

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ДЕСМИНА В МИОКАРДЕ ПРИ ОСТРОЙ ИШЕМИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

*С. В. Савченко, В. П. Новоселов, Р. В. Скребов, А. С. Морозова, В. А. Грицингер,
Т. А. Агеева, С. В. Айдагулова, К. И. Ершов, Е. И. Воронина*

*ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава
России (г. Новосибирск)*

Острую ишемию вызывали путем перевязки левой венечной артерии. Животных выводили из эксперимента через 1, 12 и 24 часа. Использование иммуногистохимической методики, позволяющей определять распределение десмина в кардиомиоцитах, дает возможность выявлять очаги острых ишемических повреждений миокарда. В работе проведена оценка распределения десмина в области вставочных дисков и Z-полос в миокарде при экспериментальном моделировании острой ишемии на лабораторных животных — крысах-самцах линии Вистар. Иммуногистохимическое исследование миокарда, выполненное с целью оценки выраженности экспрессии десмина, может быть информативным в случаях морфологической диагностики внезапной сердечной смерти и использовано в патологоанатомической и судебно-медицинской практике.

Ключевые слова: миокард, десмин, ишемия, эксперимент.

Савченко Сергей Владимирович — доктор медицинских наук, профессор, заведующий курсом ФПК и ППВ кафедры судебной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», e-mail: dr.serg.62@yandex.ru

Новоселов Владимир Павлович — доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой судебной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», e-mail: sme@sibsme.ru

Скребов Роман Владимирович — аспирант кафедры судебной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», e-mail: hmaoe@sudmed.info

Морозова Алина Сергеевна — ассистент кафедры судебной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», e-mail: alina2008200820@yandex.ru

Грицингер Валентина Александровна — ассистент кафедры судебной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», e-mail: dr.serg62@yandex.ru

Агеева Татьяна Августовна — доктор медицинских наук, профессор кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», e-mail: ageta62@yandex.ru

Айдагулова Светлана Владимировна — доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией клеточной биологии и фундаментальных основ репродукции ЦНИЛ ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», e-mail: dr.serg62@yandex.ru

Ершов Константин Игоревич — кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», e-mail: dr.serg62@yandex.ru

Воронина Евгения Игоревна — кандидат медицинских наук, ассистент кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», e-mail: dr.serg62@yandex.ru

Десмин является цитоскелетным белком, который обеспечивает поперечное прилегание миофибрилл кардиомиоцита с учетом сохранения постоянной величины длины саркомера до и после его сокращения [1]. Это позволяет сердечным мышечным клеткам сохранять стабильное состояние при возникающей механической деформации в процессе сокращения и расслабления мышечного волокна во время систолы и диастолы. Располагается десмин в межфибрилярном пространстве на периферии Z-полос, а также в местах расположения вставочных дисков кардиомиоцитов [1, 2]. Оценка структуры клеточных белков, входящих в состав цитоскелета кардиомиоцитов, позволяет расширить понимание механизмов, лежащих в основе повреждения структуры мышечных клеток в ответ на острую ишемию [3-6].

Целью исследования явилось выявление особенностей экспрессии десмина в миокарде при экспериментальном моделировании острой ишемии мышцы сердца. В качестве экспериментальных животных были использованы белые крысы линии Вистар. Выбор крыс в качестве лабораторных животных связан с тем, что патология острых очаговых повреждений миокарда на этих животных достаточно подробно исследована и описана в литературных источниках, что является удобным для проведения эксперимента [7-9].

Материалы и методы. Эксперименты по моделированию острой ишемии миокарда были проведены на 33-х крысах-самцах, масса животных составила 180–200 г. В контрольную группу вошло 3 животных.

Лабораторных животных содержали в стандартных условиях вивария, в одной клетке по 5 особей, которые имели свободный доступ к воде, при строгом соблюдении Международных правил биоэтики, предложенных международными организациями и ассоциациями, в том числе Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2013).

