

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

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРА РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ НА МЕХАНОМОРФОЗ ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПОСТИНФАРКТНОМ КАРДИОСКЛЕРОЗЕ

ГУ НЦ РВХ ВСНЦ СО РАМН, Иркутск

Определено влияние фактора роста фибробластов (FGF2) на механоморфоз левого желудочка при постинфарктном кардиосклерозе. Исследована морфологическая картина, относительное количество коллагена в миокарде, жесткость левого желудочка сердца у крыс через месяц после моделирования инфаркта миокарда. Сравнительный анализ проведен в трех группах животных – контрольной с естественным уровнем FGF2, группах с искусственно повышенным и пониженным уровнями FGF2. Показано, что при увеличении, и при уменьшении концентрации FGF2 происходит нарушение трансформации фибробластов в фиброцит, а введение моноклональных антител к FGF2 приводит к снижению количества коллагена в области постинфарктного рубца и значительному уменьшению жесткости левого желудочка.

Ключевые слова: фибробласты, постинфарктный кардиосклероз

В последние десятилетия значительно возрос интерес к использованию цитокинов при лечении различных заболеваний. Не осталась в стороне и кардиология, где наибольшее внимание уделяется вопросам васкуляризации миокарда при ишемической болезни сердца (ИБС) [1]. В настоящее время имеется значительное количество работ, в которых улучшение перфузии миокарда при ИБС достигалось применением наиболее сильных индукторов ангиогенеза – основного фактора роста фибробластов (FGF2) и фактора роста эндотелиоцитов (VEGF) [1-3]. В то же время вопросы о действии фактора роста фибробластов по его «прямому» предназначению – как индуктора дифференцировки фибробластов, синтеза коллагена и как следствие – роста соединительной ткани – изучены недостаточно. При этом представляет интерес исследование не только стимуляции роста соединительнотканых компонентов, но и противоположных процессов – развития соединительной ткани при недостатке FGF2.

Целью настоящего исследования является определение влияния фактора роста фибробластов на механоморфоз левого желудочка при постинфарктном кардиосклерозе.

Материалы и методы

Проведен хронический эксперимент с использованием 21 крысы линии Wistar массой 220-250 г в возрасте 9 мес. Эксперимент выполнялся в соответствии с правилами гуманного обращения с животными, которые регламентированы «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных живот-

ных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. № 755).

Инфаркт миокарда моделировался методом диатермокоагуляции межжелудочковой артерии крысы. Сравнительный анализ проведен в трех группах животных – контрольной с естественным уровнем FGF2, группах с искусственно повышенным и пониженным уровнями FGF2. В группе ложнооперированных животных исключалась стадия диатермокоагуляции. Исследования у животных контрольной группы проводились при течении инфаркта миокарда без изменения естественного уровня FGF2. В группе «FGF» животным внутрисердечно в полость левого желудочка однократно через 1,5 ч после операции вводили FGF2 (Sigma F0291 Lot 124K0797, доза 100 нг, объем инъекции 0,1 мл), а в сроки 6 ч и 3 сут вводился физиологический раствор (0,85 % раствор NaCl, объем 0,1 мл). В группе «анти-FGF» трехкратно через 1,5, 6 ч и 3 сут вводились моноклональные анти-FGF2 антитела (Sigma F6162 Lot 025K4835, доза 2 мкг, объем инъекции 0,1 мл). Ложнооперированным животным и животным контрольной группы в сроки 1,5, 6 ч и 3 сут проводились внутрисердечные инъекции 0,1 мл 0,85 % раствора NaCl.

Животные выводились из эксперимента через 30 сут после операции. Сердце экспериментального животного фиксировалось в 10 % растворе нейтрального формалина, срезы окрашивались гематоксилин-эозином и по методу Ван Гизона. С использованием программы ImageJ, разработанной Национальным институтом здоровья США и набором модулей фир-

мы Wayne Rasband проводилась морфометрия. При этом, применялся модифицированный планиметрический метод [4] с использованием подсчета элементов на 1 микрофотографии поля зрения при увеличении 600^x. В зоне интактного миокарда, пограничной зоне и зоне инфаркта подсчитывались капилляры, эндотелиальные клетки, фибробласты, фиброциты. Оценивался относительный объем грубоволокнистой соединительной ткани.

