

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ НА УРОВЕНЬ КОЛЛАГЕНООБРАЗОВАНИЯ В ПРОЦЕССЕ РАЗВИТИЯ ПОСТИНФАРКТНОГО КАРДИОСКЛЕРОЗА

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

(ГУ Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии ВСНЦ СО РАМН, дир. — д.м.н., проф. Е.Г. Григорьев, научно-лабораторный отдел, зав. отд. — д.м.н. М.Г. Шурыгин, Иркутск)

Резюме. Изучено влияние фактора роста эндотелия сосудов на процесс развития соединительной ткани в зоне постинфарктного кардиосклероза. Доказано, что введение VEGF в дозе 100 нг через 1.5 ч. после моделирования инфаркта миокарда приводит к достоверному повышению объема коллагеновых волокон в зоне постинфарктного кардиосклероза на 30 сутки по сравнению с контрольной группой (58.56 и 40.51% соответственно, $p < 0.05$).

Ключевые слова: фактор роста эндотелия сосудов, постинфарктный кардиосклероз, ремоделирование, коллаген.

Адрес для переписки: Шурыгин Михаил Геннадьевич. 664003, г. Иркутск, ул. Борцов революции, 1. Рабочий телефон: (3952) 290-369, e-mail: shurygin@rambler.ru

С 90-х годов XX века пристальное внимание ученых привлекли факторы роста — регуляторы пролиферации и дифференциации клеток. Одно из ключевых мест среди факторов роста занимает фактор роста эндотелия сосудов (VEGF — Vasoendothelial Growth Factor). Общеизвестно, что он участвует в индукции и регуляции как нормального, так и патологического ангиогенеза, стимулирует пролиферацию эндотелиоцитов [3, 4]. Считается, что основным физиологическим эффектом этого белка является митогенный эффект на клетки эндотелия сосудов. При этом он практически не влияет на пролиферацию других клеток. В физиологических концентрациях VEGF действует как фактор выживания эндотелия [6].

К числу клеток-продуцентов VEGF относятся макрофаги, эпителиальные клетки легких и почек, мышечные клетки и др., однако, как правило, этот фактор не секретируется самими эндотелиоцитами [5]. В неизмененных клетках иммуногистохимическими методами VEGF выявляют в цитоплазме, где он находится в связанной форме. Это обеспечивает быстрое освобождение фактора в случае повреждения клетки [2].

В связи с вышеизложенным, изучение влияния VEGF на различные физиологические и патологические процессы перспективно для понимания и коррекции нарушений при многочисленных заболеваниях.

Способность VEGF инициировать рост сосудов позволяет рассматривать их как перспективное средство, улучшающее васкуляризацию миокарда. В настоящее время ведутся исследования с применением факторов роста в модельных экспериментах *in vivo* и *in vitro*, однако в основном они сфокусированы на пролиферации и миграции эндотелиальных клеток. В то же время, в доступной литературе нами не найдено данных о влиянии данного фактора на другие звенья патологического процесса, в частности на синтез коллагена во вновь образующейся соединительной ткани. Значимость процесса неангиогенеза в постинфарктный период, а также недостаточное изучение влияния фактора роста эндотелия сосудов на процесс формирования зоны постинфарктного кардиосклероза позволили нам считать проведение данного исследования актуальным.

Цель исследования: оценить влияние фактора роста эндотелиоцитов на уровень коллагенообра-

зования в зоне формирования постинфарктного кардиосклероза.

Материалы и методы

Проведен хронический эксперимент на 160 самках крыс линии Wistar весом 220-250 г в возрасте 9 мес. (выполнено на базе отдела экспериментальной хирургии с виварием ГУ НЦ РВХ ВСНЦ СО РАМН г. Иркутска). 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 межжелудочковой артерии крысы. В качестве наркоза внутривенно вводили комбинацию в составе: кетамин из расчета 50 мг на кг веса, дроперидол — 0.5 мг на кг веса, атропин — 0.15 мг на кг. Исследования у животных контрольной группы проводили при течении инфаркта миокарда без изменения естественного уровня VEGF. В группе «VEGF» внутрисердечно в полость левого желудочка вводили VEGF (Sigma F0291 Lot 124K0797) в дозе 100 нг (объем инъекции 0.1 мл) однократно через 1.5 ч. после операции, а в сроки 6 часов и 1 сутки производилось введение физиологического раствора (0.85% раствор NaCl); группе «anti-VEGF» вводили моноклональные антитела к фактору роста эндотелия сосудов (Sigma F6162 Lot 025K4835) в дозе 1 мкг трехкратно через 1.5, 6 часов и 1 сутки. В контрольной группе в сроки 1.5, 6 часов и 1 сутки производили внутрисердечную инъекцию 0.1 мл 0.85% раствора NaCl.