На первом этапе эксперимента определяли массу животного для последующего расчета дозы хлоралгидрата, который с целью общего обезболивания вводили внутривенно из расчета 300 мг/кг веса [8]. После наступления общей анестезии животным выбривали переднюю поверхность груди, располагали на спине в стендовом устройстве для фиксации лапок. У животных экспериментальных групп острую ишемию миокарда

осуществляли после торакотомии путем прошивания иглой участка миокарда в проекции расположения левой венечной артерии в участке между ушком левого предсердия и легочным стволом. После выполнения окклюзии левой венечной артерии оперативно ушивали стенку грудной клетки.

Животные были выведены из эксперимента через 1, 12 и 24 часа (по 10 животных в каждом временном интервале из экспериментальной группы и 3 животных из группы контроля).

У выведенных из эксперимента животных вскрывали грудную и брюшную полости, отсекали сердце, которое еще сокращалось, и помещали его в чашку Петри со льдом для предотвращения фибрилляции до момента завершения последних сокращений. Сердца фиксировали в 10 % забуференном формалине (Biovitrum, Россия) в течение 24 часов. После завершения фиксации органы рассекали во фронтальной плоскости на 2 части, затем производили стандартную проводку материала в гистопроцессоре (STP-200, Leica). На ротационном микротоме из заключенных в парафин образцов изготавливали срезы толщиной около 5 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином.

Процедуру иммуногистохимического окрашивания выполняли в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя антител и согласно рекомендациям, изложенным в руководствах по иммуногистохимическим исследованиям [10]. Перед проведением иммуногистохимического окрашивания приготовленные срезы депарафинизировали и производили демаскировку антигенов тканей в PT Link модуле (Dako, Дания) в цитратном буфере (pH 6,0) при температуре 95 °C в течение 60 мин. Затем блокировали эндогенную пероксидазу 3%-м раствором H₂O₂, проводили протеиновый блок сывороткой. Далее инкубировали полученные срезы с антителами к Desmin 43/GJA1 (клон D33, mouse monoclonal, «DAKO», Дания). Для иммунного окрашивания использовали полимерную систему детекции с пероксидазной меткой (EnVision FLEX, «DAKO» Дания). Последним этапом докрашивали ядра клеток гематоксилином.

Площадь DAB-позитивных продуктов иммуногистохимической реакции оценивали как процент площади изображения с помощью микроскопа Axio Scope.A1 с фотокамерой AxioCam MRc5 и программного обеспечения ZEN blue (C.Zeiss), для каждого параметра оценивали по 35 изображений с увеличением 40×12.

Результаты исследования и их обсуждение. При вскрытии животных экспериментальной группы уже через 1 час просматривались изменения окраски миокарда по передней стенке левого желудочка в виде отечного слегка бледного очага с нечеткими контурами. Через 12 часов отечный бледный очаг на передней стенке левого желудочка просматривался отчетливо. Через 24 часа на передней стенке левого желудочка был виден крупноочаговый инфаркт желтовато-коричневого цвета.

При проведении микроскопического исследования на первом этапе оценивали структуру миокарда на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. Миокард животных контрольной группы сохранял характерное гистологическое строение, кардиомиоциты имели равномерную окраску цитоплазмы и ядер, в ряде полей зрения были признаки начавшейся фрагментации отдельных групп мышечных клеток и неравномерное кровенаполнение сосудов. При микроскопии контрольных срезов, позволяющих проводить оценку выраженности экспрессии десмина, было отмечено, что большая часть кардиомиоцитов была разделена хорошо контурируемыми вставочными дисками темно-коричневого цвета. Цитоплазма кардиомиоцитов светло-коричневого цвета имела

отчетливо выраженную темно-коричневую поперечную исчерченность (рис. 1).

