

## ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРА-2 ВАЗОЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА (VEGFR2) В КАРДИОМИОЦИТАХ КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ ДОКСОРУБИЦИНА И АМИДА БЕТУЛОНОВОЙ КИСЛОТЫ

Елена Леонидовна ЛУШНИКОВА, Марина Маратовна МЖЕЛЬСКАЯ,  
Елена Владимировна КОЛДЫШЕВА, Марина Геннадьевна КЛИННИКОВА

*Институт молекулярной патологии и патоморфологии ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины  
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2*

Цель исследования – провести иммуногистохимический анализ экспрессии рецептора-2 вазоэндотелиального фактора роста (VEGFR2) в миокарде крыс Вистар при доксорубин-индуцированной кардиомиопатии и введении амида бетулоновой кислоты как агента с политаргетным действием в сопоставлении с выраженностью деструктивных процессов. **Материал и методы.** В работе использованы крысы-самцы линии Вистар (всего 51 животное) при изолированном и сочетанном введении внутривентриально однократной сублетальной дозы доксорубина (7 мг/кг) и курсового внутривентриального введения амида бетулоновой кислоты в дозах 50 и 100 мг/кг в сутки в течение 3 и 14 дней. Проведена иммуногистохимическая оценка экспрессии VEGFR2 в миокарде с вычислением индекса VEGFR2-позитивных кардиомиоцитов, с помощью стереологического анализа определена объемная плотность кардиомиоцитов с литическими изменениями. **Результаты и их обсуждение.** Однократное введение доксорубина (в дозе 7 мг/кг) вызывало деструктивные изменения кардиомиоцитов и гемодинамические расстройства, усиливающиеся по мере увеличения срока эксперимента (14 сут). Совокупность выявленных структурно-метаболических повреждений отражала развитие регенераторно-пластической недостаточности кардиомиоцитов, составляющей основу сердечной недостаточности при антрациклиновой кардиомиопатии. Морфологические изменения миокарда при изолированном введении амида бетулоновой кислоты в значительной степени определялись используемой дозой: при его введении в дозе 100 мг/кг изменения миокарда были такими же по выраженности, как и при применении доксорубина; при сочетанном использовании доксорубина и амида бетулоновой кислоты выявлены наиболее значительные структурные повреждения миокарда. Показано, что увеличение объемной плотности литически измененных кардиомиоцитов коррелировало со значительным увеличением экспрессии VEGFR2 (коэффициент корреляции варьировал от 0,620 до 0,980).

**Ключевые слова:** миокард, кардиомиоциты, доксорубин, амид бетулоновой кислоты, рецептор-2 вазоэндотелиального фактора роста, иммуногистохимия.

Развитие сердечной недостаточности различного генеза всегда сопряжено с дефицитом кардиомиоцитов, поскольку пролиферативный ответ миокарда на повреждающие воздействия очень мал по сравнению со многими другими органами и тканями [2]. Важное значение имеет изучение регенераторных возможностей кардиомиоцитов и способов их стимулирования, что позволит найти подходы к терапевтическим воздействиям на миокард для сохранения его адекватной сократительной способности. В этом же ряду стоит проблема восстановления нормальной работы

сердечной мышцы после цитопатических воздействий, в частности, вызываемых лекарственными препаратами с противоопухолевой активностью [11]. Особую остроту эта проблема приобретает при использовании различных схем химиотерапии для лечения онкологических заболеваний у детей, поскольку у них могут реализовываться отдаленные кардиотоксические эффекты.

Ранее нами были изучены некоторые структурно-клеточные и молекулярно-биологические особенности ремоделирования миокарда при кардиомиопатии, индуцированной доксорубици-

*Лушникова Е.Л. – д.б.н., проф., зав. лабораторией цитологии и клеточной биологии, e-mail: pathol@inbox.ru*

*Мжельская М.М. – аспирант, e-mail: pathol@inbox.ru*

*Колдышева Е.В. – д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов патологических процессов, e-mail: pathol@inbox.ru*

*Клиникова М.Г. – д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории цитологии и клеточной биологии, e-mail: pathol@inbox.ru*

ном и циклофосфамидом. Установлено, что противоопухолевые препараты могут обуславливать развитие регенераторно-пластической недостаточности миокарда даже после однократного воздействия [3]. Необходимость купирования цитотоксических эффектов определяет поиск новых кардиопротекторных агентов, часто среди природных соединений различных классов. По данным, полученным ранее [4], к перспективным цитопротекторным соединениям относятся пентациклические тритерпеноиды лупанового ряда, которые характеризуются также противоопухолевыми и противовоспалительными эффектами [8, 15]. Предполагается, что молекулярно-биологические свойства данных химических агентов, опосредованные экспрессией биологически активных молекул, позволят стимулировать регенераторный потенциал миокарда для коррекции кардиотоксических повреждений и предотвращения развития кардиомиопатий токсического генеза.

