

М.Г. Шурыгин^{1,2}, О.В. Каня¹, Н.Н. Дремина¹, И.А. Шурыгина^{1,2}

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ФАКТОРОВ РОСТА НА ФИБРОБЛАСТИЧЕСКУЮ ФАЗУ ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА

¹ ФГБУ «Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии» СО РАМН (Иркутск)² ФГБУН Иркутский научный центр СО РАН (Иркутск)

Целью исследования было сравнительное изучение влияния VEGF и FGF на фибробластическую фазу воспаления при замещении некротизированного участка миокарда на модели его острого инфаркта.

На модели инфаркта миокарда у крыс изучено влияние повышения и снижения концентраций основного фактора роста фибробластов (FGF2) и фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) на динамику морфометрических показателей фибробластической фазы.

Установлено, что повышение VEGF в системном кровотоке в большей степени стимулировало рост фибробластов по сравнению с FGF. Так, плотность фибробластов в зоне репарации в группе VEGF во все сроки наблюдения превышала значения в группе FGF. Различия были достоверны на 7-е (295 [249–340] в сравнении с 205 [192–275], $p = 0,0257$) и 30-е сутки (132 [125–148] в сравнении с 88 [81–122], $p = 0,0036$).

Однако при снижении содержания факторов роста за счет введения антител, фибробластические клетки большую чувствительность демонстрировали к снижению уровня FGF. Плотность фибробластов в зоне репарации в группе антиVEGF во все сроки наблюдения достоверно превышала показатели группы антиFGF: на 3-и сутки 299 [130–481] и 132,5 [92–148], $p = 0,0257$; на 7-е сутки – 306 [272–369] и 167 [151–215], $p = 0,0008$; на 14-е сутки – 250,5 [233–260] и 131,5 [121–147], $p = 0,0002$; на 30-е сутки – 195,5 [139–237] и 88,5 [81–96], $p = 0,0003$ соответственно.

Установлено, что изменение естественной регуляторной стимуляции как в сторону усиления при дополнительном введении факторов роста, так и при снижении их уровня за счет элиминации при связывании с антителами, приводит к нарушению дифференцировки фибробластов в малоактивные фиброциты.

Ключевые слова: факторы роста, VEGF, FGF, инфаркт миокарда, фибробласты

MORPHOMETRIC ANALYSIS OF THE GROWTH FACTORS INFLUENCE ON FIBROBLASTIC PHASE OF INFLAMMATION AT EXPERIMENTAL MYOCARDIAL INFARCTION

M.G. Shurygin^{1,2}, O.V. Kanya¹, N.N. Dremina¹, I.A. Shurygina^{1,2}¹Scientific Center of Reconstructive and Restorative Surgery SB RAMS, Irkutsk²Irkutsk Scientific Center SB RAS, Irkutsk

The objective of the study was comparative study of the effect of VEGF and FGF on fibroblastic phase of inflammation by replacing necrotic myocardium on its model of acute myocardial infarction.

Model of myocardial infarction in rats was carried out to study the effect of increasing and decreasing concentrations of basic fibroblast growth factor (FGF2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) on the dynamics of morphometric parameters fibroblastic phase.

It has been established that the increase of VEGF in the systemic circulation more stimulated the growth of fibroblasts compared to FGF. Thus, the density of fibroblasts in the repair area in VEGF group during all periods of observation values in a group exceeds FGF. Differences were significant at the 7th (295 [249–340] versus 205 [192–275], $p = 0.0257$) and the 30th day (132 [125–148] versus 88 [81–122], $p = 0.0036$).

However, when reducing the amount of growth factors by introducing antibodies fibroblastic cells showed greater sensitivity to the reduction of FGF. Fibroblast density in the area of repair in the group at all time points antiVEGF observation group was significantly higher performance antiFGF: the 3rd day 299 [130–481] and 132,5 [92–148], $p = 0,0257$; the 7th day – 306 [272–369] and 167 [151–215], $p = 0,0008$; at the 14th day – 250.5 [233–260] and 131,5 [121–147], $p = 0,0002$; on the 30th day – 195.5 [139–237] and 88,5 [81–96], $p = 0.0003$ respectively.

It was established, that modifying the natural regulatory stimulation of both the side with the additional administration the growth factors and decreasing its level at the expense of elimination upon binding to antibody leads to disruption of fibroblast differentiation to fibrocytes.

