

*Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова;
Факультет Фундаментальной Медицины
Кафедра физиологии и общей патологии*

**Влияние структурного фрагмента
моноцитарного хемотаксического белка-1
(MCP-1) на течение воспалительного
процесса в миокарде у крыс при развитии
инфаркта в модели ишемии-реперфузии**

Марина Ринатовна Ахметшина
Александр Берикович Бердалин

Научный руководитель:

к.б.н. Светлана Анатольевна Гаврилова

Москва 2013

Б
Л
О
К
И
Р
О
В
К
А



Система
комплемента



ЦОГ



Липоксигеназа



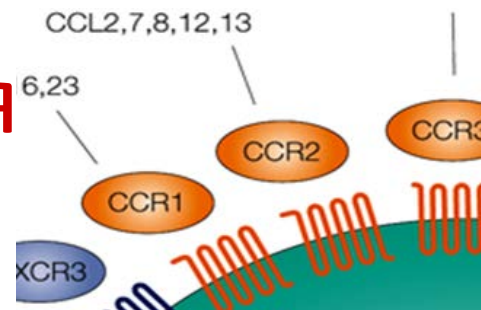
Молекулы клеточной
адгезии



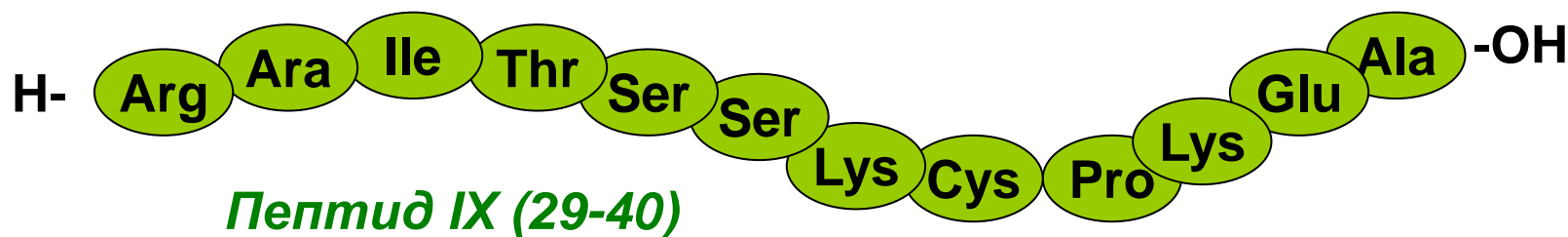
Уменьшение размеров
поражения

Как влияет
усиление
воспалительной
реакции на
развитие
реперфузионного
повреждения в
миокарде?

Структура и физиологическая активность MCP-1



Институт экспериментальной кардиологии ФГУ Российского кардиологического научно-производственного комплекса *
Министерства здравоохранения и социального развития РФ



Моноцитарный хемотаксический белок (MCP-1) – провоспалительный цитокин, рекрутирует моноциты в очаг поражения.

* Красникова Т.Л., Никитин П.И., Ксенович Т. И. // Биологические мембраны. 2011. Т. 28. С. 68–76

Цели и задачи исследования

Цель работы:

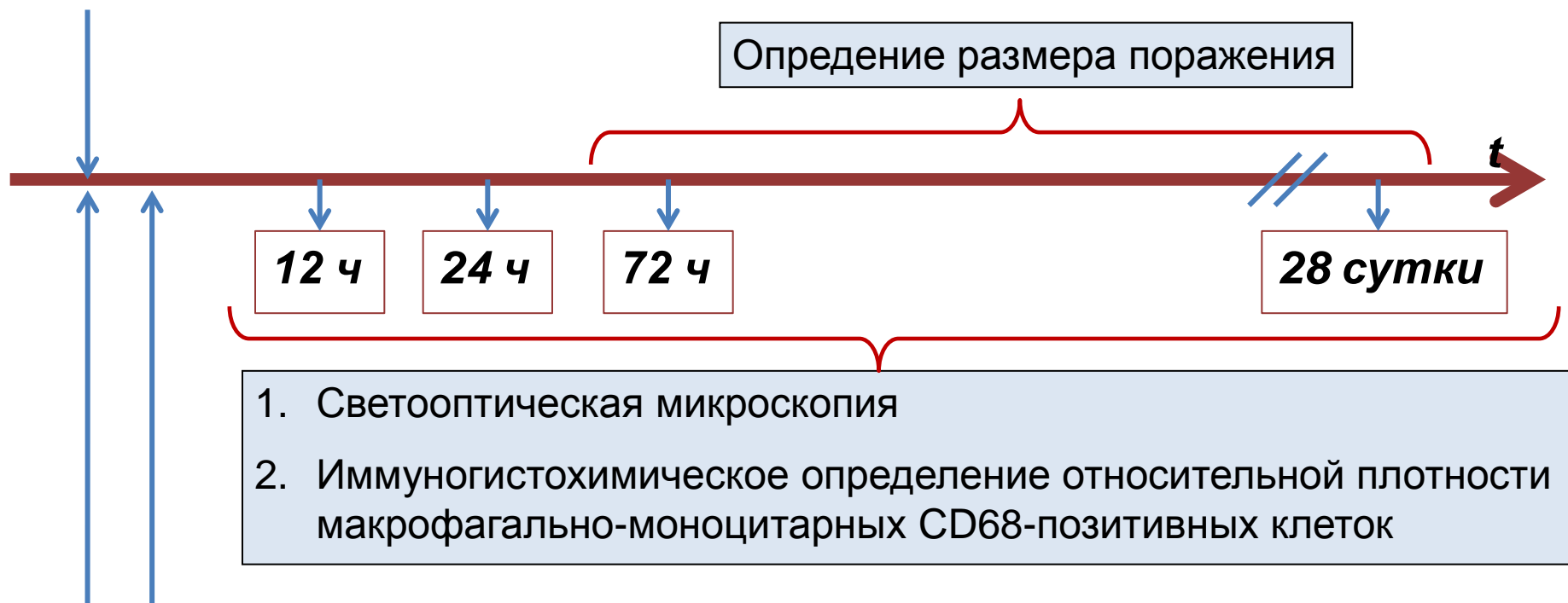
Изучить влияние провоспалительного пептида IX, активатора адгезии моноцитов, на динамику морфологических изменений миокарда в модели ишемии-реперфузии

Задачи:

1. Оценить влияние пептидного препарата на размер зоны некроза и рубца через 72 часа и 28 суток после 2,5 часовой ишемии с последующей реперфузией
2. Оценить влияние пептида IX на динамику относительной плотности CD68-позитивных клеток (макрофагально-моноцитарная фракция) в миокарде после моделирования ишемии-реперфузии
3. Исследовать влияние пептида IX на динамику морфологических изменений миокарда на светооптическом уровне

Схема проведения эксперимента

Пептид IX или 0,9% NaCl внутрисердечно в объеме 50 мкл сразу после перевязки левой коронарной артерии

