

*Плакса И. Л.¹, Бозо И. Я.¹, Краковский М. М.¹,
Исаев А. А.¹, Деев Р. В.²*

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЕРДЦА ПОСЛЕ ГЕННОЙ ИНДУКЦИИ АНГИОГЕНЕЗА В МОДЕЛИ ИНФАРКТА МИОКАРДА

¹*Институт стволовых клеток человека (генеральный директор – А. А. Исаев), Москва;*

²*Кафедра гистологии с курсом эмбриологии (заведующая – проф. И. А. Одинцова)*

Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург,

e-mail: i.plaksa2014@yandex.ru

В течение последних 20 лет в лечении заболеваний сердечно-сосудистой системы сформировалось новое направление – «терапевтический ангиогенез». Целью этой лечебной стратегии является реализация нехирургической ревазуляризации ишемизированных тканей за счёт индукции естественных процессов образования и роста сосудов микроциркуляторного русла [5]. В основе «терапевтического ангиогенеза» можно выделить три основных методологических направления: применение рекомбинантных факторов роста, обладающих ангиогенными свойствами; генная терапия и применение клеточных технологий. Генная терапия с целью индукции ангиогенеза является хорошо изученной областью, реализованной в том числе и в клинической практике; это направление подразумевает использование геннотерапевтических конструкций с геном одного из факторов роста (или сочетание нескольких генов), обладающим ангиогенными свойствами [3].

Доставка гена фактора роста в клетки-мишени обеспечивается при помощи различных векторов, которые разделяются на два типа – вирусные и невирусные, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки. После доставки терапевтического гена внутрь клеточного ядра начинается его экспрессия, по мере которой синтезируемый фактор роста выходит в межклеточное пространство и взаимодействует с клетками-мишенями, осуществляя тем самым терапевтический эффект. Фактором роста, обладающим выраженными ангиогенными свойствами, является эндотелиальный сосудистый фактор роста (Vascular Endothelial Growth Factor – VEGF) [2]. На сегодняшний день возможность применения генных препаратов с геном VEGF активно изучается в ходе исследований, а также реализуется в клинической практике для лечения пациентов с хронической ишемией на фоне облитерирующего атеросклероза сосудов нижних конечностей в формате использования pl-vegfl65 [1].

Целью настоящего исследования является морфофункциональная оценка тканей сердца после генной индукции ангиогенеза в модели инфаркта миокарда.

Материал и методы. *Геннотерапевтическая конструкция.* Плаزمид с геном эндотелиального сосудистого фактора роста была разработана в Российской Федерации (патент № 2297848 от 11.05.2005) pl-vegfl65 является активным компонентом препарата «Неоваскулген» (РУЛП-000671 от 28.09.2011).

Животные. Для проведения исследования использовались крысы линии SpragueDawley в возрасте 3 месяцев, с массой тела 200–250 граммов.

Модель острого инфаркта миокарда (ОИМ). Для анестезии использовался комбинированный наркоз кетамин (90 мг/кг) и ксилазином (10 мг/кг). Во время операции животные находились на аппарате искусственной вентиляции лёгких. Выполнялась левосторонняя торакотомия, после чего осуществлялось рассечение перикарда и перевязка левой коронарной артерии путём наложения одного шва.

Дизайн исследования. В исследование включено 30 крыс, которые были разделены на три группы. Первая группа ($n = 6$) – интактный контроль. Животным терапевтической группы ($n = 12$) через две недели после выполнения модели ОИМ осуществлялась реторакотомия и введение 200 мкг pl-veg165 в объёме 25 мкл в периинфарктную зону в ходе нескольких интрамиокардиальных инъекций. Животным группы контроля ($n = 12$) (третья группа) после реторакотомии выполняли введение воды для инъекции в объёме 25 мкл. Для подтверждения наличия инфаркта миокарда всем животным проводилась эхокардиография через 7 дней после создания модели ОИМ. После процедуры эндомиокардиального введения продолжалось наблюдение за животными в течение 5 недель. Всего продолжительность исследования от момента создания модели ОИМ до выведения животных из исследования составила 7 недель.

