробластах, локалі-

зованих у прошарках сполучної тканини навколо кардіоміоцитів (рис. 2А, В, Д). На тлі ішемії маркер CD34 ідентифікований у ядрах ендотеліоцитів (рис. 2Б, Г, Е), дисфункція яких, згідно з даними Микуляк В.Р. [5], є важливим чинником у патогенезі гострого ін-



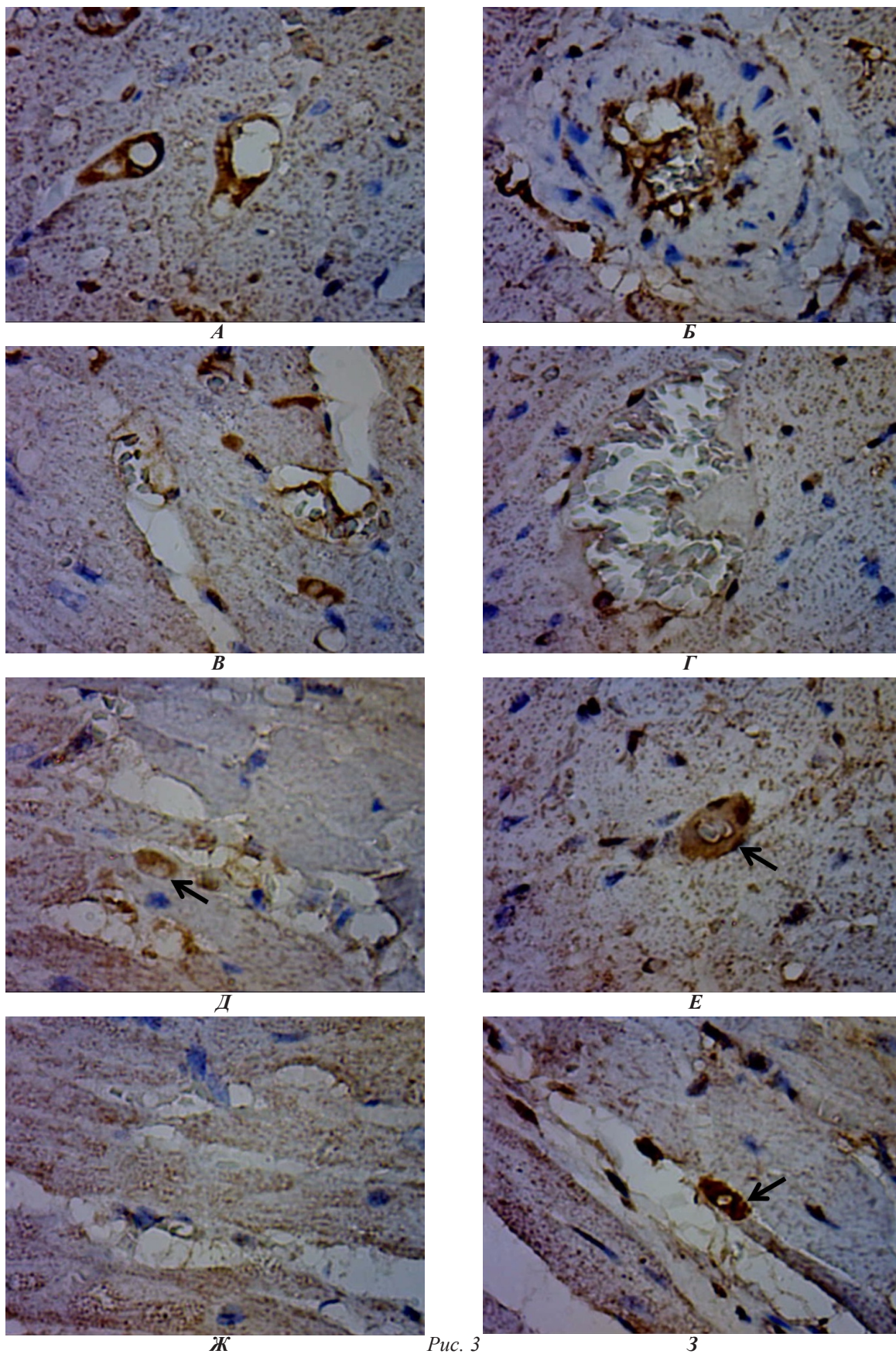


Рис. 3

Імуногістохімічна реакція Ki-67 у міокарді інтактних щурів (А, В, Д, Ж) та щурів з експериментальною ішемією міокарда (Б, Г, Е, З). Мастоцити на фрагментах Д, Е, З позначені стрілками. Зб. х600



