

УДК 616.127-005.8:616-092.9:599.323.4

ВЛИЯНИЕ СОСУДИСТО-ЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО РОСТОВОГО ФАКТОРА В СВОБОДНОЙ И ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМАХ НА АНГИОГЕНЕЗ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИНФАРКТА МИОКАРДА**Великанова Е.А., Головкин А.С., Мухамадияров Р.А.***ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, e-mail: velikanova_ea@mail.ru*

Проведен анализ эффективности применения сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGF) для стимуляции ангиогенеза в постинфарктном миокарде. Использовали сосудисто-эндотелиальный фактор роста в различной дозировке (2,5; 12,5 нг) в свободной форме и в составе липосом. Эффективность доставки препарата к миокарду и стимуляции ангиогенеза оценивали на основании анализа экспрессии VEGF и плотности сосудистой сети в миокарде. Показано, что введение препаратов VEGF сопровождается увеличением его экспрессии в миокарде. Однако только при введении липосомальной формы VEGF в более высокой дозировке (12,5 нг) достигали непрерывного повышенного содержания ростового фактора в течение длительного времени (до 7 суток). Это сопровождалось значительным увеличением плотности сосудистой сети. Меньшая концентрация VEGF в составе липосом и ростовой фактор в свободной форме не оказывали выраженного действия.

Ключевые слова: липосомы, VEGF, инфаркт миокарда, ангиогенез**THE ANGIOGENIC EFFECT OF FREE-VEGF AND LIPOSOME-MEDIATED VEGF IN RAT MYOCARDIAL INFARCTION MODEL****Velikanova E.A., Golovkin A.S., Mukhamadiyarov R.A.***Federal State Budgetary Institution Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases under the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Kemerovo, e-mail: velikanova_ea@mail.ru*

The use of pro-angiogenic growth factors in cardiovascular diseases has been associated with limited success in the clinical setting. One of the proposed problems associated with the short lived effect of the injected cytokine. The use of a liposomal delivery system could allow prolonged cytokine release. We compared free-VEGF vs. liposomes with VEGF165 with in a rat model of infarcted myocardium. It has been shown that high doses of the liposomal VEGF (12,5 ng) provides prolonged increase in myocardial vascular endothelial growth factor expression. It was associated with a significant increase in vascular density. Free-VEGF and lower concentration of liposomal VEGF has no action.

Keywords: liposomes, VEGF, myocardial infarction, angiogenesis

Одним из наиболее перспективных подходов к лечению ишемической болезни сердца и ее осложнений является стимуляция естественных процессов неоваскуляризации с помощью факторов – регуляторов ангиогенеза. [9]. В частности, во многих экспериментальных работах была показана эффективность применения сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGF) в терапии инфаркта миокарда [2, 6]. Однако на этапе клинических исследований на пациентах с ишемией миокарда были получены неоднозначные результаты [10]. Кроме того, клиническое применение VEGF ассоциировано с рядом проблем: ограниченная продолжительность действия ростового фактора, которая влечет за собой формирование незрелых и нестабильных кровеносных сосудов, его быстрое разрушение в кровотоке, возможные побочные эффекты при использовании высоких доз препарата.

Возможным подходом к решению данных проблем является использование липо-

сомальной системы доставки, которая позволяет осуществлять длительную ангиогенную стимуляцию для образования стабильных кровеносных сосудов. Потенциальная эффективность их использования обусловлена тем, что липосомы значимо изменяют фармакокинетику препарата, включенного в их состав. Они защищают инкапсулированное лекарственное вещество от инактивации под действием физиологической среды, а также увеличивают его биодоступность [8]. В сочетании с обеспечением направленного транспорта это дает возможность снизить дозу используемого ростового фактора и таким образом избежать возможных осложнений при сохранении эффективности терапевтического действия препарата.

Цель исследования – оценить эффективность стимуляции ангиогенеза при использовании свободной и липосомальной форм сосудисто-эндотелиального ростового фактора в условиях экспериментального инфаркта миокарда.

