

## АНОТАЦІЯ

*Надрага Б.-С.О.* Морфофункціональні, лектино- та імуногістохімічні характеристики ішемії / інфаркту міокарда в експерименті та на матеріалі автопсій. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 14.03.09 «Гістологія, цитологія, ембріологія».

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького. Львів, 2020.

За даними Всесвітньої Організації Охорони Здоров'я інфаркт міокарда посідає одне з перших місць серед захворювань серцево-судинної системи. У віковому аспекті відзначається тенденція до його омолодження. Захворювання на інфаркт міокарда супроводжується високою смертністю, призводить до тимчасової, а іноді й постійної втрати працездатності, що обумовлює зниження трудового потенціалу суспільства. Для кращого розуміння патогенезу інфаркту міокарда і процесів, що відбуваються у міокарді при цій патології, з метою розробки більш ефективних методів профілактики і лікування, необхідні подальші експериментальні дослідження. При достатньо великій кількості публікацій, присвячених лектиновій гістохімії серця, перебудова вуглеводних детермінант міокарда в динаміці ішемічної хвороби, інфаркту, та можливостей прогнозування процесів постінфарктної реабілітації вивчені недостатньо, хоча відомо, що гліком клітин та екстрацелюлярного матриксу відіграє важливу роль у реалізації фундаментальних процесів життєдіяльності.

Мета роботи полягала у вивченні морфофункціональних, лектино- та імуногістохімічних характеристик серцевого м'яза щурів за умов епінефрин-індукованої ішемії/ інфаркту міокарда та порівнянні отриманих

даних з результатами лектиногістохімічного дослідження цієї патології у людини.

Досліди проводили на статевозрілих щурах-самцях лінії Вістар масою 180-220 г (14 контрольних і 20 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 р. [12, 19, 20]. Комісією з питань біоетики Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького порушень морально-етичних норм при проведенні науково-дослідної роботи не виявлено (протокол № 3 від 11.03.2020 р.).

Тварини були розділені на 3 групи: 7 інтактних, 7 – котрим вводили плацебо (фізіологічний розчин 0,2 мл на 100 г маси тіла підшкірно), та 20 – котрим для моделювання ішемії міокарда підшкірно вводили 0,2 мл 0,1% розчину епінефрину на 100 г маси тіла. Через 48 годин після введення епінефрину дослідних та інтактних тварин, а також щурів, котрим вводили фізіологічний розчин, піддавали евтаназії шляхом передозування етилового ефіру.

З ділянки лівого шлуночка вирізали кусочки серцевого м'яза. Гістологічні проби фіксували у 4% нейтральному формаліні і заливали у парафін. Для вивчення загальної морфології зрізи товщиною 5-7  $\mu\text{m}$  забарвлювали гематоксиліном і еозином. Вміст вуглеводів визначали за результатами PAS-реакції (нейтральні полісахариди), та забарвленням алціановим синім при рН 2,5 (сульфатовані глікозаміноглікани). Для верифікації розвитку ішемії / інфаркту міокарда у щурів проводилося

визначення рівня активностей аспаратамінотрансферази (АСТ), лактатдегідрогенази (ЛДГ) та креатинфосфокінази МВ-фракції (КФК-МВ) в сироватці крові тварин експериментальної та обох груп контролю.

Ультраструктуру міокарда досліджуваних тварин вивчали методом трансмісійної електронної мікроскопії. Кусочки міокарда з лівого шлуночка фіксували у 2% розчині OsO<sub>4</sub>. Матеріал просочували сумішшю епоксидних смол епон-аралдит. Зрізи виготовляли на ультрамікротомі УМПТ-3М, контрастували у 2% розчині уранілацетату. Аналіз та фотодокументування здійснювали при допомозі електронного мікроскопа УЕМВ 100К (Україна) з прискорювальною напругою 75 кВ.