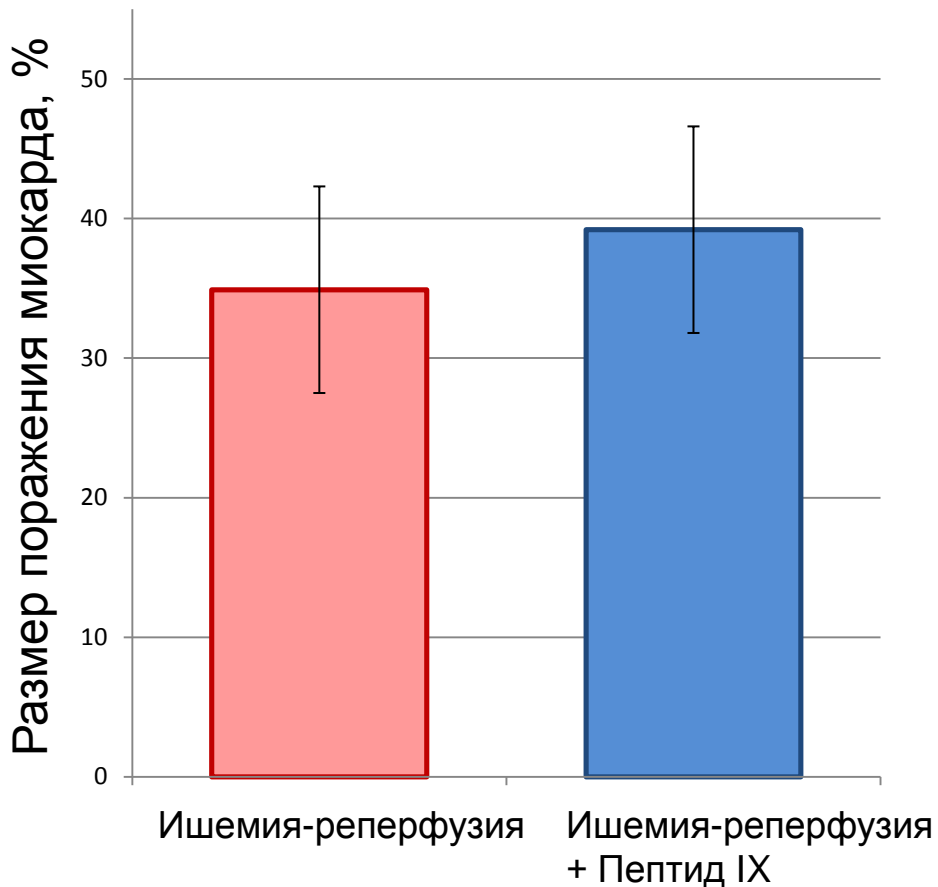


Ишемия 2,5 часа с последующей реперфузией

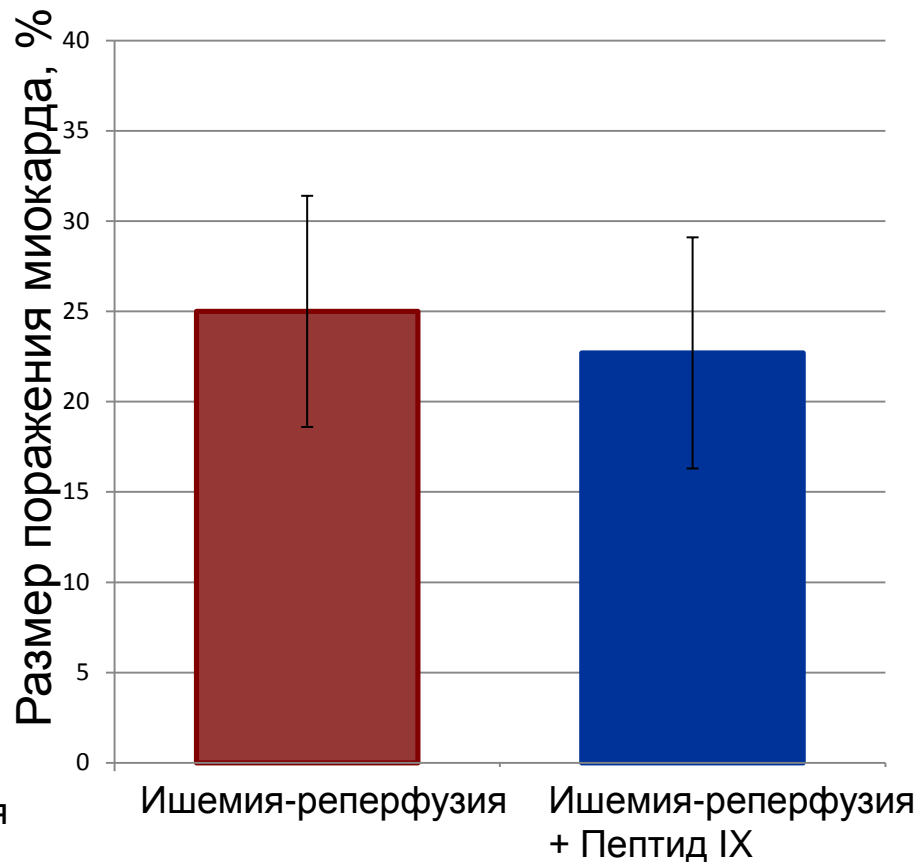
Общее количество экспериментов = 125;