Животных выводили из эксперимента через 2 ч., 6 ч., 12 ч., 1, 3, 7, 14 и 30 суток после операции. Сердце экспериментального животного фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, срезы окрашивали по методу Ван Гизон. Оценивался относительный объем грубоволокнистой соединительной ткани по предложенному нами методу.

В работе применялись следующие методы статистического анализа: вариационный (ANOVA/MANOVA), корреляционный анализы [1, 7]. Критический уровень значимости критериев принимался равным 0.05. Анализ данных проводился с использованием статистического пакета R (R project, r-project.org).

Результаты и обсуждение

При образовании соединительнотканного рубца в постинфарктный период одним из наиболее значимых компонентов формирующегося экстрацеллюлярного матрикса является коллаген. Именно коллагеновые волокна определяют механические свойства формирующегося рубца. Нами прослежена динамика формирования коллагеновых волокон в процессе развития постинфарктного кардиосклероза у экспериментальных животных в разные сроки образования постинфарктного рубца.

Мы провели исследование уровня коллагенообразования в трех зонах: в зоне интактного миокарда (задняя стенка левого желудочка); в пограничной зоне и в зоне инфаркта. Исследование проводилось как при увеличении уровня VEGF в крови экспериментальных животных, так и при подавлении эндогенного ростового фактора моноклональными антителами к VEGF. Результаты исследования групп VEGF и анти-VEGF сравнивались с контрольной группой животных при естественном течении ИМ (табл. 1, рис. 1).

Нами проведено внутригрупповое сравнение с использованием контрастов Шеффе в контрольной группе животных и группах VEGF, анти-VEGF на всех сроках исследования.

В ходе исследования нами было выявлено, что у животных контрольной группы в зоне интактного миокарда не выявлено значимого изменения относительного объема коллагена в ткани миокарда в сроки от 2 ч. до 30 суток после инфаркта (табл. 1).

У животных группы «VEGF» к 30-м суткам уровень коллагенообразования при множественных внутригрупповых сравнениях становится значимо выше (рис. 1). При этом у 40% экспериментальных животных к концу наблюдения зарегистрирован очаговый склероз в интактном миокарде в зонах неоангиогенеза. Рассеянный мелкоочаговый склеротический процесс в интактном миокарде следует расценивать как неблагоприятный побочный эффект действия высоких концентраций VEGF.

В группе животных с подавлением активности ростового фактора в интактном миокарде объем, занимаемый коллагеновыми волокнами, находился на первоначальном уровне до 7 суток. Через 7, 14 и 30 суток после операции нами выявлено значимое увеличение выработки коллагена в сравнении с начальными сроками исследования, однако достоверных различий с показателями контрольной группы вследствие большого вариационного размаха выявить не удалось.

В пограничной зоне у животных контрольной группы объем, занимаемый коллагеновыми волокнами, значимо увеличивался к 7 суткам после моделирования ИМ, в последующие сроки наблюдалось дальнейшее нарастание его количества с максимальными показателями к 30 суткам (рис. 1).

У животных группы VEGF в пограничной зоне нами отмечена схожая с наблюдаемой в группе контроля динамика. Увеличение объема, занимаемого коллагеновыми волокнами, наблюдалось через 3 суток после моделирования ИМ со значимым повышением уровня коллагенообразования на сроках 7, 14 и 30 суток по сравнению с показателями начальных сроков. Достоверных отличий с группой контроля нами выявлено не было.

При исследовании динамики коллагенообразования у животных группы анти-VEGF наблюдалось увеличение объема, занимаемого коллагеновыми волокнами, спустя 3 суток после оперативного вмешательства с дальнейшим последующим повышением к 7 суткам, как и у животных контрольной группы. В сроки 7, 14 и 30 суток при внутригрупповом сравнении нами отмечены значимые отличия показателей в сравнении с показателями начальных сроков. В то же время в период с 7 до 14 суток уровень коллагенообразования не изменялся с образованием плато на кривой в данный промежуток времени. В срок 14 суток объем коллагена у животных группы анти-VEGF в пограничной зоне был достоверно ниже, чем у контрольной группы (10.60 и 18.21% соответственно, $p < 0.05$). К 30 суткам объем, занимаемый коллагено-