Для вивчення перебудови глікоцелі рецепторів міокарда щурів за умов епінефрин-індукованої ішемії було використано панель з 8 лектинів різної вуглеводної специфічності, а саме: Con A, GNA, PNA, SBA, HPA, CNFA, WGA, LABA. Імуногістохімічні дослідження здійснювали із застосуванням 4 маркерів: Ki67, VEGF (маркери проліферації), CD34 (маркер проліферації та адгезії) та Casp3 (маркер апоптозу). Візуалізацію рецепторів лектинів та імунних маркерів здійснювали з використанням хромогена діамінобензидину тетрагідрохлориду в присутності H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

В роботі також було досліджено проби серцевого м'яза (ділянки лівого шлуночка), отримані під час автопсії двох чоловіків віком 82 і 78 років, які померли з діагнозом «Післяінфарктний кардіосклероз. Повторний гострий інфаркт міокарда». Для порівняння (умовний контроль) було використано міокард чоловіка та жінки віком 46 та 54 роки відповідно, які померли без ознак серцевої патології. Забір матеріалу здійснювали у патологоанатомічному відділенні Львівської обласної клінічної лікарні під час планових автопсій з дотриманням засад біоетики. З проб патогістологічного матеріалу (парафінові блоки) виготовляли зрізи товщиною 5-7 μм, які для вивчення загальної морфології забарвлювали

гематоксиліном та еозином. Для характеристики вуглеводних детермінант міокарда людини були використані лектини WGA, RCA, LAVA.

Біохімічні дослідження виявили значне підвищення активності АСТ, КФК-МВ та ЛДГ у тварин дослідної групи. Так, рівень АСТ зріс у 4,0 рази, КФК-МВ – у 2,4 рази, ЛДГ – у 2,0 рази. Через 48 годин після уведення епінефрину за допомогою загальноморфологічних та електронно-мікроскопічних досліджень було задокументовано утворення еритроцитарних складків та зміни морфології ендотелію гемокапілярів, що обумовлювало звуження їх просвіту. У судинах більшого калібру було виявлено утворення лейкоцитарно-еритроцитарних тромбів та їх адгезію до поверхні ендотелію. Порушення кровопостачання міокарда ініціювали дистрофічні зміни кардіоміоцитів, серед яких вакуолізація та набряк саркоплазми, локальне вкорочення саркомерів та дезорганізація міофібрил, міоцитоліз, руйнування сарколеми та мітохондрій і вихід останніх у міжклітинний простір. Імунною відповіддю на зміни некротичного характеру в кардіоміоцитах була поява у сполучнотканинній стромі міокарда макрофагів, нейтрофільних гранулоцитів, мастоцитів, лімфоцитів та плазмоцитів.

Гістохімічні дослідження виявили редукцію PAS-реактивного матеріалу у складі вставних дисків і сарколеми міокардіоцитів у поєднанні з деяким посиленням PAS-маркування внутрішніх еластичних мембран артеріол. В адвентиції судин тварин експериментальної групи було ідентифіковано зростання інтенсивності забарвлення волокнистих структур алціановим синім, що свідчить про підвищений вміст сульфатованих глікозаміногліканів.

З використанням лектинів було встановлено, що при експериментальній ішемії міокарда відбувається перебудова вуглеводних детермінант структурних компонентів міокарда, зокрема, ендотелію судин мікроциркуляторного русла, формених елементів крові, що може бути

важливим діагностичним маркером зміни їхніх адгезивних властивостей та стимулювати тромбоутворення. Лектин CNFA демонстрував підвищену спорідненість до вставних дисків та сарколеми кардіоміоцитів, лектин WGA – до судинного ендотелію щурів. Збільшення числа макрофагів, які ідентифікувалися лектином LABA за умов експериментальної ішемії, свідчить про активацію макрофагічної системи у відповідь на деструктивні процеси у кардіоміоцитах.

Імуногістохімічний маркер Casp3, що був використаний для дослідження міокарда за умов гострої ішемії продемонстрували явища апоптозу кардіоміоцитів з руйнуванням міофібрил і накопиченням у саркоплазмі продуктів їхньої деградації у формі імунореактивної зернистості. Порушення скоротливої функції кардіоміоцитів поєднувалося зі змінами морфології та CD34-імунореактивності ендотелію мікроциркуляторного русла, появою у периваскулярних просторах VEGF-позитивних макрофагів. Мастоцити як в умовах контролю, так і досліду демонстрували Ki67-імунореактивність.

Таким чином, за умов гострої ішемії міокарда в експерименті, з використанням методів імуногістохімії, на тлі підвищення адгезивних властивостей судинного ендотелію та формених елементів крові, що супроводжувалось зменшенням прохідності судин мікроциркуляторного русла міокарда була виявлена дрібнозерниста дистрофія міофібрил кардіоміоцитів, що свідчить про порушення скоротливої функції міокарда.

