

М.Г. Шурыгин, И.А. Шурыгина, Н.Н. Дремина

ДИНАМИКА ФАКТОРОВ РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ И ФИБРОБЛАСТИЧЕСКОГО ФАКТОРА РОСТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА

НЦ РВХ ВСНЦ СО РАМН (Иркутск)

В работе исследован уровень вазоэндотелиального фактора роста (VEGF) и фактора роста фибробластов (FGF) при экспериментальном инфаркте миокарда у крыс. Их динамика сопоставлена с уровнем ферментов цитолиза — ГБДГ и КФК. Выявлено значительное повышение уровня факторов роста в сроки от 2 часов до 3 суток для FGF и от 6 часов до 7 суток для VEGF.

Ключевые слова: вазоэндотелиальный фактор роста, фактор роста фибробластов, эксперимент, инфаркт миокарда

DYNAMICS OF VASOENDOTHELIAL GROWTH FACTOR AND FIBROBLAST GROWTH FACTOR IN EXPERIMENTAL CARDIAC INFARCTION

M.G. Shurigin, I.A. Shurigina, N.N. Dremina

SC RRS ESSC SB RAMS, Irkutsk

In the work the authors investigated the level of vasoendothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor (FGF) in experimental cardiac infarction in rats. The factors' dynamics was compared with the level of cytolytic enzymes — α -hydroxybutyrate dehydrogenase and creatine phosphokinase. Significant increasing of the growth factor level was revealed: from 2 hours till 3 days for FGF and from 6 hours till 7 days — for VEGF.

Key words: vasoendothelial growth factor, fibroblast growth factor, experiment, cardiac infarction

Значительный прогресс, достигнутый за последние годы в области изучения неоангиогенеза и ремоделирования сосудов, связан, прежде всего, с открытием так называемых «факторов роста». В настоящее время их использование рассматривают как одно из основных возможных направлений для поиска альтернативных методов лечения ИБС [2]. В этом плане наиболее перспективно исследование роли фактора роста эндотелия сосудов (Vasoendothelial Growth Factor, VEGF) и фактора роста фибробластов (Fibroblast Growth Factor, FGF). Именно они запускают процессы ремоделирования существующих сосудов и истинного ангиогенеза — формирования новых сосудов [8].

Целью настоящего исследования явилось выявление естественной динамики уровня FGFb и VEGF при экспериментальном инфаркте миокарда у крыс.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальная часть исследования выполнена на базе отдела экспериментальной хирургии с виварием ГУНЦ РВХ ВСНЦ СО РАМН г. Иркутска (зав. отделом к.б.н. — С.А. Лепехова).

Проведен хронический эксперимент на 85 самках крыс линии Wistar весом 220 — 250 г в возрасте 9 мес. Животных содержали в условиях вивария при свободном доступе к пище и воде на рационе питания, соответствующим нормативам ГОСТа. Эксперимент выполнялся в соответствии с правилами 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).

Инфаркт миокарда моделировали методом диатермокоагуляции околоконусной межжелудочковой артерии крысы (45 животных, основная группа). В группе ложнооперированных животных (40 животных, контрольная группа) выполнялась торакотомия, но исключалось воздействие на венечные сосуды. Выведение животных из эксперимента проводили в сроки от 2 часов до 30 суток.

В сыворотке животных определяли активность креатинфосфокиназы (КФК) с помощью тест — набора фирмы «Biocon Diagnostik» (Германия) и б-гидроксibuтиратдегидрогеназы (ГБДГ) — тест-набором фирмы «Corma» (Польша). В качестве средства измерения использовали полуавтоматический биохимический анализатор Roki («Olvex Diagnosticum»).

Количественное определение концентрации основного фактора роста фибробластов (FGF2) и вазоэндотелиального фактора роста (VEGF) в образцах плазмы крови экспериментальных животных проводили методом иммуноферментного анализа с помощью наборов реагентов R&D Systems (США). Использовали иммуноферментный анализатор ELX800 фирмы BioTek (США).

В работе применялся вариационный (ANOVA/MANOVA) анализ [7]. Критический уровень значимости критериев принимался равным 0.05. Анализ данных проводился с использованием статистического пакета R (R project, r-project.org).