Таблица 1

Динамика объема коллагена в ткани миокарда у экспериментальных животных, %

Группа	Зона	Относительный объем коллагена по срокам выведения, проц. (медиана, 25%-75% квантили)							
		2 ч	6 ч	12 ч	1 сут.	3 сут.	7 сут.	14 сут.	30 сут.
Контроль	Интактный миокард	0.35 [0.27–0.45]	0.30 [0.05–0.46]	0.24 [0.19–0.41]	0.58 [0.45–0.63]	0.48 [0.29–0.62]	0.76 [0.32–1.30]	0.65 [0.58–0.69]	1.53 [1.04–1.53]
	Пограничная зона	0.35 [0.34–0.35]	0.25 [0.23–0.84]	0.47 [0.29–0.52]	0.86 [0.70–1.00]	1.43 [0.96–1.96]	7.09 [3.68–12.28]*	18.21 [16.12–23.15]*	23.13 [21.24–24.84]*
	Зона инфаркта	0.52 [0.37–0.60]	0.51 [0.44–0.62]	0.21 [0.18–0.33]	0.49 [0.42–0.73]	1.16 [0.17–1.50]	7.19 [5.00–9.78]*	30.03 [24.28–34.78]*	40.51 [40.33–44.30]*
VEGF	Интактный миокард	0.39 [0.21–0.48]	0.26 [0.17–0.29]	0.48 [0.25–0.72]	0.48 [0.21–0.68]	0.61 [0.44–0.73]	1.26 [0.96–2.22]	1.19 [0.80–1.44]	1.86 [0.94–2.37]*
	Пограничная зона	0.24 [0.09–0.84]	0.30 [0.21–0.47]	0.26 [0.24–0.27]	0.30 [0.21–0.47]	2.41 [1.29–3.88]	9.60 [6.61–10.22]*	14.48 [12.25–17.54]*	23.30 [20.68–36.86]*
	Зона инфаркта	0.61 [0.50–0.66]	0.43 [0.35–0.66]	0.15 [0.09–0.25]	0.23 [0.19–0.41]	0.84 [0.60–1.12]	8.51 [7.76–9.99]*	32.31 [30.24–35.93]*	58.56 [48.11–73.27]* $p_k < 0.05$
анти-VEGF	Интактный миокард	0.42 [0.34–0.51]	0.26 [0.22–0.30]	0.52 [0.31–0.57]	0.54 [0.47–0.77]	0.57 [0.48–0.97]	1.60 [1.26–1.81]*	1.22 [0.73–1.99]*	1.80 [1.21–2.34]*
	Пограничная зона	0.41 [0.38–0.42]	0.51 [0.40–0.61]	0.45 [0.29–0.55]	0.68 [0.55–0.85]	2.17 [1.97–2.76]	8.88 [7.02–11.17]*	10.60 [6.14–12.79]* $p_k < 0.05$	18.50 [18.19–20.53]*
	Зона инфаркта	0.47 [0.40–0.54]	0.57 [0.40–0.64]	0.36 [0.31–0.45]	0.43 [0.43–0.49]	1.58 [1.32–1.62]	6.91 [5.30–8.08]*	24.72 [23.39–26.32]*	40.23 [27.83–48.36]*

* — значимые изменения в динамике показателя по множественным сравнениям с использованием контрастов Шеффе.

p_k — уровень значимости различий при сравнении с контрольной группой.

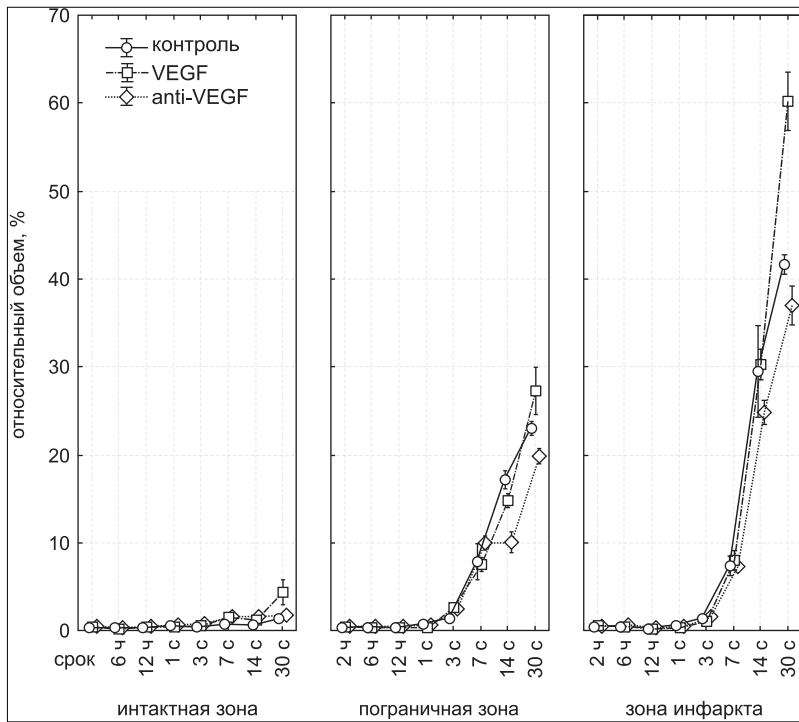


Рис. 1. Относительный объем коллагена в интактном миокарде, пограничной зоне и в зоне инфаркта у экспериментальных животных.