В этой связи большое значение имеет изучение экспрессии полифункциональных цитокинов и их рецепторов, реализующих сигнальные клеточные пути, которые активируют регенераторные процессы в кардиомиоцитах. В последнее время внимание исследователей привлекает биологическая роль вазоэндотелиального фактора роста VEGF, обладающего широкой функциональной активностью [10, 12, 18]. VEGF оказывает свои клеточные эффекты, взаимодействуя с рецепторами с тирозинкиназной активностью, главным образом с VEGFR1 и VEGFR2 (KDR/Flk-1). Установлено, что экспрессия VEGFR2 наблюдается не только в эндотелиальных клетках, но и в кардиомиоцитах [7, 13, 19].

Цель работы – провести иммуногистохимический анализ экспрессии VEGFR2 в миокарде крыс Вистар при доксорубин-индуцированной кардиомиопатии и введении амида бетулоновой кислоты как агента с политаргетным действием в сопоставлении с выраженностью деструктивных процессов.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использованы крысы-самцы линии Вистар (51 животное), которым для воспроизведения антрациклиновой кардиомиопатии однократно внутрибрюшинно вводили доксорубин гидрохлорид (ДОК) (Pharmachemie B.V., Нидерланды) в 0,9%-м растворе NaCl, в дозе 7 мг/кг. В качестве агента, снижающего негативные эффекты ДОК, использовали амид бетулоновой кислоты (АБК) ([3-оксо-20(29)-лупен-28-оил]-3-аминопропионовая кислота), синтезированный в Новосибирском институте органической химии

им. Н.Н. Ворожцова СО РАН. Водно-твиновую взвесь АБК вводили внутривентрикулярно крысам ежедневно в течение 14 дней, использовали дозировки 50 и 100 мг/кг, в качестве моноагента или в сочетании с ДОК (в этом случае назначение АБК начиналось через сутки после инъекции ДОК). Контрольным крысам однократно внутрибрюшинно вводили 0,9%-й раствор NaCl, а затем ежедневно внутривентрикулярно – воду в эквивалентном объеме. Всех животных содержали в стандартных условиях по 5–6 особей в клетке при свободном доступе к воде и пище. Проведение исследований одобрено Комитетом по биомедицинской этике ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины.

Крыс контрольной и опытных групп выводили из эксперимента декапитацией в первой половине дня через 3 и 14 суток после введения ДОК и/или АБК. Сердца животных фиксировали в 10%-м растворе нейтрального забуференного формалина, после стандартной гистологической проводки заливали в парафин, окрашивали гематоксилином и эозином, по ван Гизону. На парафиновых срезах оценивали экспрессию VEGFR2 (рецептора-2 вазоэндотелиального фактора роста) в кардиомиоцитах иммуногистохимическим методом с использованием кроличьих поликлональных антител в разведении 1:50 (E3712, Spring Bioscience, США) согласно инструкции производителя. В качестве хромогена использовали 3,3'-диаминобензидин, докрасивали гематоксилином. На парафиновых срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, с помощью стереологического анализа оценивали относительную объемную плотность кардиомиоцитов с внутриклеточными литическими изменениями, используя этот параметр в качестве маркера регенераторно-пластической сердечной недостаточности антрациклинового генеза [1].