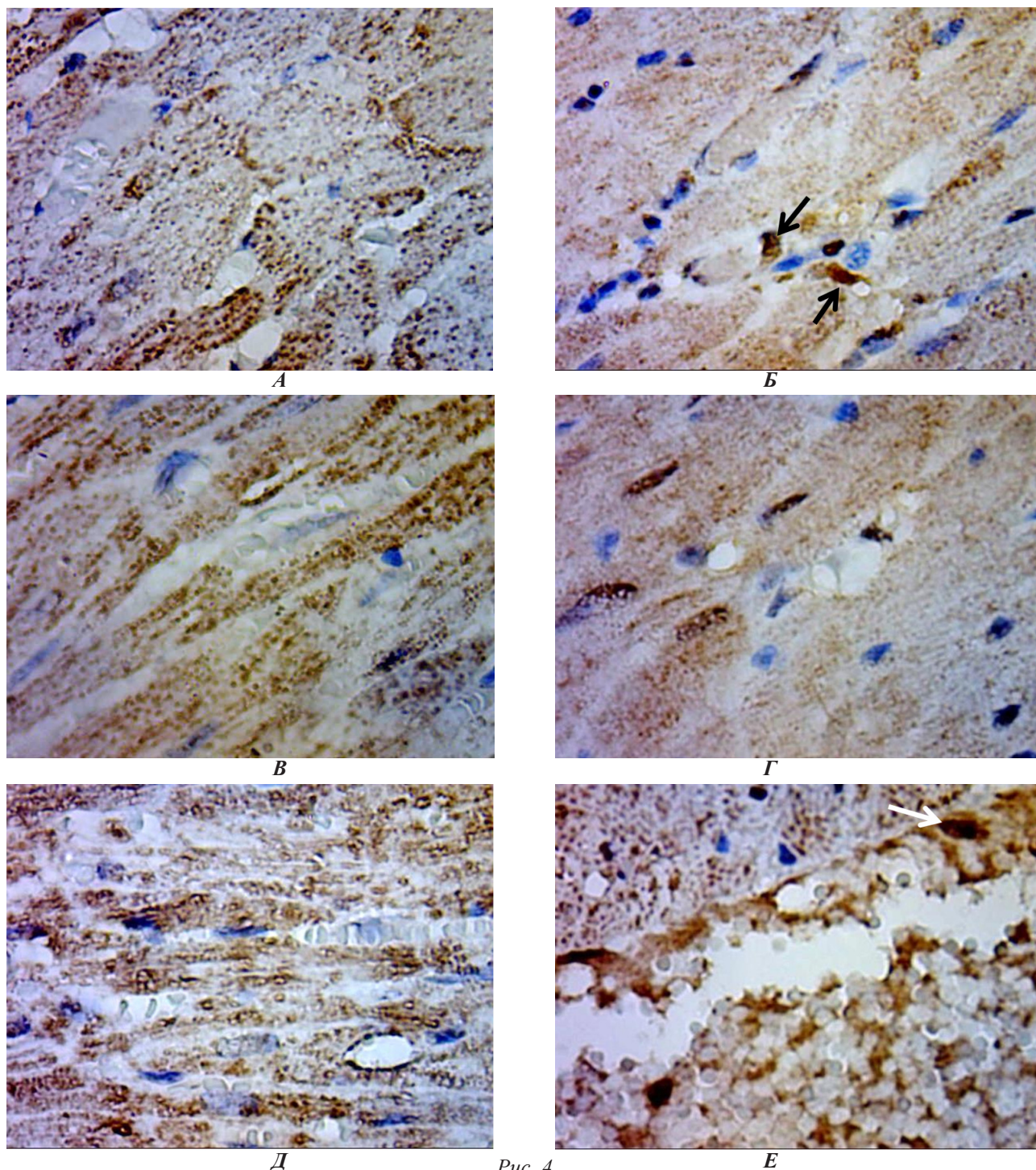


Рис. 4

Імуногістохімічна реакція VEGF у міокарді інтактних щурів (А, В, Д) та щурів з експериментальною ішемією міокарда (Б, Г, Е). Макрофаги позначені стрілками. Зб. х600

фаркту міокарда.