Эхокардиография. Трансторакальная эхокардиография (ЭХО-КГ) выполнялась всем животным через 7 дней (ЭХО-1) после создания модели ОИМ и через 5 недель (ЭХО-2) после процедуры эндомиокардиального введения при помощи электрокардиографа Vevo 2100 (Visual Sonics, USA). В качестве критериев оценки использовались следующие показатели: фракция укорочения (ФУ, %) фракция изменения площади сечения (ФИПС, %), конечный диастолический размер левого желудочка (КДРЛЖ, см), конечный систолический размер левого желудочка (КСРЛЖ, см). Для сравнительной оценки были рассчитаны средние значения этих показателей для каждой группы животных и представлены в виде разницы между ЭХО-1 и ЭХО-2.

Магнитно-резонансная томография сердца. Магнитно-резонансная томография (МРТ) сердца выполнялась под общей анестезией изофлюраном (3 %, Abbot Laboratories Ltd., England) двум животным в каждой группе непосредственно перед процедурой эндомиокардиального введения (МРТ-1) и через пять недель после неё (МРТ-2). В качестве критериев оценки использовались функциональные показатели сократимости левого желудочка: конечный систолический объём (КСО), конечный диастолический объём (КДО) и ударный объём (УО). Для сравнительной оценки между группами использовалась разница средних значений этих показателей (МРТ-1 и МРТ-2).

Определение размера очага постинфарктного рубца миокарда. Выведение животных из эксперимента осуществлялось через 35 суток после реторакотомии. Сердца фиксировали в 10 % нейтральном формалине. Для определения размера постинфарктного рубца миокарда использовалась окраска трихромом по Массону. Каждое сердце было разделено поперечно на пять частей, из которых было выполнено 5 поперечных срезов толщиной 5 мкм. Площадь рубца на поперечном срезе рассчитывалась при помощи программы ImageJ. Размер рубца на препарате выражали отношением его площади к общей площади миокарда

левого желудочка. Для расчёта размера очага инфаркта у отдельного животного вычислялся средний показатель размера рубца миокарда на пяти препаратах. После этого проводился расчёт среднего показателя размера в различных группах животных.

Оценка количества капилляров. Для определения количества капилляров на поперечном срезе в перинфарктной (перирубцовой) зоне использовалась иммуногистохимическая (ИГХ) реакция с антителами к фактору фон Виллебранда. В качестве значения плотности капиллярной сети использовался показатель, характеризующий количество капилляров на мм^2 площади среза. Для выполнения сравнительной оценки использовались отношения плотности капиллярной сети в интактной области миокарда к плотности капиллярной сети в перинфарктной зоне.

Результаты и обсуждение. В ходе исследования из эксперимента выбыло 10 животных. Из них 9 животных погибли непосредственно после перевязки левой коронарной артерии и ещё одно животное – в процессе реторакотомии для выполнения процедуры внутрисердечного введения препарата. В конце исследования остались доступны анализу 7 животных терапевтической группы, 7 животных группы контроля и 6 интактных животных.

Через неделю после перевязки коронарной артерии у всех животных по данным ЭХО-КГ отмечалось значительное увеличение КДРЛЖ и КСРЛЖ, что явилось объективным подтверждением развития у них ОИМ. Через 5 недель после выполнения процедуры эндомикардиального введения геннотерапевтической конструкции средние показатели КДРЛЖ и КСРЛЖ были ниже в группе животных, которым была введена pl-vegf165, однако разница не достигла уровня статистической значимости (рис. 1). Аналогичная тенденция выявлена при определении показателей сократимости левого желудочка (рис. 2).