Статистическую обработку проводили с использованием критерия Манна-Уитни

Пептид IX не повлиял на размер поражения



72 часа после моделирования ишемии-реперфузии

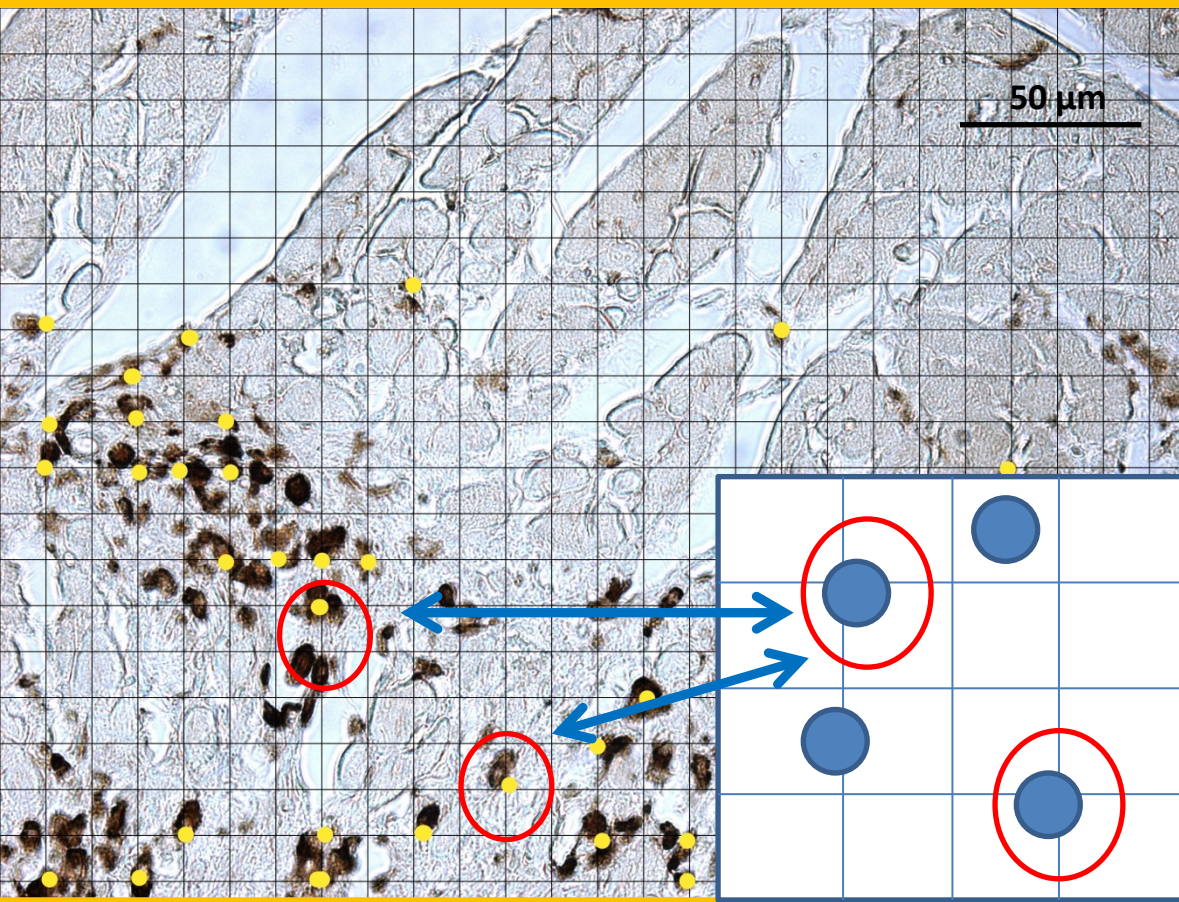


28 суток после моделирования ишемии-реперфузии

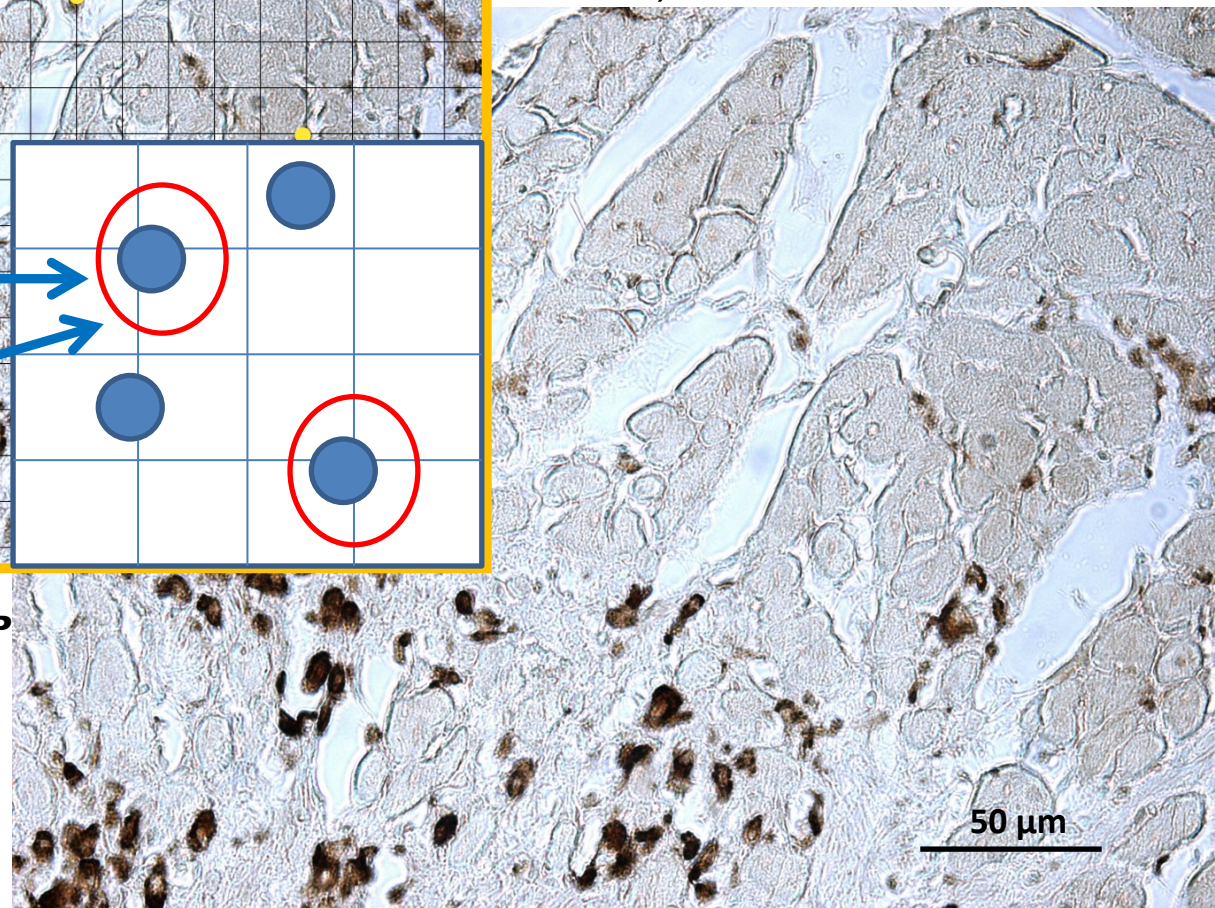
Иммуногистохимическое окрашивание CD68-позитивных клеток

Первичные антитела к CD68 (мышь против крысы)

Вторичные антитела конъюгированные с пероксидазой (коза против мыши)



50 μ m

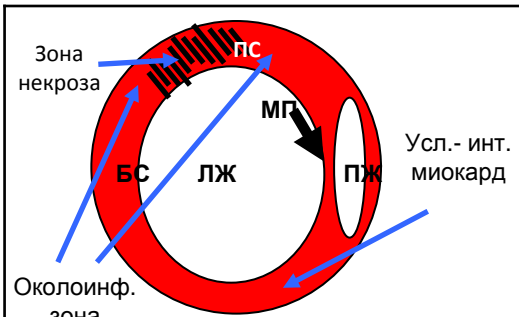


50 μ m

Относительная плотность
= отношение пересечений
окрашенных клеток с узлами
решетки к общему количеству
узлов решетки

