УДК 616.127-005.8:612.17

ФАКТОР РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ КАК СТИМУЛЯТОР АНГИОГЕНЕЗА ПРИ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА

Михаил Геннадьевич ШУРЫГИН, Ирина Александровна ШУРЫГИНА

Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии СО РАМН
664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1

На экспериментальной модели инфаркта миокарда изучено влияние повышенных и пониженных концентраций основного фактора роста фибробластов (FGF2) на ангиогенез. Выявлено, что FGF2 оказывает стимулирующее воздействие на эндотелиоциты. Отмечены рост количества эндотелиоцитов в пограничной зоне и в «интактном» миокарде под влиянием FGF2 и снижение выживаемости эндотелиоцитов в очаге повреждения при блокаде эндогенного FGF2 антителами. Таким образом, FGF2 обладает выраженным ангиогенным потенциалом в условиях ишемического повреждения миокарда.

Ключевые слова: фактор роста фибробластов, ангиогенез, инфаркт миокарда.

Ангиогенез — один из наиболее важных биологических процессов, происходящих в организме млекопитающих. В миокарде взрослого в норме интенсивность роста эндотелиальных клеток чрезвычайно низка. Однако при развитии ишемии наблюдается образование новых сосудов [1].

Перспективно применение при ишемии различных ангиогенных факторов, способных улучшить реперфузию за счет неоваскуляризации. Известно, что ангиогенной активностью обладают многие цитокины, основными из которых являются эндотелиальный фактор роста (VEGF) и фибробластический фактор роста (FGF) [2]. VEGF и FGF запускают процессы ремоделирования существующих сосудов и истинного ангиогенеза — формирования новых сосудов [3–5]. Полагают, что кислый (FGF1) и основной (FGF2) факторы роста фибробластов индуцируют ангиогенез за счет стимуляции роста эндотелиоцитов и гладкомышечных клеток [6]. Считают, что FGF1 экспрессируется в ишемизированном миокарде и может играть ключевую роль в формировании коллатералей [7].

Подобный эффект отмечен и для FGF2 при многократном введении препарата [8]. Однако по наблюдению D.F. Lazarous et al. [9], длительная терапия с применением FGF2 в эксперименте не приводила к каким-либо структурным или вазопролиферативным эффектам через 6 мес. после начала терапии. По данным K. Sato et al. [10], однократное интраперикардиальное и интракоронарное введение FGF2 ведет к улучшению перфузии и контрактильности миокарда, однако однократное внутривенное применение препарата не эффективно.

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния искусственного изменения уровня FGF2 на неоангиогенез при экспериментальном инфаркте миокарда.

Материал и методы исследования

Проведен хронический эксперимент на 126 самках крыс линии Wistar весом 220–250 г в возрасте 9 мес. Эксперимент выполнялся в соответствии с принципами гуманного обращения с животными, изложенными в директивах Европейского сообщества (86/609/EEC) и Хельсинкской декларации.

Инфаркт миокарда моделировали методом диатермокоагуляции межжелудочковой артерии крысы. В качестве наркоза внутрибрюшинно вводили комбинацию в составе: кетамин из расчета 50 мг/кг, дроперидол — 0,5 мг/кг, атропин — 0,15 мг/кг. Исследования у животных контрольной группы проводили при течении инфаркта миокарда без изменения естественного уровня FGF2. В группе «FGF» внутрисердечно в полость левого желудочка вводили FGF2 (Sigma F0291 Lot 124K0797, США) в дозе 100 нг (объем инъекции 0,1 мл) однократно через 1,5 ч после операции, а в сроки 6 часов и 3 суток производилось введение физиологического раствора (0,85% раствор NaCl); группе «анти-FGF» вводили моноклональные анти-FGF2 антитела (Sigma F6162 Lot 025K4835) в дозе 2 мкг (объем инъекции 0,1 мл) трехкратно через 1,5, 6 часов и 3 суток. В контрольной группе в сроки 1,5 ч, 6 ч и 3 суток производили внутрисердечную инъекцию 0,1 мл 0,85% раствора NaCl. Для проведения внутрисердечных инъекций животным вводили внутрибрюшинно кетамин в дозе 20 мг/кг.

Шурыгин М.Г. *— д.м.н., зав. научно-лабораторным отделом*
Шурыгина И.А. *— д.м.н., в.н.с., научно-лабораторный отдел*

Выведение животных проводили в сроки от 2 часов до 30 суток от начала эксперимента после введения в наркоз (кетамин 50 мг/кг внутрибрюшинно).

Количественное определение концентрации фактора роста фибробластов в образцах плазмы крови проводили методом иммуноферментного анализа с помощью набора реагентов R&D Systems (США), кат. № DFB50, лот 237980. В качестве средства измерения использовали иммуноферментный анализатор ELX800 (BioTek, США).

