

Б.О. Надрага
А.М. Ященко
О.Д. Луцик

Львівський національний
медичний університет імені Да-
нила Галицького

Надійшла: 11.01.2019

Прийнята: 14.02.2019

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2019.1.32-37>

УДК: 611.132.2:616.127-005.8:577.121.7]-092.9

МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ОСОБЛИ- ВОСТІ СТІНКИ СЕРЦЯ ЩУРА ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ІНФАРКТІ МІОКАРДА

Nadruga B.O., Yashchenko A.M. ✉, Lutsyk A.D.  ✉ Morphofunctional peculiarities of the rat heart in experi-
mental myocardial infarction.

Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

ABSTRACT. Background. For better understanding of the nature of myocardial infarction and processes occurring in the myocardium during this acute process in order to develop more effective methods for its prevention and treatment, further experimental studies are needed. **Objective.** The aim of present investigation was to study morphofunctional and histochemical characteristics of the rat heart muscle under the conditions of experimental myocardial infarction. **Methods.** Experiments were carried out on 20 mature male Wistar rats weighing 180-220 g (5 control and 15 experimental animals). Acute myocardial infarction was induced by subcutaneous injection of 0.1% adrenaline solution in a dose of 0.2 ml per 100 g of body weight. 48 hours after administration of adrenaline, rats were subjected to euthanasia by overdose of ethyl aether. For monitoring the heart attack levels of aspartataminotransferase (AST), lactatdehydrogenase (LDH) and creatinfosphokinase (KFK) were estimated in blood serum of control and experimental rats 24 hours post adrenalin administration. **Results.** Biochemical studies of AST, LDH and KFK showed a significant increase of these enzymes activities in the experimental group animals. In particular, AST level increased 3.5 times, LDH – 2.7 times, KFK – 2.3 times in comparison with control group rats. 48 hours pos adrenalin administration it was documented local degenerative changes in cardiomyocytes, including cellular oedema, nuclear picnosis, disaggregation of myofibrils and destructive changes of intercalated disks. In the arterioles it was detected aggregation of blood cells and their adhesion to endothelium. Histochemical studies showed a decreased PAS-reactivity of intercalated discs accompanied with enhanced PAS labeling of areriolar internal elastic membrane and exposure of PAS-reactivity in the areas of necrotized cardiomyocytes adjusting blood vessels. Moreover, the accumulation of sulfated glycosoaminoglycan deposits was characteristic for vascular adventitia in experimental group animals. **Conclusion.** Our investigation revealed a significant increase in the blood serum levels of marker enzymes (AST, LDH and KFK) in the adrenalin-induced experimental myocardial infarction. Detected formation of leukocyte-erythrocyte blood clots apparently caused the disruption of blood supply and, consequently, dystrophic changes in cardiomyocytes, i.e. intercalated disks destruction, disorganization of myofibrils, oedematic conditions in stroma, the accumulation of PAS-positive material around necrotizing cardiomyocytes and sulfated glycosaminoglycans around the blood vessels.

Key words: experimental adrenalin-induced myocardial infarction, rats, morpho-histochemical characteristics, marker enzymes.

Citation:

Nadruga BO, Yashchenko AM, Lutsyk AD. [Morphofunctional peculiarities of the rat heart in experimental myocardial infarction]. *Morphologia*. 2019;13(1):32-7. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2019.1.32-37>

 Lutsyk A.D. 0000-0001-6819-804X

✉ yashchenko_am@ukr.net; lutsykalexander@gmail.com

© SI «Dnipropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Health of Ukraine», «Morphologia»

Вступ

Одна з найважливіших проблем здоров'я населення України – хвороби системи кровообігу. Значна розповсюдженість, висока смертність та інвалідизація населення внаслідок хвороб системи кровообігу ставлять їх діагностику, профілактику та лікування в один ряд з найбільш актуальними медико-соціальними проблемами [1, 2].

