

Оценка выраженности экспрессии коннексина 43 в миокарде при острой ишемии в эксперименте

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

ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», Министерство здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Российская Федерация

Поступила в редакцию 19 августа 2016 г. Принята к печати 1 февраля 2017 г.

Для корреспонденции: Савченко Сергей Владимирович, dr.serg62@yandex.ru

Цель	Оценить особенности экспрессии коннексина 43 в миокарде при экспериментальном моделировании острой ишемии мышцы сердца.
Методы	Представлены результаты анализа данных морфодинамики острых очаговых повреждений миокарда, а также экспрессии коннексина 43 в межклеточных контактах миокарда при экспериментальном моделировании острой ишемии на лабораторных животных (n = 95). Острую ишемию вызывали путем окклюзии при локальном гипертермическом воздействии на левую венечную артерию. Забор материала миокарда для исследования проводили после выведения животного из эксперимента через 1, 3, 6, 12, 18, 24 ч.
Результаты	Экспрессия коннексина 43 при острой ишемии через 3, 6 и 12 ч после окклюзии левой венечной артерии в зонах ишемии статистически достоверно отличается от показателя контрольной группы; $p < 0,00001$. При сравнении экспрессии коннексина 43 в динамике по продолжительности ишемии миокарда через 1, 3, 6 и 12 ч от начала эксперимента выявили статистически значимые различия между всеми группами, при сравнении концентраций в группах 3 и 6 ч $p < 0,0041$, в остальных случаях $p < 0,00001$. Через 18 и 24 ч от начала эксперимента с развитием в зоне острой ишемии некротических изменений экспрессия коннексина 43 резко возрастала, однако высокие показатели экспрессии коннексина 43 в эти интервалы ишемии связаны с фоновой пропиткой некротизированного миокарда.
Выводы	Снижение уровня экспрессии белка щелевых контактов сердечных миоцитов при острой ишемии миокарда свидетельствует о взаимосвязи выявляемого коннексина 43 с продолжительностью острой окклюзии венечных артерий и выраженностью альтеративных изменений мышцы сердца. Выявление снижения экспрессии коннексина 43 в миокарде может быть использовано в патологоанатомической и судебно-медицинской практике для выявления ранних ишемических повреждений мышцы сердца, особенно в случаях внезапной сердечной смерти.
Ключевые слова	ишемия миокарда; коннексин 43; патоморфология

Как цитировать: Савченко С.В., Новоселов В.П., Морозова А.С., Скребов Р.В., Грицингер В.А., Агеева Т.А., Айдагулова С.В., Ершов К.И., Воронина Е.И. Оценка выраженности экспрессии коннексина 43 в миокарде при острой ишемии в эксперименте. Патология кровообращения и кардиохирургия. 2017;21(1):81-90. <http://dx.doi.org/10.21688/1681-3472-2017-1-81-90>

Введение

По данным Всемирной организации здравоохранения, различные формы ишемической болезни сердца по-прежнему продолжают оставаться важной проблемой современного общества. Ишемическая болезнь сердца — наиболее частая причина смерти населения многих стран мира [1–3]. Среди различных проявлений

ишемической болезни сердца особые трудности вызывают ее острые формы, сопровождающиеся особенно высокими показателями смертности [4–6].

Для уточнения и понимания механизмов и морфогенеза ишемической болезни сердца важное значение имеет экспериментальное моделирование этой патологии на лабораторных животных [7]. Экспериментальное моделирование позволяет оценить мор-



фодинамику изучаемого патологического процесса и использовать при этом современные информативные методы морфологического исследования, которые не всегда возможно применить при изучении аутопсийного материала [8].

При острой ишемии одними из первых реагируют на повреждающее воздействие клеточные мембраны, и только на следующем этапе альтерации появляется активация протеаз, приводящая к повреждению цитоскелета, выполняющего связующую роль между плазматической мембраной и внутренним содержимым клетки [9]. На плазматической мембране прилежащих друг к другу клеток локализуются межклеточные контакты, которые, наряду с механическим соединением клеток, обеспечивают связь биологических процессов, протекающих в них, способствуют интеграции метаболической активности и развитию клетки, а также осуществляют синхронизацию физиологической деятельности кардиомиоцитов [10]. Это становится возможным за счет обеспечения обмена молекулами через каналы — коннексоны, имеющиеся в щелевых контактах, образуемые шестью белками-коннексинами (рис. 1) [11]. К коннексинам, играющим важную роль в функционировании миокарда, относят коннексин 43, который является мембранным белком из семейства белков щелевых контактов, кодируется геномом человека GJA1. Доказана особая роль коннексина 43 в формировании сердца во внутриутробном развитии плода, что подтверждает наличие разнообразных пороков сердца при его мутациях у этой категории пациентов. Коннексин 43 участвует в обеспечении физиологического функционирования миокарда путем передачи синхронизированного электрического импульса по клеточным цепочкам. Это позволяет распространять электрический потенциал для синхронизированного сокращения и является важным для органоспецифической функции сердца, связанной с автоматизмом работы этого органа [12].

Цель исследования — оценка особенностей экспрессии коннексина 43 в миокарде при экспериментальном моделировании острой ишемии мышцы сердца.