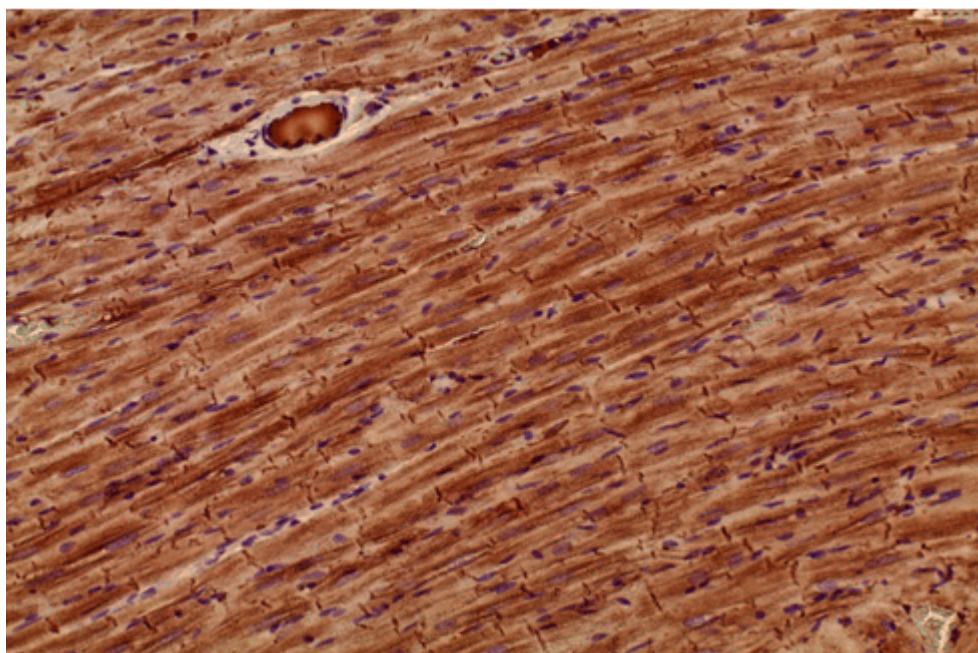


Рис. 1. Десмин в области вставочных дисков и Z-полос кардиомиоцитов миокарда у животных контрольной группы. Ув. ×200

При оценке состояния структуры срезов миокарда, окрашенных гематоксилином и эозином, через 1 час с момента окклюзии левой венечной артерии во всех наблюдениях в строме отмечался отчетливо просматриваемый умеренно выраженный межмышечный отек в сочетании с острыми расстройствами кровообращения в виде сладжирования эритроцитов в сосудах микроциркуляторного русла. Мелкие артерии находились в состоянии спазма, вены были расширенными, полнокровными. В ряде сосудов отмечали штифтиковое вытягивание эндотелиоцитов. Основная часть миокардиальных клеток сохраняла нормальную структуру, в отдельных полях зрения были умеренно выраженные признаки метахромазии. При иммунохимическом окрашивании срезов, позволяющем выявлять десмин в зоне ишемии миокарда, было отмечено уменьшение вставочных дисков.

Острая ишемия миокарда в течение 12 часов сопровождалась еще большими расстройствами кровообращения, нарастал отек стромы и периваскулярных пространств в сочетании с очаговыми кровоизлияниями и реактивными изменениями в виде полиморфноклеточной инфильтрации нейтрофильными лейкоцитами и лимфоцитами. При поляризационной микроскопии выявляли большое количество контрактурных повреждений кардиомиоцитов. Наряду с контрактурами первой и второй степени наблюдали контрактуры третьей степени, в этих случаях изотропные диски отсутствовали, а сближение анизотропных дисков сердечных миоцитов достигало того уровня, когда они сливались в сплошной светящийся конгломерат.

При микроскопии срезов с окраской, позволяющей оценивать экспрессию десмина в зоне ишемии, была отмечена неравномерная окраска саркомеров кардиомицитов. Поперечная исчерченность в части клеток отсутствовала. Наряду с этими клетками встречались кардиомиоциты с участками усиления поперечной исчерченности.

Через 24 часа с момента острой ишемии в зоне некроза миокарда был резко выражен периваскулярный и стромальный отёк, имелись очаговые кровоизлияния. Выраженные реактивные изменения были представлены полиморфноклеточной инфильтрацией

из нейтрофильных лейкоцитов и лимфоцитов. При оценке структуры миокарда было отмечено наличие разновеликих кардиомиоцитов, среди которых встречались утолщенные, набухшие клетки с гомогенизированной цитоплазмой без ядер (рис. 2). При поляризационной микроскопии в зоне ишемии были выявлены кардиомиоциты с глыбчатым распадом и миоцитолизом. При микроскопии срезов миокарда, окрашенных иммуногистохимически, во многих кардиомиоцитах поперечная исчерченность была неразличима или сохранялась только в виде отдельных очагов (рис. 3). В зоне ишемии встречались единичные вставочные диски.