Key words: growth factors, VEGF, FGF, myocardial infarction, fibroblasts

В последние десятилетия пристальное внимание ученых привлекают различные ростовые факторы, так как они играют ключевую роль в процессах роста, развития и поддержания клеточных популяций. Факторы роста представляют собой биологически активные полипептиды, которые функционируют как регуляторные сигналы, контролирующие активацию и подавление клеточной пролиферации и дифференцировки, а также способствуют выживанию клеток [2, 7]. Названия факторов роста часто отражают опреде-

ленные типы стимулируемых ими клеток, однако, это не означает, что их действие ограничивается только данной клеточной популяцией. Большинство факторов роста являются мультипотентными и способны влиять на различные типы клеток. Так, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF – Vasoendothelial Growth Factor) и фактор роста фибробластов (FGF – Fibroblast Growth Factor) в организме влияют на пролиферацию, миграцию, дифференцировку и подвижность фибробластов в процессе образования соединительной

ткани (физиологическая регенерация) или синтезируются в ответ на повреждение (репаративная регенерация) [6, 10]. При этом, несмотря на тропность к клеткам эндотелия сосудов, уровень VEGF значимо влияет на продукцию коллагена при развитии постинфарктного кардиосклероза [4].

FGF и VEGF являются одними из основных регуляторов образования соединительной ткани, стимулируя миграцию фибробластов и рост грануляционной ткани. Данные ростовые факторы являются локальными активаторами процесса репарации поврежденной ткани.

В условиях заживления поврежденных тканей, в частности в процессе развития постинфарктного кардиосклероза, наблюдается повышение как FGF, так и VEGF [5], которые влияют на жизнеспособность, пролиферативную и синтетическую активность клеток, обеспечивающих репаративный процесс.

Результаты исследований с применением факторов роста для изменения естественного течения процесса репарации на сегодняшний день достаточно противоречивы. Например, на экспериментальных моделях в постинфарктный период было показано, что применение FGF не приводит к каким-либо структурным или вазопродлиферативным эффектам через 6 мес. после начала терапии [9], в то же время K. Sato с соавторами [8] показано, что однократное внутрисердечное введение FGF приводит к улучшению перфузии и контрактильности миокарда.

Целью настоящего исследования явилось сравнительное изучение влияния VEGF и FGF на фибробластическую фазу воспаления при замещении некротизированного участка миокарда на модели его острого инфаркта.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Инфаркт миокарда моделировали методом диатермокоагуляции околоконусной межжелудочковой артерии крысы [3]. Эксперимент выполнялся в соответствии с нормами гуманного обращения с животными, которые регламентированы «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. № 755) согласно протоколу, одобренному Комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «НЦРВХ» СО РАМН.

Всего исследовано 250 самок крыс линии Wistar весом 220–250 г в возрасте 9 мес.:

– контрольная группа (50 животных) – моделирование инфаркта миокарда;

– группа животных FGF – моделирование инфаркта миокарда, введение FGF2 (Sigma, Cat. N F0291, Lot 124K0797) внутрисердечно в полость левого желудочка в дозе 100 нг однократно через 1,5 часа после операции по моделированию инфаркта миокарда (50 животных);

– группа животных антиFGF – моделирование инфаркта миокарда, введение блокатора активности FGF2 (моноклональных антител к FGF2 – Sigma, Cat. N F6162, Lot 025K4835) в дозе 2 мкг внутрисердечно в полость левого желудочка трехкратно через 1, 5, 6 часов и 3 суток после моделирования инфаркта миокарда (50 животных);

– группа животных VEGF – моделирование инфаркта миокарда, введение VEGF (VEGF164 rat recombinant, Sigma, Cat. N V3638-10UG, Lot 064K1239) внутрисердечно в полость левого желудочка в дозе 100 нг (однократно через 1,5 ч. после операции по моделированию инфаркта миокарда (50 животных);

– группа животных антиVEGF – моделирование инфаркта миокарда, введение блокатора активности VEGF (моноклональных антител к VEGF – Sigma, Cat. N V1253, Lot 044K1711) в дозе 1 мкг внутрисердечно в полость левого желудочка трехкратно через 1,5, 6 часов и 3-е суток после моделирования инфаркта миокарда (50 животных).