Методы

Основу работы составило морфологическое исследование миокарда при экспериментальном моделировании острой ишемии, вызванной гипертермической коагуляцией левой венечной артерии у лабораторных животных. При выполнении работы использовали гистологическую окраску срезов миокарда гематоксили-

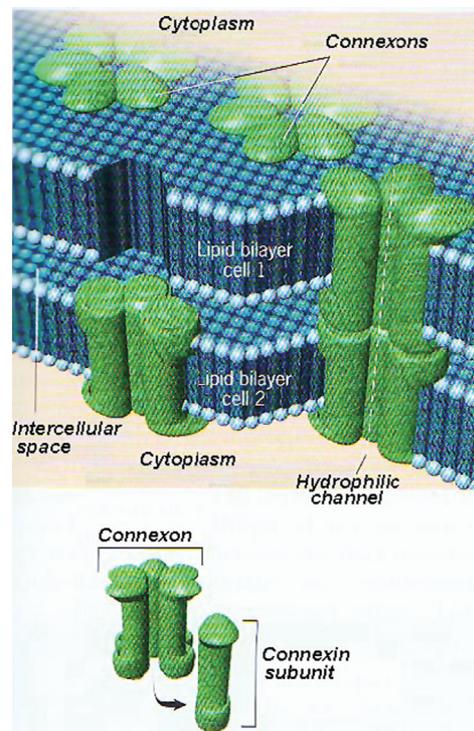


Рис. 1. Межклеточный щелевой контакт, состоящий из двух коннексонов, каждый из которых представлен шестью субъединицами, именуемыми коннексинами. Источник: Karp J. Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments, 1999

Fig. 1. An intercellular gap junction consisting of two connexons, with each of them presented by six subunits called connexins. Image: Karp J. Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments, 1999

ном и эозинном. Для оценки морфодинамики острых очаговых повреждений миокарда, наряду со световой, использовалась поляризационная микроскопия неокрашенных депарафинированных срезов. Кроме того, использовали иммуногистохимическую окраску срезов, позволяющую выявлять выраженность экспрессии коннексина 43 в межклеточных контактах кардиомиоцитов.

Выбор крыс в качестве лабораторных животных связан с определенной рациональностью и удобством проведения экспериментального моделирования острой ишемии миокарда. Кроме того, морфологическая оценка развивающихся при различной патологии острых очаговых повреждений миокарда у крыс достаточно подробно исследована и описана в литературных источниках, что также является удобным для планиро-

вания и проведения эксперимента именно на этих лабораторных животных [7, 8].

Эксперименты по моделированию острой ишемии миокарда проведены на 95 белых крысах-самцах линии «Вистар», масса животных составила 180–200 г. Лабораторных животных содержали в стандартных условиях вивария в соответствии с Международными правилами биоэтики, предложенными международными организациями и ассоциациями, в том числе Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (2013).

На первом этапе эксперимента определяли массу животного для последующего расчета дозы хлоралгидрата, который с целью общего обезболивания вводили внутривентриально из расчета 300 мг/кг веса [7]. После наступления общей анестезии животным выбривали переднюю поверхность груди, располагали на спине в стандовом устройстве для фиксации лапок. На этом этапе экспериментального моделирования оценивали сердечную деятельность с помощью электрокардиографии. Регистрацию электрокардиограмм осуществляли с помощью электрофизиологического комплекса Coulbourn Instruments LabLinc model V75-25A V72-25A, имеющего игольчатые электроды, которые накладывались в стандартных отведениях. Запись и обработку информации проводили с помощью компьютерной программы LABVIEW 5.1. Электрокардиографический контроль выполняли перед экспериментальным моделированием, после его завершения, а также непосредственно перед выводом животного из эксперимента.

Эксперимент начинали с рассечения кожи левее срединной линии тела по условной среднеключичной линии, затем грудных мышц с обнажением реберных дуг и межреберных мышц; производили рассечение межреберных мышц в 4–5-м межреберье на протяжении 1 см. У крыс развивался левосторонний пневмоторакс, поэтому осуществляли искусственную вентиляцию легких при помощи груши по типу Амбу, соединенной с раструбообразной маской. При вхождении в грудную полость вскрывали перикард, удерживая сердце в области его основания от смещения, осуществляли прошивание иглой левой венечной артерии с последующим наложением лигатуры с целью создания окклюзии. После чего ушивали грудную клетку, при этом перед наложением последнего шва на грудную стенку путем активного сдавления грудной стенки дренировали воздух из левой грудной полости с его последующим дополнительным удалением путем пунктирования шпри-

цом. После эксперимента на хвост крысы наносили маркировку, животных помещали в отдельные клетки с кормом и водой. Через определенный промежуток времени проводили электрокардиографический контроль, после чего животных выводили из эксперимента путем декапитации в состоянии наркоза хлоралгидратом.

Всего было 7 групп (6 опытных и 1 контрольная) лабораторных животных крыс-самцов линии «Вистар» ($n = 95$) в возрасте 2 мес., массой 180–200 г. Животных содержали в стандартных условиях в виварии, в одной клетке по 5 особей, которые имели свободный доступ к воде. В каждую из опытных групп входило 15 животных. Для создания необходимых условий, чтобы оценить морфодинамику острых очаговых повреждений миокарда, лабораторных животных после моделирования острой ишемии миокарда выводили из эксперимента через определенные промежутки времени: животные первой группы ($n = 15$) выведены из эксперимента через 1 ч, второй ($n = 15$) — через 3 ч, третьей ($n = 15$) — через 6 ч, четвертой ($n = 15$) — через 12 ч; пятой ($n = 15$) — через 18 ч; шестой ($n = 15$) — через 24 ч. В контрольной группе было 5 животных, которых декапитировали в состоянии наркоза хлоралгидратом. У выведенных из эксперимента животных опытных групп и крыс контрольной группы вскрывали грудную и брюшную полости, осматривали все внутренние органы, оперативно отсекали сердце, которое еще сокращалось, и помещали его в чашку Петри со льдом для предотвращения фибрилляции до момента завершения последних сокращений.