Сердце экспериментального животного фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, срезы окрашивали гематоксилин-эозином, а также иммуногистохимически с помощью набора Novolink Polymer Detection System, RE7150-K (Novocastra, Великобритания). В качестве первичных антител применяли антитела к CD31. Морфометрию проводили с использованием программы ImageJ Национального института здоровья (США) с набором модулей для медицинской морфометрии от Wayne Rasband. Применялся планиметрический метод [11] в модификации с использованием подсчета элементов на 1 микрофотографии поля зрения при увеличении × 600. Подсчитывали количество эндотелиоцитов в сосудах микроциркуляторного русла в трех зонах: зоне инфаркта, пограничной зоне и в «интактном» миокарде.

В работе применялся вариационный анализ (ANOVA/MANOVA) [12]. Критический уровень значимости критериев принимался равным 0,05. Анализ данных проводился с использованием статистического пакета R (R project, r-project.org).

Результаты и их обсуждение

На первом этапе нашего исследования ставилась задача выявить как естественную динамику уровня FGF2 в условиях эксперимента (контрольная группа), так и изменения системного содержания ростового фактора при воздействии вводимого извне FGF2 (группа «FGF»), а также при введении моноклональных антител, связывающих эндогенный FGF2 (группа «анти-FGF»).

У животных контрольной группы после моделирования инфаркта отмечено значительное повышение концентрации FGF2 с достижением максимума через 6 часов после операции (494,18 ± 58,78 пг/мл, в сравнении с 20,77 ± 7,69 у здоровых животных, $p < 0,01$) (**рис.**). При введении FGF2 выявлено закономерное более выраженное и раннее повышение его уровня, через 2 часа после операции оно почти в 3 раза превышало концентрацию FGF2, зарегистрированную в контрольной группе (428,85 ± 16,27 и 159,75 ± 14,45 пг/мл соответственно, $p < 0,01$).

Пик уровня FGF2 у животных, которым был введен ростовой фактор, как и в группе контроля, приходился на 6 ч после операции. Однако наблюдаемые значения уже не имели статистической значимости различий. Следующее статистически значимое расхождение показателей было зарегистрировано в срок 1 сутки, когда в группе «FGF» сохранялось повышенное содержание фактора роста, а в контрольной группе продолжалось снижение сывороточной концентрации FGF2 (238,14 ± 66,63 и 49,60 ± 5,98 пг/мл соответственно, $p < 0,05$) (**рис.**). В последующие сроки показатели значимо не различались, что можно объяснить кратковременностью эффекта при однократном введении.

При инъекции животным антител, блокирующих активность FGF2, отмечались закономерные достоверно более низкие концентрации FGF2 по сравнению с контрольной группой в сроки 2 и 6 часов после операции (24,33 ± 2,59 в срок 2 часа и 28,58 ± 2,05 пг/мл в срок 6 часов, в группе контроля в те же сроки — 159,75 ± 14,45 и 494,18 ± 58,78 пг/мл соответственно, $p < 0,01$) (**рис.**). В то же время через 12 часов после операции зафиксирован значительный подъем уровня FGF2 в сыворотке с достижением концентрации, сопоставимой с наблюдаемой в контрольной группе в этот срок. Введение анти-FGF2 в поздние сроки (3 суток после операции) не оказало значимого эффекта на системный уровень FGF2 у данной группы животных.

