

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

ДИНАМИКА КЛЕТОЧНЫХ РЕАКЦИЙ В ЗОНЕ ФОРМИРОВАНИЯ ПОСТИНФАРКТНОГО КАРДИОСКЛЕРОЗА ПРИ ПОДАВЛЕНИИ АКТИВНОСТИ FGFB В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

НЦ РВХ ВСНЦ СО РАМН (Иркутск)

Институт эпидемиологии и микробиологии НЦ МЭ ВСНЦ СО РАМН (Иркутск)

Иркутский филиал ФГУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова Росздрава» (Иркутск)

На модели инфаркта миокарда у крыс авторами исследовано изменение клеточных реакций в зоне формирования постинфарктного кардиосклероза при подавлении активности FGFB. Уровень FGFB снижался посредством трехкратного внутрисердечного введения моноклональных анти-FGFB антител в сроки 1,5, 6 ч и 3 суток после операции. Морфологические изменения были изучены в сроки от 2 ч до 30 суток с момента операции.

Наиболее значимые результаты изменений естественного течения процесса под действием анти-FGFB антител заключаются в:

- снижении как выживаемости эндотелиоцитов в зоне ишемического повреждения, так и замедлении их активации;
- уменьшении выраженности инфильтративной реакции;
- нарушении трансформации фибробластов в фиброциты и снижении фибробластической активности за счет активации класматоза и апоптоза.

Ключевые слова: фактор роста фибробластов, постинфарктный кардиосклероз, эксперимент

CHANGED CELLS REACTION IN CARDIOSCLEROSIS FORMATION ZONE BY FGFB DECREASED ACTIVITY IN EXPERIMENTAL MYOCARDIAL INFARCTION

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

SC RRS ESSC SB RAMS, Irkutsk

Scientific Institute of Epidemiology and Microbiology, Irkutsk

Irkutsk Branch of Sv. Fyodorov's «IRTC Eye Microsurgery», Irkutsk

Authors demonstrate changes in cells reaction in dynamic of postinfarction cardiosclerosis formation by decrease of FGFB activity. Level of FGFB decreased by three times intracardiac injection of monoclonal anti-FGFB antibody at 1,5, 6 hours and 3 day time marks on myocardial infarction rat model. Morphological changes were investigated in time from 2 hours up to 30 days after infarction modeling.

Most important results include 3 ways:

- survival of endoteliocytes in damaging zone is decreased also as decreased of their activation,
- infiltrative stage of inflammatory reaction is decreased,
- fibroblast live cycle is disturbed what demonstrate by switch to clasmatosis and apoptosis despite transformation in fibrocytes.

Key words: fibroblast growth factor, postinfarction cardiosclerosis, experiment

В последние десятилетия наблюдается большой интерес в отношении использования цитокинов при лечении различных заболеваний. Не осталась в стороне от этого и кардиология, при этом наибольшее внимание привлечено к вопросам васкуляризации миокарда при ИБС [2]. На настоящий момент известно немало работ, в которых цели улучшения перфузии миокарда при ИБС достигались применением наиболее сильных индукторов ангиогенеза — основного фактора роста фибробластов (FGFb) и фактора роста эндотелиоцитов (VEGF) [2, 4, 9]. Однако кроме улучшения состояния миокарда (которое в большинстве работ было зафиксировано только на основании клинической картины) имеются и сообщения о неблагоприятных эффектах такой терапии в виде гипотензии, стимуляции роста первичных опухолей и ускорения роста атеросклеротических бляшек за счет прорастания *vasa vasorum* [5, 7—9].

В то же время при пристальном внимании к процессам ангиогенеза при ИБС остаются в стороне

вопросы изучения действия фактора роста фибробластов по «прямому» его предназначению — как индуктора роста соединительной ткани. При этом наш взгляд интересна не только стимуляция роста соединительнотканых компонентов, но и противоположные процессы — развитие соединительной ткани при недостатке FGFb. Наш интерес к этому в данной работе ограничен клеточным компонентом формирования зоны постинфарктного кардиосклероза как наиболее значимого процесса с точки зрения морфофункционального ремоделирования сердца после перенесенного инфаркта миокарда (ИМ).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование было проведено на экспериментальной модели ИМ у 85 крыс линии Wistar весом 220—250 г. в возрасте 9 мес. Эксперимент на животных выполнялся в соответствии с правилами гуманного обращения с животными, которые регламентированы «Правилами проведения работ с исполь-