Исследования срезов проводили в универсальном микроскопе «Leica DM 4000B» (Leica Microsystems GmbH, Германия). С помощью компьютерной программы «Leica QWin V3» подсчитывали количество VEGFR2-позитивных кардиомиоцитов и измеряли площадь сечения кардиомиоцитов с внутриклеточными литическими изменениями на тестовой площади 61171,56 мкм<sup>2</sup> при увеличении в 400 раз. Для каждого животного подсчет кардиомиоцитов проводили в 15 непересекающихся тестовых площадях. Затем вычисляли индекс VEGFR2-позитивных кардиомиоцитов и относительную объемную плотность кардиомиоцитов с внутриклеточными литическими изменениями. Статистическую обработку выполняли с использованием критерия Стьюдента, вычисляли коэффициент корреляции по Пирсону. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Общетоксическое действие ДОК в дозе 7 мг/кг проявлялось в развитии асцита (наиболее выраженного через трое суток после введения ДОК), диспепсических расстройств, изменении поведенческих реакций; одно животное погибло через 7 сут после введения препарата. По данным световой микроскопии, миокард контрольных животных имел обычное строение, отмечались единичные кардиомиоциты с контрактурными повреждениями I и II степени и кардиомиоциты с разреженной (лизированной) саркоплазмой; объемная плотность последних составляла  $3,16 \pm 0,48$  %. По данным иммуногистохимического анализа, экспрессия VEGFR2 выявлялась преимущественно в эндотелиальных клетках кровеносных капилляров, интрамуральных артерий и в некоторых кардиомиоцитах (рисунки, а). Индекс VEGFR2-позитивных кардиомиоцитов в миокарде контрольных животных был невысоким и составил  $13,58 \pm 1,45$  %.

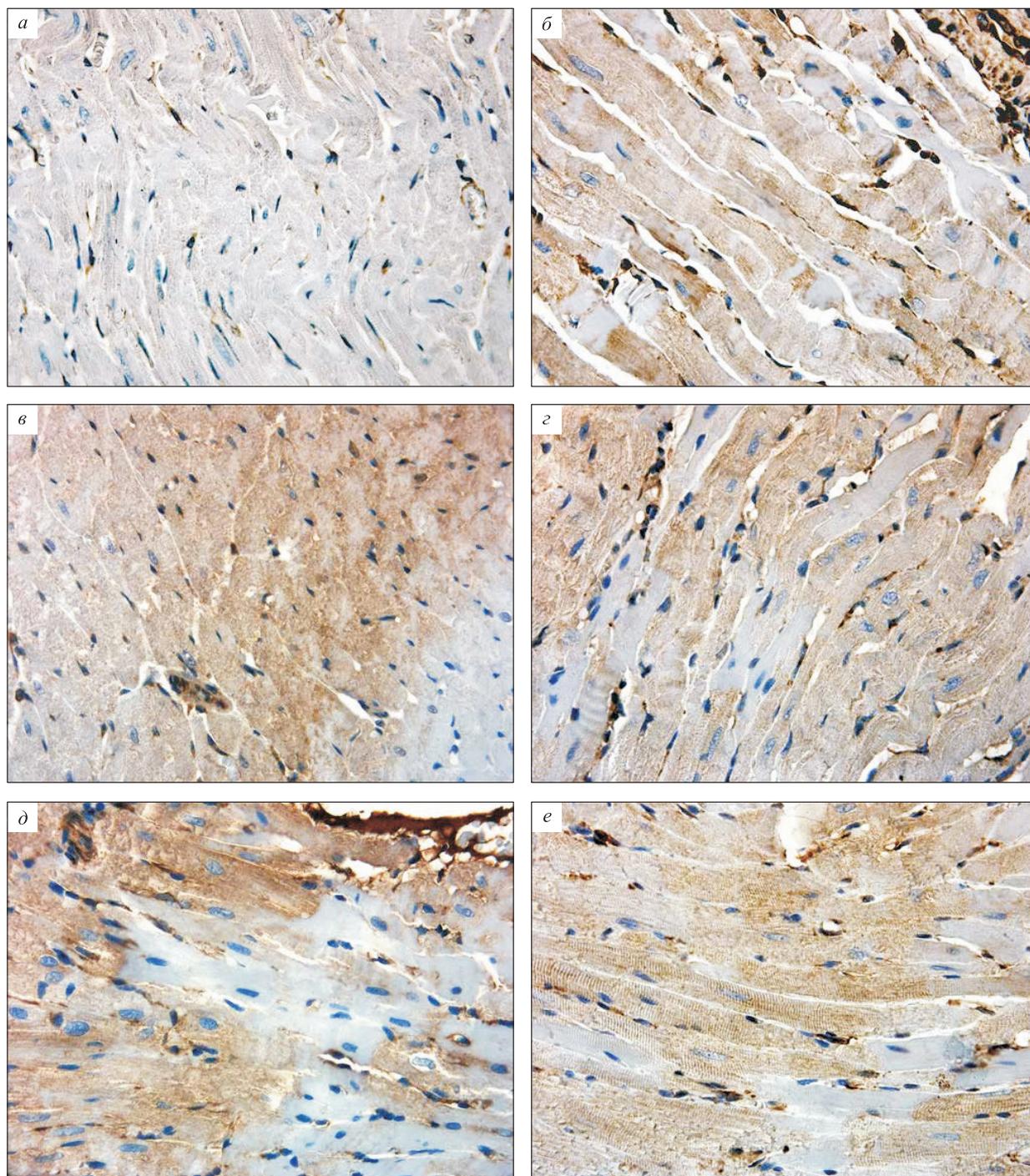
Через трое суток после введения ДОК в миокарде крыс регистрировались отдельные кардиомиоциты или их небольшие группы с контрактурными повреждениями миофибрилл, преимущественно II и III степени, при этом в 5 раз возрастала объемная плотность кардиомиоцитов с литическими повреждениями саркоплазмы (до  $18,85 \pm 2,18$  %;  $p < 0,001$ ). При иммуногистохимическом исследовании установлено, что VEGFR2 экспрессировался не только в эндотелиоцитах кровеносных сосудов, но и во многих кардиомиоцитах. В этот срок наблюдения индекс VEGFR2-позитивных кардиомиоцитов был в 7 раз выше, чем в контроле –  $94,32 \pm 0,76$  % ( $p < 0,001$ ).