Таблица 1

Динамика ферментов цитолиза, FGF2 и VEGF в сыворотке крови у экспериментальных животных

Группа		2 ч, M ± SE	6 ч, M ± SE	12 ч, M ± SE	1 сут., M ± SE	3 сут., M ± SE	7 сут., M ± SE	14 сут., M ± SE	30 сут., M ± SE
Контрольная группа	ГБДГ, ME/л	331,20 ± 19,01	312,50 ± 55,36	209,57 ± 12,66	212,87 ± 35,37	121,43 ± 15,62	128,07 ± 18,74	163,73 ± 21,27	109,57 ± 9,71
	КФК, ME/л	1958,37 ± 283,34	1687,37 ± 244,16	982,50 ± 95,50	793,68 ± 65,12	768,43 ± 109,79	792,60 ± 76,35	740,21 ± 89,52	721,70 ± 151,36
	FGF2, пг/мл	23,93 ± 6,31	52,10 ± 2,17	48,73 ± 9,31	25,46 ± 5,47	17,23 ± 1,67	20,77 ± 7,69	25,23 ± 4,07	20,57 ± 4,25
	VEGF, пг/мл	46,93 ± 2,78	46,10 ± 8,69	29,38 ± 7,22	35,07 ± 6,80	29,11 ± 8,84	14,39 ± 5,47	21,29 ± 10,93	17,56 ± 9,11
Основная группа	ГБДГ, ME/л	793,97 ± 58,63, $p < 0,05$	1027,36 ± 142,41 $p < 0,05$	825,58 ± 92,90 $p < 0,05$	623,68 ± 121,37 $p < 0,05$	257,00 ± 76,80	247,63 ± 50,11, $p < 0,05$	172,06 ± 17,03	207,60 ± 41,56, $p < 0,05$
	КФК, ME/л	12669,90 ± 1263,13, $p < 0,05$	15674,30 ± 3433,51 $p < 0,05$	7891,35 ± 1925,71 $p < 0,05$	3369,42 ± 366,89 $p < 0,05$	2275,02 ± 744,82	2478,47 ± 607,29, $p < 0,05$	966,44 ± 163,38	1213,33 ± 200,71
	FGF2, пг/мл	159,75 ± 14,45 $p < 0,05$	494,18 ± 58,78 $p < 0,05$	209,68 ± 43,12 $p < 0,05$	49,60 ± 5,98 $p < 0,05$	38,21 ± 7,34, $p < 0,05$	19,91 ± 3,55	31,13 ± 2,68	30,73 ± 9,05
	VEGF, пг/мл	41,16 ± 3,23	356,68 ± 108,06 $p < 0,05$	283,91 ± 23,68 $p < 0,05$	70,21 ± 11,03 $p < 0,05$	80,10 ± 5,84 $p < 0,05$	40,25 ± 8,18 $p < 0,05$	19,06 ± 2,98	21,80 ± 7,95

Примечание: p – значимость различий основной группы по сравнению с контрольной.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нами проведено изучение динамики в крови экспериментальных животных FGF2 и VEGF при инфаркте миокарда, а также зависимость этих показателей от выраженности цитолиза. Прежде всего этот интерес был обусловлен тем, что основное количество FGF2 и VEGF в неизмененных клетках содержится в цитоплазме [1]. Это обеспечивает быстрое освобождение фактора в случае повреждения клетки. Следовательно, выраженность цитолитического синдрома, связанная с объемом некротизирующихся клеток, должна сопровождаться соответствующей динамикой уровня факторов роста.

Для оценки динамики цитолитического синдрома при развитии инфаркта миокарда мы использовали определение активности цитоплазматических ферментов — креатинфосфокиназы (КФК) и α -гидроксibuтиратдегидрогеназы (ГБДГ). Как известно, повышение активности КФК в сыворотке крови при наличии очага поражения миокарда коррелирует с величиной зоны некроза [5]. Используемое в диагностике инфаркта миокарда у человека определение кардиоспецифичной фракции КФК-МВ у крыс имеет ограничения. Это связано с тем, что соотношение уровня КФК-МВ к уровню общей КФК в миокарде и скелетной мышце у крыс имеет меньшие различия [4, 6].