По полученному материалу экспериментальных животных провели гистологическое и иммуногистохимическое исследования, для этого сердца фиксировали в 10% забуференном формалине (Biovitrum, Россия) в течение 24 ч. После завершения фиксации сердце рассекали во фронтальной плоскости на 4 части, вырезали фрагменты толщиной 3–5 мм. Затем производили стандартную проводку материала в гистопроцессоре (STP200, Leica, Германия). 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 антитела Coppexin 43 и руководствами по иммуногистохимическим исследованиям [13, 14]. Перед иммуногистохимическим окрашиванием приготовленные срезы депарафинизировали и производили демаскировку

антигенов тканей в PT Link-модуле (Дакко, Дания) в цитратном буфере (рН 6,0) при температуре 95 °С в течение 60 мин. Затем блокировали эндогенную пероксидазу 3% раствором H₂O₂, проводили протеиновый блок сывороткой. Далее инкубировали срезы с антителами к Connexin 43/GJA1 (Rabbit polyclonal, ABCAM, США). Для иммунного окрашивания использовали полимерную систему детекции с пероксидазной меткой (EnVision FLEX, Дакко, 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 (Zeiss), для каждого параметра оценивали по 35 изображений с увеличением 40 × 12.

Статистический анализ

Статистическую обработку данных провели с помощью пакета прикладных программ Statistica 10. Проверку нормальности распределения данных в группах выполнили с помощью критерия Колмогорова – Смирнова. Различия независимых выборок при попарном сравнении оценили с помощью критерия Манна – Уитни. Различия считали достоверными при p<0,05.

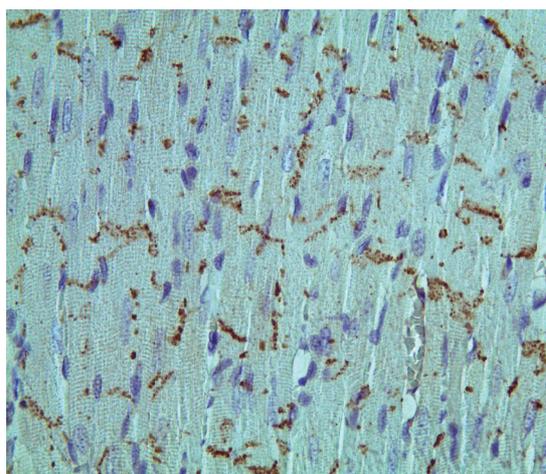


Рис. 2. Экспрессия коннексина 43 в миокарде левого желудочка (контрольная группа). Ув. × 400

Fig. 2. Connexin 43 expression in the left ventricle myocardium (control group). Magnification: X400

Результаты

При микроскопии материала на первом этапе оценивали структуру миокарда на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. Миокард животных группы сохранял характерное гистологическое строение, кардиомиоциты имели равномерную окраску цитоплазмы и ядер, в ряде полей зрения отмечались признаки начавшейся фрагментации отдельных групп мышечных клеток и неравномерное кровенаполнение сосудов.

На втором этапе микроскопии исследовали срезы, окрашенные иммуногистохимически коннексином 43. При иммуногистохимической окраске срезов миокарда в контрольной группе, позволяющей выявлять коннексин 43, кардиомиоциты имели бледно-базофильную окраску цитоплазмы с хорошо просматриваемой поперечной исчерченностью. В местах межклеточных щелевидных контактов визуализировался селективно окрашенный белок-коннексин 43 в виде полосовидных отрезков в местах щелевых контактов кардиомиоцитов на малом увеличении или скопления мелких зерен коричневого цвета на больших увеличениях (рис. 2). Уровень экспрессии коннексина 43 срезов миокарда в контрольной группе (интактных) животных составил 5,49 ± 1,38 усл. ед.

Через 1 ч с момента окклюзии 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 были спазмированы, в ряде сосудов отмечали штифтиковое вытягивание эндотелиоцитов, вены были расширенными, полнокровными. Основная часть миокардиальных клеток сохраняла нормальную структуру, в отдельных полях зрения были умеренно выраженные признаки метахромазии. Кроме того, в ряде полей зрения просматривались очаговые волнообразные изменения групп мышечных волокон.

На микроскопии срезов, окрашенных иммуногистохимически, при окклюзии продолжительностью 1 ч отмечено, что кардиомиоциты имели отчетливо просматриваемую поперечную исчерченность, особенно ярко выраженную при больших увеличениях; ядра клеток четко контурированы, удлинено-овальной формы, базофильной окраски. Межщелевые контакты сердечных миоцитов содержали коричнево-бурый пигмент — коннексин 43, однако в виде полосовидно расположенных компактных скоплений он просматривался не во всех межклеточных областях. Местами

зерна буро-коричневого цвета заполняли полностью межклеточные щели, а в некоторых полях частично. Выраженность экспрессии коннексина 43 при иммуногистохимическом окрашивании срезов миокарда в случаях острой ишемии миокарда продолжительностью 1 ч составила $4,94 \pm 3,42$ усл. ед.

Через 3 ч с момента окклюзии морфологические изменения миокарда характеризовались нарастанием признаков расстройств кровообращения, выраженными явлениями сладжирования форменных элементов в сосудах микроциркуляторного русла, а также мелких артериях и венах. В артериях на фоне сладжирования отмечали начавшуюся сепарацию плазмы. По мере нарастания ишемии миокарда после окклюзии нисходящей ветви левой венечной артерии в течение 3 ч можно отметить появление более выраженного периваскулярного отека. Спастические изменения сосудов артериального русла сменялись парезом, при этом сохранялось полнокровие вен. По сравнению с патоморфологическими изменениями на предшествующем сроке отмечалась более выраженная волнообразная деформация мышечных волокон.