Относительная плотность инфильтрации миокарда CD68

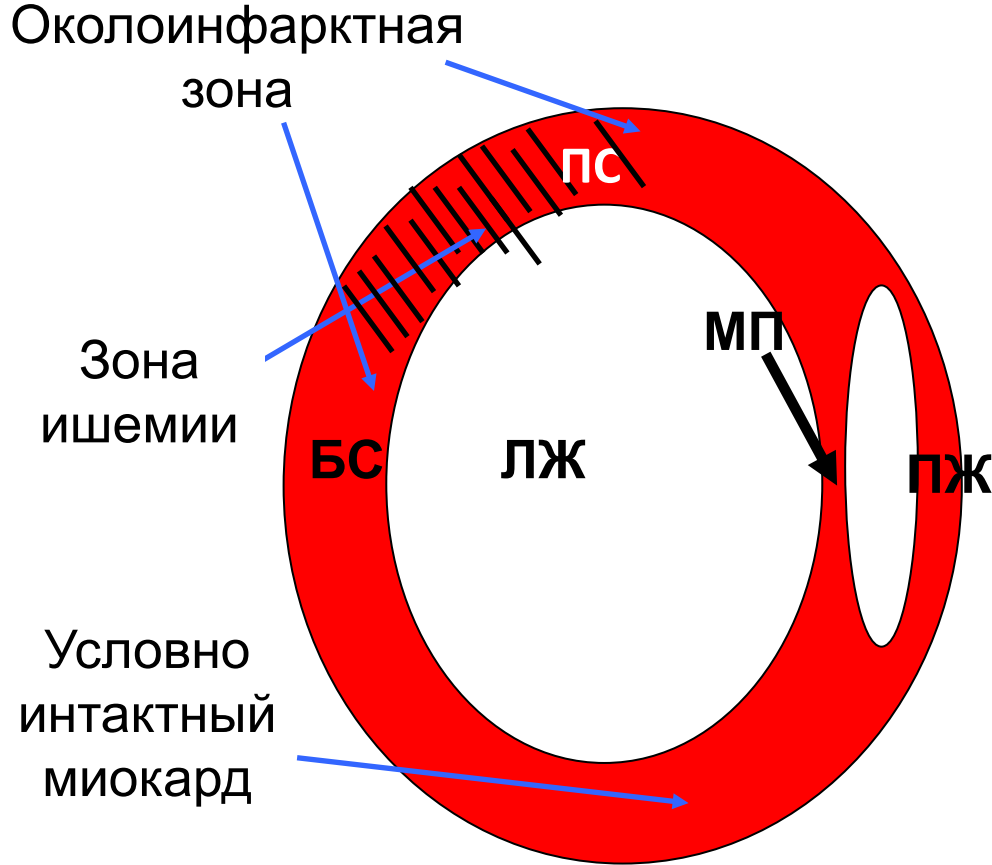
ПОЗИТИВНЫМИ клетками, моноцитами и макрофагами



		Обл. ишемии-реперфузии (рубец для 28 сут.)	Условно-интактный миокард (БС+ МП)	Периинфарктная зона	Зона грануляционной ткани
12 ч.	И-Р+П IX	4,1* ↑	2,1* ↑	нет	нет
	И-Р	3,0	1,5		
24 ч.	И-Р+П IX	1,6	1,5* ↓	7,9* ↓	нет
	И-Р	1,4	1,7		
72 ч.	И-Р+П IX	9,6* ↑	2,3	10,3	46,7
	И-Р	6,5 ↑	2,5	9,0	47,2
28 сут.	И-Р+П IX	1,7* ↓	0,8	<i>И-Р – группа ишемии-реперфузии; И-Р+П IX – группа с введением пептида IX</i>	
	И-Р	4,9 ↓	1,0		

* – P < 0,05 между И-Р и И-Р+П IX

Светооптическая микроскопия (гематоксилин-эозин)

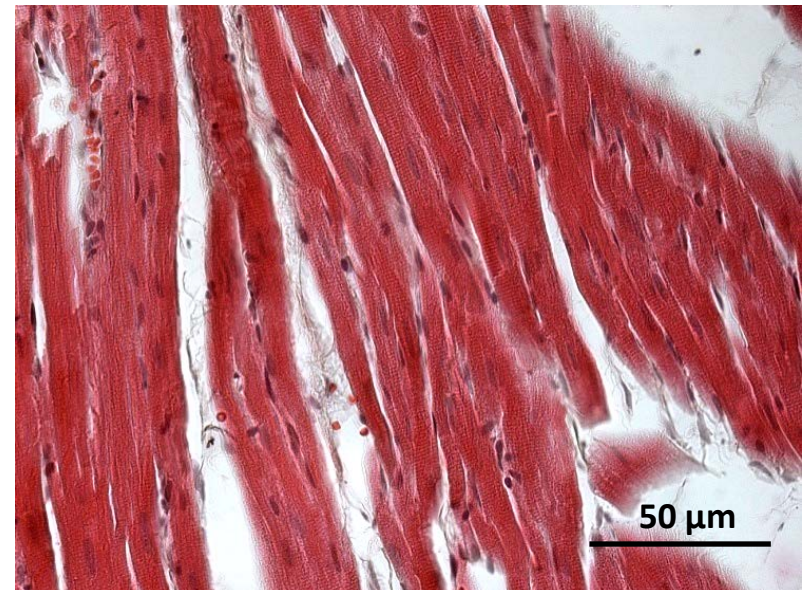


Признаки повреждения миокарда:

- 1. Признаки воспаления*
 - а) ↑ кровоизлияний
 - б) ↑ немиоцитарных клеток на срезе
- 2. Признаки повреждения миокарда*
 - а) Отсутствие поперечной исчерченности КМЦ, ядер
 - б) Неравномерная окраска ядер и цитоплазмы
 - в) Неровные контуры КМЦ