Для оценки вклада самого оперативного вмешательства в динамику факторов роста и ферментов

цитолита проведено изучение указанных показателей у животных, подвергшихся ложной операции.

Выявлено, что у ложнооперированных животных отмечалось двукратное повышение уровней ГБДГ и КФК в сроки 2 и 6 часов после операции с быстрым снижением уже через 12–24 часа после оперативного вмешательства (табл. 1). Наблюдаемое явление вполне согласуется с данными о том, что повышение активности КФК и ГБДГ может появиться в ответ на любое повреждение мышечной ткани. В последующем при анализе ферментов цитолиза у животных основной группы в качестве базового уровня на каждой временной точке использовались данные, полученные у ложнооперированных животных.

У животных основной группы динамика ферментов цитолиза была типичной для острого инфаркта миокарда — отмечалось закономерное повышение «сывороточных маркеров» — КФК и ГБДГ — уже через 2 часа после операции, достигающее максимума через 6 часов после оперативного вмешательства, с постепенным снижением уровня ферментов в последующие сроки. В сроки 2, 6, 12 часов, 1 и 7 суток уровни КФК и ГБДГ у животных данной группы были достоверно выше, чем у животных, подвергшихся ложной операции (табл. 1, рис. 1, 2). На 3 сутки мы также наблюдали более высокие показатели активности КФК и ГБДГ в контроле в сравнении с группой животных с ложной операцией, однако из-за большого вариацион-