При дослідженні автопсійного матеріалу міокарда людини з використанням загальноморфологічних методів виявлено гіпертрофію кардіоміоцитів у поєднанні з численними розривами м'язових волокон і заміщенням дефектів елементами сполучної тканини, периваскулярні розростання сполучної тканини, десквамацію ендотелію судинного русла, мікротромбози та діapedез еритроцитів. У саркоплазмі кардіоміоцитів виявлено значний вміст пігментних ліпофусцинових включень.

Дослідження перебудови глікорецепторів міокарда людини за умов постінфарктного кардіосклерозу з використанням лектинів WGA, RCA та LАВА продемонструвало чітке маркування елементів сполучнотканинної стромы, судин мікроциркуляторного русла, а також тканинного детриту.

З використанням лектину WGA у стінці артеріол ідентифіковані ендотеліоцити атипової веретеноподібної форми. Означений лектин демонстрував також підвищену реактивність з цитоплазматичними глікокон'югатами лімфоцитів та плазмоцитів, дезорганізованих волокнистих структур периваскулярної локалізації. Лектин RCA на тлі ареаактивності кардіоміоцитів проявляв підвищену афінність до волокнистих структур сполучної тканини. У порівнянні з методами загальної морфології лектини WGA та RCA більш вибірково взаємодіяли з елементами сполучної тканини, кровоносними судинами міокарда, що дозволяє рекомендувати їх використання в якості альтернативи при кількісній характеристиці кардіосклеротичних змін.

**Ключові слова:** ішемія міокарда, щури, кардіоміоцити, судинний ендотелій, постінфарктний кардіосклероз, людина, лектинова гістохімія, імуногістохімія.

## **ПРАЦІ, В ЯКИХ ОПУБЛІКОВАНІ ОСНОВНІ НАУКОВІ РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. Надрага БО, Ковавлишин ВІ, Струс ХІ, Яценко АМ, Луцик ОД. Ультраструктурна організація компонентів міокарда щурів лінії Вістар за умов експериментальної ішемії міокарда. *The scientific heritage*. 2020; 45: 46–54 (*Особистий внесок – аналіз літератури, участь в проведенні експерименту, гістохімічні дослідження лабораторного матеріалу, аналіз результатів*).
2. Надрага БО, Согомоян ЄА, Яценко АМ, Луцик ОД. Лектини в дослідженні морфології та функції серця. *Світ медицини та біології*. 2018; 1(63): 140–145 (*Особистий внесок – участь в проведенні експерименту, гістохімічні дослідження лабораторного матеріалу, аналіз результатів, підготовка статті до друку*).
3. Надрага БО, Струс ХІ, Яценко АМ, Жулкевич ІВ, Луцик ОД. Особливості глікому структурних компонентів міокарда щура за умов експериментальної ішемії міокарда. *Світ медицини та біології*. 2019; 3(69): 197–203 (*Особистий внесок – участь в проведенні експерименту, лектиногістохімічні дослідження, аналіз результатів, підготовка статті до друку*).
4. Надрага БО, Струс ХІ, Яценко АМ, Луцик ОД. Імуногістохімічні дослідження серцевого м'яза щура за умов експериментальної ішемії. *Acta Medica Leopoliensia/Львівський медичний часопис*. 2020; 26(1): 11–20 (*Особистий внесок – участь в проведенні експерименту, гістохімічні дослідження лабораторного матеріалу, аналіз отриманих результатів*).
5. Надрага БО, Струс ХІ, Яценко АМ, Луцик ОД. Вуглеводні детермінанти глікому структурних компонентів міокарда за умов експериментальної ішемії. Зб. тез доповідей VII конгресу наукового товариства анатомів, гістологів, ембріологів, топографоанатомів України, 2-4 жовтня 2019 р. Одеса, 2019: 264–265 (*Особистий внесок – участь в проведенні експерименту, гістохімічні дослідження лабораторного матеріалу, аналіз результатів, підготовка статті до друку*).

6. Надрага БО, Яценко АМ, Луцик ОД. Морфофункціональні особливості стінки серця щура при експериментальному інфаркті міокарда. Морфологія. 2019; 13(1): 32–37 *(Особистий внесок – брав участь в обробці лабораторного матеріалу, виконав аналіз результатів дослідження)*.
7. Nadraga B, Sogomonian E, Yashchenko A, Lutsyk A. Lectins in the investigation of cardiac morphology and function. In: RECOOP 13<sup>th</sup> Annual Scientific Conference Abstracts. Zagreb, 12-15 April 2018: 114 *(Особистий внесок – проаналізував літературу, брав участь в обробці лабораторного матеріалу, виконав статистичну обробку та аналіз результатів)*.