Измерение жесткости миокарда выполнялось на изолированных сердцах. После отсечения крупных кровеносных сосудов полость левого желудочка канюлировали, заполняли физиологическим раствором, сердце помещали в емкость с физиологическим раствором. Определяли изменение объема левого желудочка под действием избыточного давления (200 мм) водного столба в полости левого желудочка. Жесткость стенки камеры сердца определяли как отношение изменения давления при наполнении к вызываемому им изменению объема ($\Delta P/\Delta V$) (рис. 1).

В работе применялся вариационный (ANOVA/MANOVA) и корреляционный анализ [5, 6]. Критический уровень значимости критериев (p) принимался равным 0,05. Анализ данных проводился с использованием статистического пакета R (R project, r-project.org).

Результаты и обсуждение

На первом этапе работы оценивалась морфологическая картина миокарда у экспериментальных животных. В группе животных, подвергшихся ложной операции, изменений в миокарде не зарегистрировано, в дальнейшем эти животные использовались в качестве группы сравнения. У контрольной группы животных на тридцатые сутки в зоне инфаркта формировался соединительнотканый рубец.

У животных, однократно получавших внутрисердечную инъекцию FGF2 в дозе 100 нг количество фиброцитов в зоне инфаркта и пограничной зоне достоверно отставало от уровня контрольной группы. Аналогичная картина наблюдалась при введении антител, блокирующих активность FGF2: вследствие нарушения трансформации фибробластов в фиброциты в зоне инфаркта при сопоставимом с контрольной группой количестве фибробластов количество фиброцитов было значительно меньше.

В зоне интактного миокарда у животных, получавших FGF2, выявлена следующая закономерность: в отличие от контрольной группы у этой группы животных регистрировалось достоверно большее количество эндотелиоцитов (медиана 106 по сравнению с 75 в контрольной группе, $p < 0,05$). При этом количество капилляров в указанных группах достоверно не различалось.

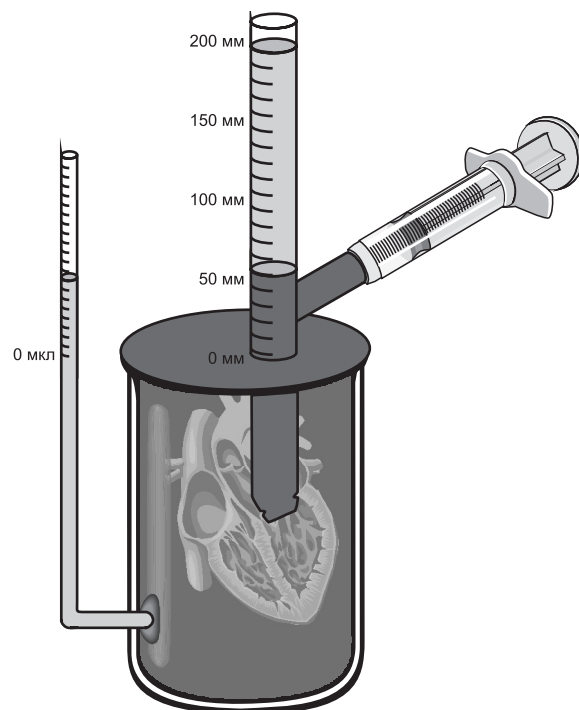


Рис. 1. Изолированное сердце

Таблица 1

Динамика относительного объема коллагена в ткани миокарда у экспериментальных животных

Группа	Зона	Относительный объем коллагена, % (медиана, [25%-75% квантили])
Ложная операция	—	0,45 [0,35–0,59]
Контрольная группа	Интактный миокард	1,53 [1,04–1,53]
	Пограничная зона	23,13 [21,24–24,84]*
	Зона инфаркта	40,51 [40,33–44,30]*
«FGF»	Интактный миокард	0,95 [0,61–1,00]
	Пограничная зона	16,52 [16,04–34,04]*
	Зона инфаркта	43,32 [41,40–45,39]*
«анти-FGF»	Интактный миокард	0,75 [0,69–0,98]
	Пограничная зона	14,18 [12,28–16,80]*
	Зона инфаркта	18,50 [17,42–21,52]*