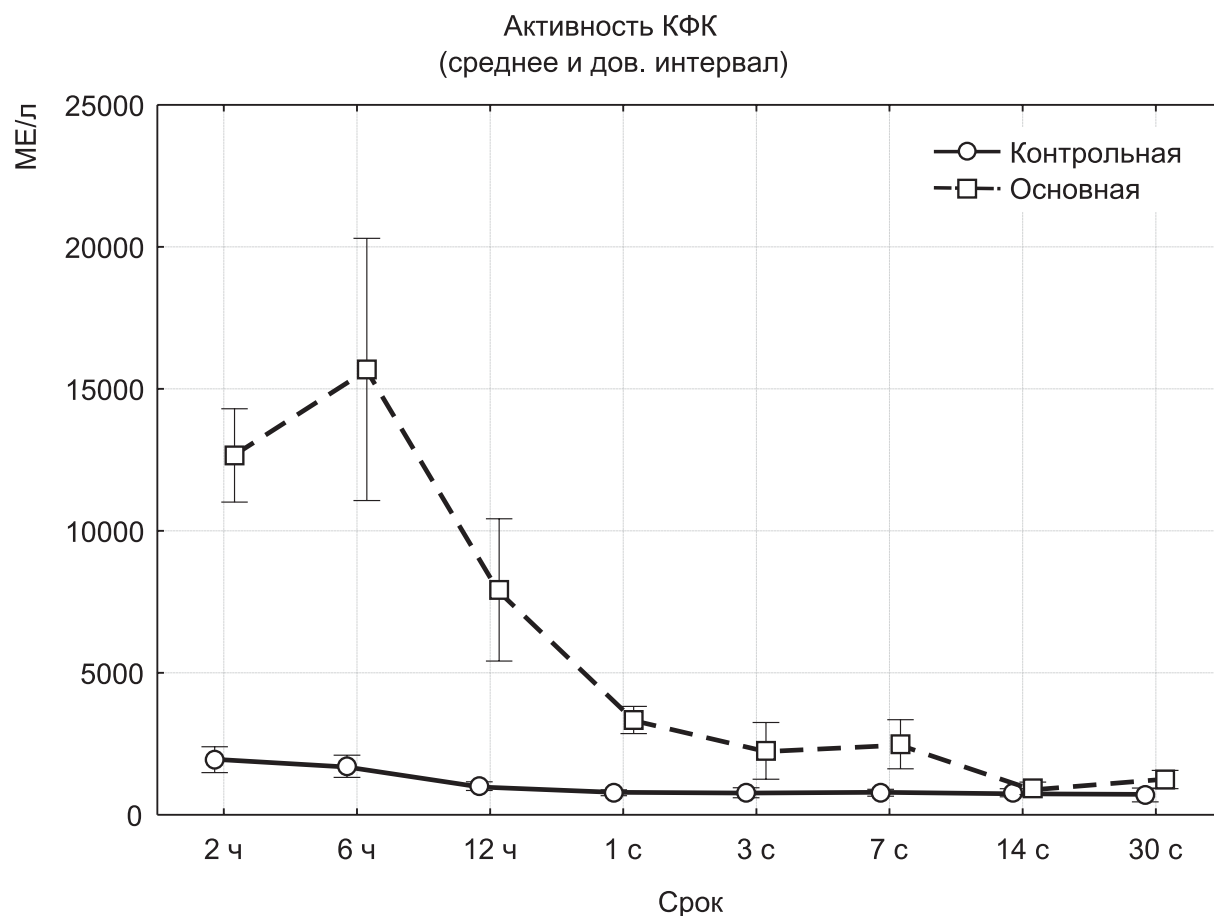


Рис. 1. Динамика уровня КФК у экспериментальных животных.