Щорічно у світі від серцево-судинних захворювань помирають понад 7 мільйонів людей, що становить 12,8% усіх смертей. Кожен шостий чоловік та кожна сьома жінка в Європі помирає від інфаркту міокарда [3]. У США, за результатами епідеміологічного дослідження дорослого населення, поширеність ішемічної хвороби серця становить 7,3 %, тоді як в Україні, за даними

МОЗ такий показник становить 10,0 % [цит. за 1].

У структурі смертності від серцево-судинних захворювань перше місце займає інфаркт міокарда [4, 5]. Для більш глибокого розуміння суті інфаркту міокарда та процесів, що відбуваються у міокарді при цьому гострому ураженні та, відповідно, для розробки ефективних методів його профілактики та лікування, доцільними є експериментальні дослідження. Сьогодні існує багато експериментальних моделей інфаркту міокарда. Різниця у механізмах пошкодження і загибелі кардіоміоцитів при різних видах несприятливих чинників обумовлює неоднаковий характер реактивних змін як зі сторони паренхіми, так і стромы міокарда [6]. Враховуючи значну поширеність, великий відсоток смертності від серцево-судинної патології, нами проведено дане експериментальне дослідження.

Мета дослідження – вивчити морфофункціональні та гістохімічні особливості стінки серця за умов експериментального інфаркту міокарда.

Матеріали та 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 загальних 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 науково-дослідної роботи не виявлено (протокол №2 від 15.02.2016).

Гострий інфаркт (ішемію міокарда) викликали підшкірним введенням 0,1% розчину адреналіну в дозі 0,2 мл на 100 г маси тіла. Через 48 годин після введення адреналіну щурів піддавали евтаназії шляхом передозування етилового ефіру. У клінічній практиці поряд з електрокардіографією для підтвердження діагнозу інфаркту міокарда використовується визначення ферментних систем аспаргатамінотрансферази (АСТ), лактатдегідрогенази (ЛДГ) та креатинфосфокінази МВ-фракції (КФК-МВ), які є непрямими факторами, проте додатково підтверджують діагноз. Тому для моніторингу розвитку інфаркту/ішемії міокарда у щурів нами проведено визначення рівня активностей АСТ, ЛДГ та КФК-МВ в сироватці крові контрольних та експериментальних тварин. Дослідження виконувались на базі меди-

чної лабораторії ПП «ДіаВітаМед», м.Львів, (ліцензія МОЗ АЕ № 638768 від 11.06.2015). Визначення проводились з використанням реагентів фірми CORMAY (PZ Cormay, Poland) та автоматичного біохімічного аналізатора CORMAY ACCENT-200 (PZ Cormay, Poland).

Визначення АСТ проводили оптимізованим і модифікованим ферментативним кінетичним методом (без використання піридальфосфату), який базується на трансформації L-аспартату до малеату, вимірюючи швидкість зміни оптичної густини при довжині хвилі 340 нм, яка прямо пропорційна активності АСТ. В основі визначення ЛДГ лежить ензиматична реакція трансформації пірувату до лактату при дії ЛДГ. Швидкість зміни коефіцієнта поглинання, виміряна при $\lambda=340$ нм, прямо пропорційна активності лактатдегідрогенази. Для визначення КФК-МВ використано метод, який базується на застосуванні антитіл до КФК-М. Специфічні антитіла до КФК-М інгібують активність КФК-ММ (яка головним чином і визначає тотальну активність КФК) і субодиниці КФК-М ізофермента КФК-МВ. Вимірюється тільки активність КФК-В. Швидкість утворення NADPH вимірюється як зміна коефіцієнта поглинання при довжині хвилі 340 нм і прямо пропорційна половині активності СК-МВ (активність субодиниці В).