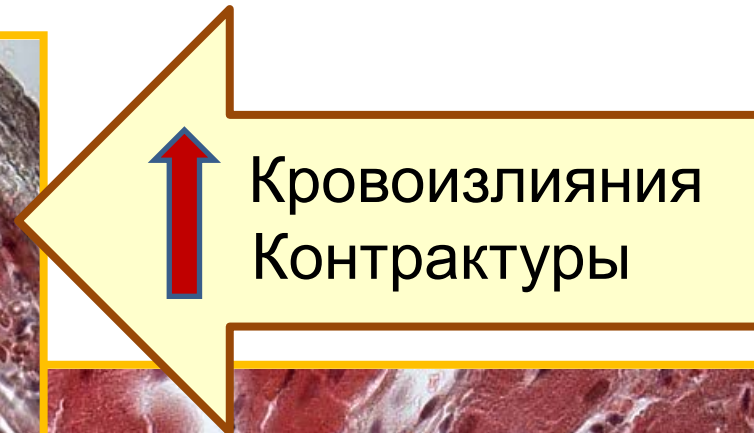
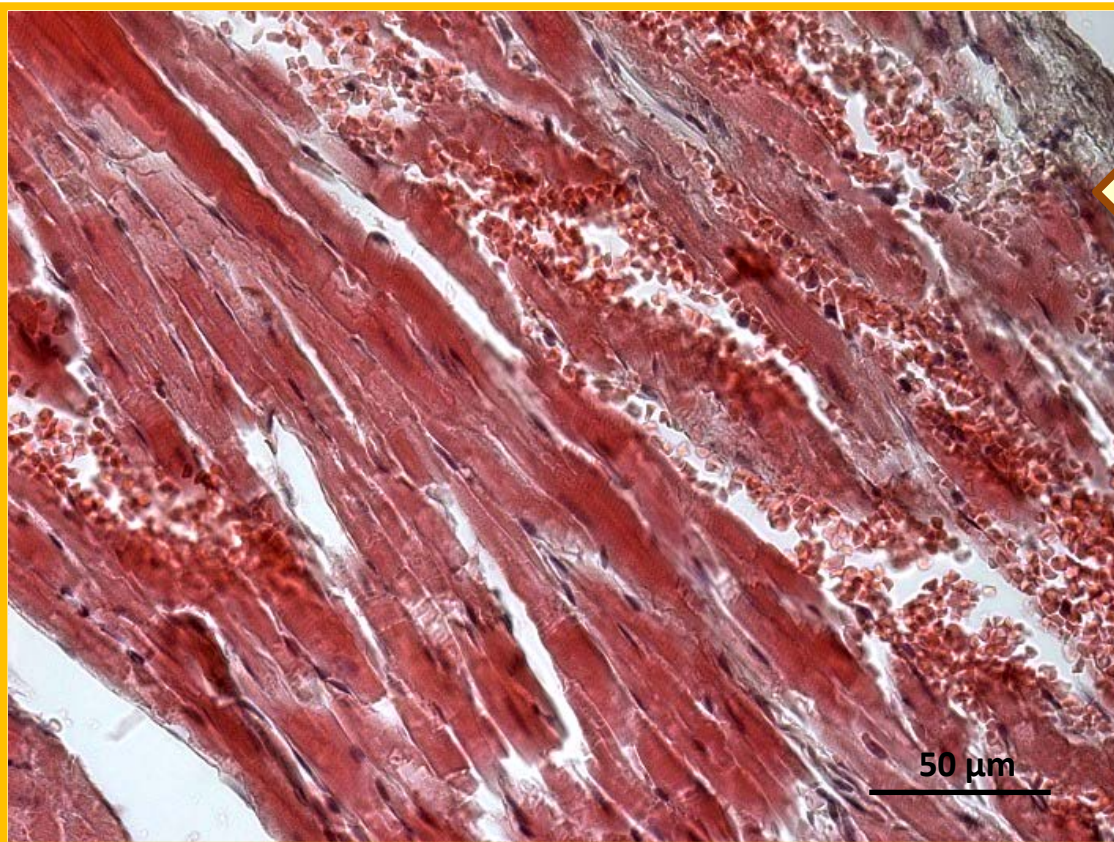
3. Признак реперфузионного повреждения:

Количество контрактур на продольно ориентированных КМЦ



12ч после ишемии-реперфузии

Околоинфарктная зона

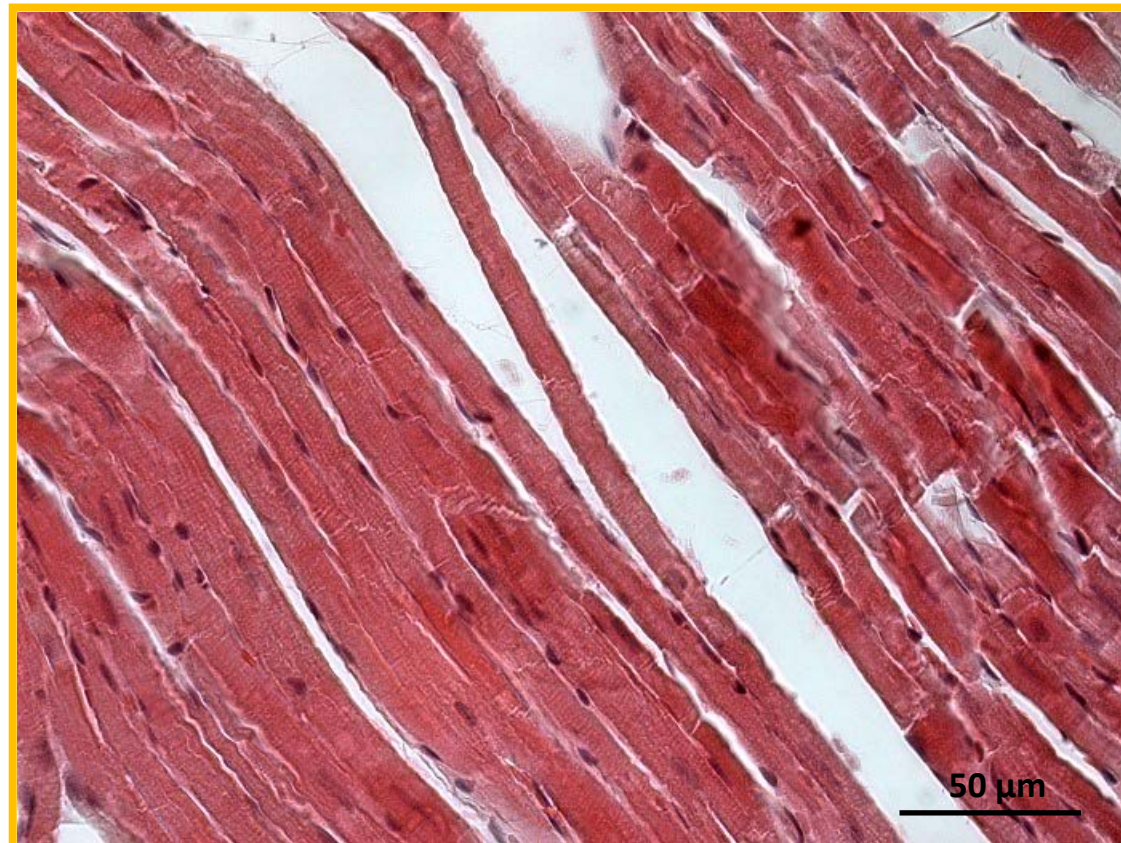


Ишемия-реперфузия
+ПептидIX



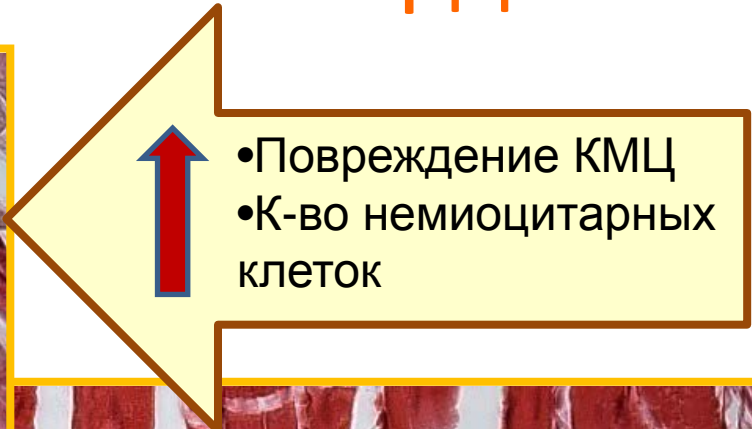
12ч после ишемии-реперфузии

Условно-интактный миокард



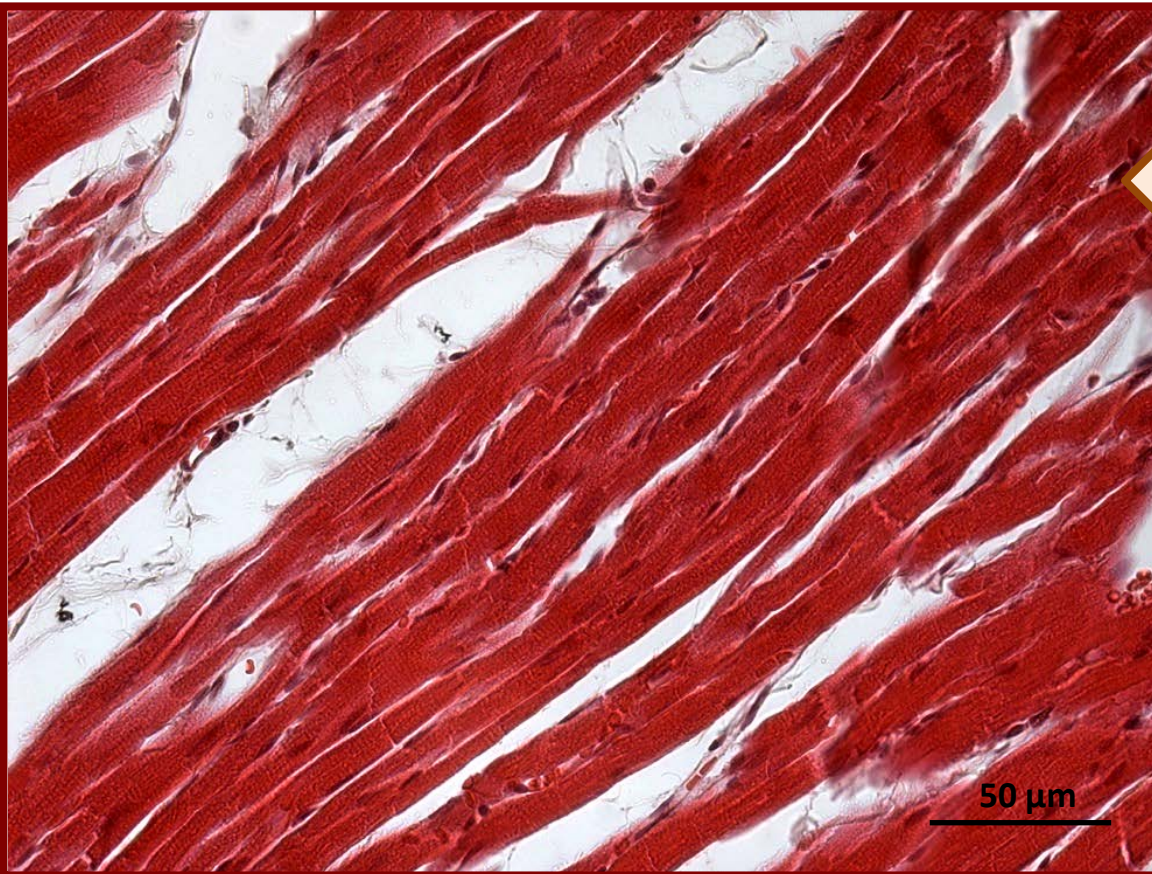
Ишемия-реперфузия
+ Пептид IX

Ишемия-реперфузия



28 сут. после ишемии-реперфузии

Условно-интактный миокард

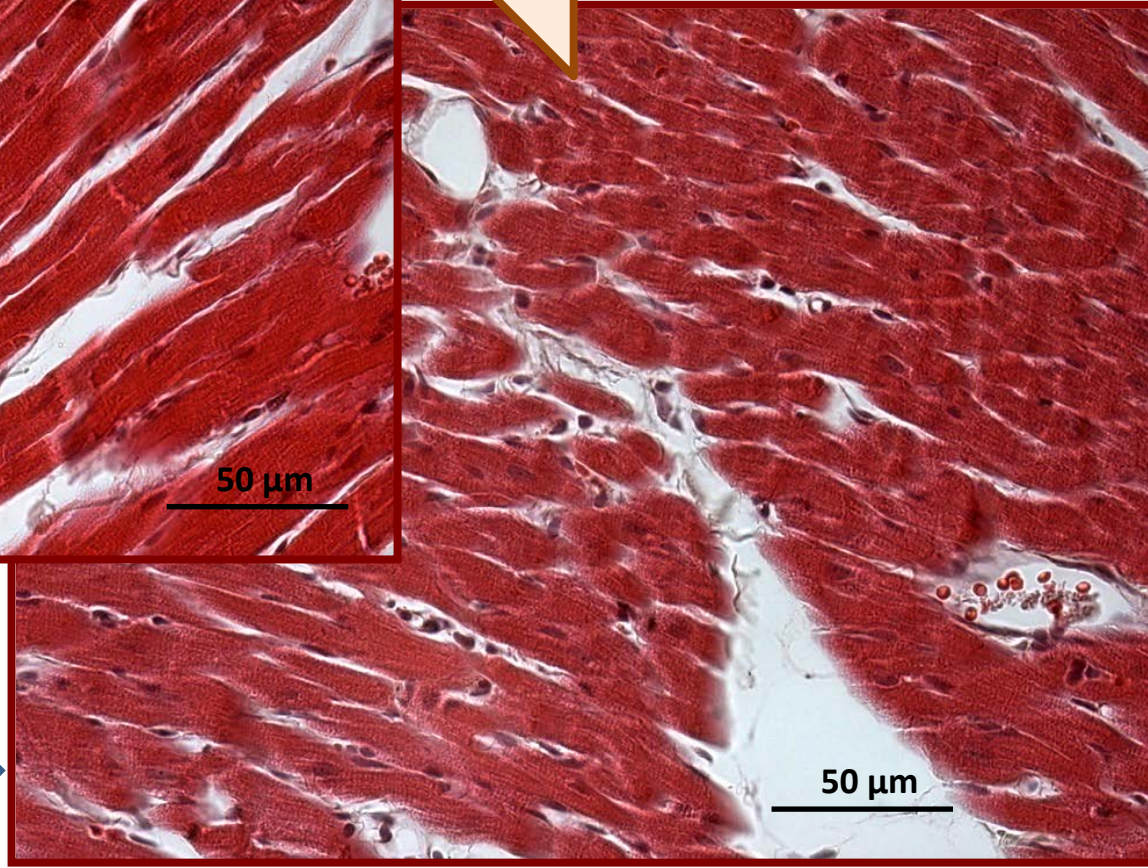


↓

- Повреждение КМЦ
- К-во немиоцитарных клеток

Ишемия-реперфузия
+ Пептид IX

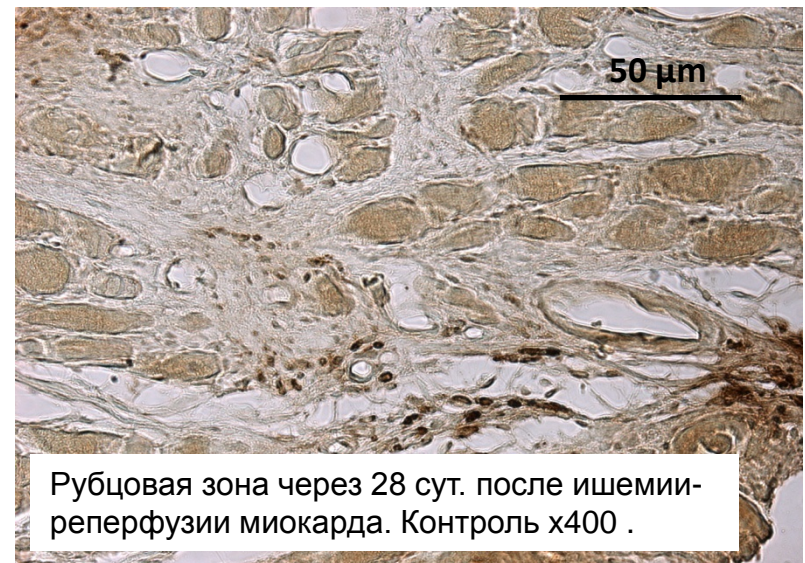
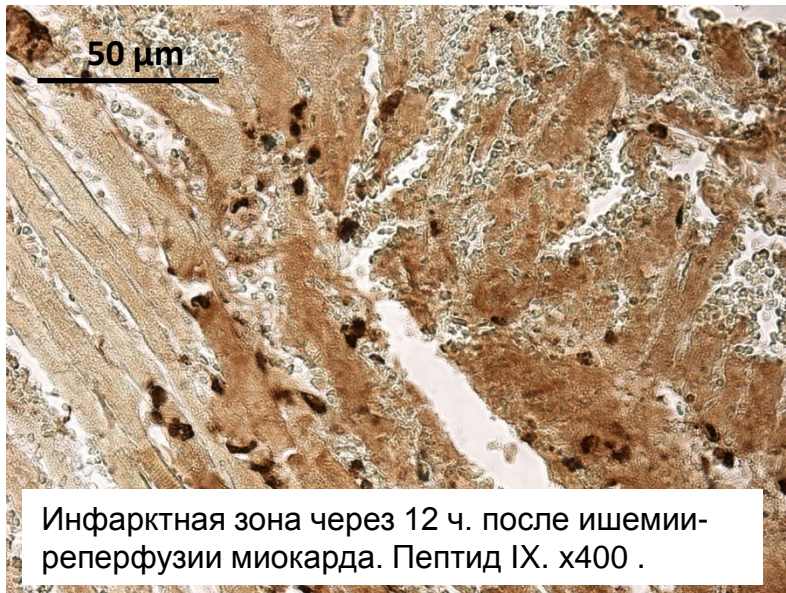
Ишемия-реперфузия



Выводы

1. Пептид IX не влияет на размер некроза через 72 часа и массу рубца через 28 суток после 2,5 часовой ишемии с последующей реперфузией миокарда у крыс
2. Через 12 часов после ишемии-реперфузии пептид IX увеличил относительную плотность CD68-позитивных клеток в инфарктной зоне в условно-интактном миокарде и уменьшил – через 28 суток