Как следует из представленных данных, микроскопическое исследование срезов, обработанных иммуногистохимически для выявления коннексина 43, позволило выявить более выраженное снижение экспрессии коннексина в межклеточных контактах, которое на малом увеличении выглядело как уменьшение, укорочение и неполное окрашивание межклеточных зон контактов кардиомиоцитов. Просматривалось окрашивание цитоплазмы кардиомиоцитов в бледно-коричневый цвет. При оценке состояния сердечных мышечных клеток отмечали снижение выраженности поперечной исчерченности, носившей мозаичный характер. Показатель интенсивности экспрессии коннексина в срезах миокарда при острой ишемии в течение 3 ч составил $1,27 \pm 0,58$ усл. ед.

При продолжительности ишемии, достигшей 6 ч, в миокарде крыс наблюдали прогрессирующие расстройства кровообращения со сладжированием в мелких артериях, венах и микрососудах. Просматривалось отечное расширение периваскулярных пространств. Выявлен отек стенок интрамуральных артерий, при этом большая часть артерий находилась в состоянии пареза; вены были расширенными, полнокровными. При оценке состояния кардиомиоцитов отмечено их выраженное набухание в сочетании с неравномерной окрашенностью цитоплазмы.

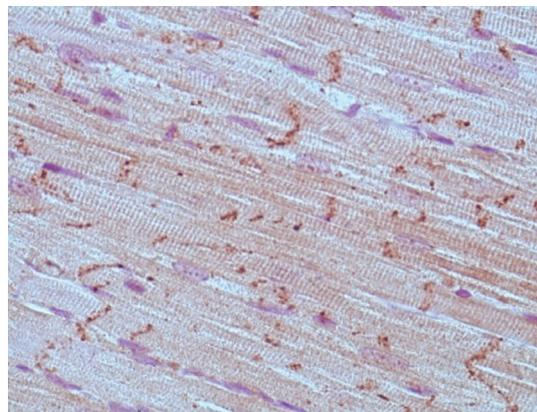


Рис. 3. Снижение экспрессии коннексина 43 в межклеточных контактах кардиомиоцитов после окклюзии продолжительностью 6 ч. Ув. $\times 400$

Fig. 3. Lowered expression of connexin 43 in the intercellular gaps of cardiomyocytes following 6-hour occlusion. Magnification $\times 400$.

При микроскопической оценке срезов, окрашенных с использованием иммуногистохимической методики, отмечено еще большее снижение экспрессии коннексина 43 в области межклеточных контактов (рис. 3). При микроскопии на малом увеличении это выглядело как уменьшение, укорочение или неполное окрашивание межклеточных зон контакта кардиомиоцитов. Показатель интенсивности экспрессии коннексина в срезах миокарда при острой ишемии в течение 6 ч составил $0,88 \pm 0,53$ усл. ед. Наряду с описанными изменениями отмечено еще более выраженное снижение поперечной исчерченности кардиомиоцитов.

Острая ишемия миокарда в течение 12 ч сопровождалась еще большими расстройствами кровообращения и выраженным сладжем форменных микроэлементов. Нарастали явления отека стромы и периваскулярных пространств. 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 светящийся конгломерат.

Наряду со снижением окрашивания вставочных дисков, отмечали появление коннексина 43 в цитоплазме кардиомиоцитов, за счет чего она окрашивалась в

бледно-коричневые тона. Оценка срезов, окрашенных с использованием иммуногистохимической методики, позволила выявить дальнейшее динамическое снижение уровня экспрессии коннексина 43 в области межклеточных контактов, которая при острой ишемии в течение 12 ч составила $0,57 \pm 0,54$ усл. ед.

В случаях ишемии, продолжавшейся 18 ч, наблюдали характерные патоморфологические изменения, связанные с ишемической стадией инфаркта миокарда. Кардиомиоциты в зоне ишемии выглядели бледными с тусклыми набухшими и деформированными ядрами. Имелась пестрота миокарда, обусловленная сочетанием более бледных и насыщенно воспринимающих краситель групп клеток и отдельных кардиомиоцитов. Отмечалось неравномерное пересокращение и волнообразная деформация мышечных волокон, а также отек стромы миокарда. В различных срезах наблюдали множественные очаговые кровоизлияния. В сосудах были множественные лейкостызы. Большинство артерий были паретически расширены, вены неравномерно кровенаполнены.

При оценке срезов, окрашенных с использованием иммуногистохимической методики, коннексин 43 окрашивал цитоплазму кардиомиоцитов в коричневый цвет. Уровень экспрессии коннексина 43 в миокарде при острой ишемии продолжительностью 18 ч составил $8,47 \pm 2,73$ усл. ед.