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. Для виявлення нейтральних полісахаридів проводили PAS-реакцію; сульфатовані глікозаміноглікани виявляли при зафарбовуванні зрізів альціановим синім (рН 2,5). Огляд та фотографування гістологічних препаратів проводили на мікроскопі «Granum», обладнаним камерою «Echoc-Imager 502000» з використанням програми «TourView 3.2».

Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали програмою SPSS 19. Розраховували медіану (Me), квантилі (Q₁, Q₃); достовірність відмінностей визначали за критеріями Манн-Уїтні. Міжгрупові відмінності вважалися достовірними при $p<0,05$.

Результати та їх обговорення

Біохімічні дослідження ферментів АСТ, ЛДГ та КФК у сироватці крові показали, що після введення щурам 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 (рис. 1-3).

Дослідження оглядових препаратів міокарда контрольних тварин показало, що серцевий м'яз має типову будову і утворений кардіоміоцитами з оксифільною цитоплазмою та слабобазофільними ядрами паличкоподібної форми. Кардіомі-

оцити з'єднуються за допомогою вставних дисків і формують м'язові волокна, у яких виявляються міофібрили. Між кардіоміоцитами присутні прошарки сполучної тканини з характерними для неї клітинними елементами та судинами мікроциркуляторного русла (Рис. 4 А). У міокарді дослідних тварин через 2 доби після введення адреналіну спостерігали 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 (Рис. 4 Б, В, Г). Подібні зміни при ішемії міокарда після введення адреналіну та інших моделях спостерігали [4, 6, 7].

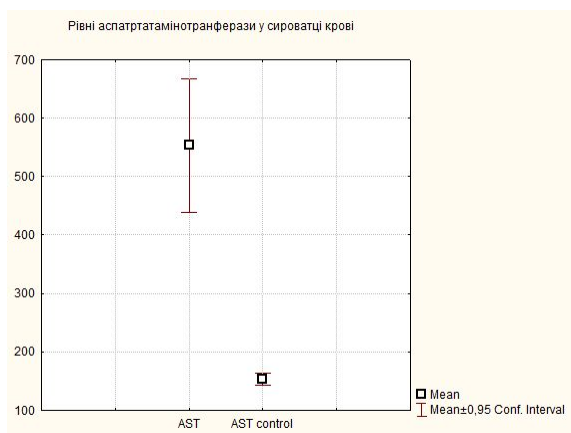


Рис. 1. Підвищення рівня АСТ у сироватці крові дослідних тварин у порівнянні з контролем.

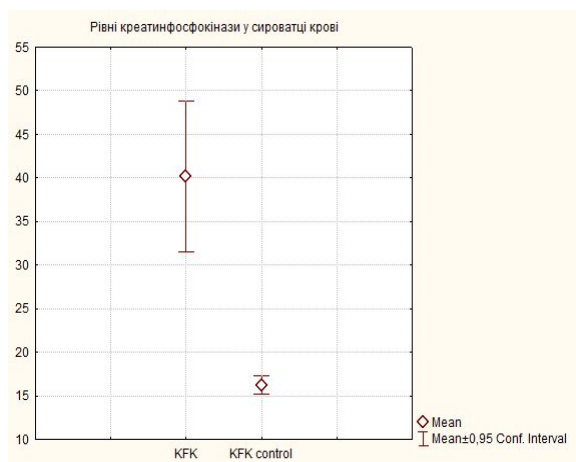


Рис. 2. Підвищення рівня КФК у сироватці крові дослідних тварин у порівнянні з контролем.

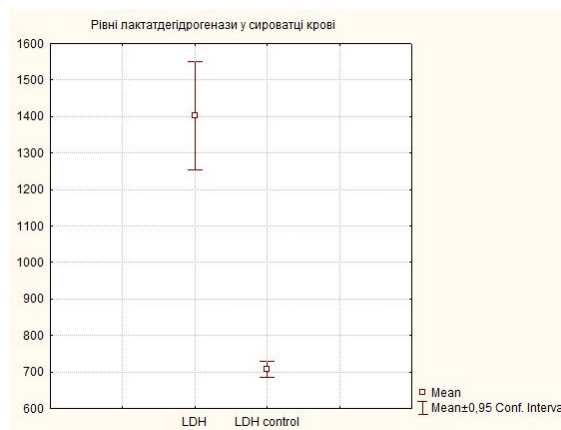


Рис. 3. Підвищення рівня ЛДГ у сироватці крові дослідних тварин у порівнянні з контролем.

