

Оценка изменений белков миокарда при острой ишемии по данным иммуногистохимического исследования

Савченко С.В., Новоселов В.П., Скребов Р.В., Гребенщикова А.С., Грицингер В.А., Агеева Т.А., Воронина Е.И., Казанская Г.М., Овсянко Е.В.

ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России

Evaluation of protein changes of the myocardium in acute ischemia according to the immunohistochemical study

Savchenko S.V., Novoselov V.P., Skrebov R.V., Grebenshchikova A.S., Gritsinger V.A., Ageeva T.A., Voronina E.I., Kazanskaya G.M., Ovsyanko E.V.

Novosibirsk State Medical University

АННОТАЦИЯ

Ишемическая болезнь сердца является ведущей причиной смертности населения развитых стран, поэтому изучение различных аспектов этой патологии представляется важной медико-биологической задачей. Материалом в проведенном исследовании послужила сердечная мышца левого желудочка 37 лиц, скоропостижно умерших от острых форм ишемической болезни сердца: в результате острой коронарной недостаточности и острого инфаркта миокарда в донекротической стадии. Контрольная группа: сердечная мышца 5 лиц, умерших вследствие черепно-мозговой травмы. Кроме светового и поляризационного исследования срезов миокарда, применяли иммуногистохимический анализ, позволяющий оценивать выраженность экспрессии клеточных белков: актина, десмина, коннексина 43. Использование иммуногистохимической окраски сердечной мышцы позволяет оценить состояние макромолекулярной структуры миокарда по экспрессии актина, десмина и коннексина 43 и может быть применено для морфологической диагностики острых очаговых повреждений миокарда в судебно-медицинской или патолого-анатомической практике в случаях внезапной сердечной смерти.

Ключевые слова: миокард, актин, десмин, коннексин 43, патология, морфологическая диагностика.

ABSTRACT

Ischemic heart disease is the leading cause of mortality in the developed countries; accordingly the study of various aspects of this disorder is a crucial medico-biological task. Cardiac muscle of the left ventricle taken from 37 individuals suddenly deceased from acute forms of ischemic heart disease (as a result of acute coronary insufficiency and acute myocardial infarction at pre-necrotic stage) served as the material for the conducted study. The control group included the cardiac muscles taken from 5 individuals deceased from traumatic brain injury. Besides light and polarized investigation of myocardial sections the immunohistochemical analysis, permitting to evaluate the intensity of cellular protein expression: actin, desmin, connexin 43, was used. The use of immunohistochemical staining of the cardiac muscle allows assessing the status of the macromolecular structure of the myocardium by the expression of actin, desmin and connexin 43 and can be applied for morphological diagnostics of acute focal myocardial injuries in forensic-medical or pathological practice in cases of sudden cardiac death.

Keywords: myocardium, actin, desmin, connexin 43, pathology, morphological diagnostics.

Поступила 25.06.2019
Принята 10.07.2019

*Автор, ответственный за переписку
Савченко Сергей Владимирович: ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России. 630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52
E-mail: dr.serg62@yandex.ru

Received 25.06.2019
Accepted 10.07.2019

*Corresponding author
Savchenko Sergey Vladimirovich: Novosibirsk State Medical University, 52, Krasny Prospect, Novosibirsk, 630091, Russia.
E-mail: dr.serg62@yandex.ru

ВВЕДЕНИЕ

Ишемическая болезнь сердца по-прежнему является ведущей причиной смертности населения развитых стран, поэтому изучение различных аспектов этой патологии — важная медико-биологическая задача [1–4]. Снижение коронарного кровотока при ишемической болезни сердца сопровождается ишемией миокарда, имеющей определенные морфофункциональные характеристики. При острой ишемии выявляют острые очаговые повреждения миокарда, которые представлены контрактурными повреждениями, миоцитоллизисом и глыбчатым распадом кардиомиоцитов [1–3, 5–7]. Это связано с изменениями структуры мышечного аппарата кардиомиоцитов, левого желудочка сердца, сократительная способность которого обеспечивает циркуляцию крови по большому кругу кровообращения [1–3, 6, 7].

Изучение особенностей функционирования миокарда в норме и при патологии, а также разработка методов профилактики и коррекции при развивающихся нарушениях работы сердца невозможны без рассмотрения молекулярной структуры кардиомиоцитов [8, 9]. Структура кардиомиоцитов представлена клеточными белками, расположение которых в клетке строго детерминировано [10]. Структурные клеточные белки кардиомиоцитов multifunctional, они позволяют не только обеспечить сохранность кардиомиоцита в процессе систолы и диастолы, но и в передаче сигналов, а также во взаимодействии с внеклеточным матриксом и внутриклеточными органеллами [8–10].

В литературе описана кардиальная патология, представленная преимущественно кардиомиопатиями, при которой наблюдаются нарушения структуры кардиомиоцитов, обусловленные изменениями клеточных белков за счет мутации определенных генов [10]. При различных вариантах кардиомиопатий, в результате мутации генов, отмечены нарушения в процессах синтеза и соответственно экспрессии ряда клеточных белков, что сопровождается нарушениями сократительной способности миокарда. Изменения клеточных белков, определяющих макромолекулярную структуру кардиомиоцитов, могут быть определены визуально с помощью иммуногистохимического исследования [10–12]. Это позволяет выявлять уменьшение или увеличение количества клеточных белков, которые имеют определенную локализацию в кардиомиоците, и благодаря этому судить о степени сохранности макромолекулярной структуры мышечных клеток.