Через 14 суток после введения ДОК деструктивные изменения в миокарде экспериментальных животных усиливались, появлялись признаки развития диффузного кардиосклероза. Манифестировали нарушения гемодинамики, которые проявлялись в венозном и капиллярном полнокровии, лимфостазе, умеренном отеке. В этот срок эксперимента объемная плотность кардиомиоцитов с литическими повреждениями увеличилась более значительно (в 6,8 раза по сравнению с контролем), чем в предыдущий срок (до  $21,65 \pm 1,33$  %;  $p < 0,001$ ), что свидетельствовало о времязависимом эффекте доксорубина. Аналогичный характер повреждений миокарда под действием антрациклиновых антибиотиков отмечен и другими исследователями, которые, в частности, показали, что их кардиотоксичность проявляется протеолизисом, апоптозом, в ряде

случаев некрозом кардиомиоцитов и последующим развитием заместительного фиброза [9, 14]. Экспрессия VEGFR2 регистрировалась во всех эндотелиоцитах и во многих кардиомиоцитах, в которых продукты реакции локализовались в основном в миофибрилярной зоне (рисунки, б). Индекс VEGFR2-позитивных кардиомиоцитов был увеличен в 6,7 раза (до  $91,14 \pm 1,56$  %;  $p < 0,001$ ). Следует отметить, что иммуногистохимическая реакция отсутствовала или была незначительной в так называемых «малых» кардиомиоцитах, которые, как правило, были собраны в небольшие кластеры. Между объемной плотностью литически измененных кардиомиоцитов и индексом VEGFR2-позитивных кардиомиоцитов обнаружена сильная положительная корреляционная связь ( $r = 0,958$ ;  $p < 0,001$ ).

У крыс, получавших АБК в качестве моноагента как в дозе 50 мг/кг, так и в дозе 100 мг/кг, морфологическая картина повреждения миокарда была сходной. Через трое суток в миокарде отмечалась мозаичность окрашивания мышечных клеток сердца: встречались кардиомиоциты с диффузными литическими изменениями саркоплазмы, деструкцией и просветлением околоядерных зон и кардиомиоциты с контрактурными повреждениями (резко эозинофильной саркоплазмой). В некоторых кардиомиоцитах наблюдались многочисленные липидные включения; липидные капли встречались также в интерстициальных прослойках. Следует отметить доза- и времязависимые альтеративные эффекты АБК: объемная плотность кардиомиоцитов с литическими изменениями при использовании АБК в дозе 50 мг/кг была в 2,7 раза меньше ( $5,32 \pm 1,04$  %), чем при использовании АБК в дозе 100 мг/кг ( $14,23 \pm 0,41$  %;  $p < 0,01$ ). Через 14 суток все отмеченные изменения миокарда усиливались: количество мышечных клеток сердца с литическими и вакуолеобразными изменениями саркоплазмы значительно возрастало. В этот срок также сохранялись различия в количественных характеристиках поврежденных кардиомиоцитов, отражающие доза-зависимый эффект: объемная плотность кардиомиоцитов с литическими изменениями при дозе АБК 50 мг/кг ( $12,62 \pm 1,08$  %;  $p < 0,01$ ) увеличилась в 3,9 раза по сравнению с контролем и в 2,4 раза по сравнению с предыдущим сроком наблюдения. При дозе АБК 100 мг/кг этот показатель ( $22,09 \pm 1,73$  %) вырос в 7,2 раза по сравнению с контролем и 1,6 раза по сравнению с предыдущим сроком.