При продолжительности острой ишемии 24 ч развивалась патоморфологическая картина, характерная для некротической стадии инфаркта миокарда. Клеточные ядра отсутствовали. Наблюдался глыбчатый распад кардиомиоцитов, который при поляризационной микроскопии представлен в виде множественных мелких глыбок анизотропной субстанции, которые хаотично чередовались с участками цитоплазмы, лишенными анизотропии. Кроме того, в части клеток цитоплазма была лишена исчерченности, при этом прилегающие к ним мелкие участки ее сохраняли, что характерно для внутриклеточного миоцитолизиса. Наряду с описанными очаговыми повреждениями кардиомиоцитов встречались множественные контрактуры III степени. В этих случаях анизотропные диски сливались в светящийся конгломерат при отсутствии изотропных дисков. При световой микроскопии срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, отмечали множественные кровоизлияния из различных эритроцитов в сочетании с единичными очагами выпадения фибриновых масс. Выявлена диффузная лейкоцитарная инфильтрация. Сосуды микроциркуляторного русла находились в состоянии пареза, в отдельных сосудах

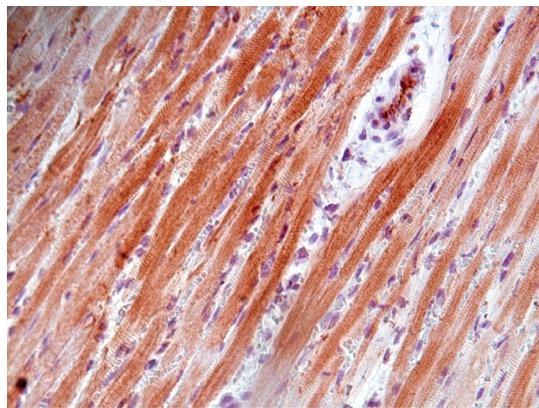


Рис. 4. Окрашивание цитоплазмы поврежденных кардиомиоцитов в коричневый цвет в зоне инфаркта с продолжительностью окклюзии 24 ч, отсутствие вставочных дисков. Ув. $\times 400$

Fig. 4. Cytoplasm of damaged cardiomyocytes dyed brown in the infarction zone, with occlusion lasting 24 hours, intercalated disks missing. Magnification $\times 400$.

отмечалась сепарация плазмы. Перифокально отмечали выраженную волнообразную деформацию с участками релаксации и пересокращения мышечных волокон в сочетании с выраженным отеком стромы миокарда.

В срезах, окрашенных коннексином 43, отчетливо просматривались очаги некроза. При этом очаг представлен кардиомиоцитами, находящимися в состоянии различного поражения, связанного с первичным глыбчатым распадом или миоцитолизисом на фоне выраженного отека стромы. При иммуногистохимической методике с острой ишемией продолжительностью 24 ч окрашивалась цитоплазма всех поврежденных кардиомиоцитов, составляющих очаг инфаркта, в коричневый цвет (рис. 4). Показатель экспрессии коннексина 43 в зоне инфаркта составил $10,44 \pm 73,0$ усл. ед.

При микроскопии на малом увеличении проведена сравнительная оценка площади инфаркта на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, и диффузного окрашивания коннексином 43 при микроскопии на малом увеличении. При этом отмечена большая площадь инфаркта на срезах, окрашенных иммуногистохимическим методом, в связи с тем, что экспрессию коннексина 43 можно наблюдать не только в зоне инфаркта, но и прилежащей перифокальной зоне.

Обсуждение

Результаты экспериментального моделирования острой ишемии миокарда на лабораторных животных позволяют заключить, что в процессе альтеративных изменений в ответ на тканевую гипоксию в различные интервалы времени (1, 3, 6, 12 ч) с момента окклюзии, прослеживается характерная морфодинамика, связанная со снижением экспрессии белка межклеточных контактов — коннексина 43. По нашему мнению, это обусловлено снижением клеточных возможностей в условиях развившейся острой ишемии синтезировать и фосфорилировать коннексин 43. Как известно, для встраивания в составе коннексонов в плазматическую мембрану метаболизм коннексина предполагает прохождение через комплекс Гольджи, после чего он перемещается в сторону плазматической мембраны, где происходит его фосфорилирование, изменение молекулярной массы и последующее встраивание в щелевидный контакт [15–17]. Таким образом, в связи с острой ишемией нарушается механизм синтеза и метаболизма коннексина 43, что сопровождается снижением его экспрессии в области щелевых контактов кардиомиоцитов, выявляемым иммуногистохимически.

Особенностью коннексинов является активная динамика их метаболизма, заканчивающаяся деградацией и выведением. Полувыведение коннексина происходит в течение 1–3 ч [18, 19]. Острая ишемия приводит, вероятно, не только к нарушению процессов синтеза, но и деградации и выведения коннексина 43, так как активная динамика метаболизма коннексина имеет эффективный механизм деградации, позволяющий предотвратить внутриклеточное накопление коннексина 43 [16]. На особенности экспрессии коннексина 43 при острой ишемии влияет увеличение тока катионов кальция через клеточные каналы в направлении клетки, а также активация лизосом и протеинкиназ [16, 18]. С учетом вышеизложенных рассуждений можно заключить, что снижение экспрессии коннексина 43 при острой ишемии миокарда является многофакторным процессом [20].