Материалы и методы исследования

Липосомы получали методом экструзии через поликарбонатные фильтры (Costar) с диаметром пор 100 нм на экструдере (Lipex Biomembranes Inc., Канада). Липидную пленку получали при помощи ротационного испарителя (Heidolph, Германия) на стенках стеклянной колбы объемом 1 л. Молярное соотношение яичного лецитина (Lipoid, Германия) и холестерина (Sigma) в липосомах составило 7:5. Раствор сосудисто-эндотелиального ростового фактора включали в липосомы методом замораживания/оттаивания. Полученную суспензию 10 раз пропускали через экструдер с использованием фильтров с необходимым размером пор. Перед использованием липосомы разбавляли физиологическим раствором до необходимой концентрации. Конечная концентрация липосом в среде для интрамиокардиальной инъекции составила 2,5 мг/мл в пересчете на липиды.

В эксперименте использовали коммерческий рекомбинантный сосудисто-эндотелиальный ростовой фактор крысы (R&D). Перед использованием его разводили физиологическим раствором до рабочей концентрации (25 и 5 нг/мл).

На сегодняшний день нет данных о дозе VEGF, необходимой для стимуляции ангиогенеза. Концентрация рабочего раствора VEGF подбиралась с учетом литературных данных и результатов собственных предварительных экспериментов. Исходя из гипотезы о том, что включение ростового фактора в состав липосом значительно повысит его биодоступность, мы использовали значительно сниженную дозировку препарата по сравнению с используемыми в большинстве исследований (около 100 нг) [4].

Исследование проводилось на самцах лабораторных крыс субпопуляции Wistar массой 300–380 г. Эксперимент проводили с учетом требований и принципов гуманного обращения с экспериментальными животными. Инфаркт миокарда моделировали посредством перевязки нисходящей ветви левой коронарной артерии. Через 3 суток проводили повторную операцию с целью интрамиокардиальной инъекции терапевтических препаратов. В контрольной группе проводили ложную операцию. В экспериментальных

группах интрамиокардиально вводили сосудисто-эндотелиальный ростовой фактор в количестве 2,5 нг (V2,5) и 12,5 нг (V12,5) либо липосомальную форму сосудисто-эндотелиального ростового фактора в аналогичных концентрациях (V + L12,5 и V + L12,5 соответственно). Животных выводили из эксперимента на 3, 7 и 14 сутки после повторной операции.

Из замороженных образцов миокарда изготавливали криостатные срезы миокарда толщиной 8 мкм. Для блокировки неспецифического связывания срезы инкубировали в растворе 1% BSA. Для оценки васкуляризации миокарда проводили иммунофлуоресцентное окрашивание с использованием мышинных антител к CD31 крысы (Millipore, США) и вторичных антител, конъюгированных с родамином (Millipore, США). Подсчитывали количество сосудов в поле зрения при увеличении в 200 раз, анализировали 10 случайно выбранных полей зрения. Для оценки экспрессии сосудисто-эндотелиального ростового фактора в миокарде проводили иммунофлуоресцентное окрашивание с использованием кроличьих антител к VEGF крысы (Millipore, США) и вторичных антител, конъюгированных с FITC (Millipore, США). Визуализацию осуществляли на люминесцентном микроскопе «Axio Imager.A1» (Carl Zeiss, Германия). Выраженность экспрессии VEGF оценивали на основании измерения интенсивности свечения флуоресцентной метки с помощью программного обеспечения AxioVision. Измерение проводили в 10 случайно выбранных полях зрения, для анализа использовали среднее значение измерений.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью программы Statistica 6.0. Рассчитывали медиану и квартили (Me (25; 75%)). Для оценки различий использовали U-критерий Манна – Уитни; различия между величинами показателей считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Экспрессия VEGF на срезах миокарда

Результаты оценки влияния введения препаратов VEGF на экспрессию ростового фактора в миокарде представлены в таблице.