INTRODUCTION

As before ischemic heart disease is the leading cause of mortality in the developed countries; accordingly the study of various aspects of this disorder is a crucial medico-biological task [1–4]. The diminution of coronary blood flow in ischemic heart disease is accompanied by myocardial ischemia possessing the definite morphofunctional characteristics. In acute ischemia the acute focal myocardial injuries presented by contractual damages, myocytolysis, and clumpy patholysis of cardiomyocytes are revealed [1–3, 5–7]. It is associated with the changes in muscular system structure of cardiomyocytes, left ventricle, the contractility of which ensures blood circulation of the systemic loop [1–3, 6, 7].

The study of peculiarities of myocardium performance both as normal and abnormal one as well as the development of preventive measures and correction in the developing cardiac disorders are impossible without considering the molecular structure of cardiomyocytes [8, 9]. The cardiomyocyte structure consists of cellular proteins and their arrangement in the cell is strictly determined [10]. Structural cellular proteins of cardiomyocytes are multifunctional; they allow not only ensuring the cardiomyocyte preservation as both systole and diastole but signaling proceed as well as during interaction with extracellular matrix and intracellular organelles [8–10].

In the literature one describes the cardiac pathology mainly presented by cardiomyopathies in which cardiomyocyte structure disturbances caused by cellular protein changes at the expense of mutation of the certain genes are observed [10]. In different variants of cardiomyopathies as a result of gene mutation some abnormalities in synthesis processes and the expression of a number of proteins accordingly are noted that is accompanied by myocardium contractility disturbances. The changes of cellular proteins defining the macromolecular structure of cardiomyocytes can be determined by sight using immunohistochemical investigation [10–12]. It allows revealing the decrease or increase of cellular protein number that has a definite localization in a cardiomyocyte and, owing to that fact, estimating the stage of macromolecular structure preservation of myocytes.

In terms of the foregoing the estimation of macromolecular cardiomyocyte structure status in acute myocardial ischemia takes on special importance taking into consideration the wide prevalence

С учетом вышеизложенного оценка состояния макромолекулярной структуры кардиомиоцитов при острой ишемии миокарда приобретает особую важность, принимая во внимание широкую распространенность и высокую смертность населения планеты от различных форм ишемической болезни сердца.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Провести оценку состояния клеточных белков кардиомиоцитов — актина, десмина и коннексина 43 при острой ишемии миокарда.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом послужила сердечная мышца левого желудочка 37 скоропостижно умерших от острых форм ишемической болезни сердца: в результате острой коронарной недостаточности и острого инфаркта миокарда в донекротической стадии. Среди умерших было 32 мужчины и 5 женщин в возрасте от 41 до 63 лет. В контрольную группу вошло 5 случаев смерти (3 мужчины и 2 женщины) в результате черепно-мозговой травмы тупыми предметами.

Забор фрагментов миокарда для исследования осуществляли из области задней, боковой и передней стенок левого желудочка, перегородки, верхушки сердца и сосочковый мышцы, которые фиксировали в 10% забуференном формалине (Biovitrum, Россия) в течение 24 ч, после чего проводили стандартную проводку материала в гистопроцессоре (STP-200, Leica, Германия). На ротационном микротоме из заключенных в парафин образцов изготавливали срезы толщиной около 5 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Световую и поляризационную микроскопию сердца проводили с использованием универсального микроскопа C. Zeiss Axio Scope.A1, который был оснащен анализатором, поляризатором и фотокамерой AxioCam MRc5.

Кроме световой и поляризационной микроскопии срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, использовали иммуногистохимическое окрашивание срезов миокарда, позволяющее оценивать выраженность экспрессии клеточных белков — актина, десмина и коннексина 43. Иммуногистохимическое окрашивание срезов выполняли в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя антител и согласно рекомендациям, изложенным в руководствах по иммуногистохимическим исследованиям [8, 13]. Перед проведением иммуногистохимического окрашивания приготовленные срезы депарафинизировали и производили демаскировку ан-

and high mortality worldwide caused by different forms of ischemic heart disease.

AIM OF THE RESEARCH

To evaluate the status of cellular proteins of cardiomyocytes — actin, desmin, connexin 43 in acute myocardial ischemia.

MATERIALS AND METHODS

Cardiac muscle of the left ventricle taken from 37 individuals suddenly deceased from acute forms of ischemic heart disease (as a result of acute coronary insufficiency and acute myocardial infarction at pre-necrotic stage) served as the material for the conducted study. There were 32 males and 5 females at the age of 41–63 years among deceased individuals. 5 lethal cases (3 males and 2 females) as a result of traumatic brain injury caused by the damage by blunt objects were included into the control group.

Samples of the myocardium fragments for the investigation were taken from the posterior, lateral, and anterior walls of the left ventricle, septum, apex of the heart and papillary muscle that were fixed in 10% buffered formalin (Biovitrum, Russia) for 24 hours; whereupon the standard specimen preparation was performed in the tissue processor (STP-200, Leica, Germany). In the rotary microtome the sections as thick as 5 µm were made from the specimen enclosed in paraffin that were stained with hematoxylin and eosin. Light and polarized microscopy of the heart was performed with the usage of a universal microscope C. Zeiss Axio Scope.A1 fitted out with a analyzer, polarizer, and photocalera AxioCam MRc5.