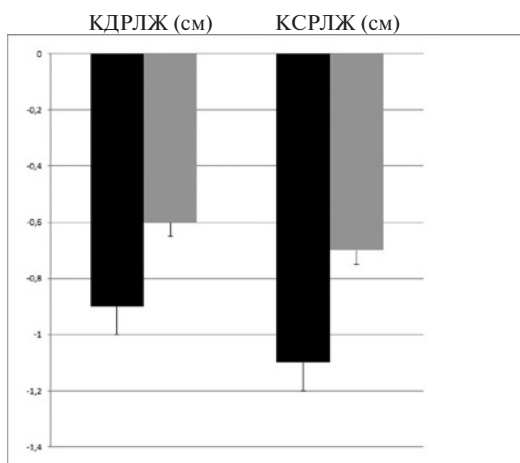


Рис. 1. Средние показатели КДРЛЖ и КСРЛЖ между ЭХО-1 и ЭХО-2: черные столбцы – группа 3 (введена вода для инъекций); серые столбцы – группа 2 (введена геннотерапевтическая конструкция)

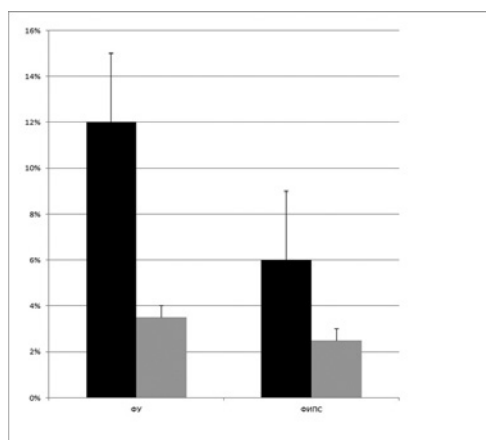


Рис. 2. Средние показатели ФУ и ФИПС между ЭХО-1 и ЭХО-2: черные столбцы – группа 3 (введена вода для инъекций); серые столбцы – группа 2 (введена геннотерапевтическая конструкция)

После выполнения перевязки латеральной проксимальной коронарной артерии значительно снизились такие показатели, как: объём выброса, фракция изменения площади левого желудочка и минутный объём выброса. Это свидетельствовало о резком снижении сократительной способности левого желудочка в результате инфаркта. Через 35 суток в терапевтической группе наблюдались лучшие результаты относительно группы контроля, однако разница показателей не достигла уровня статистической значимости (рис. 3).

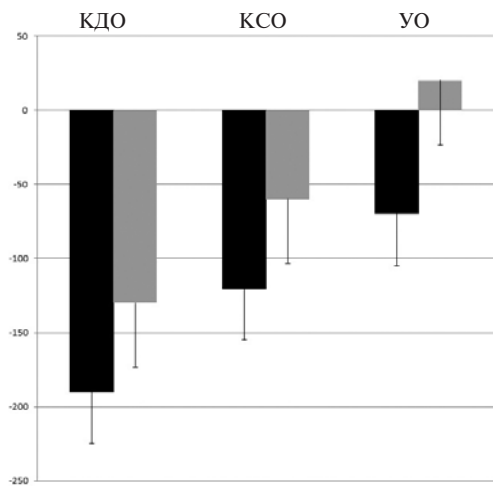


Рис. 3. Средние показатели разницы КДО (мкл) КСО (мкл) и УВ (мкл) между ЭХО-1 и ЭХО-2: черные столбцы – группа 3 (введена вода для инъекций); серые столбцы – группа 2 (введена геннотерапевтическая конструкция)

Характеристика тканей при миокарде левого желудочка. При морфометрическом анализе установлено, что размер постинфарктного рубца миокарда в терапевтической и контрольной группах составил соответственно 19,4 % и 22,8 %. Несмотря на очевидную тенденцию к сохранению работоспособных кардиомиоцитов, выявленная разница недостаточна для подтверждения статистической значимости различий (рис. 4).

При этом установлено, что плотность капиллярной сети при введении pl-veg165 была достоверно выше ($p < 0,01$) (рис. 5, 6).