Распределение животных по группам и срокам наблюдения

Группа	Срок выведения								Всего
	2 ч	6 ч	12 ч	24 ч	3 сут.	7 сут.	14 сут.	30 сут.	
a-FGF	5	5	5	5	5	5	5	5	40
Контроль	6	5	5	6	5	6	6	6	45

зованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. № 755) в отделе экспериментальной хирургии НЦ РВХ ВСНЦ СО РАМН (зав. отделом к.б.н. С.А. Лепехова). Все оперативные вмешательства проводились в асептических условиях.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ИНФАРКТА МИОКАРДА

Под общей анестезией (внутрибрюшинно — кетамин, дроперидол и атропин в дозе 50, 0,5 и 0,15 мг на кг веса соответственно) выполняли левостороннюю торакотомию и проводили диатермокоагуляцию передней межжелудочковой артерии диатермокоагулятором «F.L.Fischer Bipolator 17601» током с частотой 350 кГц в течение 1 сек. Далее торакотомное отверстие закрывали, восстанавливали отрицательное давление в плевральной полости, рану послойно ушивали. Для предотвращения развития инфекции однократно внутримышечно вводили гентамицин в дозе 5 мг/кг.

После моделирования ИМ животные были разделены случайным образом на 2 группы: контрольная и основная. В контрольной группе постинфарктный период имел естественное течение, а в основной группе животным вводили внутрисердечно в полость левого желудочка антитела к FGfB (Sigma F6162 Lot 025K4835) в дозе 2 мкг трехкратно через 1,5, 6 ч и 3-е суток после операции. По окончании эксперимента животных выводили через 2 ч, 6 ч, 12 ч, 1, 3, 7, 14 и 30 суток. Распределение животных по группам и срокам выведения приведены в таблице 1. Материалом для исследования служил миокард.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Фиксацию материала осуществляли в 10% растворе нейтрального формалина. После фиксации осуществляли проводку и заливку в парафиновые блоки, из которых изготавливали серийные срезы толщиной 3 мкм и окрашивали их гематоксилин-эозином. Морфологические исследования проведены в лаборатории патоморфологии научно-лабораторного отдела НЦ РВХ ВСНЦ СО РАМН (зав. лабораторией к.м.н. О.А. Гольдберг).

МОРФОМЕТРИЯ

Морфометрию проводили с использованием программы ImageJ Национального института здоровья (США) с набором модулей для медицинской морфометрии от Wayne Rasband. Применялся планиметрический метод [1] в модификации с использованием подсчета клеточных элементов на 1 микрофотографии (ув. 400х). Подсчет велся в 3 зонах — интактного миокарда, пограничной зоне, зоне

инфаркта. В каждой зоне анализировалось 4 поля зрения. Подсчитывались: эндотелиальные клетки, фибробласты, фиброциты, лимфоциты, сегментоядерные лейкоциты, макрофаги.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При сравнении морфологической картины на первой временной точке (2 ч) мы не наблюдали значимых различий в морфологической картине в сравниваемых группах. И в контрольной, и в основной группах животных в этот срок гистопатология в зоне инфаркта характеризовалась нарушениями кровообращения: неравномерным полнокровием, участками обширных кровоизлияний, стазами в капиллярах, а также отеком стромы и околоклеточных пространств. В кардиомиоцитах наблюдалась вакуолизация цитоплазмы, некробиотические изменения — утрата поперечной исчерченности, набухание ядер кардиомиоцитов, кариопикноз. Появлялись единичные нейтрофилы, лимфоциты и макрофаги (фото 1, стр. 255).