С учетом того, что одним из основных компонентов новообразованной соединительной ткани является коллаген I и III типов и именно коллагеновые волокна определяют механические характеристики рубца, было проведено исследование относительного объема коллагеновых волокон в миокарде экспериментальных животных на разных этапах формирования зоны постинфарктного кардиосклероза. Оценивалась интенсивность коллагенообразования в зоне инфаркта, пограничной зоне и в интактном миокарде при воздействии FGF2 и антител к FGF2, проведен сравнительный анализ с процессом заживления у животных контрольной группы. Выявлено, что объем волокон коллагена в интактном миокарде как у животных контрольной группы, так и при воздействии FGF и анти-FGF значимо не различался.

У животных, получавших FGF2, и у животных контрольной группы значимых различий в уровне коллагенообразования в пограничной зоне не зарегистрировано. У животных, получавших фактор, блокирующий активность FGF2, на тридцатые сутки объем коллагена был в 2 раза ниже, чем в группе контроля ($p < 0,05$). Аналогичная картина наблюдалась в зоне инфаркта: у животных, получавших FGF2, уровень коллагена значимо не отличался от данных контрольной группы. У животных, получавших анти-FGF2, интенсивность коллагенообразования в зоне инфаркта была существенно ниже, чем в группе контроля, объем коллагеновых волокон более чем в 2 раза отличался от показателей в контрольной группе ($19,15 \pm 1,22\%$ и $41,71 \pm 1,30\%$ соответственно; $p < 0,05$) (табл. 1).

Большой интерес представляет анализ зависимости продукции коллагена от количественного состава клеток фибробластического ряда.

В контрольной группе, где фиброобразование протекало без искусственного изменения уровня FGF2, максимальное содержание коллагена соответствовало умеренному содержанию фибробластов (менее 100 на поле зрения) и максимальному количеству фиброцитов (рис. 2а).

В группе «FGF» картина несколько отличалась (рис. 2б). Как и в контрольной группе, максимальный объем коллагена расположен в области сочетания умеренного количества фибробластов (около 100 на поле зрения) и максимального количества фиброцитов (которое, однако, значительно меньше, чем в контрольной группе (рис. 2а). В группе с использованием анти-FGF2 антител наблюдалась совершенно иная картина (рис. 2в), которую можно охарактеризовать как взаимодействие малых показателей коллагена и фиброцитов. Такая зависимость свидетельствует не только о снижении трансформации фибробластов в