Besides light and polarized investigation of myocardial sections stained with hematoxylin and eosin the immunohistochemical analysis permitting to evaluate the intensity of cellular protein expression: actin, desmin, connexin 43 was used. Immunohistochemical staining of the sections was performed in compliance with the references of the manufacturer of the antibodies and in accordance with guidelines stated in the guidance on immunohistochemical studies [8, 13]. Before the immunohistochemical staining performance the prepared sections were dewaxed and tissue-specific antigens were disclosed in PT Link module (Dako, Denmark), in a citrate buffer (pH 6.0) at the temperature 95°C for 60 min. Then endogenous peroxidase was blocked up with H₂O₂ 3% solution; the protein block was prepared by serum. Next, the obtained

тигенов 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% раствором H_2O_2 , проводили протеиновый блок сывороткой. Далее инкубировали полученные срезы с антителами к Actin, Muscle Specific Ab-4 (HHF35); к Desmin 43/GJA1 (клон D33, mouse monoclonal, DAKO, Дания) и к Connexin 43/GJA1 (Rabbit polyclonal, ABCAM, США). Для иммунного окрашивания использовали полимерную систему детекции с пероксидазной меткой (EnVision FLEX, DAKO, Дания). Завершающим этапом явилось докрасивание ядер клеток гематоксилином.

При оценке содержания актина, десмина и коннексина 43 площадь DAB-позитивных продуктов иммуногистохимической реакции анализировали как процент площади изображения с помощью микроскопа (C. Zeiss Axio Scope. A1 с фотокамерой AxioCam MRc5) и программного обеспечения ZEN blue (C. Zeiss). Каждый параметр просчитывали по 35 изображениям с увеличением 40×10 с помощью статистической программы STATISTICA 10.0 (StatSoft, Inc., США), графическое представление данных — при помощи программ STATISTICA и Microsoft Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При световой микроскопии срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, наблюдали сладжирование эритроцитов в сосудах микроциркуляторного русла, а также в мелких артериях и венах. Отмечали развитие периваскулярного и межмышечного отека. В ряде полей зрения был отек стенок интрамуральных артерий, при этом большая часть артерий находилась в состоянии пареза; вены были расширенными, полнокровными. При исследовании кардиомиоцитов выявляли их набухание в сочетании с неравномерной окраской цитоплазмы. Кроме того, в отдельных полях зрения имело место исчезновение поперечной исчерченности кардиомиоцитов и отсутствие ядер. Некробиотически измененные мышечные волокна имели более яркую эозинофильную окраску; отмечена инфильтрация нейтрофильными лейкоцитами кардиомиоцитов в зоне ишемии (рис. 1).

При проведении поляризационной микроскопии срезов миокарда наблюдали формирование в кардиомиоцитах анизотропии различной выраженности за счет контрактур I, II и III степени. Были выявлены кардиомиоциты, в которых на протяжении нескольких сегментов отсутствовала анизотропия, что было связано с начав-

sections were incubated with Actin, Muscle Specific Ab-4 (HHF35) antibodies; Desmin 43/GJA1 (клон D33, mouse monoclonal, DAKO, Denmark) antibodies; and Connexin 43/GJA1 (Rabbit polyclonal, ABCAM, USA) antibodies. The polymeric detection system with peroxidase marking (EnVision FLEX, DAKO, Denmark) was used for the immune staining. The closing stage was the counterstaining of cell nuclei with hematoxylin.

The value of actin, desmin, and connexin 43 being estimated, the area of DAB-positive products of the immunohistochemical reaction was analyzed as the area percentage of the image by the microscope (C. Zeiss Axio Scope.A1 with photocamera AxioCam MRc5) and software ZEN blue (C. Zeiss). Every parameter was calculated according to 35 images with 40×10 magnification with the use of the statistical program STATISTICA 10.0 ("StatSoft", Inc., USA), data graphic presentation was done by STATISTICA and Microsoft Excel 2010 programs.

RESULTS AND DISCUSSION

When performing the light microscopy of the sections stained by hematoxylin and eosin, the erythrocyte sludging in the vessels of microcirculatory bed as well as in small arteries and veins was observed. The developing perivascular and intermuscular edema was revealed. In some visual fields there was the edema of the walls of intramural arteries, at that most arteries were in paresis; veins were dilated and full-blooded. Cardiomyocytes being studied, their swelling in conjunction with the irregular cytoplasm coloration was revealed. Besides, in some visual fields there was the vanishing of the cross striation of cardiomyocytes and lack of nuclei. The necrobiotic changes of the muscular fiber had a brighter eosinophil coloration; cardiomyocyte infiltration with neutrophilic leucocytes was noted (Fig. 1).

When performing the polarized microscopy of the myocardium sections, the formation of anisotropies of different intensity at the expense of contractions of I, II and III degree in cardiomyocytes was observed. Cardiomyocytes with the lack of anisotropy for the space of several segments were revealed that was related to the beginning myocytolysis. In some visual fields the appearance of anisotropic clumps alternating with the sites lacking anisotropy in the absence thereof cross striation was noted in the individual cardiomyocytes. The described changes were due to the focal mosaic lysis and clumpy patholysis of cardiomyocyte myofibrils.