Экспрессия VEGFR2 регистрировалась как в эндотелиоцитах кровеносных сосудов, так и в кардиомиоцитах, в которых продукт реакции был



**Рис.** Иммуногистохимическое выявление VEGFR2 в миокарде крыс при действии доксорубицина и амида бетулоновой кислоты. Ув. 400. а – миокард интактных животных; б – неравномерность иммуногистохимической реакции через 14 суток после применения ДОК; в – экспрессия VEGFR2 в эндотелиоцитах и кардиомиоцитах после применения АБК в дозе 50 мг/кг; г – отсутствие экспрессии в «малых» кардиомиоцитах после применения АБК в дозе 100 мг/кг; д – экспрессия VEGFR2 после сочетанного применения ДОК и АБК в дозе 50 мг/кг; е – экспрессия VEGFR2 после сочетанного применения ДОК и АБК в дозе 100 мг/кг

представлен в виде мелкой зернистости в саркоплазме (рисунок, в). В «малых» кардиомиоцитах экспрессия VEGFR2 не выявлялась (рисунок, з). Индекс VEGFR2-позитивных кардиомиоцитов при введении АБК в дозе 50 мг/кг через трое суток эксперимента составил  $96,36 \pm 0,21 \%$ , через 14 суток –  $92,86 \pm 0,58\%$ , что превышало контрольный уровень соответственно в 7 и 6,8 раза ( $p < 0,001$ ). При использовании АБК в дозе 100 мг/кг индекс VEGFR2-позитивных кардиомиоцитов через трое суток возрос в 6,9 раза ( $93,14 \pm 1,19 \%$ ;  $p < 0,01$ ), через 14 суток – в 6,6 раза по сравнению с контролем ( $90,28 \pm 0,53 \%$ ;  $p < 0,001$ ). Между объемной плотностью литически измененных кардиомиоцитов и индексом VEGFR2-позитивных кардиомиоцитов выявлена положительная корреляционная связь: для АБК в дозе 50 мг/кг  $r = 0,620$  ( $p < 0,01$ ), для АБК в дозе 100 мг/кг  $r = 0,879$  ( $p < 0,01$ ).

Сочетанное использование ДОК и АБК обуславливало сходные с ДОК-индуцированными структурные изменения миокарда – как по характеру повреждений, так и по их выраженности. Сохранялась мозаичность окрашивания кардиомиоцитов, обусловленная разным характером их повреждений (литическими изменениями и контрактурами миофибрилл); в отдельных клетках наблюдались липидные включения, в строме – диффузная инфильтрация мононуклеарами, интерстициальный отек, геморрагии. Начиная с 14-х суток регистрировалось развитие периваскулярного и межмышечного фиброза. При сочетанном применении ДОК и АБК в дозе 50 мг/кг объемная плотность литически измененных кардиомиоцитов через трое суток составляла  $12,42 \pm 1,58 \%$ , что было больше контроля в 3,9 раза ( $p < 0,01$ ) и в 2,3 раза больше, чем при введении АБК в той же дозе в качестве моноагента. Через 14 суток этот показатель возрос до  $21,70 \pm 0,5 \%$ , что было в 6,9 раза больше, чем в контроле ( $p < 0,01$ ), и в 1,7 раза больше, чем после введения АБК в той же дозе.

При сочетанном применении ДОК и АБК в дозе 50 мг/кг характер распределения продукта иммуногистохимической реакции был таким же, как и при действии ДОК, но интенсивность окрашивания кардиомиоцитов была существенно выше (рисунок, д). Сохранялась мозаичность окрашивания кардиомиоцитов, обусловленная отсутствием иммуногистохимической реакции в «малых» кардиомиоцитах (рисунок, д). Индекс VEGFR2-позитивных кардиомиоцитов в миокарде крыс через трое суток был увеличен в 6,9 раза по сравнению с контролем (до  $93,94 \pm 0,99 \%$ ;  $p < 0,001$ ), через 14 суток – в

6,5 раза (до  $88,69 \pm 2,91 \%$ ;  $p < 0,001$ ). В данном случае также установлена положительная корреляционная связь между объемной плотностью литически измененных кардиомиоцитов и индексом VEGFR2-позитивных кардиомиоцитов ( $r = 0,824$ ;  $p < 0,001$ ).