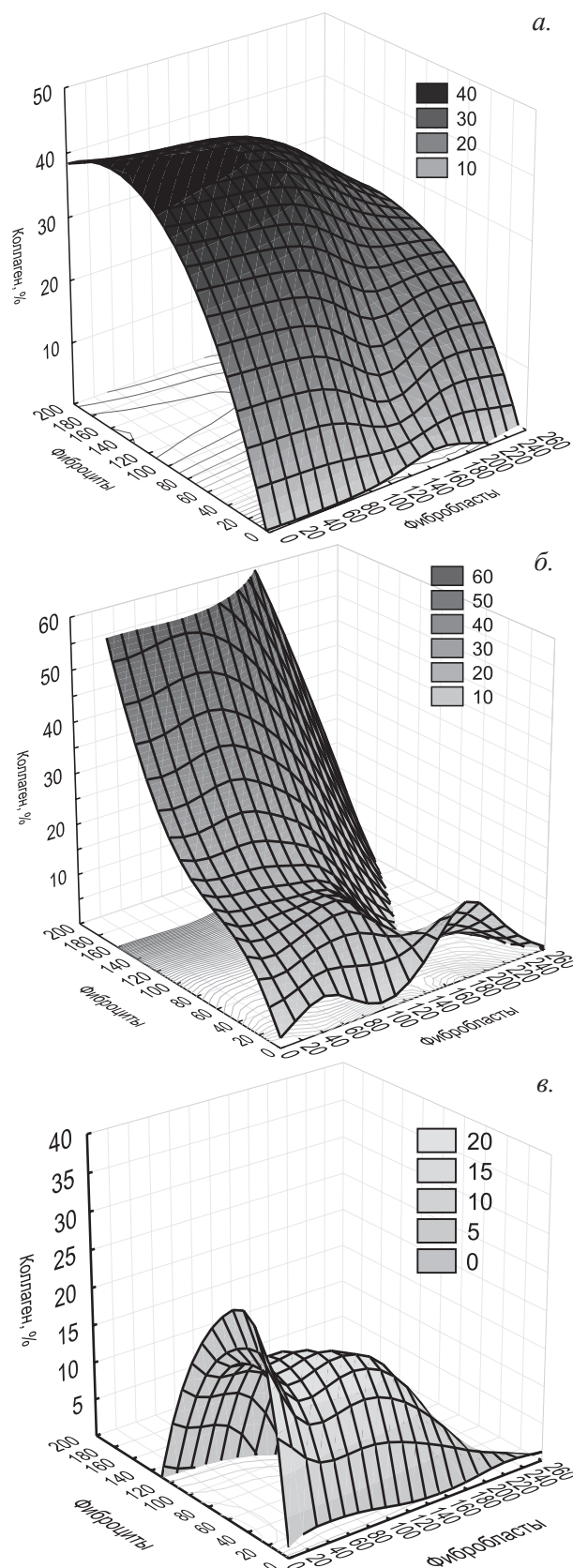


Рис. 2. Соотношение количества коллагена и клеточных элементов фибробластического ряда у животных различных групп (поверхность с наименьшей суммой квадратических отклонений). а – контрольная группа; б – группа «FGF»; в – группа «анти-FGF»

фиброциты (которое наблюдалось и в группе FGF), но и о снижении синтеза коллагена фибробластами. При этом значение соотношения объема коллагена и количества фиброцитов ближе к показателям контрольной группы по сравнению с показателями группы «FGF».

С точки зрения изменения функции миокарда при его постинфарктном ремоделировании представляет большой интерес исследование жесткости миокарда. Определение жесткости, как соотношение изменения давления полости камеры сердца к вызываемому этим давлением увеличению объема, по сравнению с исследованием модуля упругости участков миокарда более целесообразно, так как позволяет получить интегральную оценку податливости стенки камеры при кровенаполнении, в то время как модуль упругости характеризует только локальный участок, а его показатель сильно зависит от анизотропии миокарда по направлению нагрузки и локализации.

За нормальный показатель принималось значение жесткости, полученное у ложнооперированных животных на тридцатые сутки после операции. При этом в остальных группах произошло значительное увеличение жесткости (табл. 2).

Поскольку распределение показателя жесткости в исследуемых группах аналогично уровню коллагенообразования в них, было проведено исследование корреляционной зависимости этих параметров, которое выявило сильную прямую корреляционную зависимость (коэффициент ранговой корреляции Спирмена $R=0,91646$, $p<0,001$). С учетом этого, был проведен регрессионный анализ и определено уравнение регрессии для линейной модели зависимости жесткости левого желудочка при крупноочаговом кардиосклерозе от объема коллагенообразования в зоне инфаркта:

$$\text{Жесткость} = 4927,266 + 59,0427 \times x$$

x – объем коллагеновых волокон в зоне постинфарктного кардиосклероза.

Таким образом, выявленная зависимость жесткости миокарда от объема коллагена позволяет утверждать, что повышение содержания коллагена является основой механоморфоза желудочка сердца при постинфарктном кардиосклерозе, поскольку повышение жесткости приводит к развитию диастолической недостаточности, а подавление синтеза коллагена в группе «анти-FGF» позволяет снизить жесткость миокарда левого желудочка при развитии постинфарктного кардиосклероза у животных этой группы. Это открывает определенные перспективы в управлении процессом формирования постинфарктного рубца с целью предотвращения избыточного повышения жесткости миокарда и обусловленного этим развития сердечной недостаточности при постинфарктных состояниях. Проведенное исследование показало, что однократное введение FGF2 в ранние сроки после моделирования инфаркта миокарда оказывает значимого влияния на жесткость левого желудочка.