Оценка экспрессии VEGF в миокарде, у.ед.

Группы	Сроки наблюдения		
	3 сутки	7 сутки	14 сутки
Контроль	0,00 (0,00; 0,00) [#]	107,50 (71,87; 139,18) ^{*/#}	15,73 (0,00; 156,53) [*]
V2,5	26,35 (19,94; 31,64) ^{***#}	1,40 (0,00; 2,08) ^{*/***}	0,00 (0,00; 0,00) ^{*/***}
V + L12,5	0,00 (0,00; 3,11) ^{###}	6,87 (3,51; 9,22) ^{*/***/###}	0,00 (0,00; 0,00) ^{**/**}
V12,5	0,00 (0,00; 0,00) [#]	15,68 (15,13; 17,50) ^{*/***}	0,00 (0,00; 1,21) ^{**/###}
V + L12,5	19,10 (10,35; 22,71) ^{***}	8,00 (7,06; 10,19) ^{*/***}	0,00 (0,00; 0,12) ^{*/**}

Примечания: различия статистически достоверны ($p < 0,05$): * – по сравнению с 3 сутками наблюдения; ** – по сравнению с предыдущим сроком наблюдения; *** – по сравнению с группой контроля; # – по сравнению с группой V + L12,5; ### – по сравнению с предыдущей группой.

В контрольной группе на 3 сутки на срезах миокарда не отмечалась экспрессия VEGF. На 7 сутки наблюдалось яркое све-

чение метки (107,50 ед.), сохранявшееся на 14 сутки (15,73 ед). В группе V2,5 выраженное флуоресцентное окрашивание

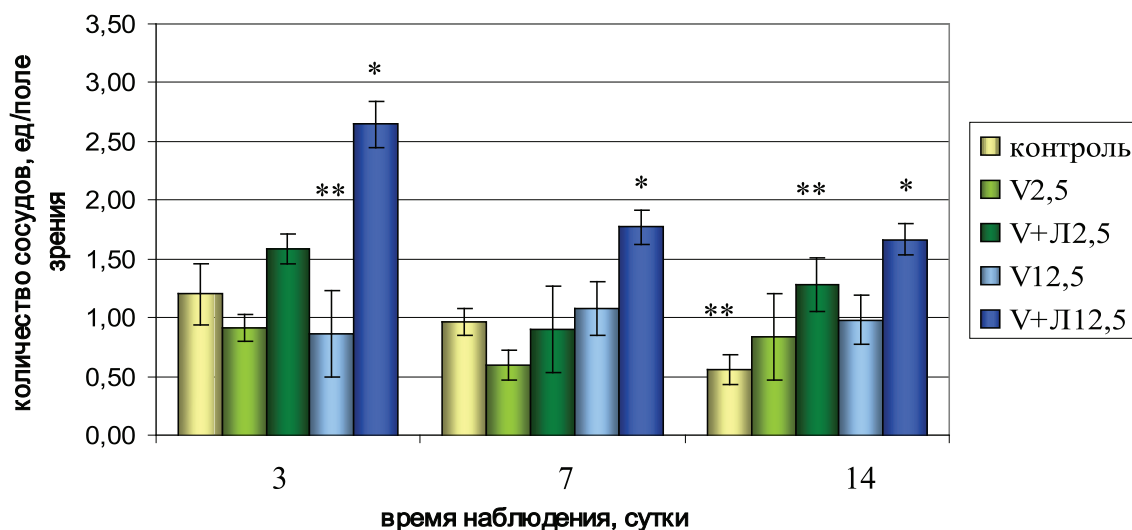
(26,35 ед.) наблюдалось уже на 3 сутки, снижаясь к 7 суткам до 1,40 ед.; на 14 сутки свечение метки не обнаруживалось. В группе V + Л12,5 флуоресцентный сигнал регистрировался только на 7 сутки наблюдения (6,87 ед).