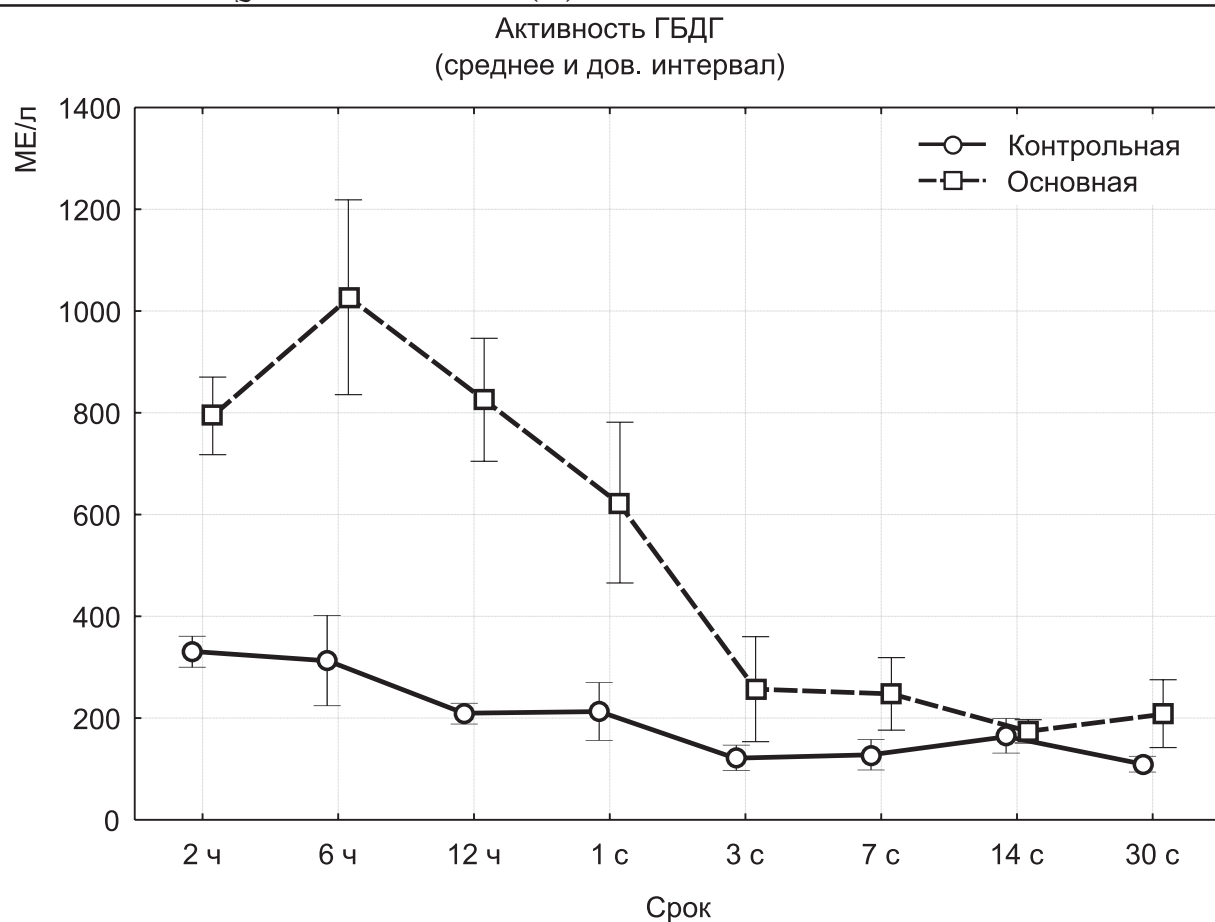


Рис. 2. Динамика уровня ГБДГ у экспериментальных животных.

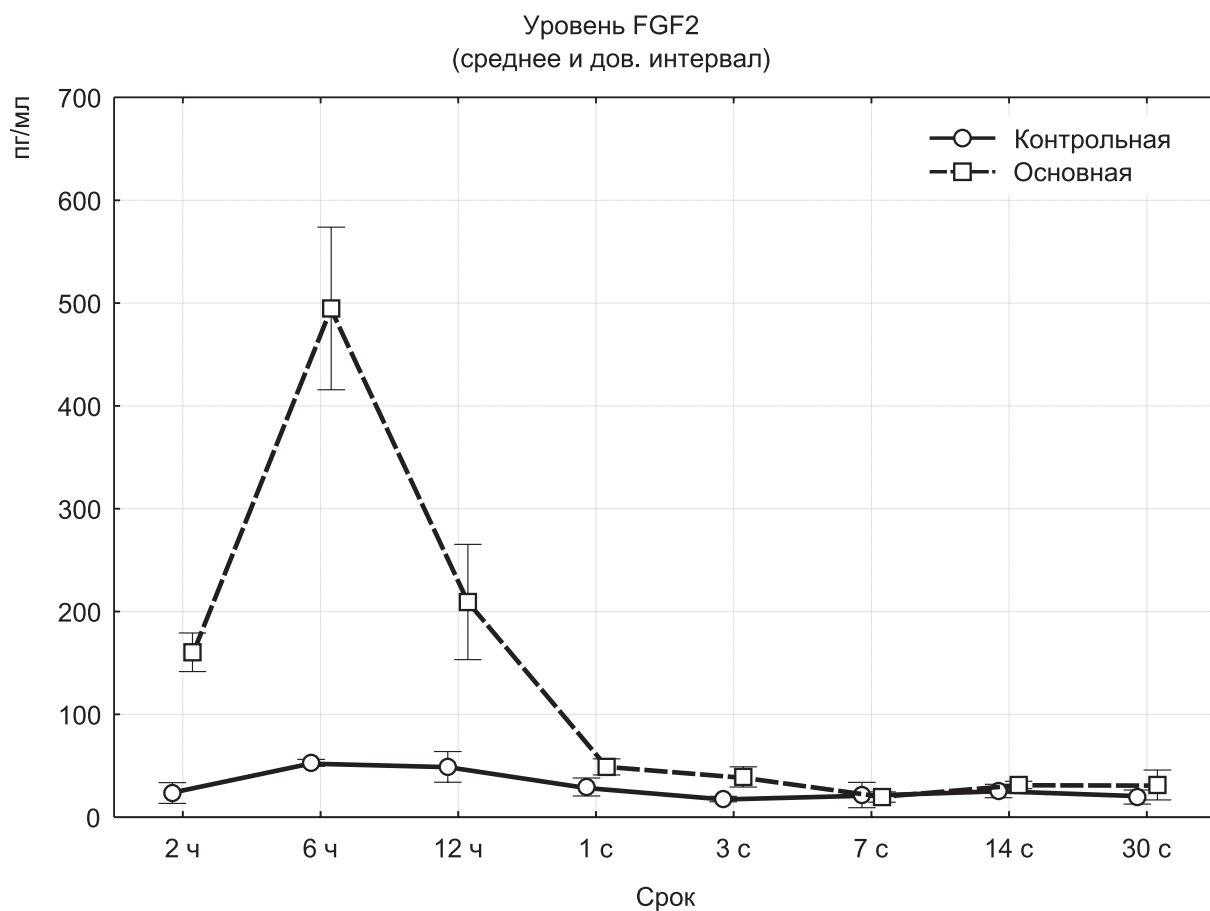


Рис. 3. Динамика уровня FGF2 у экспериментальных животных.