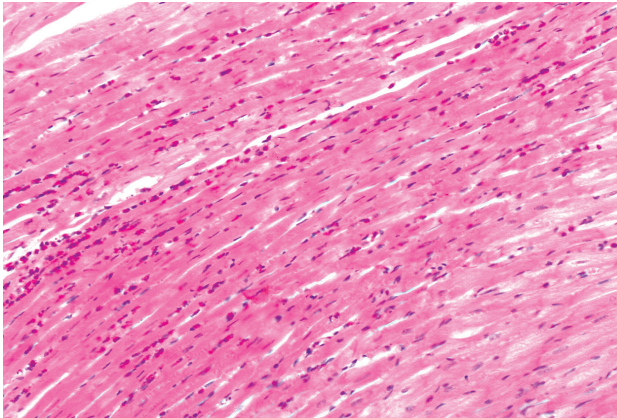


Рис. 1. Метахромазия кардиомиоцитов, инфильтрация нейтрофильными лейкоцитами, отек стромы. Инфаркт миокарда. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение (ув.) 100
Fig. 1. Cardiomyocyte metachromasia, infiltration by neutrophilic leukocytes, stroma edema. Myocardial infarction. Staining by hematoxylin and eosin. Magnification (mg.) 100

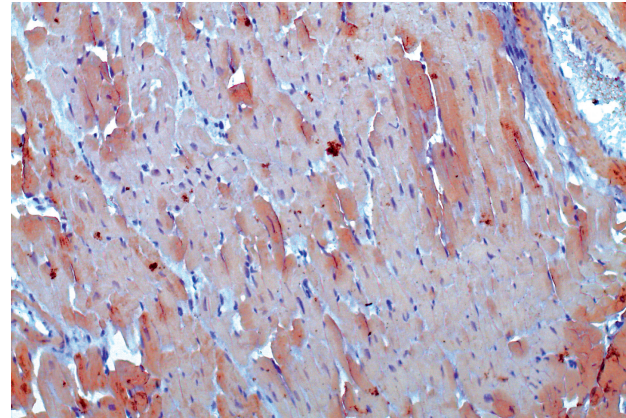


Рис. 2. Снижение экспрессии актина в зоне ишемии миокарда, отек стромы. Острая коронарная недостаточность. Иммуногистохимическое исследование (ИГХ). Актин. Ув. 200
Fig. 2. Actin expression decrease in the myocardial ischemia area, stroma edema. Acute coronary insufficiency. Immunohistochemical investigation (IHI). Actin. Mg. 200

шимся миоцитоллизисом. В ряде полей зрения в отдельных кардиомиоцитах отмечали появление анизотропных глыбок, чередующихся с участками, лишенными анизотропии, при отсутствии поперечной исчерченности. Описанные изменения были обусловлены очаговым мозаичным лизисом и глыбчатым распадом миофибрилл кардиомиоцитов.

Актин является глобулярным белком, формирующим цитоскелет кардиомиоцитов, участвует в образовании актомиозиновых комплексов саркомеров, как основной сократительный элемент миокарда [14]. Актин присутствует преимущественно в цитоплазме, но в небольшом количестве обнаруживается и в ядрах клеток.

При обзорной микроскопии срезов, окрашенных иммуногистохимически для выявления актина, в ряде полей зрения была отмечена гетерогенность повреждения кардиомиоцитов. При оценке структуры кардиомиоцитов отмечали наличие участков неравномерной окраски цитоплазмы клеток. Поперечная исчерченность поврежденных клеток была нечеткой, размытой, плохо визуализировалась, одновременно наблюдали снижение экспрессии актина в цитоплазме клеток (рис. 2).

Клеточный белок десмин играет важную роль в сохранении структуры сердечных клеток и нормального обеспечения сокращения во время систолы и диастолы [15, 16]. Десмин экспрессирован в области вставочных дисков и Z-линий саркомера, он участвует в объединении миофибрилл между собой, а также с постсинапти-

Actin is the globular protein forming the cytoskeleton of cardiomyocytes and takes part in actomyosin complexes of sarcomeres formation as the basic contractile element of myocardium [14]. Actin is present primarily in cytoplasm, but some amount is revealed in cell nuclei too.

In observation microscopy of sections stained immunohistochemically for actin revealing the heterogeneity of cardiomyocyte injury was noted in some visual fields. The cardiomyocyte structure being evaluated, the presence of sites with the irregular cytoplasm coloration was noted. Cross striation of the damaged cells was indeterminate, fuzzy, poorly visualized at the same time the decrease of actin expression in cell cytoplasm was observed (Fig. 2).

Cellular protein desmin plays an important role in structure preservation of the cardiac cells and regular contraction support during systole and diastole [15, 16]. Desmin is expressed in the area of intercalated disks and Z-lines of a sarcomere; it takes part in myofibril union between each other as well as with postsynaptic sites with outer membrane and cell nucleus, mitochondria and other cellular organelles [15–17].

Microscopy of the sections stained immunohistochemically for desmin revealing done, one observed sharply expressed cytoplasm metachromatism of cardiomyocytes that was visualized as the presence of sites intensively stained and poorly absorbing the pigment in which the cross striation was not observable. Intercalated disks in the

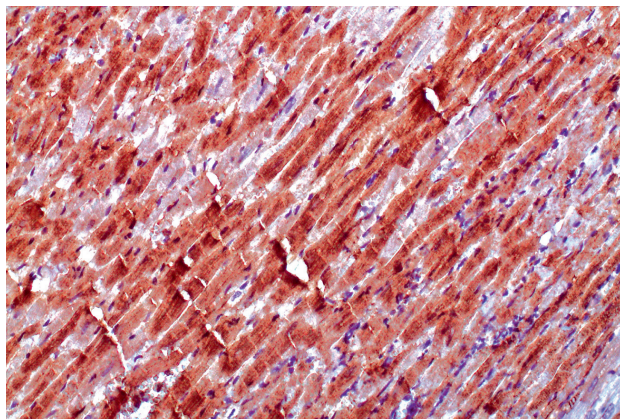


Рис. 3. Гомогенизация цитоплазмы, отсутствие поперечной исчерченности и вставочных дисков кардиомиоцитов. Инфаркт миокарда. ИГХ. Десмин. Ув. 200

Fig. 3. Cytoplasm homogenization, lack of cross striation and intercalated disks of cardiomyocytes. Myocardial infarction. IHI. Desmin. Mg. 200.