После сочетанного применения ДОК и АБК в дозе 100 мг/кг объемная плотность литически измененных кардиомиоцитов через трое суток составляла  $20,62 \pm 0,81 \%$  (больше в 6,5 раза по сравнению с контролем,  $p < 0,01$ ), к 14-м суткам этот показатель возрастал до  $24,72 \pm 1,14 \%$  (больше контроля в 7,8 раза,  $p < 0,01$ ). Следует отметить, что использование этой дозы АБК, по сравнению с меньшей дозой, вызвало более значительное увеличение количества литически измененных кардиомиоцитов в первый срок эксперимента (в 1,7 раза), но через 14 суток при обеих дозировках выраженность литических изменений кардиомиоцитов была одинаковой.

При сочетанном применении ДОК и АБК в дозе 100 мг/кг установлено, что через трое суток индекс VEGFR2-позитивных кардиомиоцитов увеличился в 6,6 раза по сравнению с контролем (до  $89,31 \pm 1,32 \%$ ;  $p < 0,001$ ), что было несколько меньше, чем при сочетанном введении ДОК и АБК в дозе 50 мг/кг. Общая картина распределения и локализации в кардиомиоцитах продукта иммуногистохимической реакции была такой же, как и в других группах (рисунок, е). Через 14 суток этот показатель возрос до  $94,55 \pm 0,86 \%$  ( $p < 0,001$ ). Коэффициент корреляции между объемной плотностью литически измененных кардиомиоцитов и индексом VEGFR2-позитивных кардиомиоцитов в данной группе равнялся  $r = 0,980$  ( $p < 0,001$ ). Возможно, разные по выраженности изменения индексов VEGFR2-позитивных кардиомиоцитов при использовании разных доз АБК отражают особенности экспрессии белка VEGFR2 в зависимости от степени активации цитопротекторных реакций в кардиомиоцитах.

Выявленное нами значительное усиление экспрессии VEGFR2 в кардиомиоцитах при действии ДОК и АБК как при изолированном, так и при сочетанном применении может быть связано со стимуляцией цитопротекторных реакций, поскольку реализация эффектов VEGF, одного из распространенных во внеклеточном матриксе митогенов, в кардиомиоцитах опосредуется через внутриклеточный сигнальный путь PI3K/Akt, играющий центральную роль в регуляции роста, дифференцировки и выживании клеток [5, 16, 17].

Применение производных бетулоновой кислоты как агентов с политаргетным действием для возможной коррекции кардиотоксических

повреждений направлено преимущественно на уменьшение продукции свободных радикалов, усиление экспрессии эндогенных антиоксидантов и нейтрализацию действия провоспалительных цитокинов [6]. Выяснение некоторых молекулярных механизмов защитной реакции позволит добавить в этот список индукцию цитопротекторных реакций кардиомиоцитов, и экспрессия рецепторов VEGFR2 может служить маркером внутриклеточных изменений кардиомиоцитов, позволяющих сохранять клеточный гомеостаз. Показано, в частности, что активация VEGFR2 играет важную роль в морфогенетических процессах в миокарде, при этом стимуляция VEGFR-сигнальных каскадов может достигаться не только за счет VEGF, но и за счет других лигандов [20].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Однократное введение ДОК (в дозе 7 мг/кг) вызывает повреждения кардиомиоцитов и гемодинамические расстройства, усиливающиеся по мере увеличения срока эксперимента (14 суток). Совокупность выявляемых структурно-метаболических повреждений представляет собой морфологическую картину регенераторно-пластической недостаточности кардиомиоцитов с последующей их диффузной элиминацией и развитием кардиофиброза, составляющими основу антрациклин-индуцированной кардиомиопатии.

АБК, примененный в дозе 50 мг/кг, не оказывал значимого цитотоксического воздействия на кардиомиоциты только в течение первых трех суток, затем отмечался его умеренный цитотоксический эффект. Применение АБК в дозе 100 мг/кг оказывало на кардиомиоциты почти такое же цитотоксическое воздействие, как и назначение ДОК (объемная плотность литически измененных кардиомиоцитов возрастала примерно в 7 раз). При сочетанном применении обоих химических соединений умеренный цитопротекторный эффект АБК проявлялся только в дозе 50 мг/кг (если судить по объемной плотности литически измененных кардиомиоцитов) и только в течение первых трех суток при сравнении с действием только ДОК. При использовании ДОК и АБК в дозе 100 мг/кг через 14 суток регистрировались более выраженные структурные изменения миокарда (объемная плотность литически измененных кардиомиоцитов была максимальной) и наиболее выраженное увеличение экспрессии VEGFR2 в кардиомиоцитах.