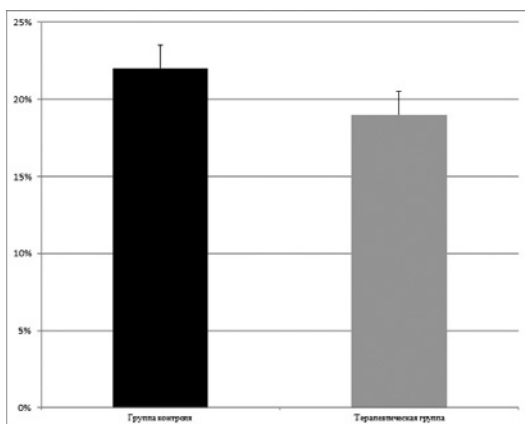


Рис. 4. Соотношения удельной площади постинфарктного рубца миокарда и интактного миокарда у животных группы 3 (введена вода для инъекций) и группы 2 (введена геннотерапевтическая конструкция) – черные столбцы

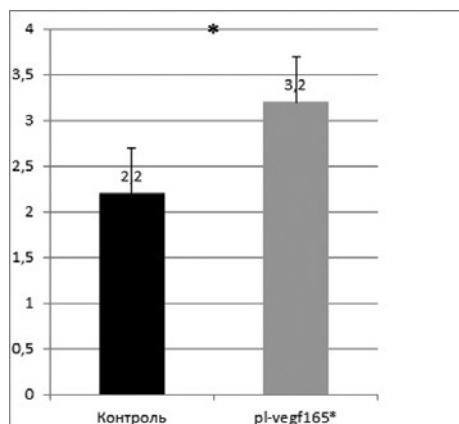


Рис. 5. Отношения показателя плотности капиллярной сети в интактной области миокарда к плотности капиллярной сети в периинфарктной зоне (на 1 мм); * различия статистически значимы при $p < 0,01$

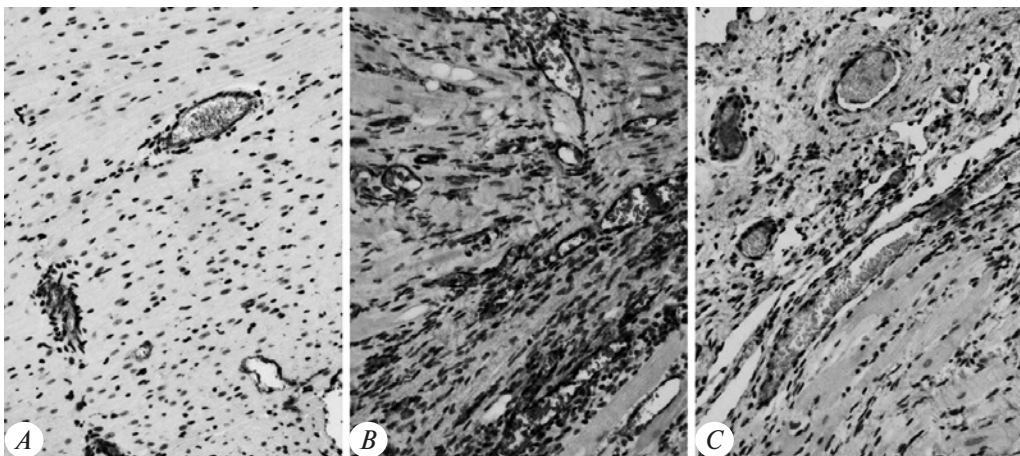


Рис. 6. Строение перирубцовой (периинфарктной) зоны миокарда: А – интактное животное; В – группа контроля; С – терапевтическая группа, периинфарктная зона. Иммуногистохимическая реакция с антителами к фактору фон Виллебранда. Ув. 200×

Таким образом, у всех животных через 7 дней после перевязки левой коронарной артерии наблюдалось выраженное снижение сократительной функции левого желудочка по данным ЭКГ, ЭХО-КГ, МРТ. Это проявлялось увеличением конечных размеров левого желудочка, ФУ и ФИПС. В течение всего срока наблюдения за животными эти показатели возрастали, что характеризовало нарастающую декомпенсацию функции левого желудочка. Однако у животных, которым осуществлялось введение *pl-vegfl65*, наблюдалась тенденция к интенсивному восстановлению функциональных показателей органа. Полученные результаты, однако, не позволили выявить статистически значимых различий, что может быть связано с малым числом животных в группах и коротким сроком наблюдения за ними.