Необходимо учитывать, что наблюдаемое резкое повышение экспрессии коннексина 43 через 18 и 24 ч после острой ишемии миокарда связано с достижением окклюзии, когда формируются ишемическая и некротическая стадии инфаркта миокарда. При этом развивающиеся некробиотические и некротические изменения сопровождаются резким повышением уровня протеолитических

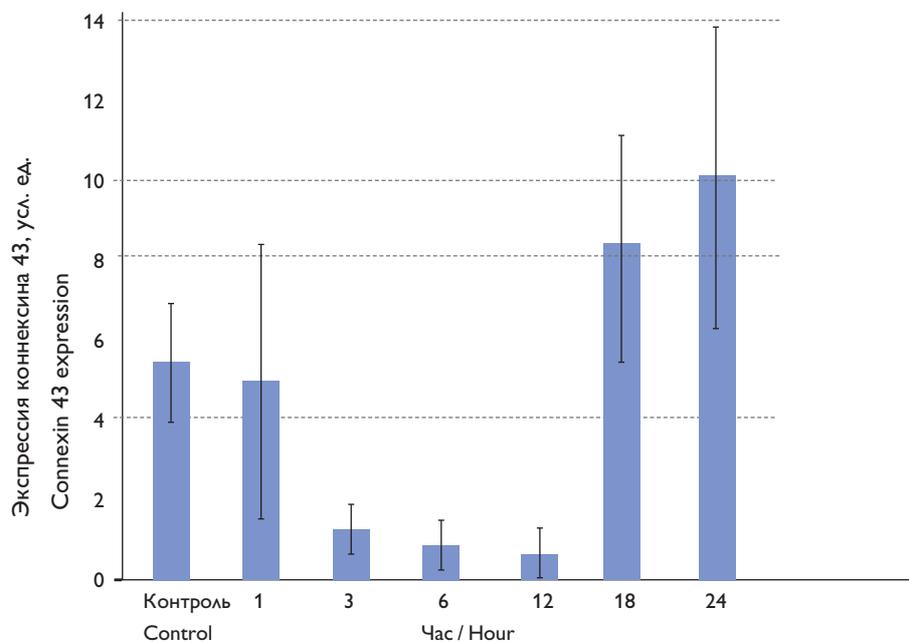


Рис. 5. Экспрессия коннексина 43 в зоне острой ишемии миокарда крыс (в % площади препарата) в динамике эксперимента (по оси абсцисс)

Fig. 5. Expression of connexin 43 in the acute myocardial ischemia zone in rats (in % of preparation area) in experiment dynamics (X line)

ферментов в клетке и появлением так называемого фонового окрашивания миокарда коннексином 43.

Как следует из данных, представленных на рис. 5, через 3, 6 и 12 ч после окклюзии ветви левой венечной артерии экспрессия коннексина 43 в зонах ишемии статистически достоверно отличается от показателей контрольной группы; $p < 0,00001$ во всех группах. При сравнении экспрессии коннексина 43 в динамике по продолжительности ишемии миокарда через 1, 3, 6 и 12 ч от начала эксперимента выявлены статистически значимые различия между всеми группами; уровень значимости p при сравнении концентраций в группах 3 и 6 ч составил 0,0041 ($p < 0,0041$), в остальных случаях $p < 0,00001$.

Через 18 и 24 ч от начала эксперимента с развитием в зоне острой ишемии некротических изменений экспрессия коннексина 43 резко возростала, достоверно превосходила контрольные значения, а также в несколько раз превышала средние показатели в группах с периодом воздействия 1, 3, 6 и 12 ч; $p < 0,00001$. Однако показатели экспрессии коннексина 43, как уже было отмечено выше, через 18 и 24 ч после острой ишемии связаны с фоновой пропиткой некротизированного миокарда.

Заключение

Выявление уровня экспрессии коннексина 43 в мышце сердца — информативное иммуногистохимическое исследование, позволяющее оценить состояние межклеточных щелевых контактов кардиомиоцитов, участвующих в структурно-функциональном обеспечении метаболизма миокарда. Снижение уровня экспрессии белка щелевых контактов сердечных миоцитов коннексина 43 при острой ишемии миокарда свидетельствует о взаимосвязи выявляемого коннексина 43 с продолжительностью острой окклюзии венечных артерий и выраженностью альтеративных изменений мышцы сердца.

Снижение экспрессии коннексина 43 в миокарде следует рассматривать как информативный, иммуногистохимически выявляемый маркер ишемии миокарда, что может быть важным в патологоанатомической и судебно-медицинской практике для определения ранних ишемических повреждений мышцы сердца, особенно в случаях внезапной сердечной смерти.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование

Исследование выполнено в соответствии с планом НИР Новосибирского государственного медицинского университета.

Вклад авторов

Савченко С.В.: идея исследования; участник эксперимента, микроскопического исследования, иммуногистохимического исследования; оценка полученных результатов, написание и редактирование статьи.

Новоселов В.П.: обсуждение идеи исследования, полученных результатов; редактирование статьи.

Морозова А.С.: участник эксперимента и микроскопического исследования.

Скребов Р.В.: участник эксперимента, микроскопического исследования, иммуногистохимического исследования; оценка полученных результатов и написание статьи.

Грицингер В.А.: участник микроскопического исследования; оценка полученных результатов.

Агеева Т.А.: участник иммуногистохимического исследования; оценка полученных результатов.

Айдагулова С.В.: участник микроскопического исследования; оценка полученных результатов.

Ершов К.И.: участник эксперимента.

Воронина Е.И.: участник иммуногистохимического исследования; оценка полученных результатов.

Список литературы

1. Кактурский А.В. Клиническая морфология острого коронарного синдрома. Архив патологии. 2007;69(4):16-9.
2. Рыбакова М.Г., Кузнецова И.А., Порсуков И.А. Морфологическая диагностика острого коронарного синдрома. Вестник педиатрической академии. 2007;(7):87-9.
3. Rubin E., Farber J.L. Pathology. Philadelphia-New York: Lippincott-Raven Publishers; 1999. p. 577-81.
4. Новоселов В.П. О некоторых проблемах территориальных бюро судебно-медицинской экспертизы Сибирского федерального округа. Вестник судебной медицины. 2013;2(4):5-10.
5. Резник А.Г., Иванов И.Н. Морфология миокарда в случаях смерти от острых форм ишемической болезни сердца. Архив патологии. 2007;69(4):32-4.
6. Савченко С.В. Актуальные вопросы экспертной оценки морфологии сердца. Вестник судебной медицины. 2012;1(3):5-8.
7. Ершов К.И., Ноговицин А.В., Галунская М.А., Серяпина А.А., Егорова К.В., Бахарева К.И. Модификация метода ишемии/реперфузии миокарда [Электронный ресурс]. 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).
8. Непомнящих Л.М. Морфогенез важнейших общепатологических процессов в сердце. Новосибирск: Наука, 1991. 349 с.