Выявленное с помощью иммуногистохимического анализа значительное усиление экспрес-

сии VEGFR2 в кардиомиоцитах (в 6,5–7 раз по сравнению с контролем) при действии ДОК и АБК при различных режимах применения свидетельствует о важной роли VEGF-опосредованных сигнальных каскадов в реализации цитопротекторных реакций и организации регенераторных процессов в миокарде.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Непомнящих Л.М., Лушникова Е.Л., Молодых Н.А., Клиникова М.Г., Молодых О.П. Ультраструктура и стереология кардиомиоцитов при развитии регенераторно-пластической недостаточности миокарда в онтогенезе // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2011. 151. (1). 100–106.
2. Непомнящих Л.М., Лушникова Е.Л., Гольдштейн Д.В. Способны ли современные клеточные технологии устранить биологические ограничения тканеспецифической регенерации миокарда? // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2005. (2). 63–74.
3. Непомнящих Л.М., Лушникова Е.Л., Клиникова М.Г., Молодых О.П. Влияние препаратов с противопухоловой активностью – доксорубицина и циклофосфана – на структурную реорганизацию миокарда крыс и численность кардиомиоцитов // Сиб. онкол. журн. 2011. (4). 30–35.
4. Толстикова Т.Г., Сорокина И.В., Толстиков Г.А., Фехтер О.Б. Терпеноиды ряда лупана – биологическая активность и фармакологические перспективы. I. Нативные производные лупана // Биоорг. химия. 2006. 32. (1). 42–55.
5. Brazil D.P., Park J., Hemmings B.A. PKB binding proteins: getting in on the Akt // Cell. 2002. 111. 293–303.
6. Cardinale D., Bacchiani G., Beggiano M., Colombo A., Cipolla C.M. Strategies to prevent and treat cardiovascular risk in cancer patients // Semin. Oncol. 2013. 40. 186–198.
7. Chiusa M., Hool S.L., Truetsch P., Djafarzadeh S., Jakob S.M., Seifriz F., Scherer S.J., Suter T.M., Zuppinger C., Zbinden S. Cancer therapy modulates VEGF signaling and viability in adult rat cardiac microvascular endothelial cells and cardiomyocytes // J. Mol. Cell. Cardiol. 2012. 52. 1164–1175.
8. Cichewicz R.H., Kouzi S.A. Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection // Med. Res. Rev. 2004. 24. 90–114.
9. Choi J.Y., Youn H.J., Kang J.H. Transthoracic echocardiographic assessment of adriamycin-induced cardiomyopathy in rats with a 15 MHz transducer // J. Korean Soc. Echocardiogr. 2000. 8. 78–86.
10. Compernelle V., Brusselmans K., Acker T., Hoet P., Tjwa M., Beck H., Plaisance S., Dor Y., Keshet E., Lupu F., Nemery B., Dewerchin M., Van Veldhoven P.

- Plate K., Moons L., Collen D., Carmeliet P. Loss of HIF-2 alpha and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice // *Nat. Med.* 2002. 8. 702–710.
11. Gianni L., Herman E.H., Lipshultz S.E., Minotti G., Sarvazyan N., Sawyer D.B. Anthracycline cardiotoxicity: from bench to bedside // *J. Clin. Oncol.* 2008. 26. (22). 3777–3784.
12. Feng Y., Rhodes P.G., Bhatt A.J. Dexamethasone pre-treatment protects brain against hypoxic-ischemic injury partially through up-regulation of vascular endothelial growth factor A in neonatal rats // *Neuroscience.* 2011. 179. 223–232.
13. Li F., Zhao H., Liao Y., Takashima S., Asano Y., Shintani Y., Hori M., Kitakaze M. Higher mortality in heterozygous neuropilin-1 mice after cardiac pressure overload // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. 370. 317–321.
14. Lim C.C., Zuppinger C., Guo X., Kuster G.M., Helmes M., Eppenberger H.M., Suter T.M., Liao R., Sawyer D.B. Anthracyclines induce calpain-dependent titin proteolysis and necrosis in cardiomyocytes // *J. Biol. Chem.* 2004. 279. 9. 8290–8299.
15. Park S.Y., Kim H.J., Kim K.R., Lee S.K., Lee C.K., Park K.K. Betulinic acid, a bioactive pentacyclic triterpenoid, inhibits skeletal-related events induced by breast cancer bone metastases and treatment // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2014. 275. 152–162.
16. Ruixing Y., Dezhai Y., Hai W., Kai H., Xianghong W., Yuming C. Intramyocardial injection of vascular endothelial growth factor gene improves cardiac performance and inhibits cardiomyocyte apoptosis // *Eur. J. Heart Fail.* 2007. 9. (4). 343–351.
17. Shiojima I., Walsh K. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis // *Circ. Res.* 2002. 90. 1243–1250.
18. Westenbrink B.D., Ruifrok W.P., Voors A.A., Tilton R.G., van Veldhuisen D.J., Schoemaker R.G., van Gilst W.H., de Boer R.A. Vascular endothelial growth factor is crucial for erythropoietin-induced improvement of cardiac function in heart failure // *Cardiovasc. Res.* 2010. 7. (1). 30–39.
19. Zentilin L., Puligadda U., Lionetti V., Zacchigna S., Collesi C., Pattarini L., Ruozi G., Camporesi S., Sinagra G., Pepe M., Recchia F.A., Giacca M. Cardiomyocyte VEGFR-1 activation by VEGF-B induces compensatory hypertrophy and preserves cardiac function after myocardial infarction // *FASEB J.* 2010. 24. (5). 1467–1478.
20. Zhang X., Wang X., Zhu H., Kranias E.G., Tang Y., Peng T., Chang J., Fan G.C. Hsp20 functions as a novel cardiokine in promoting angiogenesis via activation of VEGFR2 // *PLoS One.* 2012. 7. (3). e32765.