Выведение животных из эксперимента проводили в сроки от 2 часов до 30 суток. Сердце экспериментального животного фиксировали в забуференном растворе 10% нейтрального формалина, готовили гистологические срезы, окрашивали гематоксилин-эозином. Морфометрию проводили с использованием программы ImageJ Национального института здоровья (США) с набором модулей для медицинской морфометрии от Wayne Rasband. Применяли планиметрический метод в модификации с использованием подсчета элементов на 1 микрофотографии. Для оценки степени развития грубоволокнистой соединительной ткани на микрофотографиях срезов с окраской по методу Ван-Гизона измеряли соотношение площади среза, занимаемой волокнами коллагена, к общей площади ткани предложенным нами способом [1].

Анализ данных проводили с использованием статистического пакета Statistica for Windows, номер лицензии AXAR402G263414FA-V.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения влияния факторов роста на процессы ремоделирования миокарда при экспериментальном инфаркте у крыс проводили количественную оценку клеточных элементов в динамике процесса формирования постинфарктного рубца в зоне инфаркта.

При изучении морфологической картины выявлено, что у животных фибробластическая фаза начиналась с 3-х суток, когда в зоне некроза формировалась грануляционная ткань. На 7-е сутки в зоне некроза происходило замещение некротизированных тканей молодой соединительной тканью. На 14–30-е сутки наблюдали созревание соединительной ткани. При этом интенсивность пролиферации фибробластов и сроки максимальной выраженности фибробластической фазы, а также трансформация активных фибробластов в фиброциты в группах различались.

Так, в большинстве групп максимальная плотность фибробластов на единицу площади зоны инфаркта миокарда приходилась на 7-е сутки. В контрольной группе она составила 202 [176–211] на поле зрения 91089 мкм². В группе VEGF в этот срок она определена как 295 [249–340], достоверно превышая показатель группы контроля ($p = 0,0046$). Интересно, что и в группе антиVEGF этот показатель достоверно превышал данные контрольной группы – 306 [272–369] ($p = 0,0025$). В группе антиFGF при пиковой выраженности количества фибробластов на

7-е сутки имелась тенденция к снижению плотности фибробластов на единицу площади по сравнению с группой контроля (167 [151–215]), однако различия были недостоверны.

В группе FGF отмечено длительное сохранение в зоне репарации высокой плотности фибробластов – на 7-е и 14-е сутки, при этом если на 7-е сутки плотность не отличалась от показателей в контрольной группе – 205 [192–275], то сохранение высокой плотности и на 14-е сутки – 204,5 [179–246] приводило к достоверным отличиям от группы контроля в этот срок, составившей 95,5 [83,5–108] на 91089 мкм² ($p = 0,00009$).

Отмечено, что изменение концентрации вазоэндотелиального фактора роста существенно влияло на длительность обнаружения в зоне репарации высокой плотности активных фибробластов. Так, если в контрольной группе после пиковых значений на 7-е сутки в последующие сроки количество фибробластов значительно снижается (на 14-е сутки – 95,5 [83,5–108], на 30-е сутки – 80 [70,5–84]), в группе VEGF этот показатель значимо превышал значения контрольной группы: на 14-е сутки – 252,5 [220–282] ($p = 0,00009$), на 30-е сутки – 132 [125–148] ($p = 0,00009$). Аналогичная картина наблюдалась и в группе антиVEGF: на 14-е сутки – 250,5 [233–260] ($p = 0,00009$), на 30-е сутки – 195,5 [139–237] ($p = 0,00009$).

Для установления, какой из факторов роста в большей степени влияет на пролиферацию фибробластов в зоне репарации, нами было проведено сравнение групп VEGF и FGF, антиVEGF и антиFGF между собой.

Установлено, что в нашем исследовании повышение VEGF в системном кровотоке в большей степени стимулировало рост фибробластов по сравнению с FGF. Так, плотность фибробластов в зоне репарации в группе VEGF во все сроки наблюдения превышала значения в группе FGF. Различия были достоверны на 7-е (295 [249–340] в сравнении с 205 [192–275], $p = 0,0257$) и 30-е сутки (132 [125–148] в сравнении с 88 [81–122], $p = 0,0036$).

Однако при снижении содержания факторов роста за счет введения антител, фибробластические клетки большую чувствительность демонстрировали к снижению уровня FGF. Плотность фибробластов в зоне репарации в группе антиVEGF во все сроки наблюдения достоверно превышала показатели группы антиFGF: на 3-и сутки 299 [130–481] и 132,5 [92–148], $p = 0,0257$; на 7-е сутки – 306 [272–369] и 167 [151–215], $p = 0,0008$; на 14-е сутки – 250,5 [233–260] и 131,5 [121–147], $p = 0,0002$; на 30-е сутки – 195,5 [139–237] и 88,5 [81–96], $p = 0,0003$, соответственно.