Проведення PAS-реакції показало, що PAS-позитивний матеріал у міокарді контрольних щурів ідентифікується, в основному, у внутрішній оболонці стінки судин, формених елементах крові, навколо дрібних судин, а також у складі вставних дисків (Рис. 5 А, В). У міокарді дослідних тварин PAS-позитивний матеріал мав подібну локалізацію, але реакція була менш інтенсивною у вставних дисках, проте її інтенсивність істотно зростала у внутрішній еластичній мембрані артеріол та в ділянках некротизованих кардіоміоцитів навколо судин, що може бути обумовлено накопиченням глікогену (Рис. 5 Б, Г). Подібне нагромадження депозитів глікогену в ділянках локалізації некротизованих кардіоміоцитів при інфаркті міокарда спостерігали Кияк Ю.Г. і співавт. [8] з використанням методів електронної мікроскопії.

При зафарбовуванні гістологічних зрізів міокарда щурів контрольної та дослідної груп альціановим синім при рН 2,5, сульфатовані глікозаміноглікани були виявлені у волокнистих структурах адвентиційної оболонки судин; при цьому більш інтенсивна реакція була ідентифікована у дослідній групі тварин (Рис. 6 А, Б).

Морфологічні та гістохімічні зміни у міокарді згідно з даними літератури обумовлені високою концентрацією катехоламінів в кардіоміоцитах, що призводить до надмірного споживання ними кисню та змін проникності клітинних мембран, виражених порушень коронарної мікроциркуляції [9].

Морфологічні та електрофізіологічні дослідження міокарда після введення неселективних бета-2-адреностимуляторів підтвердили ідентичність картини некротичного ураження серця з інфарктом міокарда [10].