Загальноприйнято трактувати CD34 як молекули адгезії, експресія яких притаманна клітинам багатьох різновидів тканин, зокрема, пуповини, кісткового мозку, стовбурових клітин мезенхіми, попередникам ендотеліальних клітин і ендотеліоцитам кровоносних, але

не лімфатичних судин. Не дивлячись на певні протиріччя між даними окремих авторів, антиген CD34 традиційно використовується в якості маркера для ідентифікації кровоносних судин, для оцінки щільності судин у тканинах, а також в якості маркера ангиогенезу, зокрема, у пухлинах молочної залози [7].

Реакція з Ki-67 у контрольних тварин була ідентифікована у цитоплазмі кардіоміоцитів та у ендотеліоцитах судин мікроциркуляторного русла (рис. 3А, В, Д, Ж). На тлі гіпоксії мікарда підвищена експресія Ki-67 виявлена у складі дрібної цитоплазматичної зернистості кардіоміоцитів, внутрішній оболонці артеріол та у клітинних елементах їх адвентиційної оболонки (рис. 3Б), у внутрішній оболонці венул, ядрах ендотеліоцитів. У складі мікарда тварин як контрольної, так і дослідної груп інтенсивну реактивність цитоплазми з Ki-67 демонстрували поодинокі мастоцити периваскулярної локалізації (рис. 3В, Е, З).

Експресія маркера VEGF у міокарді контрольних тварин спостерігалась у ендотеліоцитах судин мікроциркуляторного русла (рис. 4Д) та у складі цитоплазматичної зернистості кардіоміоцитів (рис. 4А, В, Д). На тлі експериментальної ішемії мікарда імунореактивність задокументована в ендотеліоцитах судинного русла (рис. 4Е) та у складі цитоплазматичної зернистості кардіоміоцитів (рис. 4Б, Г). Навколо судин з ознаками тромбозу виявлено збільшення кількості VEGF-реактивних макрофагів (рис. 4Б, Г, Е). Внаслідок тромбозу судин порушується кровопостачання кардіоміоцитів, що призводить до некротичних змін останніх.

Важлива властивість VEGF фактора - це позитивний хемотаксичний ефект на міграцію попередників ендотеліоцитів і макрофагів, які індують ріст судин мікроциркуляторного русла [9]. Отримані нами дані узгоджуються з результатами Довгаль Г.В. і співавт. [2], які на іншій моделі інфаркту мікарда показали, що у перифокальній щодо інфаркту зоні зростає експресія судинного ендотеліального фактору росту (VEGF), що розцінюється як механізм спрямованого ангіогенезу навколо ділянки пошкодженого мікарда.

## Висновок

Проведені імуногістохімічні дослідження мікарда з використанням моноклональних антитіл за умов гострої ішемії показали, що

у кардіоміоцитах відбуваються апоптичні процеси з руйнуванням міофібрил, внаслідок чого розвиваються порушення скоротливої функції міокарда, у поєднанні зі пошкодженням ендотелію судин мікроциркуляторного русла, появою у периваскулярних просторах VEGF-позитивних макрофагів. Виявлені у периваскулярному просторі мастоцити демонстрували імунореактивність з Casp3 та CD34.

Перспективи подальших досліджень. Планується провести дослідження стінки серця при експериментальній ішемії міокарда з використанням трансмісійної електронної мікроскопії.

## Література

1. Babaeva AH, Shkand TV, Chyzh NA, Trofymova AV. Biotechnological principles of experimental myocardial necrosis formation. *Vesnyk neotlozhnoy i vostanovitel'noy medytsyny*. 2012; 13(1): 11-15. Russian (Бабаева АГ, Шканд ТВ, Чиж НА, Трофимова АВ. Биотехнологические принципы формирования экспериментального некроза миокарда. *Вестник неотложной и восстановительной медицины*. 2012; 13(1): 11-15).
2. Dovhal HV, Dovhal MA, Shevchenko IV. Disorders of rat heart morphogenesis in the early postnatal period under the influence of lead acetate and under conditions of correction. *Visnyk problem biolohiyi i medytsyny*. 2018; 4(2) (147): 271-276. Ukrainian (Довгаль ГВ, Довгаль МА, Шевченко ІВ. Порушення морфогенезу серця щурів в ранньому постнатальному періоді під впливом ацетату свинцю та за умов корекції. *Вісник проблем біології і медицини*. 2018; 4(2) (147): 271-276).
3. Fedorov SV, Herashchenko SB. Morphometric indicators of cardiomyocytes in ischemic heart failure under the influence of ivabradine. *Svit medytsyny ta biolohiyi*. 2015; 1(48): 183-185. Ukrainian (Федоров СВ, Геращенко СБ. Морфометричні показники кардіоміоцитів при ішемічній серцевій недостатності під впливом івабрадину. *Світ медицини та біології*. 2015; 1(48): 183-185).
4. Jaffe AS, Babuin L, Apple FS. Biomarkers in acute cardiac disease. *J American College Cardiology*. 2006; 48(1): 1-11.
5. Mykulyak VR. Comprehensive assessment of endothelial functional status in patients with acute myocardial infarction. *Aktualni problemy suchasnoyi medytsyny*. 2013; 13(2): 186-190. Ukrainian (Микуляк ВР. Комплексна оцінка функціонального стану ендотелію у хворих на гострий інфаркт міокарда. *Актуальні проблеми сучасної медицини*. 2013;