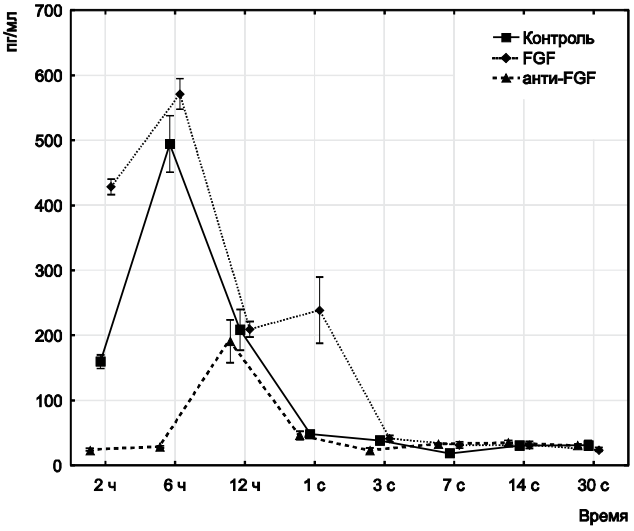

Рис. *Динамика уровня FGF2 у экспериментальных животных.*

При изучении морфологической картины выявлено, что у контрольной группы животных при моделировании инфаркта миокарда процесс протекал согласно классическим канонам: в первые часы после операции (до 6 ч) гистопатология в зоне инфаркта характеризовалась расстройством кровообращения: неравномерным полнокровием, стазами в капиллярах, обширными кровоизлияниями, а также отеком стромы, некробиотическими изменениями в кардиомиоцитах. Через 12 часов после операции отмечали максимальную выраженность нейтрофильной реакции в зоне инфаркта. Через 3 сут. в зоне некроза начинала формироваться грануляционная ткань, что проявлялось резким возрастанием количества сосудов синусоидного и капиллярного типов. На 7 сут. в зоне некроза усиливались резорбтивные процессы, происходило замещение некротизированных мышечных волокон молодой соединительной тканью. На 14–30 сутки в зоне формирования постинфарктного рубца отмечалось дальнейшее созревание соединительной ткани с уменьшением количества сосудов.

В пограничной зоне пик нейтрофильной реакции приходился на 12 часов, с 12 часов до 3 суток наблюдался рост количества капилляров и эндотелиоцитов на единицу площади с постепенным снижением к 30 суткам.

У животных, получавших FGF2 внутрисердечно в дозе 100 нг однократно, в зоне инфаркта количество эндотелиоцитов (**табл.**) достоверно не отличалось во все сроки наблюдения от значений контрольной группы. Количество эндотелиоцитов в пограничной зоне у животных, получавших FGF2, постепенно увеличивалось, начиная с 24 часов наблюдения, становясь достоверно отличающимся от показателя в контрольной группе через 14 суток (**табл.**).

У животных, получавших анти-FGF2, через 12 часов после операции выявлена интересная динамика количества эндотелиоцитов в зоне ишемического повреждения. Так как эндотелиоциты менее энергетически зависимы, чем кардиомиоциты, часть их при развитии инфаркта миокарда не подвергается некрозу. Однако если в контрольной группе мы видим некоторую стабилизацию количества эндотелиоцитов после формирования очага некроза, а в пограничной зоне уже на 12 часов отмечается тенденция к росту их количества (при этом изменяется и морфологическая характеристика клеток — ядра становятся округлыми, свидетельствуя об активации), то в группе «анти-FGF» к 12 часам после моделирования инфаркта четко прослеживается динамика снижения количества эндотелиальных клеток (**табл.**). Пытаясь найти объяснение этому факту, мы обнаружили данные

Таблица

Количество эндотелиоцитов у животных, получавших FGF и анти-FGF, в сравнении с контрольной группой (медиана и [1–3 квартили])

Зона	группа	2 ч	6 ч	12 ч	1 сут.	3 сут.	7 сут.	14 сут.	30 сут.
«Интактная»	контрольная	71 [65–77]	82 [70,5–0,5]	88 [72–89]	80 [65–88]	89 [74–94]	96 [83–98]	87 [74–96]	75 [75–86]
	FGF2	84,5 [71–95]	94 [91–98]	104 [88–113]	95,5 [78–123]	110,5 [93–120]*	128 [110–155]*	133 [130–159]*	106 [93–108]*
	анти-FGF2	87 [82–90]	85 [83–85]	87 [85–96]	83 [81–94]	96 [73–103]	88 [79–109]	85 [84–89]	74 [63–77,5]
Пограничная	контрольная	47 [39–58]	48 [42–55]	57 [52–62]	63 [51–110]	98 [83,5–136]	100 [96–130]	109 [102–117]	106 [103–109]
	FGF2	43 [33–57]	41,5 [39–44]	51,5 [37–69,5]	105 [87–107]	122 [90–154]	125 [108–197]	135 [128–143]*	95,5 [74–117]
	анти-FGF2	54 [41–55]	44 [34,5–52,5]	35,5 [28–43]*	39 [35–40]*	68 [45–89]*	100 [96–126]	99 [77–103]	84 [79–121]
Инфарктная	контрольная	47 [43–48]	37 [34–42,5]	32 [32–56]	39 [38–43]	121 [68–136]	167 [118–184]	95,5 [89–102]	95 [86–104]
	FGF2	32,5 [30–38,5]	27 [22–27]	28 [18–54]	23 [4–66]	110 [95–148]	146,5 [128,5–180]	141 [73–162]	67 [50–159]
	анти-FGF2	46,5 [37,5–55]	36 [27–64]	29 [17–32]	6 [0–7]*	88 [11–183]	96 [75–214]	104 [71–155]	109 [68–126]

Примечание: * — достоверность различий по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

о «цитопротективной» функции FGF2 в отношении эндотелиоцитов [13, 14], которая, вероятно, и нарушается при связывании FGF2 антителами.