Через 6 ч после моделирования инфаркта на гистологических препаратах в области ишемического повреждения наблюдался распад кардиомиоцитов (фрагментация и гомогенизация отдельных мышечных волокон, кариолизис, эозинофилия цитоплазмы). Среди инфильтративных клеточных элементов встречались нейтрофилы, единичные лимфоциты, макрофаги и сидерофаги. Еще по прошествии 6 ч (12-часовая точка) отмечали максимальную выраженность нейтрофильной реакции. При этом анализ клеточной инфильтративной реакции приводит к несколько разноречивым результатам — выявлен более ранний пик нейтрофильной инфильтрации в пограничной зоне в контрольной группе (12 ч против суток в основной группе), в то время как в группе животных, получавших анти-FGfB антитела, в зоне некроза пик нейтрофильной реакции приходился на более ранние сроки (на 6 часов, с последующим спадом, в сравнении с 12-часовым пиком в контроле). Однако нельзя не отметить, что пиковая интенсивность нейтрофильной инфильтрации все же более выражена в контрольной группе (рис. 1). В срок 12 ч наблюдались преимущественно полиморфно-ядерные лейкоциты с многочисленными включениями в цитоплазме, часть из этих клеток в стадии распада, что свидетельствовало о стабилизации очага некроза. Нарастал распад мышечных волокон. Количество сидерофагов достигало максимума.

В этот же срок проявляются различия в динамике количества эндотелиоцитов в зоне ишемического повреждения. Так как эндотелиоцит является менее энергетически зависимой клеткой в сравнении с кар-

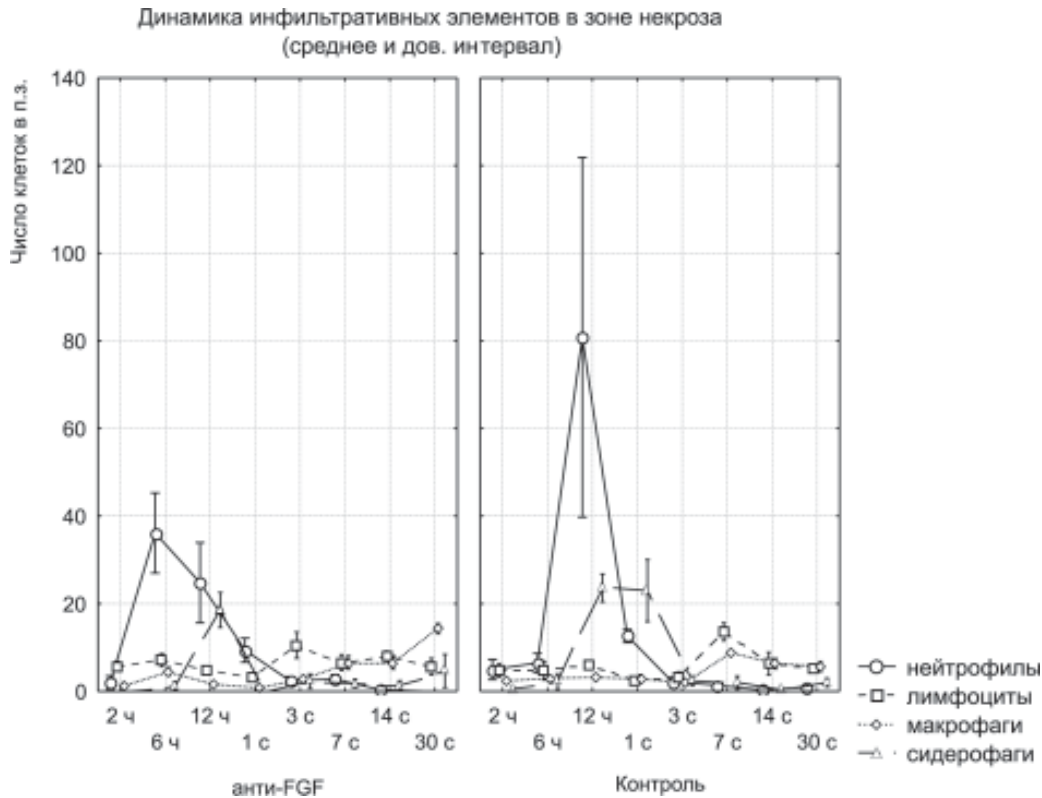


Рис. 1. Динамика количества инфильтративных элементов в зоне инфаркта.

диомиоцитом, часть эндотелиоцитов 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 к 12 ч отмечается тенденция к росту их количества (при этом изменяется и морфологическая характеристика клеток — их ядра становятся округлыми, свидетельствуя об активации клеток), то в основной группе к 12 ч после моделирования инфаркта уже четко прослеживается динамика снижения количества эндотелиоцитов (фото 2 и 3, стр. 255; рис. 2). Пытаясь найти объяснение этому факту, мы обнаружили в литературе данные о «цитопротективной» функции ростовых факторов [3, 6, 10], которая, вероятно, и подавляется при связывании FGFb антителами.