В группе V12,5 свечение метки отмечалось на 7 сутки (15,68 ед), к 14 суткам интенсивность сигнала снижалась до неопределяемого минимума. При введении липосомальной формы VEGF в аналогичной концентрации (группа V + Л12,5) окрашивание наблюдалось уже на 3 сутки (19,10 ед). К 7 суткам интенсивность свече-

ния снижалась (8,00 ед). На 14 сутки флуоресцентного сигнала не отмечалось.

Плотность сосудистой сети в миокарде

В группе контроля на 3 сутки после ложной операции количество сосудов в поле зрения составило 1,2 ед. (рисунок). На 7 сутки отмечена тенденция к снижению уровня показателя (0,96 ед.). На 14 сутки наблюдалось выраженное уменьшение количества сосудов в поле зрения (0,56 ед), различия по сравнению с 7 сутками статистически значимы ($p < 0,05$).



Количество сосудов в поле зрения, ед. в поле зрения:
 * – различия со всеми группами статистически значимы, $p < 0,05$; ** – различия с группой контроля статистически значимы, $p < 0,05$; *** – различия с первыми сутками наблюдения статистически значимы, $p < 0,05$

В группе V2,5 на 3 сутки после инъекции количество сосудов составило 0,91 ед. в поле зрения, что несколько меньше, чем в группе контроля. К 7 суткам значение показателя несколько снижалось (0,60 ед.), затем вновь повышалось на 14 сутки до 0,84 ед. Однако статистически значимых отличий как внутри группы, так и в сравнении с группой контроля не наблюдалось.

В группе V + Л12,5 количество сосудов на 3 сутки несколько превышало значение в контрольной группе – 1,58 ед. На 7 сутки отмечалось значимое уменьшение плотности капилляров – 0,9 ед. ($p < 0,05$). К 14 суткам наблюдалась тенденция к увеличению сосудистой плотности до 1,28 ед.

В группе V12,5 на 3 сутки количество сосудов было невелико – 0,86 ед. В течение всего периода наблюдения отмечались небольшие колебания значения показателя – 1,07 и 0,98 ед. на 7 и 14 сутки соответ-

ственно. Статистически значимых отличий не наблюдалось.

В группе V + Л12,5 количество сосудов на 3 сутки значительно превышало остальные группы – 2,65 ед. К 7 суткам отмечена тенденция к уменьшению количества сосудов – 1,77 ед. На 14 сутки значение показателя продолжало незначительно снижаться – 1,66 ед. Различия с другими группами статистически значимы в течение всего периода наблюдения.

Накопление в тканях гипоксией индуцированного фактора и последующая активация синтеза проангиогенных факторов, в частности VEGF, это естественный механизм, направленный на компенсацию ишемического состояния за счет формирования новых кровеносных сосудов и улучшения микроциркуляции. Однако в ряде исследований было показано, что после инфаркта миокарда наблюдается кратковременный

выраженный подъем уровня VEGF, затем его содержание снижается до исходных значений в течение 1–3 суток [5, 7]. Также известно, что присутствие VEGF является необходимым условием как для инициации ангиогенеза, так и для стабилизации сосуда; в случае его недостатка на стадии формирования сосудистой трубки происходит элиминация вновь образованных зачатков кровеносных сосудов [3]. Указанные факторы приводят к тому, что, несмотря на состояние ишемии, развивающееся в миокарде, уровень естественного ангиогенеза довольно низок.

Хотя на сегодняшний день доказанным является тот факт, что для эффективного ангиогенеза необходимо присутствие VEGF, в литературе нет данных о необходимой для этого концентрации ростового фактора в ткани или длительности его воздействия. Применительно к нашему исследованию, с учетом динамики содержания VEGF в постинфарктном миокарде представлялось эффективным введение препаратов ростового фактора на 3 сутки после инфаркта. В сочетании с его пролонгированной доставкой посредством липосом это должно обеспечить непрерывное поддержание повышенного уровня VEGF.