## SUMMARY

*Nadruga B.-S.O.* Morphofunctional, lectin- and immune-histochemical characteristics of ischemia / myocardial infarction in experiment and on autopsy material. - Qualified scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation for Doctor of Philosophy degree in the specialty 14.03.09 «Histology, Cytology, Embryology».

Danylo Halytsky Lviv National Medical University. Lviv, 2020.

According to the World Health Organization database, myocardial infarction is one of the leading diseases of the cardiovascular system with strong trend for its rejuvenation. Myocardial infarction is accompanied by high mortality rate, leading to temporary and, sometimes, permanent disability, causing strong negative impact on the labor potential of society. For better understanding of myocardial infarction pathogenesis and processes taking place in the myocardium affected by this pathology, further experimental studies are needed to develop more effective methods of this disease prevention and treatment. Alongside with a large scale publications on lectin histochemistry of the heart, the knowledge on myocardial carbohydrate determinants rearrangement during ischemic disease progression and heart attack, as well as the possibility of predicting the processes of post-infarction rehabilitation remains obscure, although it is well-known that glycome of cells and extracellular matrix plays important role in health maintenance and diseases processing.

The purpose of this work was to investigate the morphofunctional, lectin- and immunohistochemical characteristics of rat cardiac muscle under conditions of epinephrine-induced myocardial ischemia / infarction and to compare the obtained data with the results of lectin-histochemical study of this pathology in humans.

Experiments were performed on adult male Wistar rats 180-220 g of weight (14 control and 20 experimental). Animals were kept on a standard diet

of vivarium according to the hygiene requirements. All manipulations were carried out in accordance with the general ethical principles of animal experimentation (Ukraine, 2001), which is consistent with the provisions of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental Purposes and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986), Law of Ukraine No. 3447-IV «On the Protection of Animals from Cruelty» dated 21.02.2006 [12, 19, 20]. The Commission on Bioethics of Danylo Halytsky Lviv National Medical University did not find any violations of moral and ethical standards during the research work (protocol № 3 of 11.03.2020).

Animals were subdivided into three groups including: 7 intact rats, 7 rats injected with placebo (0.2 ml of saline per 100 g body weight subcutaneously), and 20 rats injected with 0.2 ml of 0.1% epinephrine solution per 100 g of body weight subcutaneously to induce myocardial ischemia. 48 hours after epinephrine administration rats the three groups were euthanized by an overdose of ethyl ether. Pieces of the heart muscle were cut from the left ventricle.

Tissue samples were fixed in 4% neutral formalin and embedded in paraffin. To study general morphology, sections 5-7 µm thick were stained with haematoxylin and eosin. Carbohydrate content was detected by PAS reaction (neutral polysaccharides) and by staining with Alcian blue at pH 2.5 (sulfated glycosaminoglycans). In order to verify the development of ischemia / myocardial infarction in rats, the activity three enzymes, namely, aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH) and creatine phosphokinase MB fraction (KPK-MB) in the rats serum was detected.

The myocardial ultrastructure was studied by transmission electron microscopy. For this purpose pieces of myocardium from the left ventricle were fixed in 2% OsO<sub>4</sub> solution. The material was impregnated with a mixture of epoxy resins epon-araldite. The sections made on an ultramicrotome UMPT-3M were counterstained in 2% uranyl acetate solution. Pictures were taken on

UEMV 100K electron microscope (Ukraine) with an acceleration voltage of 75 kV.

A panel of eight lectins with different carbohydrate specificity, namely – Con A, GNA, PNA, SBA, HPA, CNFA, WGA, LABA – were used to study the redistribution of rat myocardial glycoreceptors under epinephrine-induced ischemia. Immunohistochemical studies were performed using four markers: Ki67, VEGF (markers of proliferation), CD34 (proliferation and adhesion marker) and Casp3 (apoptosis marker). Visualization of lectin receptors was performed using diaminobenzidine tetrahydrochloride chromogen in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Additionally to experimental animals it was also examined heart muscle (left ventricular area) of two men, aged 82 and 78, who died with the diagnosis «Postinfarction cardiosclerosis. Repeated acute myocardial infarction». Myocardial specimen of man and woman aged 46 and 54 years, respectively, who died without evidence of cardiac pathology, were used for comparison (conditional control). Material was obtained at the pathological anatomy department of Lviv Regional Clinical Hospital during routine autopsies. For general morphology sections 5-7 µm thick were stained with haematoxylin and eosin. To characterize the carbohydrate determinants of human myocardium WGA, RCA, LABA lectins were used.

