

ИЗМЕНЕНИЕ MORFOFUNKЦИОНАЛЬНЫХ ПАРАМЕТРОВ МИОКАРДА ПРИ МОДЕЛИРУЕМОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ПОД ВЛИЯНИЕМ ПЛАЗМИДНОГО ВЕКТОРА С ДНК ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ

Шуман Е.А., Коротков А.В.

Научный руководитель – д.м.н., профессор Makeев О.Г.

ГОУ ВПО «Уральская государственная медицинская академия Росздрава»

ГУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»

Сосудистые заболевания и, прежде всего, ишемическая болезнь сердца и кардиомиопатии, сопровождающиеся тяжелой сердечной недостаточностью, являются одной из главных причин смертности взрослого населения промышленно развитых стран [3]. Несмотря на достигнутые успехи в лечении этих заболеваний, значительная часть пациентов имеет абсолютные противопоказания для реваскуляризации с применением эндоваскулярной баллонной ангиопластики, стентирования или шунтирования [2].

Поэтому большие надежды связываются с разработкой методов терапевтической реваскуляризации посредством применения пептидных факторов роста, в частности факторов роста эндотелия сосудов (VEGF), фибробластов (FGF1-5) и ангиопоэтина (Ang). Еще более перспективным представляется разработка технологий генотерапии, предусматривающих прямое введение встроенных в векторную систему генов факторов роста сосудов в миокард, скелетные мышцы или непосредственно в сосудистую стенку [6, 8, 9, 13, 14].

Преимуществом таких технологий является то, что даже при невысокой эффективности трансфекции, наблюдается стабильная секреция трансфектированной клеткой фактора роста в течение времени, достаточного для формирования сосудистой сети, как на периферии, так и в очаге поражения [1, 4, 5, 6, 7, 17, 18].

В настоящее время большинство исследователей и клиницистов рассматривает трансфекцию, как самый многообещающий метод терапевтической реваскуляризации, выгодно отличающийся от инъекции пептидных факторов роста высокой избирательностью и безопасностью терапии при однократном введении в область поражения [15, 19].

Однако накопленные к настоящему времени факты, полученные в ходе доклинических и клинических исследований, характеризуются значительным разбросом регистрируемых эффектов [10,11, 12,16,19]. Поэтому для обеспечения доклинического этапа испытаний технологии терапевтической реваскуляризации чрезвычайно актуальным является оценить в эксперименте эффективность использования генных конструкторов.

Цель исследования

Оценить влияние внутримиекардиального введения генных конструкторов ангиогенного фактора роста эндотелиоцитов в условиях экспериментальной сердечной недостаточности.

Материалы и методы исследования

Эксперименты проводили на кроликах - самцах породы Шиншилла массой 2,8-3,2 кг и возрастом 1- 1,2 года. Животным после премедикации атропином 0,04 мг/кг, для предотвращения отека слизистой трахеи, под тиопенталовым наркозом (внутрибрюшинно, 40 мг/кг) в условиях искусственной вентиляции легких проводили левую стернотомию. С целью обеспечения неполной окклюзии передней нисходящей артерии сердца выполнялась перевязка ее проксимального сегмента на мандрене, сужающая просвет сосуда на 80%. Опытной группе животных (n=5) сразу после наложения лигатуры интрамиокардиально однократно вводили генный конструктор фактора роста эндотелиоцитов rhVEGF165 в концентрации 40 мкг/мл физиологического раствора, из расчета 50 мкг/см² зоны ишемии с шагом по площади зоны 5 мм. Для повышения эффективности трансфекции миокардиоцитов в готовый раствор добавляли оригинальную комбинацию 2-диметиламиноэтанола и меченого по тритию глюкозамина (Amersham Biosciences). Последний, благодаря участию в формировании хелатной оболочки плазмиды, по радиоактивности клеточных компартментов позволяет отслеживать результативность трансфекции миокардиоцитов и локализацию вектора в клетках. Контрольной группе животных вводился физиологический раствор, включающий в себя все компоненты кроме генного конструктора.

Генный конструктор фактора rhVEGF165 производства Sigma, синтезированный компанией по нашему заказу, представляет собой плазмидную ДНК с включением гена, состоящего из 165 кодонов, последовательность которого соответствует универсальной для человека и животных изоформе гена фактора роста эндотелиоцитов VEGF. В состав генного конструктора также входит участок цитомегаловирусного промоутера, регулирующего трансфекцию, гены-регуляторы, сайт полиаденирования и терминирующий кодон.