## IMMUNOHISTOCHEMICAL EVALUATION OF VASOENDOTHELIAL GROWTH FACTOR RECEPTOR-2 (VEGFR2) EXPRESSION IN RAT CARDIOMYOCYTES UNDER DOXORUBICIN AND BETULONIC ACID AMIDE ADMINISTRATION

Elena Leonidovna Lushnikova, Marina Maratovna MZHEL'SKAYA,  
Elena Vladimirovna KOLDYSHEVA, Marina Gennadievna KLINNIKOVA

*Institute of Molecular Pathology and Pathomorphology, Federal Research Center  
of Fundamental and Translational Medicine  
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2*

---

The aim of the study is to perform an immunohistochemical analysis of the expression of the vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) in the myocardium of Wistar rats in doxorubicin-induced cardiomyopathy and the administration of betulonic acid amide as an agent with a polytarget effect in comparison with the severity of destructive processes in heart muscle cells. **Material and methods.** Wistar male rats (total 51 animals) were used in the work with isolated and combined administration of a single sublethal dose of doxorubicin (7 mg/kg) and course administration of betulonic acid amide at doses of 50 mg/kg/day and 100 mg/kg/day for 3 and 14 days. Immunohistochemical evaluation of VEGFR2 expression in the myocardium was carried out with the calculation of the index of VEGFR2-positive cardiomyocytes; the volume density of cardiomyocytes with lytic changes was estimated using stereological analysis. **Results and discussion.** A single administration of doxorubicin (at a dose of 7 mg/kg) caused destructive changes in cardiomyocytes and hemodynamic disorders in myocardium, which increased with the duration of the experiment (14 days). The complex of the revealed structural and metabolic lesions reflected the development of regenerative-plastic insufficiency of cardiomyocytes, which is the basis of cardiac insufficiency in anthracycline cardiomyopathy. Morphological changes in the myocardium with isolated administration of betulonic acid amide were largely determined by the dose used. At a dose of 100 mg/kg, myocardial changes were similar in severity with doxorubicin-induced changes. Combined use of doxorubicin and betulonic acid amide revealed the most significant structural damage of the myocardium. It was shown that the increase in the volume density of lytic altered cardiomyocytes correlated with a significant increase in VEGFR2 expression (correlation coefficient varied from 0.620 to 0.980).

---

**Key words:** myocardium, cardiomyocytes, doxorubicin, betulonic acid amide, vascular endothelial growth factor receptor 2, immunohistochemistry.

*Lushnikova E.L. – doctor of biological sciences, professor, head of the laboratory of cytology and cell biology,  
e-mail: pathol@inbox.ru*

*Mzhelskaya M.M. – post-graduate student of the Institute of Molecular Pathology and Pathomorphology,  
e-mail: pathol@inbox.ru*

*Koldysheva E.V. – doctor of biological sciences, leading researcher of the laboratory of molecular mechanisms  
of pathological processes, e-mail: pathol@inbox.ru*

*Klinnikova M.G. – doctor of biological sciences, leading researcher of the laboratory of cytology and cell biology,  
e-mail: pathol@inbox.ru*