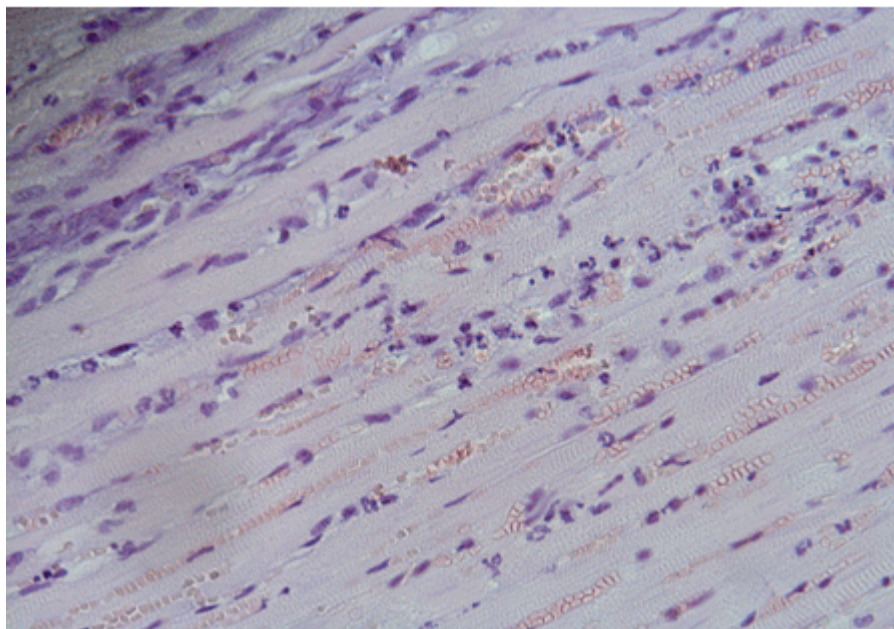


Рис. 2. Цитоплазма кардиомиоцитов гомогенизирована, ядра отсутствуют, отмечается полиморфноклеточная инфильтрация из нейтрофильных лейкоцитов и лимфоцитов в зоне ишемии через 24 часа после окклюзии. Ув. $\times 400$

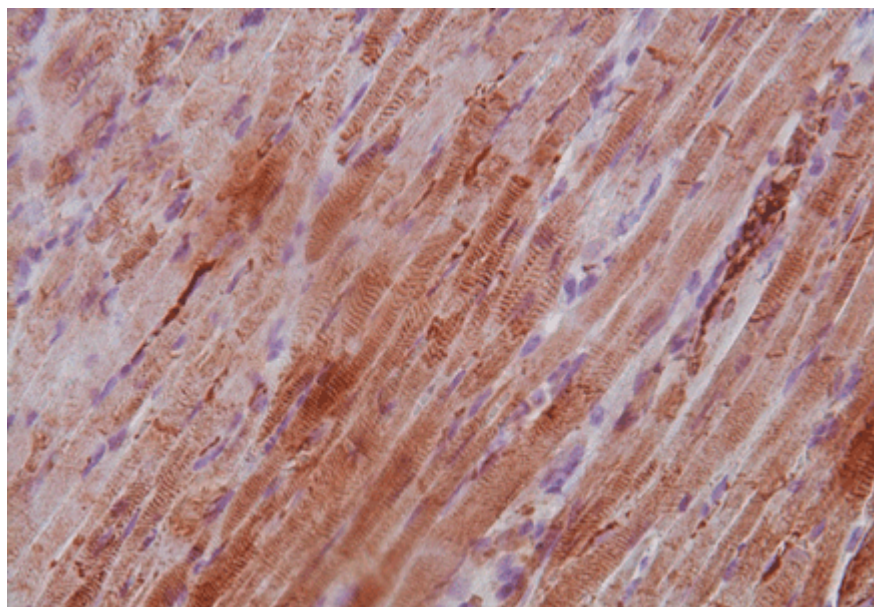


Рис. 3. Снижение экспрессии десмина в зоне ишемии через 24 часа после окклюзии, единичные вставочные диски, отсутствие Z-полос. Ув. $\times 400$

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что при экспериментальном моделировании острой ишемии миокарда на лабораторных животных, при микроскопии

кардиомиоциты в срезах миокарда, окрашенных иммуногистохимически с целью выявления десмина, имеют равномерное светло-коричневое окрашивание с хорошо контрастирующими темно-коричневыми участками в местах вставочных дисков кардиомиоцитов и в области Z-полос на протяжении всей мышечной клетки. При развитии ишемии миокарда в различные интервалы времени в течение 24 часов с момента окклюзии прослеживается характерная морфодинамика, связанная со снижением экспрессии десмина в виде снижения количества вставочных дисков и исчезновения Z-полос кардиомиоцитов. Полученные данные находят подтверждение в литературных источниках авторов, занимавшихся изучением особенностей метаболизма десмина [1, 2].