Через 24 ч количество нейтрофилов в зоне некроза снижалось, сохранялся высокий уровень сидерофагов. В контрольной группе в пограничной зоне начинался рост сосудов, в то время как в основной группе продолжалось снижение количества эндотелиоцитов в очаге повреждения.

Через 3 суток и в пограничной зоне, и в зоне инфаркта картина резко менялась. Вслед за стадией нейтрофильной инфильтрации в очаге некроза начали преобладать резорбция и организация. Отмечалось большое количество фибробластов, формировалась грануляционная ткань, что проявлялось резким возрастанием количества сосудов синусоидного и капиллярного типов. Выявлялись единичные фиброциты.

К 7 суткам в зоне некроза усиливались резорбтивные процессы, происходило замещение не-

кротизированных мышечных волокон молодой соединительной тканью. Нарастала плотность упаковки фибробластов, достигая максимума за все сроки наблюдения. В этот срок выявлены минимальные значимые отличия в пограничной зоне в количестве фибробластов в исследуемых группах, которое немного преобладало их в контроле. Через неделю после операции уже происходили изменения части фибробластов, характерные для клазматоза. Некоторые фибробласты теряли активность, трансформируясь в фиброциты.

На 14 сутки в зоне формирования постинфарктного рубца отмечалось созревание грануляционной ткани с уменьшением количества сосудов. Снижалось количество фибробластов при одновременном нарастании количества фиброцитов. В сравнительном аспекте выявляется более плавное снижение количества фибробластов в группе a-FGFb в сравнении с контролем, и очень интересное, с нашей точки зрения, явление дисбаланса количества фибробластов и фиброцитов при применении анти-FGF антител. Если в контрольной группе большая часть фибробластов, теряя активность, превращалась в фиброциты, то у животных при введении антител к FGFb наблюдалось нарушение этой трансформации, и большая часть фибробластов просто прекращала свое существование. При этом их ядра набухали и теряли тинкториальные свойства, а цитоплазма вакуолизировалась и фрагментировалась (фото 4, стр. 255).

На 30 сутки в зоне инфаркта формировался соединительнотканый рубец. Количество клеточных элементов и сосудов уменьшалось, количество фиброцитов в группе контроля превышало количество