новыми волокнами, достигал максимальных показателей (18.50%), достоверных различий с группой контроля не зарегистрировано.

В зоне инфаркта у животных контрольной группы до 7 суток объем коллагеновых волокон на препарате достоверно не изменялся. Начиная с 7 суток после моделирования ИМ нами было отмечено резкое повышение уровня коллагенообразования с максимальными значениями на 30 сутки (40.51%). При этом по внутригрупповым сравнениям нами выявлено, что показатели данной группы в сроки 7, 14 и 30 суток значимо отличались от зарегистрированных в начальные сроки (табл. 1).

В группе животных с искусственным увеличением концентрации ростового фактора в кро-

ви увеличение объема, занимаемого коллагеновыми волокнами, наблюдалось на 7 сутки после операции. В последующие сроки наблюдалось дальнейшее нарастание объема коллагена с максимумом на 30 сутки исследования. Начиная с 7 суток с момента ИМ, увеличение количества коллагеновых волокон становилось значимым по сравнению с первоначальными показателями. На 30 сутки показатели группы VEGF были достоверно выше таковых в контрольной группе животных (58.56 и 40.51% соответственно, $p < 0.05$).

У животных с преднамеренным подавлением активности фактора роста эндотелия сосудов увеличение объема, занимаемого коллагеновыми волокнами, начиналось с 7 суток после оперативного вмешательства, достигая максимальных значений на 30 сутки. На всех этапах наблюдения достоверных отличий от показателей контрольной группы в соответствующие сроки не зарегистрировано (табл. 1).

Таким образом, нами выявлено усиление коллагенообразования в области формирования рубца при экспериментальном инфаркте миокарда после внутрисердечного введения фактора роста эндотелия сосудов экспериментальных животных.

Проведенные нами исследования показывают, что фактор роста эндотелия сосудов влияет на процесс коллагенообразования в зоне постинфарктного кардиосклероза, значительно усиливая его при введении высоких концентраций VEGF. В то же время чрезмерно высокие концентрации VEGF приводят к развитию очагового кардиосклероза в интактном миокарде, что является побочным эффектом действия данного фактора роста.

INFLUENCE OF VASOENDOTHELIAL GROWTH FACTOR ON THE LEVEL OF COLLAGEN FORMATION IN THE PROCESS OF POSTINFARCTION CARDIOSCLEROSIS

M.G. Shurygin, I.A. Shurygina, N.N. Driomina

(Scientific Center of Reconstructive and Restorative Surgery ESSC SB RAMS, Irkutsk)

The authors studied influence of vasoendothelial growth factor on the process of connective tissue development in the area of postinfarction cardiosclerosis. It has been proved that introduction of VEGF in the dose of 100 ng in 1.5 hours after modeling of cardiac infarction brings to reliable increasing of volume of collagen fibers in the area of postinfarction cardiosclerosis on 30th day in comparison with control group (58.56 and 40.51 % correspondingly, $p < 0.05$).

ЛИТЕРАТУРА

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика. — М.: Практика, 1999. — 459 с.
2. Заридзе Д.Г. Канцерогенез. — М.: Медицина, 2004. — 576 с.
3. Isner J.M., Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization// J. Clin. Invest. — 1999. — Vol. 103, № 9. — P. 1231-1236.
4. Carmeliet P., Jain R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases// Nature. — 2000. — Vol. 407. — P. 249-255.
5. Cao Y., Ji W. — R., Qi P. et al. Placenta growth factor: identification and characterization of a novel isoform generated by RNA alternative splicing// Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1997. — Vol. 27, № 3. — P. 493-498.
6. Ku D.D., Zaleski J.K., Litu S., Brock T.A. Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries// Am. J. Physiol. — 1993. — Vol. 265. — P. 586-592.
7. Glantz S.A., Slinker B.K. Primer of applied regression and analysis of variance. — N.Y.: McGraw-Hill/ Appleton & Lange, 2000. — 949 p.