Отсутствие статистически значимых различий в объемных характеристиках соединительной ткани в стенке левого желудочка, по нашему мнению, связано не только с малым числом животных в группах, но и с естественными биологическими закономерностями развития постнекротического процесса в сердечной мышечной ткани. Увеличение оксигенации перинекротической зоны (периинфарктной зоны), что показано морфометрически, не ведет к интенсификации резорбции коллагеновых волокон в исследованный период – 42 сут после перевязки сосуда. Выбранная модель отражает типичную клиническую ситуацию, а именно – введение терапевтических средств уже после произошедшей «сердечной катастрофы» в более или менее отдаленный период. Подобное вмешательство, приводящее к интенсификации васкуляризации периинфарктной зоны (терапевтический ангиогенез), скорее, необходимо для поддержания пограничного гибернирующего миокарда и профилактики прогрессии некротического процесса с последующим образованием рубца в отсроченном периоде.

Еще одним потенциально возможным эффектом цитокиновой терапии может быть активизация локальных стволовых клеток, которые, помимо эффекта васкуляризации, могут привести и к продуктивному кардиомиогенезу в области

повреждения миокарда, во всяком случае – у животных. Так, у животных с моделью ишемии миокарда, создаваемой путём перевязки левой огибающей артерии, было показано, что эндокардиальное введение рекомбинантного VEGF индуцирует митоз кардиомиоцитов или их предшественников, что, по мнению авторов, обеспечивает постепенное восстановление функции левого желудочка [4].

У животных с моделью диабетической кардиомиопатии на фоне стрептозоцин-индуцированного сахарного диабета было выявлено, что снижение экспрессии и эндогенного синтеза VEGF в тканях миокарда является одним из основных звеньев патогенеза снижения сократительной функции левого желудочка. Введение pl-vegfl65 обеспечило сохранение функциональных показателей, что коррелировало с увеличением плотности капиллярной сети, снижением интенсивности апоптоза эндотелиальных клеток и кардиомиоцитов, а также увеличением концентрации предшественников эндотелиальных клеток в периферической крови [6].

Таким образом, генно-опосредованная реализация стратегии терапевтического ангиогенеза приводит к положительным изменениям в экспериментальной модели ОИМ у животных, что подтверждается функциональными методами исследований; приводит к васкуляризации периинфарктных (перирубцовых) зон. Это, по-видимому, способствует оптимизации восстановления морфофункциональной организации миокарда, не подвергшегося необратимым повреждениям в ходе инфаркта (некрозу). Полученные данные позволяют планировать дальнейшие исследования по подбору эффективных доз и режимов введения перспективных прототипов генно-терапевтических препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Деев Р. В., Бозо И. Я., Мжаванадзе Н. Д. и др. Эффективность применения гена VEGF165 в комплексном лечении пациентов с хронической ишемией нижних конечностей 2А-3 стадии // *Ангиология и сосудистая хирургия*. 2014. № 2. С. 38–48.
2. Мжаванадзе Н. Д., Бозо И. Я., Калинин Р. Е. и др. Реалии и перспективы применения генной терапии в сердечно-сосудистой хирургии // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2012. № 2. С. 58–62.
3. Boulikas T. Status of gene therapy in 1997: molecular mechanisms, disease targets, and clinical applications // *Gene Ther. Mol. Biol.* 1998. № 1. P. 1–172.
4. Laguens R., Meckert P. C., Janavel G. V. et al. Entrance in mitosis of adult cardiomyocytes in ischemic pig hearts after plasmid-mediated rhVEGF165 gene transfer // *Gene Therapy*. 2002. № 9. P. 1676–1681.
5. Tilemann L., Ishikawa K., Weber T. et al. Gene therapy for heart failure // *Circ. Res.* 2012. № 11. P. 777–793.
6. Yoon Y., Uchida S., Masuo O. et al. Progressive attenuation of myocardial vascular endothelial growth factor expression is a seminal event in diabetic cardiomyopathy: restoration of microvascular homeostasis and recovery of cardiac function in diabetic cardiomyopathy after replenishment of local vascular endothelial growth factor // *Circulation*. 2005. № 111. P. 2073–2085.