Обнаруженные закономерности по изменению функциональной активности фибробластов в зоне репарации подтверждались и объективными показателями, отражающими функциональную активность фибробластов. В частности, концентрация коллагеновых волокон в зоне инфаркта миокарда на 30-е сутки в группе VEGF была максимальной среди всех групп наблюдения и достоверно превышала показатели контрольной группы. В то же время при блокировании эндогенного FGF2 достигалась мини-

мальная синтетическая активность фибробластов в зоне формирования постинфарктного кардиоскелета (табл. 1).

Таблица 1
Относительный объем коллагеновых волокон в области формирования постинфарктного рубца через 30 суток после моделирования инфаркта миокарда

Группа	Относительный объем коллагена, % (медиана, 25%–75% квантили)
Контрольная	40,51 [40,33–44,30]
FGF2	43,32 [41,40–45,39]
Анти-FGF2	18,50 [17,42–21,52]*
VEGF	58,56 [48,11–73,27]*
Анти-VEGF	40,23 [27,83–48,36]

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

Интересно влияние факторов роста на динамику трансформации фибробластов в фиброциты в зоне репарации. Так, в группе контроля, начиная с 14-х суток, в зоне репарации преобладали неактивные фиброциты. Применение как факторов роста, так и антител к ним нарушало трансформацию фибробластов в фиброциты, в результате чего до конца наблюдения в данных группах фибробласты преобладали над фиброцитами, при попарном сравнении с группой контроля во всех случаях зафиксирована достоверность отличий как на 14-е, так и на 30-е сутки наблюдения. В группах с измененной концентрацией VEGF эти изменения были наиболее наглядными. При этом наиболее выраженные изменения в трансформации фибробластов в фиброциты отмечены в группе антиVEGF. Наблюдаемые изменения в снижении количества фиброцитов могут быть объяснены тем, что механизмы выведения активных фибробластов через запуск апоптоза при нарушении естественного уровня стимуляции ростовыми факторами преобладает над трансформацией фибробластов в фиброциты.

**ЛИТЕРАТУРА
REFERENCES**

1. Способ определения относительной площади волокон коллагена в гистологическом препарате: пат. 2332665 Рос. Федерация: МПК G01N33/48 (2006.01) / Шурыгин М.Г., Дремина Н.Н., Шурыгина И.А., Мачхин И.Н., Антипина С.Л.; заявитель и патентообладатель ГУ Науч. центр реконстр. и восстанов. хирургии ВСНЦ СО РАМН. – № 2006142273/15; заявл. 29.11.06; опубл. 27.08.08, Бюл. № 24.- 8 с.: ил.

Method of defining comparative collagen fibre area in histological preparation: Ru Patent 2332665/ Shurygin M.G., Dremina N.N., Shurygina I.A., Machkhin I.N., Antipina S.L., 2007-08-27.

2. Шурыгин М.Г., Дремина Н.Н., Шурыгина И.А., Мачхин И.Н. Основные активаторы ангиогенеза и их применение в кардиологии (обзор литературы) // Бюл. ВСНЦ СО РАМН.- 2005.- № 6.- С. 199-207.

Shurigin M.G., Dremina N.N., Shuragina I.A., Machkhin I.N. The main activators of angiogenesis and their use

in cardiology (review) // *Bul. ESSC SB RAMS.* – 2005. – N 6. – P. 199–207 (in Russian).

3. Шурыгин М.Г., Шурыгина И.А. Фактор роста фибробластов как стимулятор ангиогенеза при инфаркте миокарда // *Бюл. СО РАМН.* – 2010. – Т. 30, № 6. – С. 89–92.

Shurigin M.G., Shurigina I.A. Fibroblast growth factor as angiogenesis stimulator at myocardial infarction // *Bul. SO RAMN.* – 2010. – Vol. 30, N 6. – P. 89–92 (in Russian).

4. Шурыгин М.Г., Шурыгина И.А., Дремина Н.Н. Влияние фактора роста эндотелия сосудов на уровень коллагенообразования в процессе развития постинфарктного кардиосклероза // *Сиб. мед. журн.* – 2008. – Т. 78, № 3. – С. 53–55.