9. Геннис Р. Биомембраны. Молекулярная структура и функции. М.: Мир, 1997. 419 с.
10. Baranova A., Ivanov D., Petrash N., Pestova A., Skoblov M., Kelmanson I., Shagin D., Nazarenko S., Geraymovych E., Litvin O., Tiunova A., Born T. L., Usman N., Staroverov D., Lukyanov S., Panchin Y. The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. *Genomics*. 2004;83(4):706-16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygeno.2003.09.025>
11. Panchin Y., Kelmanson I., Matz M., Lukyanov K., Usman N., Lukyanov S. A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Current biology*. 2000;10(13):473-4.
12. Rackauskas M., Neverauskas V., Skeberdis V.A. Diversity and properties of connexin gap junction channels. *Medicina (Kaunas)*. 2010;46(1):1-12.
13. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. 4-е издание, переработанное и дополненное / Под редакцией С.В. Петрова и Т.Н. Райхлина. Казань: DESIGNstudio "RED", 2012. 624 с.
14. Dabbs D.J. Diagnostic immunohistochemistry. Elsevier Inc., 3rd edition; 2010. 941 p.
15. Martin P.E., Blundell G., Ahmad S., Errington R.J., Evans W.H. Multiple pathways in the trafficking and assembly of connexin 26, 32 and 43 into gap junction intercellular communication channels. *J Cell Sci*. 2001;114(Pt. 21):3845-55.
16. Lampe P.D., TenBroek E.M., Burt J.M., Kurata W.E., Johnson R.G., Lau A.F. Phosphorylation of connexin43 on serine368 by protein kinase C regulates gap junctional communication. *J Cell Biol*. 2000;149(7):1503-12.
17. VanSlyke J.K., Musil L.S. Dislocation and degradation from the ER are regulated by cytosolic stress. *J Cell Biol*. 2002;157(3):381-94. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200111045>
18. Laird D.W., Castillo M., Kasprzak L. Gap junction turnover, intracellular trafficking, and phosphorylation of connexin43 in brefeldin A-treated rat mammary tumor cells. *J Cell Biol*. 1995;131(5):1193-203.
19. Musil L.S., Le A.C., VanSlyke J.K., Roberts L.M. Regulation of connexin degradation as a mechanism to increase gap junction assembly and function. *J Biol Chem*. 2000;275(33):25207-15.
20. Antunes E., Borrecho G., Oliveira P., Brito J., Águas A., Martins dos Santos J. Immunohistochemical evaluation of cardiac connexin43 in rats exposed to low-frequency noise. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013;6(9):1874-9.

Assessment of the severity of connexin 43 expression in the myocardium in acute ischemia in experiment

Savchenko S.V., Novoselov V.P., Morozova A.S., Skrebov R.V., Grizinger V.A., Ageeva T.A., Aidagulova S.V., Erschov K.I., Voronina E.I.

Novosibirsk State Medical University, Ministry of Health of Russian Federation, 630091 Novosibirsk, Russian Federation

Corresponding author. Sergey V. Savchenko, dr.serg62@yandex.ru

Aim. The article deals with expression of connexin 43 in the myocardium in experimental modeling of acute ischemia of the heart muscle.

Methods. The results of morphodynamics analysis of acute focal myocardial damage, as well as connexin 43 expression in the intercellular contacts of the myocardium during experimental modeling of acute ischemia in laboratory animals (n=95) are presented. Acute ischemia was induced by occlusion under local hyperthermic exposure of the left coronary artery. Myocardial samples were drawn for study following the withdrawal of animals from the experiment in 1,3,6,12,18,24 hours.

Results. The expression of connexin 43 in acute ischemia in 3, 6 and 12 hours after occlusion of the left coronary artery in ischemic areas has a statistically significant difference as compared to that of the control group, $p < 0.00001$. When comparing the expression of connexin 43 in dynamics over the duration of the ischemic myocardium after 1 hour, 3 hours, 6 and 12 hours from the start of the experiment, statistically significant differences were observed between all three groups. When analyzing the concentrations, the significance level of p in 3- and 6-hour groups amounted to 0.0041 ($p < 0.0041$), in other cases it was equal to 0.00001 ($p < 0.00001$). After 18 and 24 hours from the start of the experiment, due to the development of necrotic changes in the area of acute ischemia, the connexin 43 expression increased drastically, however, high levels of connexin 43 expression in these ischemic intervals seem to be associated with background necrotized impregnation of the myocardium.

Conclusion. A decrease in the level of expression of protein gap junctions of cardiac myocytes (Cx43) in acute myocardial ischemia indicates the presence of correlation between the detected connexin 43, the duration of acute occlusion of the coronary arteries and the severity of alterative changes of the heart muscle. A lowered expression of connexin 43 in the myocardium can be used in pathological studies and forensic practice to detect early ischemic damage of the heart muscle, especially in cases of sudden cardiac death.

Keywords: myocardial ischemia; connexin 43; pathomorphology

Received 19 August 2016. Accepted 1 February 2017.