Заключение. Предложена методика экспериментального моделирования острой ишемии миокарда на лабораторных животных, позволяющая воспроизводить инфаркт миокарда. При оценке экспрессии десмина в срезах миокарда отмечена характерная морфодинамика, обусловленная уменьшением количества вставочных дисков и исчезновением Z-полос кардиомиоцитов, что обусловлено острой ишемией. Оценка выраженности экспрессии десмина может быть информативной при морфологической диагностике очагов острой ишемии в миокарде в случаях скорострительной смерти.

Список литературы

1. Ganote C., Vander Heide R. // Amer. J. Path. — 1987. — Vol. 129. — P. 327-344.
2. Чумаченко П. В. Иммуноморфологическая диагностика ранних некрозов миокарда с помощью моноклональных антител / П. В. Чумаченко, А. М. Вихерт // Архив патологии. 1991. — Т. 53, № 3. — С. 16-19.
3. Савченко С. В. Патоморфологические исследования в судебно-медицинской практике на современном этапе / С. В. Савченко // Вестник судебной медицины. — 2015. — Т. 4, № 2. — С. 21-24.
4. Гистологическая оценка межклеточных контактов кардиомиоцитов при ишемии миокарда / С. В. Савченко, В. П. Новоселов, А. С. Морозова, Р. В. Скребов, В. А. Грицингер, Т. А. Агеева, Е. И. Воронина, К. И. Ершов // Вестник судебной медицины. — 2016. — Т. 5, № 3. — С. 26-29.
5. Desmin Myopathy / L. Goldfarb [et al.] // Brain. — 2004. — Vol. 127. — P. 723-734. — 10.1093/brain/awh033. PMID14724127.
6. Desmin-free cardiomyocytes and myocardial dysfunction in end stage heart failure / S. Di Somma [et al.] // Eur. J. Heart. Fail. — 2004. — Vol. 6. — P. 389-398.
7. Hyperbaric oxygen limits infarct size in ischemic rabbit myocardium in vivo / D. L. Sterling [et al.] // Circulation. — 1993. — Vol. 88. — P. 1931-1936.
8. Модификация метода ишемии/реперфузии миокарда [Электронный ресурс] / К. И. Ершов, А. В. Ноговицин, М. А. Галунская, А. А. Серяпина, К. В. Егорова, К. И. Бахарева // Медицина и образование в Сибири : сетевое научное издание. — 2014. — № 3. — Режим доступа : http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1411. — Дата обращения : 14.06.2016.
9. A new technique of coronary artery ligation : experimental myocardial infarction in rats in vivo with reduced mortality / Ye Jian [et al.] // Mol. Cell. Biochem. — 1997. — Vol. 176. — P. 227-233.
10. Петров С. В. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / С. В. Петров. — 4-е изд., перераб. и доп. — Казань, 2012. — 624 с.

DISTRIBUTION OF DESMIN IN MYOCARDIUM DURING ACUTE ISCHEMIA IN EXPERIMENT

[S. V. Savchenko, V. P. Novoselov, R. V. Skrebov, A. S. Morozova, V. A. Gritsinger, T. A. Ageeva,
S. V. Aidagulova, K. I. Erschov, E. I. Voronina](#)

*State Budgetary Educational Institute of Higher Professional Education «Novosibirsk State
Medical University of Ministry of Health» (Novosibirsk)*

Acute ischemia was induced by ligation of the left coronary artery. Animals were removed from the experiment after 1 hour, 12 and 24 hours. The use of immunohistochemical methods in evaluating the distribution of desmin in cardiomyocytes provides an opportunity to identify pockets of acute ischemic myocardial damage. This article estimates the distribution of desmin around the intercalated discs and Z-bands in the myocardium during an experimental modeling of acute ischemia in laboratory animals, namely Wistar male rats. An immunohistochemical study of the myocardium performed to assess the severity of desmin expression may be informative for morphological diagnostics of sudden cardiac death and used in pathological and forensic-medical practice.