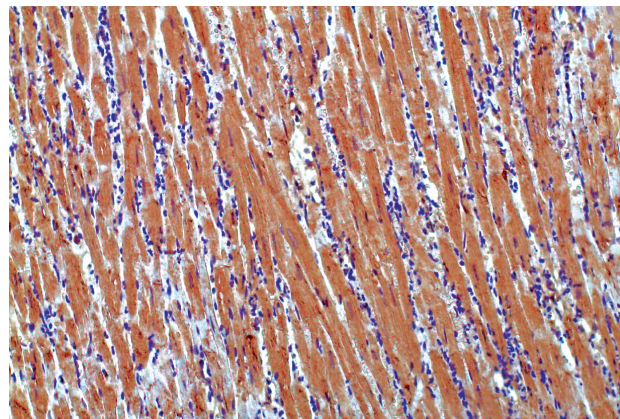


Рис. 4. Отсутствие поперечной исчерченности и вставочных дисков кардиомиоцитов, отек стромы, инфильтрация нейтрофильными лейкоцитами. Инфаркт миокарда. ИГХ. Коннексин 43. Ув. 200

Fig. 4. Lack of cross striation and intercalated disks of cardiomyocytes, stroma edema, infiltration by neutrophilic leukocytes. Myocardial infarction. IHI. Connexin 43. Mg. 200.

ческими участками, с наружной мембраной и ядром клетки, митохондриями и другими клеточными органеллами [15–17].

При микроскопии срезов, окрашенных иммуногистохимически для выявления десмина, отмечали резко выраженную метакромазию цитоплазмы кардиомиоцитов, которая визуализировалась в виде наличия участков, интенсивно окрашенных и слабо воспринимающих краситель, в которых поперечная исчерченность была не различима. Вставочные диски в пределах исследуемого среза не определялись. В отдельных местах среза встречали кардиомиоциты с умеренно сохранившейся окраской цитоплазмы и поперечной исчерченностью клеток. В некоторых полях зрения наблюдалась фрагментация кардиомиоцитов, при этом особенно отчетливой была гетерогенность окрашивания клеток (рис. 3). Отдельные кардиомиоциты выглядели набухшими, другие были истончены. В отдельных полях зрения имела место инфильтрация нейтрофильными лейкоцитами.

Исследуемый клеточный белок коннексин 43 является мембранным белком из семейства белков щелевых контактов, он участвует в обеспечении бесперебойного функционирования миокарда путем передачи синхронизированного электрического импульса по клеточным цепочкам, что важно для органоспецифической функции сердца, связанной с автоматизмом работы этого органа [7, 5, 18].

При патоморфологической оценке срезов, окрашенных с использованием иммуногистохи-

limit of a studied section were not defined. In the separate areas of the section the cardiomyocytes with moderately preserved cytoplasm coloration and cross striation of the cells were noted. In some visual fields cardiomyocyte fragmentation was observed, at that heterogeneity of cell staining was especially distinct (Fig. 3). Some individual cardiomyocytes looked swollen others were thinned. In separate visual fields there was the infiltration with neutrophilic leucocytes.

The studied cellular protein connexin 43 is a membrane protein from the family of the gap junction proteins; it takes part in support of constant myocardium functioning by means of synchronized electric pulse transmission through cellular chains that is important for organo-specific function of the heart related to work automaticity of this body organ [7, 5, 18].

When the sections stained with the use of immunohistochemical method to visualize connexin 43 being estimated pathomorphologically, microscopy at low magnification allowed observing the decrease, shortening or incomplete staining of intercellular areas of the cardiomyocyte contact in the field of intercalated disks. Along with the described changes one noted the cytoplasm staining of cardiomyocyte groups in brown color caused by connexin 43 accumulation in cell cytoplasm, the cross striation decrease of cardiomyocytes and cytoplasm homogenization (Fig. 4).

When the microscopic study of myocardium sections stained immunohistochemically for ac-

мической методики с целью визуализации коннексина 43, микроскопия на малом увеличении позволяла наблюдать уменьшение, укорочение или неполное окрашивание межклеточных зон контакта кардиомиоцитов в области вставочных дисков. Наряду с описанными изменениями были отмечены окрашивание цитоплазмы групп кардиомиоцитов в коричневый цвет, обусловленное накоплением коннексина 43 в цитоплазме клеток; снижение поперечной исчерченности кардиомиоцитов и гомогенизация цитоплазмы (рис. 4).

При проведении микроскопического исследования срезов миокарда, окрашенных иммуногистохимически для выявления актина и десмина в кардиомиоцитах, обращала на себя внимание гетерогенность повреждения клеток, что свидетельствует о различной степени выраженности ишемического повреждения клеток. Эти данные позволяют заключить, что актин и десмин играют важную роль не только как клеточные белки, обеспечивающие макромолекулярную структуру кардиомиоцитов, но и отражают сохранение пула жизнеспособных клеток в процессе их выживаемости в условиях ишемического воздействия.