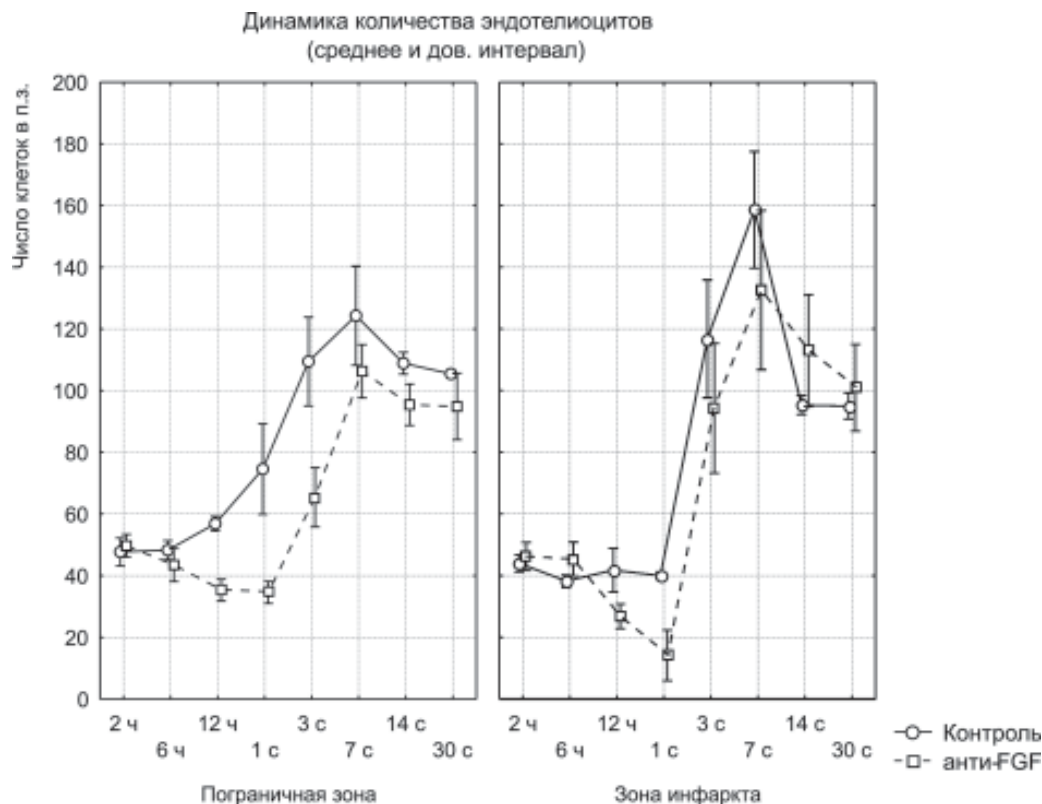


Рис. 2. Динамика количества эндотелиоцитов в группах анти-FGF и контроле.

фибробластов (фото 5, 6, стр. 255). В основной группе вследствие нарушения трансформации при сопоставимом с контролем количестве фибробластов (85 (81–106) в сравнении с 84,5 (80–89), $P > 0,05$) количество фиброцитов было значительно меньше (58 (5673) и 152 (148–156) соответственно, $p < 0,01$).

Таким образом, на основании проведенного исследования можно отметить 3 наиболее значимые тенденции в динамике клеточных реакций в области развития постинфарктного кардиосклероза при подавлении активности FGFb за счет связывания его антителами:

- 1) снижение выживаемости эндотелиоцитов в очаге повреждения и замедление их активации;
- 2) снижение интенсивности инфильтративной фазы воспаления;
- 3) нарушение жизненного цикла фибробластов, заключающееся в уменьшении трансформации их в фиброциты с переключением на альтернативные способы снижения фибробластической активности (клазматоз и апоптоз).

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия / Г.Г. Автандилов. — М.: Медицина, 1990. — 384 с.
2. Новые подходы к лечению ишемической болезни сердца: терапевтический ангиогенез в сочетании с хирургической реваскуляризацией миокарда / Л.А. Бокерия, Е.З. Голухова, М.В. Еремеева и др. // Тер. архив. — 2004. — № 6. — С. 25–30.
3. Activation of FGFR1beta signaling pathway promotes survival, migration and resistance to

chemotherapy in acute myeloid leukemia cells / M.A. Karajannis, L. Vincent, R. Drenzo et al. // *Leukemia*. — 2006. — Vol. 20 (6). — P. 979–986.

4. Direct intramuscular gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor augments collateral development and tissue perfusion / Y. Tsurumi, S. Takeshita, D. Chen et al. // *Circulation*. — 1994. — Vol. 12. — P. 3281–3290.

5. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease / J. Folkman // *Nat. Med.* — 1995. — Vol. 1. — P. 27–31.

6. Frangogiannis N. Targeting the Inflammatory Response in Healing Myocardial Infarcts / N. Frangogiannis // *Curr. Med. Chem.* — 2006. — Vol. 13, N 16. — P. 1877–1893.

7. Hypotensive activity of fibroblast growth factor / P. Cuevas, F. Carceller, S. Ortega et al. // *Science*. — 1991. — Vol. 254. — P. 1208–1210.

8. Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis / K.S. Moulton, K. Vakili, D. Zurakowski et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2003. — Vol. 100, N 8. — P. 4736–4741.

9. Leiden J.M. Human gene therapy: the good, the bad, and the ugly / J.M. Leiden // *Circ. Res.* — 2000. — Vol. 86, N 9. — P. 923–925.

10. VEGF, a prosurvival factor, acts in concert with TGF-beta1 to induce endothelial cell apoptosis / G. Ferrari, G. Pintucci, G. Seghezzi et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2006. — Vol. 103 (46). — P. 17260–17265.