Shurygin M.G., Shurygina I.A., Dremina N.N. Influence of vasoendothelial growth factor on the level of collagen formation in the process of postinfarction cardiosclerosis // *Siberian J. of Medicine.* – 2008. – Vol. 78, N 3. – P. 53–55 (in Russian).

5. Шурыгин М.Г., Шурыгина И.А., Дремина Н.Н. Динамика факторов роста эндотелия сосудов и фибробластического фактора роста при экспериментальном инфаркте миокарда // *Бюл. ВСНЦ СО РАМН.* – 2007. – № 6. – С. 169–174.

Shurigin M.G., Shurigina I.A., Dremina N.N. Dynamics of vasoendothelial growth factor and fibroblast growth factor in experimental cardiac infarction // *Bul. ESSC SB RAMS.* – 2007. – N 6. – P. 169–174 (in Russian).

6. Bikfalvi A., Klein S., Pintucci G., Rifkin D.B. Biological roles of fibroblast growth factor-2 // *Endocr. Rev.* – 1997. – Vol. 18. – P. 26–45.

7. Goustin A.S., Leof E.B., Shipley G.D., Moses H.L. Growth factors and cancer // *Cancer Res.* – 1986. – Vol. 46, N 3. – P. 1015–1029.

8. Sato K., Laham R.J., Pearlman J.D., Novicki D., Sellke F.W., Simons M., Post M.J. Efficacy of Intracoronary Versus Intravenous FGF-2 in a Pig Model of Chronic Myocardial Ischemia // *Ann. Thorac. Surg.* – 2000. – Vol. 70. – P. 2113–2118.

9. Shou M., Thirumurti V., Rajanayagam S., Lazarous D.F. et al. Effect of basic fibroblast growth factor on myocardial angiogenesis in dogs with mature collateral vessels // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 1997. – Vol. 29, N 5. – P. 1102–1106.

10. Zhao J., Hu L., Liu J., Gong N., Chen L. The Effects of Cytokines in Adipose Stem Cell-Conditioned Medium on the Migration and Proliferation of Skin Fibroblasts In Vitro // *BioMed. Research. International.* – 2013. – Vol. 2013. – Article 578479, doi: 10.1155/2013/578479.

Сведения об авторах

Шурыгин Михаил Геннадьевич – доктор медицинских наук, зав. научно-лабораторным отделом ФГБУ «НЦРВХ» СО РАМН, главный научный сотрудник отдела медико-биологических исследований и технологий ФГБУН ИНЦ СО РАН (664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1; тел.: (3952) 29-03-69; e-mail: mshurygin@gmail.com)

Каня Олег Витославович – аспирант ФГБУ «НЦРВХ» СО РАМН (664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1; e-mail: ole1587@gmail.com)

Дремина Наталья Николаевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории патофизиологии тканей и функциональной морфологии ФГБУ «НЦРВХ» СО РАМН (664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1; e-mail: drema76@mail.ru)

Шурыгина Ирина Александровна – доктор медицинских наук, зам. директора ФГБУ «НЦРВХ» СО РАМН по научной и инновационной деятельности, главный научный сотрудник отдела медико-биологических исследований и технологий ФГБУН ИНЦ СО РАН (664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1; тел.: (3952) 29-03-38; e-mail: irinashurygin@gmail.com)

Information about the authors

Shurygin Mikhail Gennadyevich – M.D., Head of the scientific laboratory department of Scientific Center of Reconstructive and Restorative Surgery SB RAMS, chief scientist of the Department of Biomedical Research and Technology at Irkutsk Scientific Center SB RAS (664003, Bortsov Revolutii str. 1; tel.: (3952) 290-369; e-mail: mshurygin@gmail.com)

Kanya Oleg Vitoslavovich – graduate at Scientific Center of Reconstructive and Restorative Surgery SB RAMS (664003, Bortsov Revolutii str., 1; e-mail: ole1587@gmail.com)

Dremina Natalia Nickolayevna – PhD, senior scientist of the laboratory of pathophysiology of tissues and functional morphology at Scientific Center of Reconstructive and Restorative Surgery SB RAMS (664003, Bortsov Revolutii str., 1; e-mail: drema76@mail.ru)

Shurygina Irina Aleksandrovna – M.D., deputy director of Scientific Center of Reconstructive and Restorative Surgery SB RAMS, chief scientist of the department of biomedical research and technology of Irkutsk Scientific Center SB RAS (664003, Bortsov Revolutii str., 1; tel.: (3952) 290-338; e-mail: irinashurygin@gmail.com)