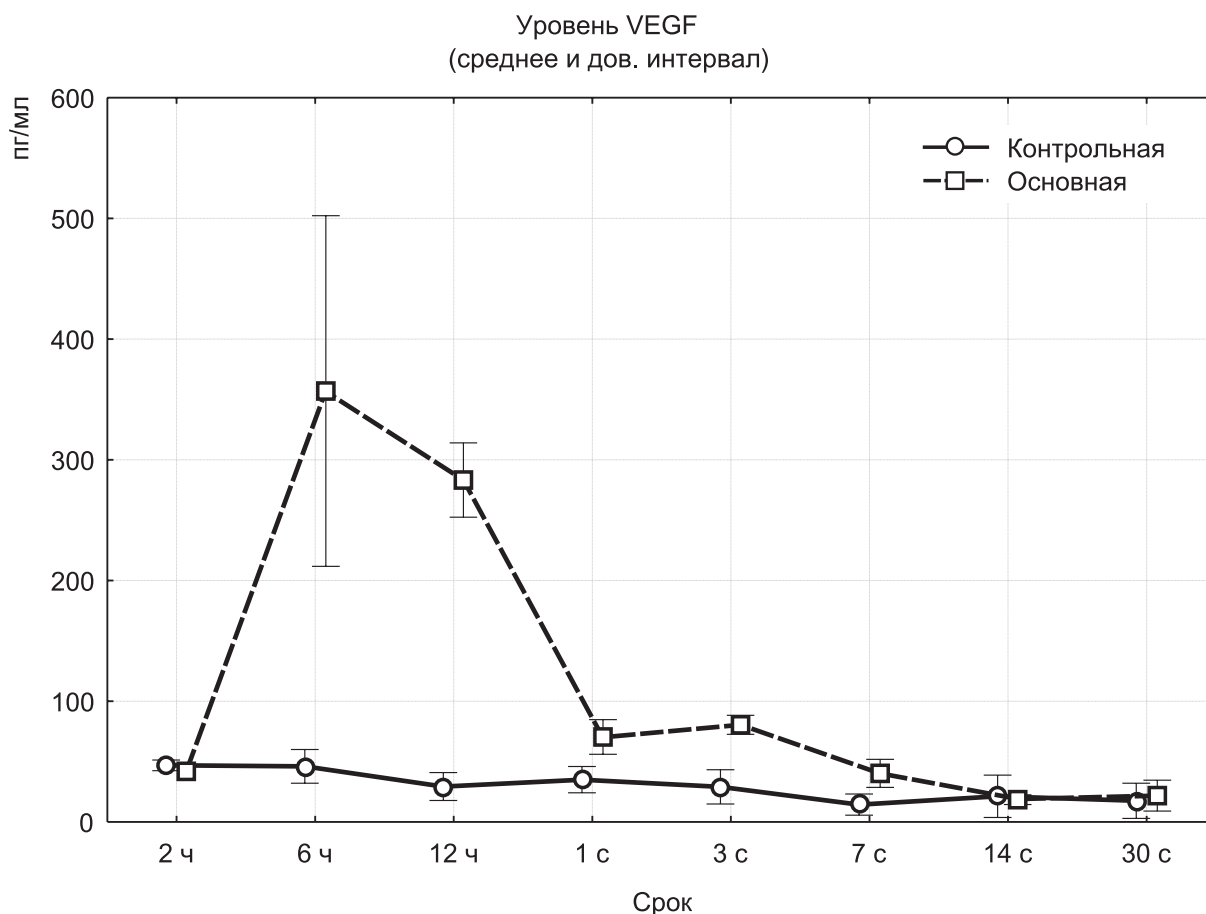


Рис. 4. Динамика уровня VEGF у экспериментальных животных.