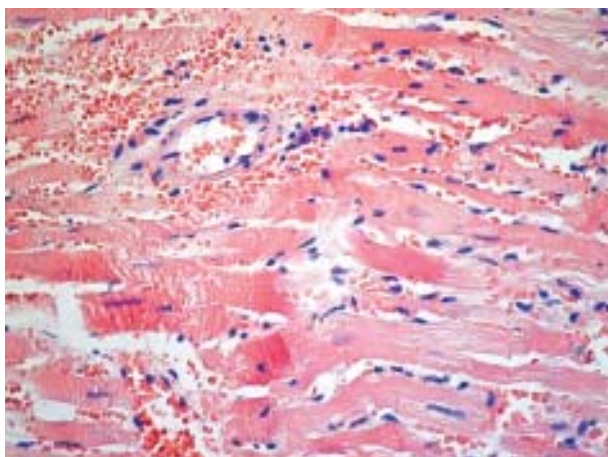


Фото 1. Группа анти-FGF. 2 часа после операции. Зона инфаркта. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. 600.

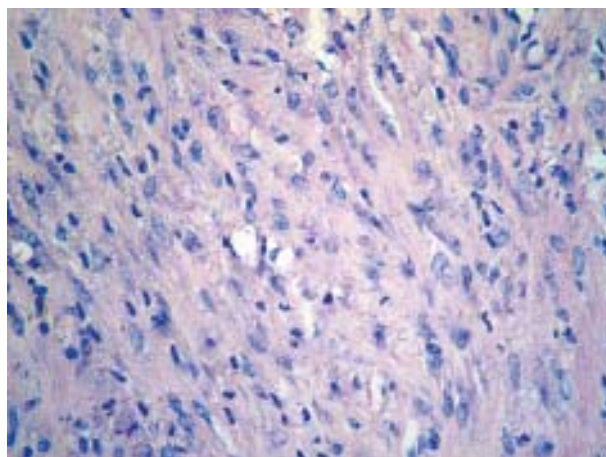


Фото 4. Группа анти-FGF. 14 суток после операции. Умеренное количество фибробластов и единичные фиброциты в зоне формирующегося рубца. Клазматоз фибробластов. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. 600.

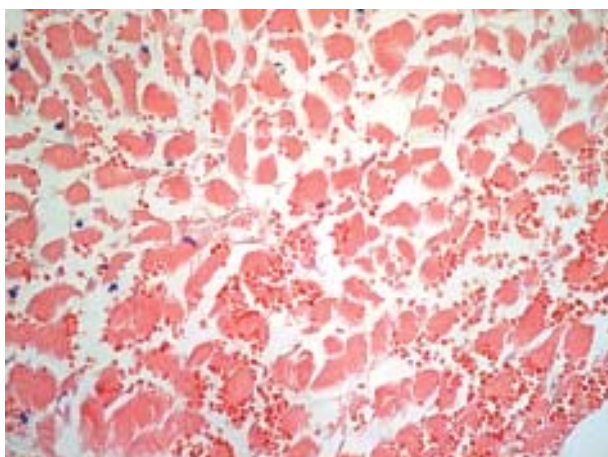


Фото 2. Группа анти-FGF. 12 часов после операции. Отсутствие эндотелиоцитов. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. 600.

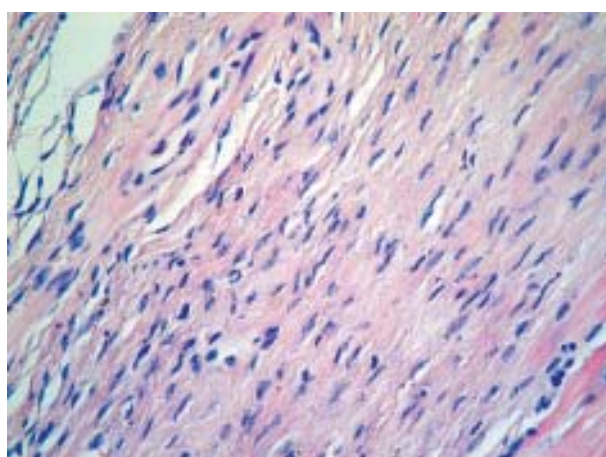


Фото 5. Группа анти-FGF. 30 суток после операции. Зона инфаркта. Снижение количества клеток фибробластического ряда. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. 600.