При оценке срезов миокарда, окрашенных с целью выявления десмина, наряду со снижением экспрессии этого клеточного белка в цитоплазме кардиомиоцитов в местах Z-линий, отмечали отсутствие экспрессии десмина в местах вставочных дисков.

При острой ишемии одними из первых реагируют на повреждающее воздействие клеточные мембраны, и только на следующем этапе альтерации происходит активация протеаз, приводящая к повреждению цитоскелета, выполняющего связующую роль между плазматической мембраной и внутренним содержимым клетки [15]. На плазматической мембране прилежащих друг к другу клеток локализуются межклеточные контакты, которые, наряду с механическим соединением кардиомиоцитов, обеспечивают связь биологических процессов, протекающих в них, способствуют интеграции метаболической активности и развитию клетки, а также осуществляют синхронизацию физиологической деятельности кардиомиоцитов [19]. Это становится возможным за счет обеспечения обмена молекулами через каналы — коннексоны, имеющиеся в щелевых контактах и образуемые шестью белками-коннексинами [8].

Снижение экспрессии коннексина 43 в области вставочных дисков кардиомиоцитов, а так-

тин and desmin revealing in cardiomyocytes being performed, the heterogeneity of cell damage drew our attention being the evidence of various degrees of manifestation of the ischemic cell injury. These findings allow making a conclusion that actin and desmin play not only an important role as cellular proteins providing the cardiomyocyte macromolecular structure but reflect conservation of the pool of viable cells during their survival under ischemic affecting.

Estimating the myocardium sections stained in order to reveal desmin along with expression decrease of this cellular protein in cardiomyocyte cytoplasm at the sites of Z-lines the lack of desmin expression at the sites of intercalated disks was noted.

In acute ischemia they are among the first that respond to the cellular membrane injury and only at the next stage of alternation the protease activation resulting in the injury of cytoskeleton performing the linking role between plasmatic membrane and inner cell contents emerges [15]. On the plasmatic membrane of the adjacent cells the intercellular contacts providing the interrelation of biological processes taking place in cardiomyocytes together with the mechanical cardiomyocyte connection are localized, they contribute to the integration of metabolic activity and cell development as well as accomplish the synchronizing of physiological cardiomyocyte activity [19]. It is possible at the expense of the providing of molecular interchange between canals — connexons presenting in the gap junctions and formed by six connexin-proteins [8].

The decrease of connexin 43 expression in the field of cardiomyocyte intercalated disks as well as its accumulation in cell cytoplasm can be explained by the disturbance of the processes of metabolism support and connexin 43 degradation. In ischemic cardiomyocytes the decrease of connexin 43 expression takes place and at the same time the process abnormality of cellular protein phosphorylation is accompanied by the accumulation of nonphosphorylated connexin 43 in cardiomyocyte cytoplasm.

CONCLUSION

The use of immunohistochemical staining of cardiac muscle sections is highly informative morphological analysis technique permitting to evaluate the abnormality nature of macromolecular structure of cardiomyocytes. The immunohistochemical staining study of the myocardium substantially

же его накопление в цитоплазме клеток можно объяснить нарушением процессов обеспечения метаболизма и деградации коннексина 43. В ишемизированных кардиомиоцитах происходит уменьшением экспрессии коннексина 43 в области вставочных дисков, при этом процесс нарушения фосфорилирования клеточного белка сопровождается накоплением нефосфорилированного коннексина 43 в цитоплазме кардиомиоцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование иммуногистохимической окраски срезов сердечной мышцы является высокоинформативным методом морфологического анализа, позволяющим оценить характер нарушений макромолекулярной структуры кардиомиоцитов. Иммуногистохимическое исследование миокарда в значительной степени дополняет данные, полученные при световой и поляризационной микроскопии в ходе морфологической оценки острых очаговых повреждений миокарда. Визуализация состояния структуры миокарда

supplements the findings obtained in the light and polarized microscopy in the course of morphological diagnostics of acute focal myocardial injuries. The visualization of the myocardium structure with the use of immunohistochemical investigation with the revealing of actin, desmin and connexin 43 can be applied in forensic-medical or pathological practice in cases of sudden cardiac death.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

с использованием иммуногистохимического исследования с выявлением актина, десмина и коннексина 43 может быть использована в судебно-медицинской или патолого-анатомической практике в случаях внезапной сердечной смерти.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Максимов В.Н., Куликов И.В., Устинов С.Н. и др. Ассоциация полиморфизма гена SREBF2 с внезапной сердечной смертью // Бюл. Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. 2011. Т. 31, № 5. С. 14–18.
2. Кактурский Л.В., Рыбакова М.Г., Кузнецова И.А. Внезапная сердечная смерть (морфологическая диагностика). СПб.: ГПAB, 2008. Вып. 100. 80 с.
3. Непомнящих Л.М. Морфогенез важнейших общепатологических процессов в сердце. Новосибирск: Наука, 1991. 352 с.
4. Rubin E., Farber J.L. Pathology. Philadelphia; New York: Lippincott-Raven Publishers, 1999. P. 577–581.
5. Лушникова Е.Л., Непомнящих Л.М. Методика количественного морфологического анализа острых очаговых повреждений и инфаркта миокарда // Бюл. эксперимент. биологии и медицины. 1998. Т. 125, № 1. С. 112–115.
6. Резник А.Г. Судебно-медицинская оценка патоморфологических изменений сердца и биохимических показателей перикардиальной жидкости при смерти от различных причин: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. СПб., 2009. 37 с.
7. Целлариус Ю.Г., Семенова Л.А., Непомнящих Л.М. Очаговые повреждения и инфаркт миокарда: Световая, поляризационная и электронная микроскопия. Методические разработки по патологической анатомии. Новосибирск: СО АМН СССР, 1980. 72 с.
8. Butkevich E. Submembrane cytoskeleton-regulated assembly and functional activity of gap junctions. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten der Georg-August-Universität zu Göttingen, 2004. 82 p.