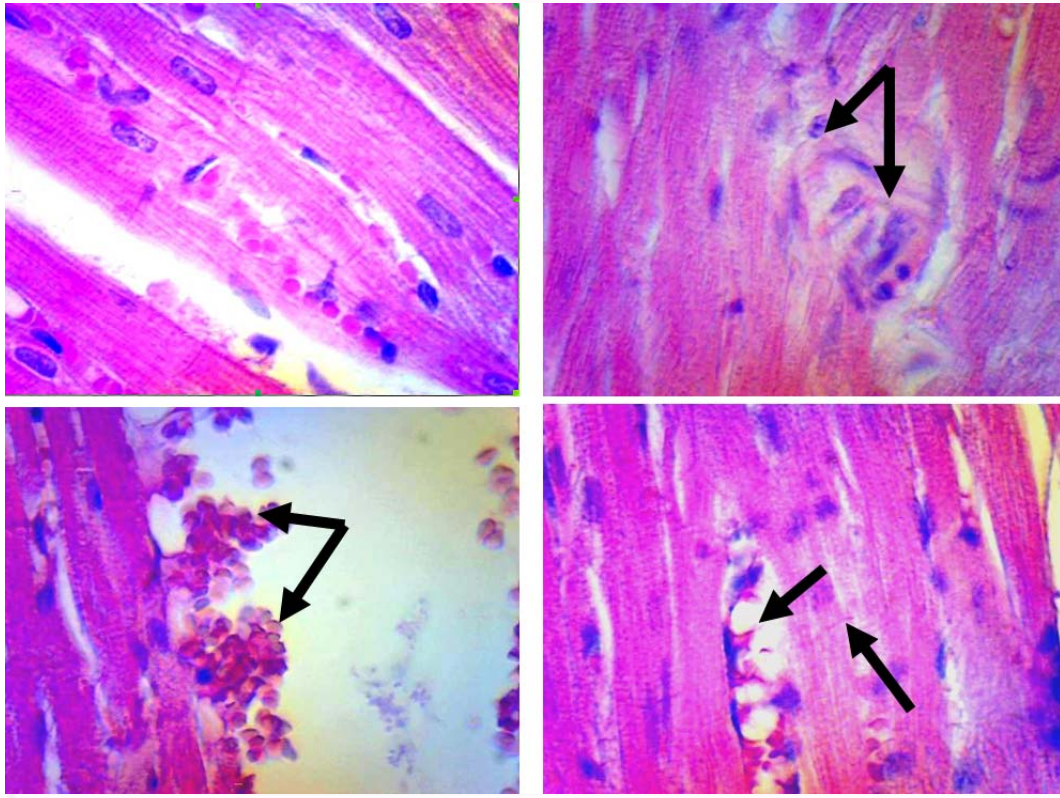


Рис. 4. Стінка серця щура (міокард). Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 600$. А – контроль, Б, В, Г – дослід. Б – деструктивні зміни кардіоміоцитів (стрілки); В – Лейкоцитарно-еритроцитарні тромби та їх адгезія до стінки судин (стрілки); Г – розширення просвіту гемокапілярів та деструктивні зміни вставних дисків (стрілки), набряк сполучної тканини.