В зоне «интактного» миокарда у животных, получавших FGF, в отличие от крыс контрольной группы, наблюдался достоверный рост количества эндотелиоцитов, начиная с 6 часов после моделирования миокарда и до конца наблюдения (30 сутки), различия достоверны с 3 по 30 сутки (**табл.**).

Заключение

Нами выявлено, что FGF2 оказывает стимулирующее воздействие на эндотелиоциты. Отмечен рост количества эндотелиоцитов в пограничной зоне и в «интактном» миокарде под влиянием FGF2 и снижение выживаемости эндотелиоцитов в очаге повреждения и замедление их активации при блокаде эндогенного FGF2 антителами. Таким образом, FGF2 обладает выраженным ангиогенным потенциалом в условиях ишемического повреждения миокарда.

Работа выполнена при поддержке грантов П803 «Проведение поисковых научно-исследовательских работ по направлению «Физико-химическая молекулярная и клеточная биология» и П1250 «Проведение поисковых научно-исследовательских работ по направлению «Фундаментальная медицина и физиология» в рамках реализации федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы.

Список литературы:

1. *Бузиашвили Ю.И., Picano E., Амбатьелло С.Г., Мацкеплишвили С.Т.* Ангиогенез как антиишемический механизм // Кардиология. 2000. (12). 82–86.

Buziashvili Yu.I., Picano E., Ambatiello S.G., Matskeplishvili S.T. Angiogenesis as antiischemic mechanism // Kardiologiya. 2000. (12). 82–86.

2. *Freedman S.B., Isner J.M.* Therapeutic angiogenesis for coronary artery disease // Ann. Intern. Med. 2002. 136. 54–71.

3. *Isner J.M., Asahara T.* Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization // J. Clin. Invest. 1999. 103. (9). 1231–1236.

4. *Carmeliet P., Jain R.K.* Angiogenesis in cancer and other diseases // Nature. 2000. 407. 249–257.

5. *Carmeliet P.* Angiogenesis in life, disease and medicine // Nature. 2005. 438. 932–936.

6. *Conway E.M., Collen D., Carmeliet P.* Molecular mechanisms of blood vessel growth // Cardiovasc. Res. 2001. 49. (3). 507–521.

7. *Schaper W., Ito W.D.* Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth // Circ. Res. 1996. 79. (5). 911–919.

8. *Unger E.F., Banai S., Shou M. et al.* Basic fibroblast growth factor enhances myocardial collateral flow in a canine model // Am. J. Physiol. 1994. 266. (4, Pt. 2). H1588–H1595.

9. *Lazarous D.F., Scheinowitz M., Shou M. et al.* Effects of chronic systemic administration of basic fibroblast growth factor on collateral development in the canine heart // Circulation. 1995. 91. (1). 145–153.

10. *Sato K., Laham R.J., Pearlman J.D. et al.* Efficacy of intracoronary versus intravenous FGF-2 in a pig model of chronic myocardial ischemia // Ann. Thorac. Surg. 2000. 70. (6). 2113–2118.

11. *Автандилов Г.Г.* Медицинская морфометрия. М.: Медицина, 1990. 384 с.

Avtandilov G.G. Medical morphometry. M.: Meditsine, 1990. 384 p.

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

13. *Senger D.R.* Molecular framework for angiogenesis: a complex web of interactions between extravasated plasma proteins and endothelial cell proteins induced by angiogenic cytokines // Am. J. Pathol. 1996. 149. 1–7.

14. *Senger D.R., Van De Water L.* VEGF expression by epithelial and stromal cell compartments: resolving a controversy // Am. J. Pathol. 2000. 157. (1). 1–3.

FIBROBLAST GROWTH FACTOR AS ANGIOGENESIS STIMULATOR AT MYOCARDIAL INFARCTION

Michael Gennadievich SHURYGIN, Irina Alexandrovna SHURYGINA

Research Center of Reconstructive and Plastic Surgery SB RAMS
1, Bortzov Revolutsii str., Irkutsk, 664003

Using a rat model of myocardial infarction we examined the influence of high and low concentration of basic fibroblast growth factor (FGF2) on angiogenesis. We founded that the FGF2 stimulated endotheliocytes. We fixed the increase of endotheliocytes counts in board and «intact» zones of myocardial infarction at the higher level of FGF2 also as decrease of endotheliocytes living ability at the block of endogenous FGF2. Our findings suggest that the FGF2 have high angiogenic potential in case of ischemic myocardial damage.

Key words: fibroblast growth factor, angiogenesis, myocardial infarction.

Shurygin M.G. *— doctor of medical sciences, head of scientific laboratory department, e-mail: shurygin@rambler.ru*
Shurygina I.A. *— doctor of medical sciences, leading researcher, scientific laboratory department*