Biochemical studies revealed a significant increase of AST, LDH and KPK activities in serum of the experimental group animals. Namely, the AST level increased 4.0 times, KPK – 2.4 times, LDH – 2.0 times in comparison with control group rats. 48 hours after epinephrine administration erythrocyte sludging accompanied by swelling of capillary endothelium were documented by general morphology and electron microscopic studies. The formation of leukocyte-erythrocyte blood clots and their adhesion to the surface of endothelium were detected in vessels of larger dimensions.

Disorders of myocardial blood supply triggered dystrophic changes of cardiomyocytes, including vacuolation and swelling of sarcoplasm, local shortening of sarcomeres and disorganization of myofibrils, myocytolysis, destruction of sarcolemma, mitochondrial leakage, and, finally, destruction of cardiomyocytes. Some cardiomyocytes exposed signs of apoptosis, manifested by nuclear fragmentation. Immune response to necrotic changes of cardiomyocytes included the appearance in within the myocardial interstitium of macrophages, neutrophilic granulocytes, mast cells, lymphocytes and plasma cells.

Histochemical studies revealed a reduction of PAS reactivity of intercalated discs and sarcolemma of cardiocytes in combination with certain enhancement of PAS labeling of arteriolar internal elastic membranes, these changes encompassing ischemia induced redistribution of neutral polysaccharides. In within the blood vasculature adventitia of experimental group animals it was detected an increase in the color intensity of the fibrous structures with alcian blue indicating an increased content of sulfated glycosaminoglycans.

Lectin histochemistry investigations revealed rearrangement of carbohydrate determinants in the microcirculatory bed vascular endothelium, as well as in formed elements of blood under experimental myocardial ischemia, these observations apparently reflecting changes of their adhesive properties and trend for the enhanced thrombogenesis. CNFA lectin demonstrated rather selective binding to intercalated discs and sarcolemma of cardiomyocytes, while WGA lectin selectively labeled vascular endothelium of rat myocardium. The immune response to ischemia induced destruction of cardiomyocytes was reflected by the accumulation in within the interstitial connective of macrophages, identified by LABA lectin label.

Casp3 immunohistochemical marker used for the study of myocardium under experimental ischemia in our hands demonstrated the phenomena of

cardiomyocyte apoptosis with destruction of myofibrils and accumulation in the sarcoplasm products of their degradation in the form of immunoreactive small size granularity. Impaired cardiomyocyte function was combined with changes in the morphology and CD34 immunoreactivity (proliferatory activities, adhesive properties) of the microcirculatory bed vascular endothelium, with the appearance in the perivascular spaces of VEGF-positive macrophages.

Mast cells in both control and experimental conditions demonstrated Ki67 immunoreactivity. Thus, immunohistochemical investigations confirmed our earlier general morphology and lectin histochemistry observation on the ischemia-induced enhancement of adhesive properties of both – vascular endothelium and formed elements of blood – leading to the decrease patency of myocardial microcirculatory bed. Decreased oxygenation ratio triggered destruction of contractile myocardiocytes, in parts, by means of Casp3-recognised apoptotic route.

Investigation of postinfarction human myocardium using general morphology methods revealed hypertrophy of cardiomyocytes in combination with numerous ruptures of muscle fibers and replacement of defects by connective tissue, increased perivascular content of the latter, desquamation of vascular endothelium, microthrombosis and red blood cells diapedesis. Cardiomyocyte sarcoplasm exposed a rich content of pigmented lipofuscin inclusions. WGA, RCA, and LABA lectins labels were restricted to connective tissue stroma, vascular microcirculatory bed, and tissue debris.

Due to WGA binding atypical spindle-shaped endothelial cells were identified in the arteriolar wall. This same lectin also showed increased reactivity with cytoplasmic glycoconjugates of macrophages, disorganized fibrous elements of perivascular localization. RCA lectin, non reactive with cardiomyocytes, demonstrated increased affinity to fibrous connective tissue. Compared to haematoxylin-eosin staining, WGA and RCA lectins labeled more selectively connective tissue elements, myocardial blood vessels, this notion

makes it possible recommendation these lectins for monitoring human myocardium cardiosclerotic changes.

**Key words:** myocardial ischemia, rats, cardiomyocytes, vascular endothelium, postinfarction cardiosclerosis, human, lectin- and immune-histochemistry.