Keywords: myocardium, desmin, ischemia, experiment.

About authors:

Savchenko Sergey Vladimirovich — Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of Course, Novosibirsk State Medical University, e-mail: dr.serg.62@yandex.ru

Novoselov Vladimir Pavlovich — Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of Chair, Novosibirsk State Medical University, e-mail: sme@sibsme.ru

Skrebov Roman Vladimirovich — Postgraduate, Novosibirsk State Medical University, e-mail: hmaoe@sudmed.info

Morozova Alina Sergeevna — Postgraduate, Novosibirsk State Medical University, e-mail: alina2008200820@yandex.ru

Grizinger Valentina Aleksandrovna — Assistant, Novosibirsk State Medical University, e-mail: dr.serg62@yandex.ru

Ageeva Tatyana Augustovna — Dr. Sci. (Med.), Professor, Novosibirsk State Medical University, e-mail: ageta62@yandex.ru

Aidagulova Svetlana Vladimirovna — Dr. Sci. (Biol.), Professor, Head of Laboratory, Novosibirsk State Medical University, e-mail: dr.serg62@yandex.ru

Erschov Konstantin Igorevich — Cand. Sci. (Biol.), Senior Lecturer, Novosibirsk State Medical University, e-mail: dr.serg62@yandex.ru

Voronina Evgeniya Igorevna — Cand. Sci. (Med.), Assistant, Novosibirsk State Medical University, e-mail: dr.serg62@yandex.ru

List of the Literature:

1. Ganote C., Vander Heide R. // Amer. J. Path. — 1987. — Vol. 129. — P. 327-344.
2. Chumachenko P. V. Immunomorphologic diagnosis of early myocardial necrosis using monoclonal antibodies to desmin and vimentin / P. V. Chumachenko, A. M. Vikhert // Arkhiv Patologii. 1991. — Vol. 53, N. 3. — P. 16-19.
3. Savchenko S. V. Patho-morphologic research in medico-legal practice at the present stage / S. V. Savchenko // Bulletin of Forensic Medicine. — 2015. — Vol. 4, N. 2. — C. 21-24.
4. Histological evaluation of cardiomyocyte cell-cell contacts in myocardial ischemia / S. V. Savchenko, V. P. Novoselov, A. S. Morozova, R. V. Skrebov, V. A. Grizinger, T. A. Ageeva, E. I. Voronina, K. I. Ershov // Bulletin of Forensic Medicine. — 2016. — Vol. 5, N. 3. — P. 26-29.
5. Desmin Myopathy / L. Goldfarb [et al.] // Brain. — 2004. — Vol. 127. — P. 723-734. — DOI: 10.1093/brain/awh033. PMID14724127.
6. Desmin-free cardiomyocytes and myocardial dysfunction in end stage heart failure / S. Di Somma [et al.] // Eur. J. Heart. Fail. — 2004. — Vol. 6. — P. 389-398.
7. Hyperbaric oxygen limits infarct size in ischemic rabbit myocardium in vivo / D. L. Sterling [et al.] // Circulation. — 1993. — Vol. 88. — P. 1931-1936.
8. Modification of method of myocardium ischemia/reperfusion [Electronic source] / K. I. Ershov, A. V. Nogovitsin, M. A. Galunskaya, A. A. Seryapina, K. V. Egorova, K. I. Bakhareva // Medicine and Education in Siberia: Online Scientific Publication. — 2014. — N. 3. — Access mode : (http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1411). — Access date : 14.06.2016.
9. A new technique of coronary artery ligation: experimental myocardial infarction in rats in vivo with reduced mortality / Ye Jian [et al.] // Mol. Cell. Biochem. — 1997. — Vol. 176. — P. 227-233.
10. Petrov S. V. Manual on immunohistochemical diagnosis of human tumors / S. V. Petrov. — 4th edition, updated and revised. — Kazan, 2012. — 624 p.