ного размаха статистической достоверности различий в этот срок не выявлено.

Несомненный интерес в данном исследовании представляли изучение динамики уровня FGF2 и VEGF у животных под воздействием оперативного вмешательства, а также при моделировании инфаркта миокарда.

В нашем эксперименте у животных, подвергшихся ложной операции, отмечалось кратковременное повышение уровня FGF2 через 6 и 12 часов после оперативного вмешательства в 2 раза. При этом начальная концентрация (через 2 ч. после операции) составляла $23,9 \pm 6,3$ пг/мл. Уровень VEGF также кратковременно повышался в сроки 2 и 6 часов после операции. К суткам после операции концентрация ростовых факторов в крови стойко нормализовалась. Такая динамика хорошо согласуется с кратковременным повышением КФК и ГБДГ при проведении ложной операции.

Учитывая травматическое воздействие самого оперативного вмешательства, такая тенденция изменения концентрации FGF2 и VEGF вполне объяснима. Таким образом, повышение уровня FGF2 и VEGF мы расценивали как «фоновый уровень», обусловленный операцией торакотомии.

У животных основной группы отмечено значительное повышение FGF2 с достижением максимума через 6 часов после операции. При этом уровень FGF2 достоверно превышал аналогичный

показатель у животных, подвергшихся ложной операции, в сроки 2, 6, 12 часов, 1 и 3 сут. (табл. 1, рис. 3).

Уровень VEGF также значительно повышался (табл. 1, рис. 4) с достижением максимума в срок 6 часов послеоперации. Его уровень был достоверно выше, чем в группе контроля в сроки 6, 12 часов, 1, 3 и 7 суток после операции.

Таким образом, нами выявлено, что при экспериментальном инфаркте миокарда отмечается значительное повышение ростовых факторов — FGF2 и VEGF, начиная с ранних сроков после возникновения ишемического повреждения. Несмотря на сходную динамику, концентрация вазоэндотелиального фактора роста нарастает медленнее, чем FGF, и при этом длительность периода этого повышения достигает 7 суток. Учитывая короткий период полураспада VEGF [3], его повышенный уровень на фоне нормализации цитолитических ферментов свидетельствует об активном синтезе и секреции этого фактора роста.

ЛИТЕРАТУРА

1. Заридзе Д.Г. Канцерогенез / Д.Г. Заридзе. — М.: Медицина, 2004. — 576 с.
2. Новые подходы к лечению ишемической болезни сердца: терапевтический ангиогенез в сочетании с хирургической реваскуляризацией

миокарда / Л.А. Бокерия, Е.З. Голухова, М.В. Еремеева и др. // Тер. архив. — 2004. — № 6. — С. 25–30.

3. A target-mediated model to describe the pharmacokinetics and hemodynamic effects of recombinant human vascular endothelial growth factor in humans / S.M. Eppler, D.L. Combs, T.D. Henry et al. // *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. — 2002. — Vol. 72, Is. 1. — P. 20–32.

4. Cardiac troponins and creatine kinase content of striated muscle in common laboratory animals / S. Fredericks, G.K. Merton, M.J. Lerena et al. // *Clin. Chim. Acta*. — 2001. — Vol. 304, N 1–2. — P. 65–74.

5. Comparison of different noninvasive methods of infarct sizing during experimental myocardial infarction / L.R. Poliner, L.M. Buja, R.W. Parkey

et al. // *J. Nucl. Med.* — 1977. — Vol. 18, N 6. — P. 517–523.

6. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on changes in left ventricular myocardial creatine kinase system after myocardial infarction: their relation to ventricular remodeling and function / E. Hironaka, M. Hongo, M. Azegami et al. // *Jpn. Heart J.* — 2003. — Vol. 44, N 4. — P. 537–546.

7. Glantz S.A. Primer of applied regression and analysis of variance / S.A. Glantz, B.K. Slinker. — N.Y.: McGraw-Hill / Appleton & Lange, 2000. — 949 p.

8. Isner J.M. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization / J.M. Isner, T. Asahara // *J. Clin. Invest.* — 1999. — Vol. 103, N 9. — P. 1231–1236.