REFERENCES

1. Maksimov V.N., Kulikov I.V., Ustinov S.N. (2011). Association of gene polymorphism SREBF2 with sudden cardiac death. *Bulletin of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences*, 31 (5), 14–18.
2. Kakturskiy L.V., Rybakova M.G., Kuznetsova I.A. (2008). *Sudden Cardiac Death (Morphological Diagnostics)*. St. Petersburg, 100, 80 p. In Russ.
3. Nepomnyashchih L.M. (1991). *Morphogenesis of the Most Important General Pathologic Processes in the Heart*. Novosibirsk, 352 p. In Russ.
4. Rubin E., Farber J.L. (1999). *Pathology*. Philadelphia; New York: Lippincott-Raven Publishers, pp. 577–581.
5. Lushnikova E.L., Nepomnyashchich L.M. (1998). Quantitative morphological analysis of acute focal damage and myocardial infarction. *Bull. of Experimental Biology and Medicine*, 125 (1), 112–115.
6. Reznik A.G. (2009). Forensic-medical assessment of pathomorphological changes of the heart and biochemical indices of pericardial fluid in death from different causes: Abstract of theses ... Dr. Sci. (Med.). St. Petersburg, 37 p. In Russ.
7. Tsellarius Y.G., Semenova L.A., Nepomnyashchich L.M. (1980). *Focal Injuries and Myocardial Infarction: Light, Polarized and Electronic Microscopy. Methodic Elaborations on Pathologic Anatomy*. Novosibirsk, 72 p. In Russ.
8. Butkevich E. (2004). Submembrane cytoskeleton-regulated assembly and functional activity of gap junctions. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten der Georg-August-Universität zu Göttingen, 82.

9. Herman D.S., Lam L., Taylor M.R. et al. Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy // *N. Engl. J. Med.* 2012. Vol. 336 (7). P. 619–628.
10. Куприянова А.Г., Белецкая Л.В., Зайденев В.А. и др. Оценка состояния макромолекулярной структуры кардиомиоцитов у больных различными формами кардиомиопатии // *Вестн. трансплантологии и искусственных органов.* 2012. Т. 14, № 2. С. 32–42.
11. Савченко С.В., Новоселов В.П., Морозова А.С. и др. Экспрессия десмина в миокарде при экспериментальном моделировании острой ишемии // *Вестн. судебной медицины.* 2016. Т. 5, № 4. С. 24–28.
12. Савченко С.В., Новоселов В.П., Гребенщикова А.С. и др. Морфологическая диагностика острых очаговых повреждений миокарда с использованием иммуногистохимического исследования // *Сиб. мед. вестн.* 2018. № 4. С. 43–46.
13. Петров С.В., Райхлин Т.Н. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. 4-е изд., перераб. и доп. Казань: DESIGN studio “RED”, 2012. 624 с.
14. Dos Remedios C.G., Chhabra D., Kekic M. et al. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments // *Physiol. Rev.* 2003. Vol. 83 (2). P. 433–473.
15. Bär H., Strelkov S.V., Sjöberg G., Aebi U., Herrmann H. The biology of desmin filaments: how do mutations affect their structure, assembly, and organisation? // *J. Struct. Biol.* 2004. Vol. 148 (2). P. 137–152.
16. Radu R.I., Bold A., Pop T.O. et al. Histological and immunohistochemical changes of the myocardium in dilated cardiomyopathy // *Rom. J. Morphol. Embryol.* 2012. Vol. 53 (2). P. 269–275.
17. Shah S.B., Davis J., Weisleder N. et al. Structural and functional roles of desmin in mouse skeletal muscle during passive deformation // *Biophys. J.* 2004. Vol. 86 (5). P. 2993–3008.
18. Antunes E., Borrecho G., Oliveira P. et al. Immunohistochemical evaluation of cardiac connexin43 in rats exposed to low-frequency noise // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2013. Vol. 6. P. 1874–1879.
19. Baranova A., Ivanov D., Petrash N. et al. The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins // *Genomics.* 2004. Vol. 83 (4). P. 706–716.
9. Herman D.S., Lam L., Taylor M.R. et al. (2012). Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.*, 336 (7), 619–628.
10. Kupriyanova A.G., Beletskaya L.V., Zaydenov V.A. et al. (2012). Evaluation of the macromolecular structure of cardiac myocytes in patients with various forms of cardiomyopathy. *Russ. J. of Transplantology and Artificial Organs*, 14 (2), 32–42.
11. Savchenko S.V., Novoselov V.P., Morozova A.S. et al. (2016). Desmin expression in myocardium in experimental modeling of acute ischemia. *Bulletin of Forensic Medicine*, 5 (4), 24–28. In Russ.
12. Savchenko S.V., Novoselov V.P., Grebenshchikova A.S. et al. (2018). Morphological diagnostics of acute focal damage of the use of immunohistochemical studies. *Siberian Medical Bull.*, 4, 43–46.
13. Petrov S.V., Rayhlin T.N. (ed.) (2012). *Manual on Immunohistochemical Diagnostics of Human Tumors.* Kazan, 624 p. In Russ.
14. Dos Remedios C.G., Chhabra D., Kekic M. et al. (2003). Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol. Rev.*, 83 (2), 433–473.
15. Bär H., Strelkov S.V., Sjöberg G., Aebi U., Herrmann H. (2004). The biology of desmin filaments: how do mutations affect their structure, assembly, and organisation? *J. Struct. Biol.*, 148 (2), 137–152.
16. Radu R.I., Bold A., Pop T.O. et al. (2012). Histological and immunohistochemical changes of the myocardium in dilated cardiomyopathy. *Rom. J. Morphol. Embryol.*, 53 (2), 269–275.
17. Shah S.B., Davis J., Weisleder N. et al. (2004). Structural and functional roles of desmin in mouse skeletal muscle during passive deformation. *Biophys. J.*, 86 (5), 2993–3008.
18. Antunes E., Borrecho G., Oliveira P. et al. (2013). Immunohistochemical evaluation of cardiac connexin 43 in rats exposed to low-frequency noise. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 6, 1874–1879.
19. Baranova A., Ivanov D., Petrash N. et al. (2004). The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. *Genomics*, 83 (4), 706–716.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Савченко Сергей Владимирович — д-р мед. наук, профессор, заведующий курсом судебной медицины кафедры судебной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Новоселов Владимир Павлович — д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой судебной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; начальник ГБУЗ НСО «Новосибирское областное клиническое бюро судебно-медицинской экспертизы».