3. В острый период после ишемического эпизода пептид усилил реакцию воспаления, что обеспечило большую сохранность миокарда в отставленный период.

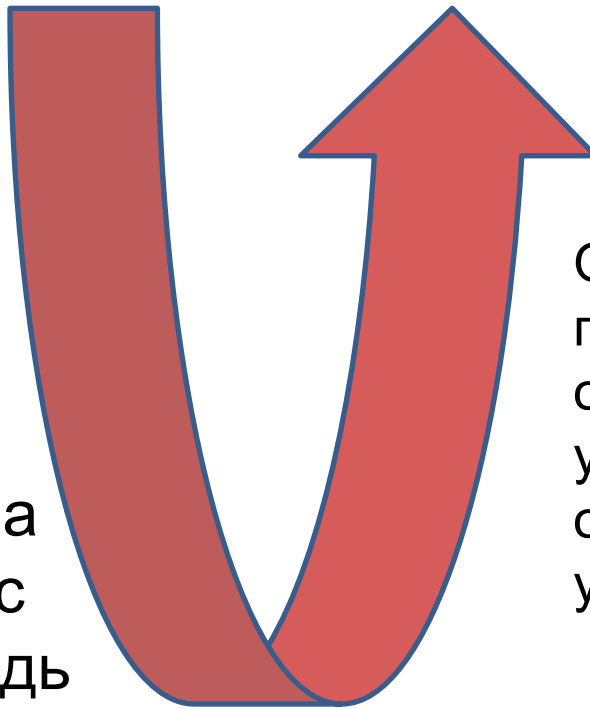
Иммуногистохимическое окрашивание на CD68



Иммуногистохимическая окрасивание CD68-позитивных клеток

Первичные антитела
к CD68 (мышь
против крысы)

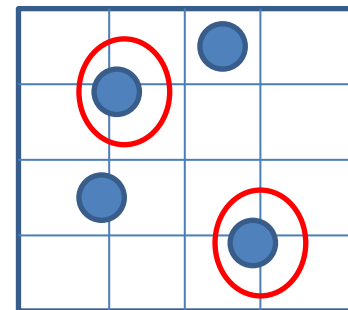
Вторичные антитела
конъюгированные с
пероксидазой (лошадь
против мыши)



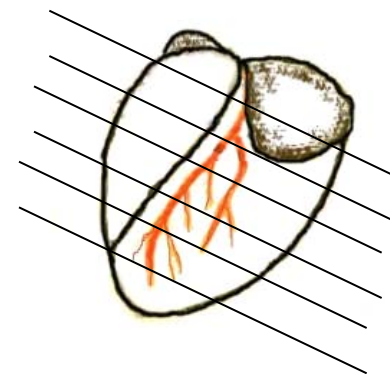
Mann-Whitney
U-test

Отношение количества
пересечений
окрашенных клеток с
узлами решетки к
общему количеству
узлов решетки

Серия случайно
ориентированных
микрофотографий



Оценка размеров некроза



- ✓ Расчет процента площади пораженной ткани к общей площади левого желудочка на каждом срезе с двух сторон препарата
- ✓ Расчет общего размера пораженной ткани для каждого сердца
- ✓ На 28 сутки оценку размера поражения проводят по массе рубца миокарда



- Спасибо за внимание

Иммуногистохимическая окраска CD68-позитивных клеток

3% H₂O₂

97°C, цитратный
буфер

BSA

Первичные антитела
(2 часа, 37°C,
влажная камера)