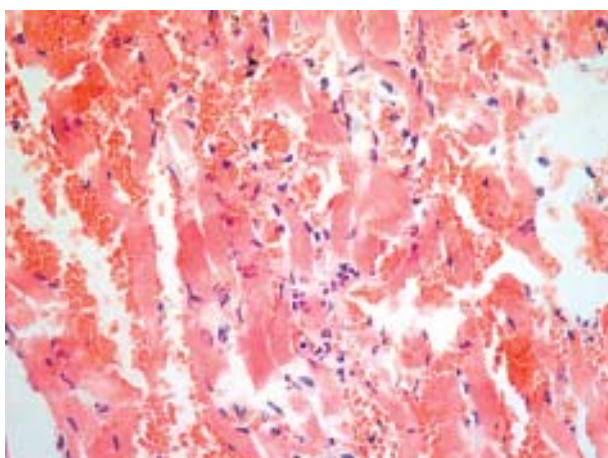


Фото 3. Контрольная группа. 12 часов после операции. Зона некроза. Сохранившиеся эндотелиоциты и нейтрофильная инфильтрация. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. 600.

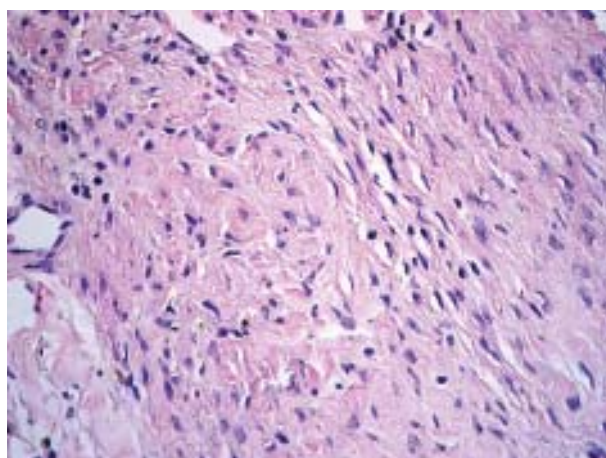


Фото 6. Контрольная группа. 30 суток после операции. Фибробласты и фиброциты в зоне формирующегося соединительнотканного рубца. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. 600.

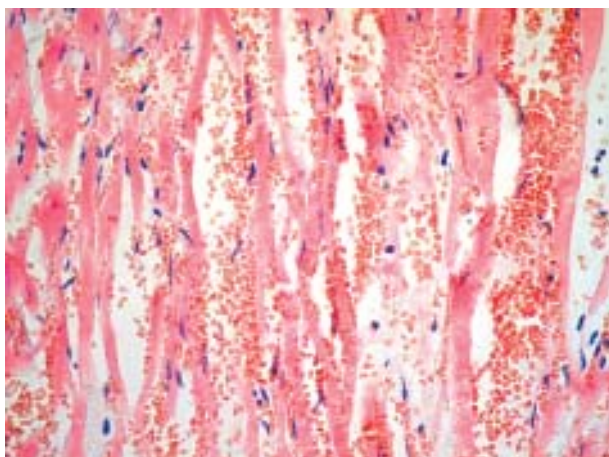


Фото 1. Контрольная группа. 6 часов после операции. Зона инфаркта. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. 600.

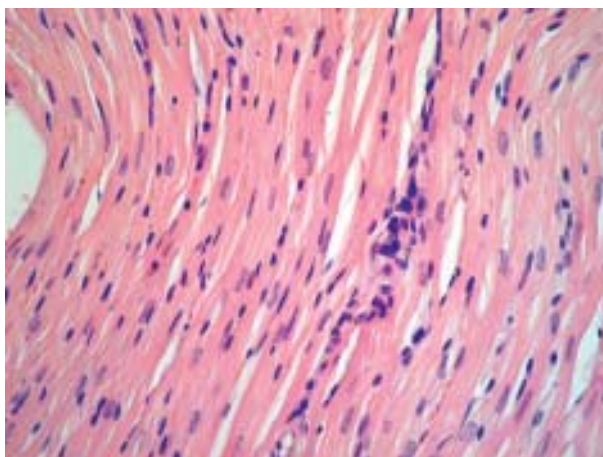


Фото 4. Группа FGF. 7 суток после операции. Активация и увеличение количества эндотелиоцитов в области интактного миокарда. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. 600.