- 13(2): 186-190).
6. Nadraha BO, Strus KHI, Yashchenko AM, Zhulkevych IV, Lutsyk OD. Features of glycose structural components of rat myocardium under experimental myocardial ischemia. *Svit medytsyny ta biolohiyi*. 2019; 3(69): 197-203. Ukrainian (Надрага БО, Струс ХІ, Ященко АМ, Жулкевич ІВ, Луцик ОД. Особливості глікому структурних компонентів міокарда щура за умов експериментальної ішемії міокарда. *Світ медицини та біології*. 2019; 3(69): 197-203).
7. Nefedova NA, Kharlova OA, Danylova NV, Mal'kov PH, Hayfullyn NM. Markers of angiogenesis in tumor growth. *Arkhyv patolohyyi*. 2016; 2: 55-62. Russian (Нефедова НА, Харлова ОА, Данилова НВ, Мальков ПГ, Гайфуллин НМ. Маркеры ангиогенеза при опухолевом росте. *Архив патологии*. 2016; 2: 55-62).
8. Shkand TV, Chyzh NA, Naumova OV, Sandomyrs'kyu BP. Morphological characteristics of rat heart at experimental myocardium necrosis. *Svit medytsyny ta biolohiyi* 2013; 3: 19-23. Ukrainian (Шканд ТВ, Чиж НА, Наумова ОВ, Сандомирський БП. Морфологічні характеристики серця щурів при експериментальному некрозі міокарда. *Світ медицини та біології* 2013; 3: 19-23).
9. Shkuropat VM, Tverdokhlib IV, Dryuk MF. Characteristics of VEGF and CD34 factors after surgical treatment of patients with chronic grade III ischemia. *Morphologia*. 2010; IV(2): 53-64. Ukrainian (Шкуропат ВМ, Твердохліб ІВ, Дрюк МФ. Характеристика факторів VEGF і CD34 після хірургічного лікування хворих з хронічною ішемією нижньої кінцівки III ступеня. *Morphologia*. 2010; IV(2): 53-64).
10. Silkina YV. Histogenetic transformations of the cardiac conduction system. *Morphologia*. 2010; 4(3): 50-66. Ukrainian (Сілкіна ЮВ. Гістогенетичні перетворення провідної системи серця. *Morphologia*. 2010; 4(3): 50-66).
11. Skrebov RV, Savchenko SV, Novoselov VP, Morozova AS. Histological assessment of myocardium at various options of experimental modeling of acute ischemia. *Medicine and Education in Siberia* 2016; 3: 10-16.
12. WHO Fact sheet № 8310, updated June 2011 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html>.
13. Widimsky P, Wijns W, Fajadet J, de Belder M. Reperfusion therapy for ST elevation acute myocardial infarction in Europe: description of the current situation in 30 countries. *Eur Heart J* 2010; 31: 943-957.
14. Zalessky VN, Dynnyk OB. Apoptosis of cardiomyocytes in ischemic stress: cytotoxic and regulatory effects of reactive oxygen forms on myocardium. *Sovremennye problemy toksykologii*. 2006; 2: 34-36. Russian (Залесский ВН, Дынник ОБ. Апоптоз кардиомиоцитов при ишемическом стрессе: цитоксические и регуляторные влияния активных форм кислорода на миокард. *Современные проблемы токсикологии*. 2006; 2: 34-36).
15. Zhebel VM, Lozynsky SE. From left ventricular hypertrophy to hypertensive heart. Paradigm transformation. *Ukrayinsky kardiolohichnyy zhurnal* 2011; 6: 88-93. Ukrainian (Жебель ВМ, Лозинський СЕ. Від гіпертрофії лівого шлуночка до гіпертензивного серця. Зміна парадигми. *Український кардіологічний журнал* 2011; 6: 88-93).