Исходя из результатов, можно заключить, что во многих случаях введение ростового фактора не оказывало выраженного влияния на уровень его экспрессии в миокарде. В группах V + Л2,5 и V12,5 так же, как и в контрольной, значимая экспрессия VEGF наблюдалась начиная с 7 суток после инъекции. С учетом очень короткого срока существования ростовых факторов в кровотоке указанное увеличение содержания ростового фактора не связано с введением препарата и, по всей видимости, объясняется естественными причинами – гипоксией, воспалением и/или механическим повреждением миокарда при выполнении инъекции. С точки зрения обеспечения пролонгированного присутствия VEGF в ткани, введение указанных препаратов оказалось неэффективным.

Повышенная экспрессия VEGF на 3 и 7 сутки в группе V + Л12,5 также может отчасти иметь естественные причины. Однако вероятным также представляется эффект постепенного выхода VEGF из липосом. Как нами было показано ранее, липосомы способны депонироваться в миокарде [1]. При постепенном разрушении депонированных липосом включенный в их состав VEGF будет выходить в окружающие ткани. Таким образом может осуществляться пролонгированная доставка ростового фактора. В нашем случае

можно сказать, что применение липосом с VEGF 12,5 может обеспечить повышение уровня ростового фактора в ткани на срок до 7 суток после введения.

Полученные при анализе экспрессии VEGF результаты частично подтверждаются данными о сосудистой плотности в миокарде. В контрольной группе наблюдается постепенное снижение количества сосудов в течение всего периода наблюдения, что может говорить о начале формирования сосудистой сети с ее последующей деградацией. В группах с введением свободного VEGF в различной концентрации не отмечено выраженной динамики количества сосудов. Это соотносится с данными о прерывистом характере экспрессии VEGF в миокарде в течение всего срока наблюдения. Таким образом, очевидно, что разовое введение данного количества VEGF недостаточно эффективно в отношении доставки ростового фактора для стимуляции ангиогенеза, что подтверждается низкими значениями плотности сосудистого русла.

Также это свидетельствует о том, что повышение VEGF в группе V2,5 носило временный характер и может как являться следствием введения препарата, так и объясняться естественной реакцией окружающих тканей.

При введении липосомальной формы VEGF в дозе 12,5 нг на 3 сутки отмечается значимое увеличение количества сосудов по сравнению с контрольной группой и группами с введением свободного VEGF. Необходимо отметить, что большее значение показателя обеспечивается в основном появлением большого количества мелких сосудов, что свидетельствует об эффективном процессе ангиогенеза. Это соответствует данным об уровне VEGF в миокарде и позволяет говорить о пролонгированной доставке ростового фактора в течение времени, необходимого для закладки и формирования сосудов.

На 7 сутки происходит некоторое снижение количества сосудов, возможно, вследствие деградации части формирующихся сосудов. Однако к 14 суткам количество сосудов меняется незначительно, можно считать, что происходит стабилизация образованной сосудистой сети.

Выводы

1. Интрамиокардиальное введение VEGF (12,5 нг) в составе липосом на 3 сутки после инфаркта способствует длительному (до 7 суток) повышению содержания ростового фактора в ткани.

2. Липосомальная форма VEGF в количестве 12,5 нг является эффективным стимулятором ангиогенеза и вызывает выраженное увеличение плотности сосудистой сети в миокарде.