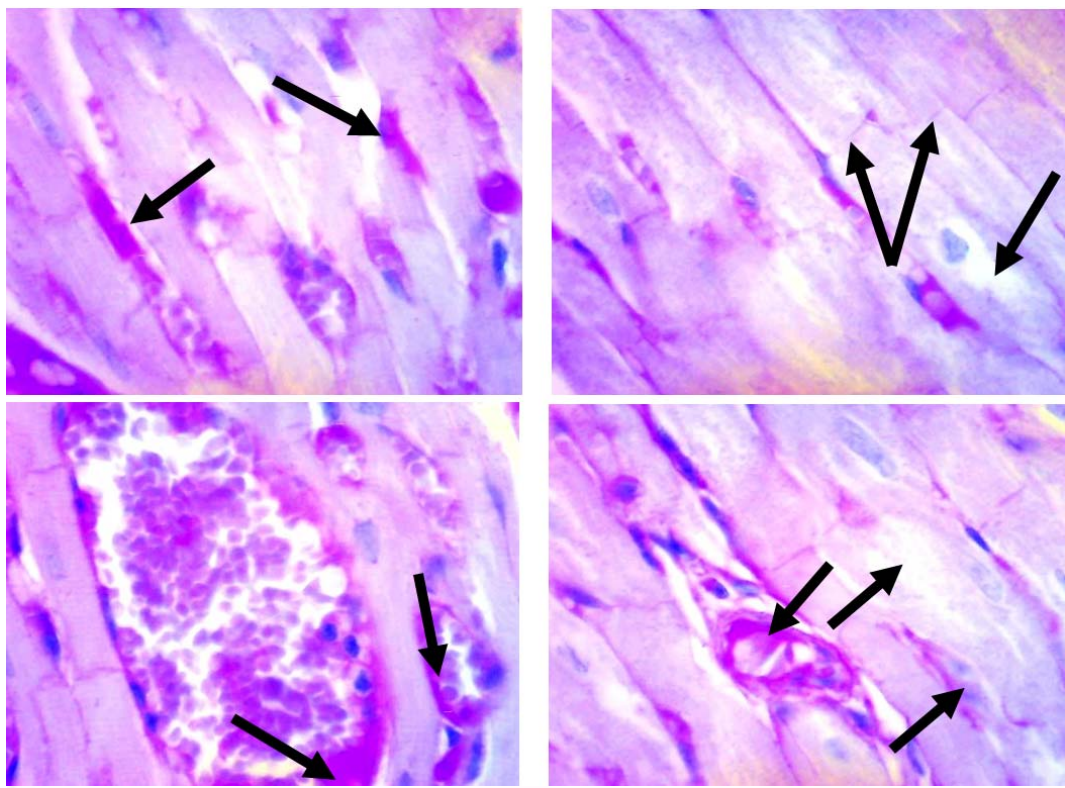


Рис. 5. Стінка серця щура (міокард). PAS-реакція. $\times 600$. А,В – контроль: PAS-позитивний матеріал в стінках судин мікроциркуляторного русла (стрілки); Б,Г – дослід: PAS-позитивний матеріал у стінках судин, вставних дисках; виражені деструктивні зміни (стрілки).

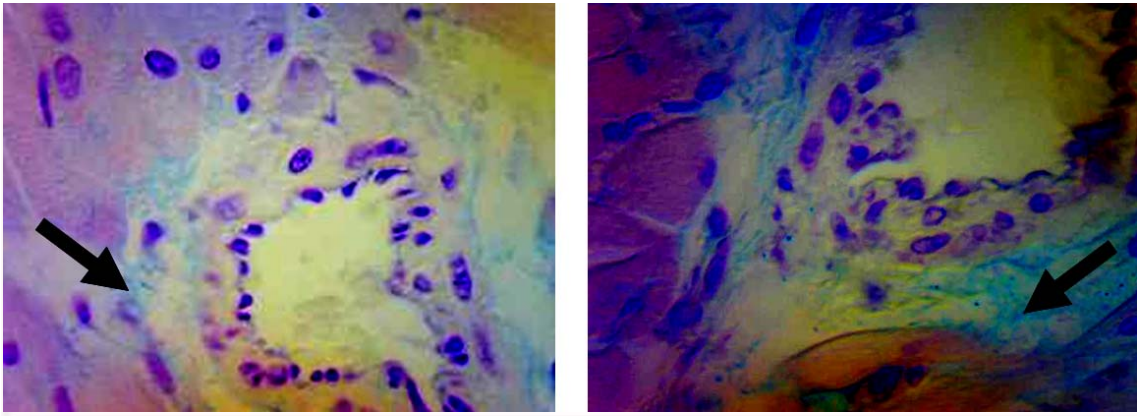


Рис. 6. Стінка серця щура (міокард). Забарвлення альціановим синім рН 2,5. $\times 600$. А – контроль: зафарбовування волокнистих структур адвентиційної оболонки артерії; Б – дослід: посилене зафарбовування волокнистих структур адвентиційної оболонки артерії.

Підсумок

При експериментальному інфаркті міокарда індукованому 0,1% розчином адреналіну в дозі 0,2 мл на 100 г маси тіла спостерігалось підвищення рівня маркерних ферментів (АСТ, ЛДГ та КФК). Формування лейкоцитарно-еритроцитарних тромбів на тлі уведення адреналіну обумовлювало порушення кровопостачання і, відповідно, дистрофічні зміни кардіоміоцитів, зміни структури вставних дисків, пікноз ядер, набряк кардіоміоцитів та строми, накопичення PAS-позитивного матеріалу навколо некротизованих кардіоміоцитів та сульфатованих глікозаміногліканів навколо судин.

Перспективи подальших досліджень

У перспективі будуть проведені лектино- та імуногістохімічні дослідження міокарда при описаній експериментальній моделі та проведений порівняльний аналіз експериментальних та клінічних досліджень.

Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних або явних конфліктів інтересів, що пов'язані з цим рукописом, на момент публікації не існує та не передбачається.

Джерела фінансування

Дослідження проведено в рамках науково-дослідної теми «Лектино- та імуногістохімічний аналіз вуглеводних детермінант нормальних та патологічно змінених клітин і тканин» (номер державної реєстрації 0117U001076).