Funding: The study was completed in accordance with the research plan of Novosibirsk State Medical University.

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

Author contributions

Design philosophy; participation in experiment, microscopic study, immune histochemical study; assessment of results obtained; article writing and editing: Savchenko S.V. Discussion of study design and results; article editing: Novoselov V.P. Participation in experiment and microscopic study: Morozova A.S. Participation in experiment, microscopic study, immune histochemical study; assessment of results and article writing: Skrebov R.V. Participation in microscopic study; assessment of results: Grizinger V.A. Participation in immune histochemical study; assessment of results: Ageeva T.A. Participation in microscopic study; assessment of results: Aidagulova S.V. Participation in experiment: Erschov K.I. Participation in immune histochemical study; assessment of results: Voronina E.I.

Copyright: © 2017 Savchenko et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 License.

References

1. Kaktursky L.V. Clinical morphology of acute coronary syndrome. *Arkhiv patologii = Archive of pathology*. 2007;69(4):16-9. (In Russ.)
2. Rybakova M.G., Kuznetsova I.A., Porsukov I.A. *Vestnik pediatricheskoy akademii*. 2007;(7):87-9. (In Russ.)
3. Rubin E., Farber J.L. *Pathology*. Philadelphia-New York: Lippincott-Raven Publishers; 1999. p. 577-81.
4. Novoselov V.P. On some problems of regional forensic medical examination of the siberian federal district. *Vestnik sudebnoy meditsiny = Journal of Forensic Medicine*. 2013;2(4):5-10. (In Russ.)
5. Reznik A.G., Ivanov I.N. The morphology of the myocardium in cases of death from acute forms of ischemic heart disease. *Arkhiv Patologii = Archive of pathology*. 2007;69(4):32-4. (In Russ.)
6. Savchenko S.V. Current issues of the expert opinion about heart morphology. *Vestnik sudebnoy meditsiny = Journal of Forensic Medicine*. 2012;1(3):5-8. (In Russ.)
7. Ershov K.I., Nogovitsin A.V., Galunskaya M.A., Seryapina A.A., Egorova K.V., Bakhareva K.I. Modification of method of myocardium ischemia / reperfusion. *Medicine and Education in Siberia*. Available from: http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1411 (accessed 14.06.2016). (In Russ.)
8. Nepomnyashchikh L.M. The morphogenesis of the most important general pathological processes in the heart. Novosibirsk, Nauka Publ.; 1991. 349 p. (In Russ.)
9. Gennis R.B. Biomembranes. *Molecular structure and function*. Moscow, Mir Publ.; 1997. 419 p. (In Russ.)
10. Baranova A., Ivanov D., Petrash N., Pestova A., Skoblov M., Kelmanson I., Shagin D., Nazarenko S., Geraymovych E., Litvin O., Tiunova A., Born T.L., Usman N., Staroverov D., Lukyanov S., Panchin Y. The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. *Genomics*. 2004;83(4):706-16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygeno.2003.09.025>
11. Panchin Y., Kelmanson I., Matz M., Lukyanov K., Usman N., Lukyanov S. A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Current biology*. 2000;10(13):473-4.
12. Rackauskas M., Neverauskas V., Skeberdis V.A. Diversity and properties of connexin gap junction channels. *Medicina (Kaunas)*. 2010;46(1):1-12.
13. *Manual on immunohistochemical diagnostics of human tumors*. Edited by S.V. Petrov and T.N. Richline. Kazan, DESIGNstudio "RED" Publ.; 2012. 624 p. (In Russ.)
14. Dabbs D.J. *Diagnostic immunohistochemistry*. Elsevier Inc.; 2010. 941 p.
15. Martin P.E., Blundell G., Ahmad S., Errington R.J., Evans W.H. Multiple pathways in the trafficking and assembly of connexin 26, 32 and 43 into gap junction intercellular communication channels. *J Cell Sci*. 2001;114(Pt 21):3845-55.
16. Lampe P.D., TenBroek E.M., Burt J.M., Kurata W.E., Johnson R.G., Lau A.F. Phosphorylation of connexin43 on serine368 by protein kinase C regulates gap junctional communication. *J Cell Biol*. 2000;149(7):1503-12.
17. VanSlyke J.K., Musil L.S. Dislocation and degradation from the ER are regulated by cytosolic stress. *J Cell Biol*. 2002;157(3):381-94. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200111045>
18. Laird D.W., Castillo M., Kasprzak L. Gap junction turnover, intracellular trafficking, and phosphorylation of connexin43 in brefeldin A-treated rat mammary tumor cells. *J Cell Biol*. 1995;131(5):1193-203.
19. Musil L.S., Le A.C., VanSlyke J.K., Roberts L.M. Regulation of connexin degradation as a mechanism to increase gap junction assembly and function. *J Biol Chem*. 2000;275(33):25207-15.
20. Antunes E., Borrecho G., Oliveira P., Brito J., Águas A., Martins dos Santos J. Immunohistochemical evaluation of cardiac connexin43 in rats exposed to low-frequency noise. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013;6(9):1874-9.

How to cite: Savchenko S.V., Novoselov V.P., Morozova A.S., Skreblov R.V., Grizinger V.A., Ageeva T.A., Aidagulova S.V., Erschov K.I., Voronina E.I. Assessment of the severity of connexin 43 expression in the myocardium in acute ischemia in experiment. *Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokhirurgiya = Circulation Pathology and Cardiac Surgery*. 2017;21(1):81-90. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.21688/1681-3472-2017-1-81-90>