Список литературы

1. Депонирование липосом, содержащих VEGF, после интрамиокардиального и системного введения при экспериментальном инфаркте миокарда / Е.А. Великанова, А.С. Головкин, Р.А. Мухамадияров и др. // Вестник Кемеровского государственного университета. – 2013. – № 1(53). – С. 8–12
2. Парфенова Е.В. Терапевтический ангиогенез: достижения, проблемы, перспективы / Парфенова Е.В., Ткачук В.А. // Кардиологический вестник. – 2007. – № 2. – С. 5–15.
3. Цитокиновый контроль процесса ангиогенеза / Е.И. Амчиславский, Д.И. Соколов, Э.А. Старикова и др. // Медицинская иммунология. – 2003. – Т.5. – 5/6. – С. 493–506.
4. Шурыгин М.Г. Влияние фактора роста эндотелия сосудов на уровень коллагенообразования в процессе развития постинфарктного кардиосклероза / М.Г. Шурыгин, И.А. Шурыгина, Н.Н. Дремина // Сибирский медицинский журнал. – 2008. – № 3. – С. 53–55.
5. Шурыгин М.Г. Динамика факторов роста эндотелия сосудов и фибробластического фактора роста при экспериментальном инфаркте миокарда / М.Г. Шурыгин, И.А. Шурыгина, Н.Н. Дремина // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2007. – № 6. – С. 169–174.
6. Biodegradable collagen patch with covalently immobilized VEGF for myocardial repair. / Miyagi Y, Chiu LL, Cimini M et al. // Biomaterials. – 2011. – № 32. – P.1280–1290.
7. Differential expression of vascular endothelial growth factor isoforms and receptor subtypes in the infarcted heart / T. Zhao, W. Zhao, Y. Chen // Int J Cardiol. – № 167(6). – 2013. – P. 2638–2645
8. Elbayoumi T.A. Current Trends in Liposome Research / Elbayoumi T.A., Torchilin V.P. // Methods Mol Biol. – 2010. – № 605. – P. 1–27.
9. Menasché P. Cardiac reparation: fixing the heart with cells, new vessels and genes / Menasché P, Desnos, M. // European Heart Journal. – 2002. – № 4. – P. D73–D81
10. Said S.S. Advances in Growth Factor Delivery for Therapeutic Angiogenesis / Said S.S., Pickering J.G., Mequanint K. // J Vasc Res. – 2013. – № 50. – P. 35–51

References

1. Velikanova E.A., Golovkin A.S., Mukhamadiyarov R.A., Toropova Y.G., Lisachenko G.V. *Vestnik Kemerovskogo gosudarstvennogo universiteta – Bulletin of Kemerovo State University*, 2013, no. 1(53), pp. 8–12
2. Parfenova E.V., Tkachuk V.A. *Kardiologicheskij vestnik – Cardiology Bulletin*, 2007, no. 2, pp. 5–15.
3. Amchislavskij E.I., Sokolov D.I., Starikova Je.A. et al. *Medicinskaja immunologija – Medical Immunology*, 2003, Vol. 5. pp. 493–506.
4. Shurygin M.G., Shurygina I.A., Dremina N.N. *Sibirskij medicinskij zhurnal – Siberian journal of medicine*, 2008, no. 3, pp. 53–55.
5. Shurygin M.G., Shurygina I.A., Dremina N.N. *Bul. VSNЦ СО РАМН*, 2007, no. 6, pp. 169–174.
6. Miyagi Y, Chiu LL, Cimini M et al. *Biomaterials.*, 2011, Vol. 32, pp. 1280–1290.
7. Zhao T., Zhao W., Chen Y. *Int J Cardiol*, 2013, Vol. 167(6), pp. 2638–2645.
8. Elbayoumi T.A., Torchilin V.P. *Methods Mol Biol.*, 2010, Vol. 605, pp. 1–27.
9. Menasché P., Desnos M. *European Heart Journal.*, 2002, Vol. 4, pp. D73–D81.
10. Said S.S., Pickering J.G., Mequanint K. *J Vasc Res.*, 2013, Vol. 50, pp. 35–51.

Рецензенты:

Будаев А.В., д.м.н., профессор кафедры патологической физиологии, ГОУ ВПО «Кемеровская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, г. Кемерово;

Лисаченко Г.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой патологической физиологии, ГОУ ВПО «Кемеровская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, г. Кемерово.

Работа поступила в редакцию 22.09.2014.