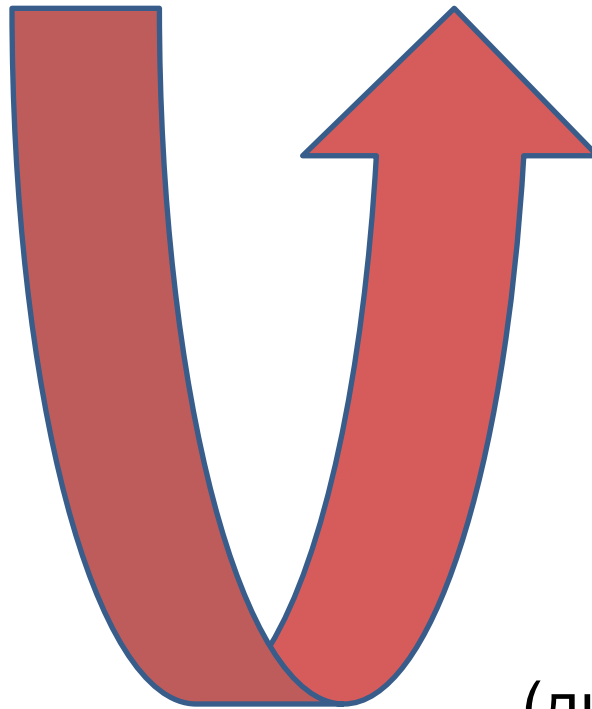
PBS

Вторичные антитела,
1 час

Mann-Whitney
U-test

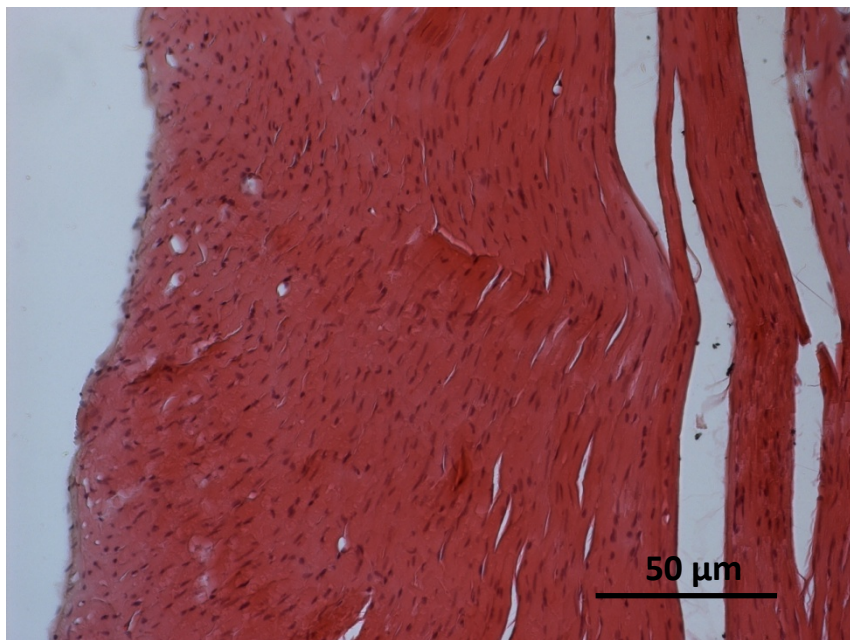
0,5% метиловый
зеленый, покровное
стекло

субстрат
пероксидазы
(диаминобензидин)

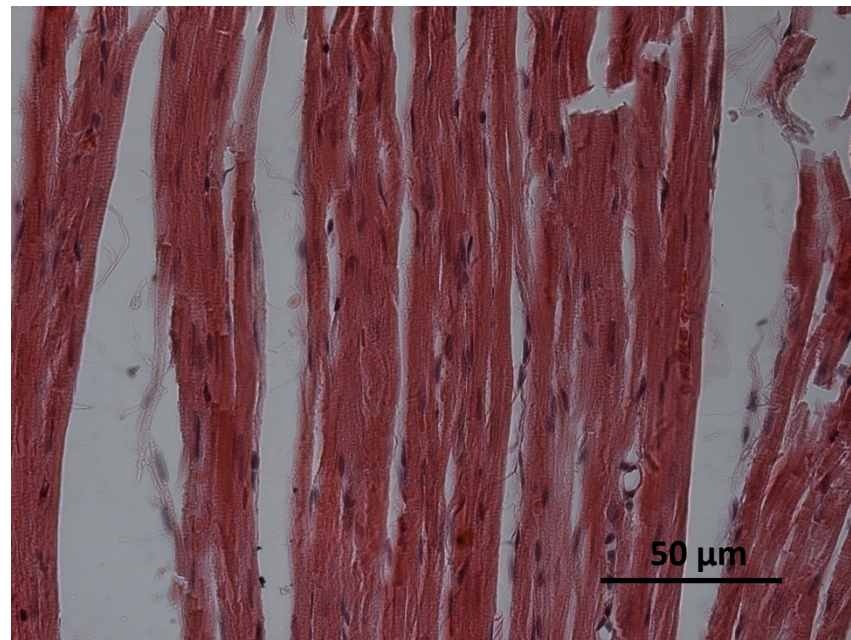


Влияние пептида IX на протекание воспалительной реакции в КМЦ, 72ч

Возрастает количество клеток с поперечной исчерченностью



Контроль



Пептид IX

Результаты полуколичественной оценки основных качественных морфологических признаков

12 ч	К		П			
	некроз	околоинф	интактн	некроз	околоинф	интактн
Поперечная исчерченность	0	2	3	0	1	3
Степень повреждения клеток	4	2	0	4	2	1
Кровоизлияния	3	2	0	3	0	0
Немиоцитарные клетки	3	3	1	3	3	2
Контрактуры	0	2	1	0	0	0

72 ч	К		П			
	Некроз	околоинф	интактн	некроз	околоинф	интактн
Поперечная исчерченность	0	0	0	0	0	2
Степень повреждения клеток	5	2	2	5	2	2
Кровоизлияния	3	0	0	3	0	0
Немиоцитарные клетки	4	3	2	4	3	1
Контрактуры	0	1	1	0	1	1

24 ч	К		П			
	некроз	околоинф	интактн	Некроз	околоинф	интактн
Поперечная исчерченность	0	0	2	0	0	2
Степень повреждения клеток	4	2	1	4	2	1
Кровоизлияния	3	0	0	3	1	0
Немиоцитарные клетки	3	2	2	3	3	1
Контрактуры	0	0	0	0	0	0

28 сут	К		П			
	некроз	околоинф	интактн	некроз	околоинф	интактн
Поперечная исчерченность	0	1	3	0	2	3
Степень повреждения клеток	-	2	2	-	2	1
Кровоизлияния	1	1	0	0	0	0
Немиоцитарные клетки	4	2	3	3	2	1
Контрактуры	0	0	0	0	0	0