Літературні джерела References

1. Biduchak AS, Shkrobanets ID, Leonets SI. [Epidemiological peculiarities of the diseases of cardiovascular system in Ukraine and Chernivtsi region]. Bukovinian Medical Herald. 2013;17(3):100-103. Ukrainian.
2. Kovalenko VM, Kornatsky VM. [Implementation of the State program of fight against arterial hypertension in Ukraine]. Ukrainian Cardiologic Journal. 2010;6:7-12. Ukrainian.
3. Steg PG, James SK, Atar D, Badano LP. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: the task force on the management of ST-segment elevation acute myocardial infarction of the European Society of Cardiology (ESC). European Heart Journal. 2012;33(20):2569-619.
4. Babayeva AG, Shkandt TV, Chizh NA, Trofimova AV. Bulletin of Urgent and Reparative Medicine. 2012;13(1):11-5. Russian.
5. Mladenka P, Hrdina R, Bobrovová Z, Semecky V. Cardiac biomarkers in a model of acute catecholamine cardiotoxicity. Human and Experimental Toxicology. 2009;28(10):631-40.
6. Shkand TV, Chizh NA, Naumova OV, Sandomirsky BP. [Morphological characteristics of rat heart at experimental myocardium necrosis]. World of Medicine and Biology. 2013;3:19-23. Ukrainian.
7. 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;3:10-6.
8. Kyyak YuH, Barnett OYu, Kovalyshyn VI, Kyyak YYu. [Correlation between clinical and cellular cardiology (clinical and ultrastructural studies)]. Lviv: Quart, 2012. 160 p. Ukrainian.
9. Gevorkian AG. [Experimental modeling of myocardial alterations: molecular mechanisms and possibilities of their corrections with natural bioactive compounds]. Armenian Biological Journal. 2017;69(2):24-33. Russian.
10. Rona G. Catecholamine cardiotoxicity. J Mol Cell Cardiol. 1985;17(4):291-306.

Надрага Б.О., Ященко А.М., Луцик О.Д. Морфофункціональні особливості серця щура при експериментальному інфаркті міокарда.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Для кращого розуміння характеру інфаркту міокарда і процесів, що відбуваються в міокарді при цій патології, з метою розробки більш ефективних методів профілактики і лікування, необхідні подальші експериментальні дослідження. **Мета** дослідження полягала у вивченні морфофункціональних та гістохімічних характеристик серцевого м'яза щура в умовах експериментального інфаркту міокарда. **Методи.** Дослідження проводили на 20 зрілих самцях щурів лінії Вістар масою 180-220 г (5 контрольних і 15 експериментальних тварин). Гострий інфаркт міокарда індукували підшкірним введенням 0,1% розчину адреналіну в дозі 0,2 мл на 100 г маси тіла. Для моніторингу розвитку інфаркту міокарда визначали рівні аспаратамінотрансферази (АСТ), лактатдегідрогенази (ЛДГ) і креатинфосфокінази (КФК). **Результати.** Біохімічні дослідження показали значне підвищення активності АСТ, ЛДГ і КФК у тварин дослідної групи. Так, рівень АСТ зріс у 3,5 рази, ЛДГ – в 2,7 рази, КФК – в 2,3 рази порівняно з контрольною групою щурів. Через 48 годин після введення адреналіну за допомогою морфологічних досліджень було задокументовано місцеві дегенеративні зміни в кардіоміоцитах, включаючи набряк, пікноз ядер, дезагрегацію міофібрил і деструктивні зміни вставних дисків. В артеріолах було виявлено утворення лейкоцитарно-еритроцитарних тромбів та їх адгезію до ендотелію. Гістохімічні дослідження виявили знижену PAS-реактивність вставних дисків у поєднанні з посиленням PAS-маркування внутрішніх еластичних мембран артеріол, депозити PAS-реактивного матеріалу в ділянках локалізації некротизованих кардіоміоцитів, що прилягали до кровоносних судин. В адвентиції судин тварин експериментальної групи було також ідентифіковано накопичення депозитів сульфатованих глікозаміногліканів. **Висновок.** Проведене дослідження продемонструвало значне підвищення рівня маркерних ферментів (АСТ, ЛДГ і КФК) у сироватці крові тварин з адреналін-індукованим експериментальним інфарктом міокарда. Виявлене утворення лейкоцитарно-еритроцитарних тромбів, правдоподібно, викликало порушення кровопостачання з наступними дистрофічними змінами в кардіоміоцитах, що проявлялися руйнуванням вставних дисків, дезорганізацією міофібрил, накопиченням PAS-позитивного матеріалу навколо некротизованих кардіоміоцитів і сульфатованих глікозаміногліканів у адвентиції кровоносних судин.