Скребов Роман Владимирович — аспирант кафедры судебной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

ABOUT THE AUTHORS

Savchenko Sergey Vladimirovich — Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of Forensic Medicine Course of the Forensic Medicine Department, Novosibirsk State Medical University.

Novoselov Vladimir Pavlovich — Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Forensic Medicine Department, Novosibirsk State Medical University; Head of the Novosibirsk Regional Clinical Bureau of Forensic Medical Examination.

Skrebov Roman Vladimirovich — Post-graduate Student of the Forensic Medicine Department, Novosibirsk State Medical University.

Grebenshchikova Alina Sergeyevna — Assistant of the Forensic Medicine Department, Novosibirsk State Medical University; Doctor — Forensic Medical Examiner of Forensic Histological Unit, Novosibirsk Regional Clinical Bureau of Forensic Medical Examination.

Гребенщикова Алина Сергеевна — ассистент кафедры судебной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; врач — судебно-медицинский эксперт судебно-гистологического отделения ГБУЗ НСО «Новосибирское областное клиническое бюро судебно-медицинской экспертизы».

Грицингер Валентина Александровна — канд. мед. наук, старший преподаватель кафедры судебной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; врач — судебно-медицинский эксперт судебно-гистологического отделения ГБУЗ НСО «Новосибирское областное клиническое бюро судебно-медицинской экспертизы».

Агеева Татьяна Августовна — д-р мед. наук, профессор кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет»; заведующий патолого-анатомическим отделением ГБУЗ НСО «Городская клиническая больница № 2» (Новосибирск).

Воронина Евгения Игоревна — канд. мед. наук, ассистент кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет»; врач-патологоанатом ГБУЗ НСО «Городская клиническая больница № 1» (Новосибирск).

Казанская Галина Михайловна — канд. биол. наук, старший научный сотрудник патолого-анатомического отделения ФГБУ «Новосибирский медицинский исследовательский центр им. академика Е. Н. Мешалкина» Минздрава России.

Овсянко Елена Владимировна — д-р мед. наук, профессор кафедры анатомии человека ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Образец цитирования: Савченко С.В., Новоселов В.П., Скребов Р.В., Гребенщикова А.С., Грицингер В.А., Агеева Т.А., Воронина Е.И., Казанская Г.М., Овсянко Е.В. Оценка изменений белков миокарда при острой ишемии по данным иммуногистохимического исследования // Journal of Siberian Medical Sciences. 2019. № 3. С. 95–104.

Gritsinger Valentina Aleksandrovna — Cand. Sci. (Med.), Senior Teacher of the Forensic Medicine Department, Novosibirsk State Medical University; Doctor — Forensic Medical Examiner of Forensic Histological Department, Novosibirsk Regional Clinical Bureau of Forensic Medical Examination.

Ageyeva Tatyana Avgustovna — Dr. Sci. (Med.), Professor of the Pathologic Anatomy Department, Novosibirsk State Medical University; Head of the Pathologic Anatomical Department, City Clinical Hospital No. 2, Novosibirsk.

Voronina Evgeniya Igorevna — Cand. Sci. (Med.), Assistant of the Pathologic Anatomy Department, Novosibirsk State Medical University; Mortal Anatomist City Clinical Hospital No. 1, Novosibirsk.

Kazanskaya Galina Mikhailovna — Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher of the Pathologic Anatomical Department, Novosibirsk Medical Research Center named after Academician E.N. Meshalkin.

Ovsyanko Elena Vladimirovna — Dr. Sci. (Med.), Professor of the Human Anatomy Department, Novosibirsk State Medical University.

Citation example: Savchenko S.V., Novoselov V.P., Skrebov R.V., Grebenshchikova A.S., Gritsinger V.A., Ageyeva T.A., Voronina E.I., Kazanskaya G.M., Ovsyanko E.V. (2019). Evaluation of protein changes of the myocardium in acute ischemia according to the immunohistochemical study. *Journal of Siberian Medical Sciences*, 3, 95–104.