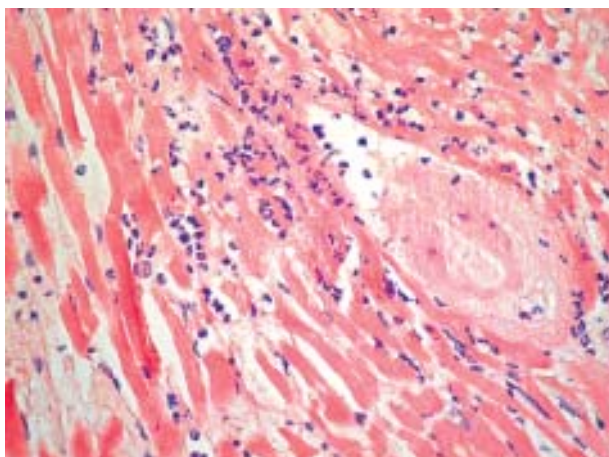


Фото 2. Группа FGF. 6 часов после операции. Выраженная нейтрофильная инфильтрация в зоне инфаркта. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. 600.

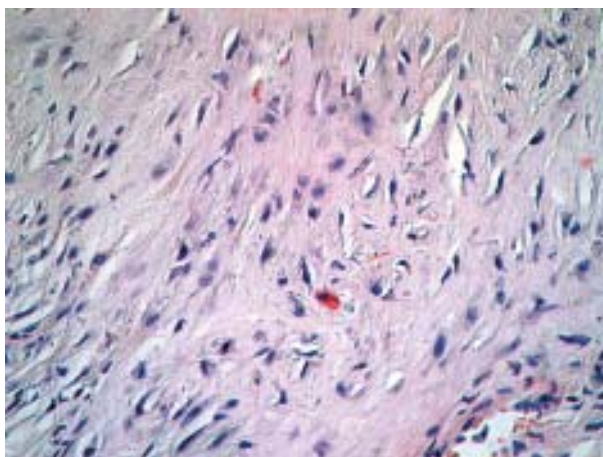


Фото 5. Контрольная группа. 14 суток после операции. Фибробласты и фиброциты в зоне формирующегося соединительнотканного рубца. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. 600.

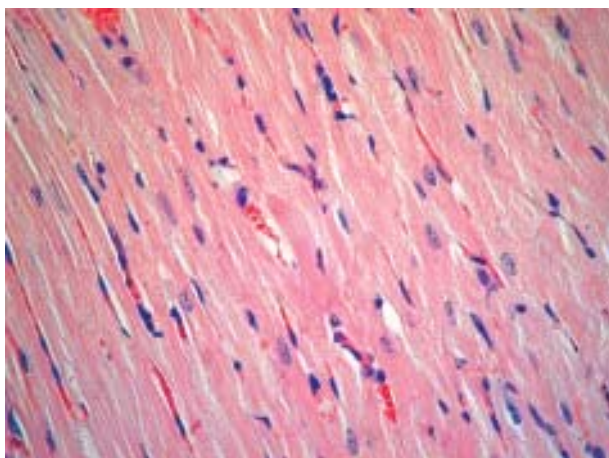


Фото 3. Контрольная группа. 7 суток после операции. Интактный миокард. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. 600.

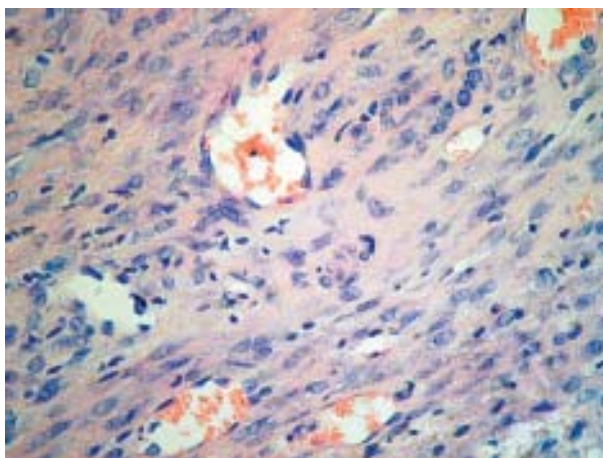


Фото 6. Группа FGF. 14 суток после операции. Большое количество фибробластов в зоне формирующегося соединительнотканного рубца. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. 600.