При искусственном увеличении или уменьшении концентрации FGF2 у экспериментальных животных нарушается процесс трансформации фибробластов в фиброциты, а также меняется соотношение клеток фибробластического ряда.

INFLUENCE OF FIBROBLAST GROWTH FACTOR ON LEFT VENTRICLE MECHANOMORPHOSIS DUE EXPERIMENTAL POSTINFARCTION CARDIOSCLEROSIS

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

The purpose of this study was to define the influence of Fibroblast Growth Factor (FGF2) on left ventricle mechanomorphosis at experimental postinfarction

Таблица 2

Жесткость миокарда в группах экспериментальных животных на тридцатые сутки после операции

Группа	Жесткость, Па/мл (медиана, [25%-75% квантили])	Межгрупповые различия по тесту Mann-Whitney	
		Z	p
Ложная операция	3428,06 [3292,49–3557,25]		
Контрольная группа	7535,04 [7342,33–7584,95]	$Z_{\text{л}}=-2,92770$	$p_{\text{л}}=0,00342$
«FGF»	7753,35 [7703,53–7801,23]	$Z_{\text{к}}=1,77559$	$p_{\text{к}}=0,07580$
«анти-FGF»	5976,83 [5673,62–6437,64]	$Z_{\text{к}}=-2,19338$ $Z_{\text{FGF}}=-2,50672$	$p_{\text{к}}=0,02828$ $p_{\text{FGF}}=0,01219$

$Z_{\text{л}}$; $p_{\text{л}}$ – значимость различий в сравнении с ложнооперированными животными;

$Z_{\text{к}}$; $p_{\text{к}}$ – значимость различий в сравнении с контролем;

Z_{FGF} ; p_{FGF} – значимость различий в сравнении с группой FGF.

cardiosclerosis. In a month after cardiac infarction modeling in rats morphological study was done, comparative contents of collagen in myocardium and rigidity of left ventricle were examined. Comparative analysis was done in 3 groups of animals – control one with natural level of FGF2 and the group with artificially increased and decreased level of FGF2.

It has been shown that both at increasing and decreasing of concentration of FGF2 there is disturbance of transformation of fibroblasts into fibrocytes. Introduction of FGF2 monoclonal antibodies resulted in reduction of collagen contents in the area of postinfarction scar and in significant reduction of left ventricle rigidity in comparison with control. Revealed influence of FGF2 on mechanomorphosis of left ventricle wall at experimental cardiosclerosis opens up some definite prospect in management of postinfarction zone formation.

Литература

1. Бокерия Л.А., Голухова Е.З., Еремеева М.В. и др. Новые подходы к лечению ишемической болезни сердца: терапевтический ангиогенез в сочетании с хирургической реваскуляризацией миокарда // *Терапевт. архив*. 2004. 6. 25-30.
2. Bokeriya L.A., Golukhova E.Z., Eremeeva M.V. etc. New approaches to treatment of cardio ischemia; therapeutic angiogenesis in combination with surgical myocardial revascularization // *Therap. Arch*. 2004. 6. 25-30.
3. Tsurumi Y., Takeshita S., Chen D. et al. Direct intramuscular gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor augments collateral development and tissue perfusion // *Circulation*. 1994. 12. 3281-3290.
4. Leiden J.M. Human gene therapy: the good, the bad, and the ugly // *Circ. Res*. 2000. 86. 9. 923-925.
5. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. М.: Медицина. 1990. 384 с.
6. Glantz S.A. Medical biological statistics. M: Praktika. 1999. 459 p.
7. Glantz S.A., Slinker B.K. Primer of applied regression and analysis of variance. N.Y.: McGraw-Hill / Appleton & Lange. 2000. 949 p.
8. Glantz S.A. Medical biological statistics. M: Praktika. 1999. 459 p.
9. Glantz S.A., Slinker B.K. Primer of applied regression and analysis of variance. N.Y.: McGraw-Hill / Appleton & Lange. 2000. 949 p.