Ключові слова: експериментальний адреналін-індукований інфаркт міокарда, щури, морфогістохімічна характеристика, маркерні ферменти.

Надрага Б.А., Ященко А.М., Луцик А.Д. Морфофункциональные особенности стенки сердца крыс при экспериментальном инфаркте миокарда.

РЕФЕРАТ. Актуальность. Для более глубокого понимания характера инфаркта миокарда с целью разработки более эффективных методов профилактики и лечения этой патологии, необходимы дальнейшие экспериментальные исследования. **Цель** настоящей работы заключалась в изучении морфофункциональных и гистохимических характеристик сердечной мышцы крысы в условиях экспериментального инфаркта миокарда. **Методы.** Исследования проводились на 20 зрелых крысах-самцах линии Вистар массой 180-220 г (5 контрольных и 15 экспериментальных животных). Острый инфаркт миокарда индуцировали подкожным введением 0,1% раствора адреналина в дозе 0,2 мл на 100 г массы тела. Для мониторинга развития инфаркта миокарда через 24 часа после введения адреналина определяли уровни аспаратаминотрансферазы (АСТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и креатинфосфокиназы (КФК). **Результаты.** Биохимические исследования выявили значительное повышение активности АСТ, ЛДГ и КФК у животных опытной группы. Так, уровень АСТ вырос в 3,5 раза, ЛДГ - в 2,7 раза, КФК - в 2,3 раза по сравнению с контрольной группой крыс. С помощью морфологических исследований были задокументированы местные дегенеративные изменения в кардиомиоцитах, включая отек, пикноз ядер, дезагрегацию миофибрилл и деструктивные изменения вставочных дисков. В артериолах было обнаружено образование лейкоцитарно-эритроцитарных тромбов и их адгезию к эндотелию. Гистохимические исследования выявили пониженную PAS-реактивность вставочных дисков в сочетании с усилением PAS-маркировки внутренних эластичных мембран артериол, накопление PAS-реактивного материала в участках локализации прилегающих к кровеносным сосудам некротизированных кардиомиоцитов. В адвентиции сосудов животных экспериментальной группы было идентифицировано накопления депозитов сульфатированных гликозаміногліканов. **Вывод.** Проведенное исследование продемонстрировало значительное повышение уровня маркерных ферментов (АСТ, ЛДГ и КФК) в сыворотке крови животных с адреналин-индуцированным экспериментальным инфарктом миокарда. Обнаруженное образование лейкоцитарно-эритроцитарных тромбов вызвало нарушение кровоснабжения со последующими дистрофическими изменениями в кардиомиоцитах, проявлявшиеся разрушением вставочных дисков, дезорганізацією міофібрилл, отеком стромы, накоплением PAS-реактивного материала вокруг некротизированных кардиомиоцитов и отложении сульфатированных гликозаміногліканов в адвентиции кровеносных сосудов.

Ключевые слова: экспериментальный адреналин-индуцированный инфаркт миокарда, крысы, морфогистохимическая характеристика, маркерные ферменты.