Уровень ангиогенеза оценивали на 30-е сутки после операции на микроскопических срезах миокарда, окрашенных гематоксилин-эозином, на основании определения числа капилляров, среднего диаметра капилляров (d), измеряемого с помощью окуляр-микрометра, расчета плотности (n) (кап/мм²), обменной поверхности капилляров (ОПК) и емкости капиллярного русла (ЕКП) на 1мм³ миокардиальной ткани. Изучение рО₂ в зоне повреждения на открытом сердце проводили полярографическим методом с использованием генерирующей пары медная амальгама - кадмий.

Радиоактивность фракций клеток ядер и цитоплазмы определяли после дифференциального центрифугирования разрушенных гомогенизацией кардиомиоцитов на жидкостном сцинтилляционном счетчике Бета 2 (эффективность счета по ³H - 56%).

Статистическая обработка проводилась с использованием пакета прикладных программ Statistica 3.04. Результаты считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Полученные данные продемонстрировали, что на 30-й день после окклюзии в зоне моделируемой ишемии у контрольных животных плотность сосудистых элементов значительно отличалась от соседних зон с исходно адекватным кровоснабжением, что свидетельствует об отсутствии существенной стимуляции неоангиогенеза в качестве компенсаторной реакции на снижение кровотока в условиях избранной модели повреждения.

В то же время в опытной группе было выявлено более плотное расположение капилляров, интенсивно анастомозирующих друг с другом и образующих переплетенную капиллярную сеть. В отдаленных от зоны вмешательства участках миокарда капилляры сохраняли прежнюю структуру - располагались параллельно друг к другу и имели правильный ход с ровными контурами.

При морфометрической оценке капиллярной системы зоны ишемии средний диаметр капилляров статистически не отличался в обеих группах животных (различия 4,4%, $p > 0,1$). В опытной группе с введением генного конструкта по сравнению с контрольной группой в зоне моделируемой ишемии отмечалось увеличение плотности функционирующих капилляров (на 14,1%, $p < 0,05$) и их обменной поверхности (на 25,4%, $p < 0,05$). Важным показателем функционирования новообразованного капиллярного русла явилось увеличение парциального давления кислорода в бассейне кровоснабжения частично перевязанной артерии с $18,0 \pm 4,8$ – в контроле до $52,1 \pm 11,3$ ($p < 0,05$) - после введения вектора VEGF165 (таб. 1).

Таблица 1

Морфометрические изменения микроциркуляторного русла миокарда в зоне моделируемой ишемии через 30 суток после неполной окклюзии передней нисходящей артерии (контрольная группа) и применения генного конструкта phVEGF165 (опытная группа)

Параметры микроциркуляторного русла миокарда	Контрольная группа Окклюзия	Опытная группа Окклюзия+phVEGF165
p (кап/мм ²)	$3,66 \pm 0,09$	$4,18 \pm 0,06^*$
d (мкм)	$6,5 \pm 0,3$	$6,8 \pm 1,1$
L (мм)	$2120 \pm 80,0$	$2600,0 \pm 76,0^*$
ОПК (мм ²)	$46,52 \pm 1,2$	$62,4 \pm 5,5^*$
pO_2 (mmHg)	$18,0 \pm 4,8$	$52,1 \pm 11,3^*$

* - отличия опытной группы от контрольной ($p \leq 0,05$).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что однократное интрамиокардиальное введение phVEGF165 в условиях моделируемой ишемии вызывает усиление неоангиогенеза в виде формирования новых капилляров, ответвляющихся от уже существующих, что свидетельствует об успешной трансфекции клеток миокарда плазмидной ДНК, экспрессии гена фактора роста эндотелиоцитов и продукции VEGF миокардиальными клетками в достаточном количестве для проявления его эффекта.

Раздельная радиометрия клеток, а также ядерной и цитоплазматической фракций биоптата миокарда в опытной группе показала, что основная часть внутриклеточной радиоактивности приходится на цитоплазму (95%), а не на ядерную фракцию (5%). Последнее указывает на эпигенетическое расположение вектора. Вместе с тем, внеядерная экспрессия введенного гена обеспечивает синтез VEGF в течение времени, необходимого для ангиогенеза. Тем самым, созданная модель позволяет оценивать эффективность терапевтического ангиогенеза, отрабатывать оптимальные режимы трансфекции генных конструктов *in vivo*, а также способов их введения.

Выводы

1. Генный конструкт на основе плазмидной ДНК, включающей участок цитомегаловирусного промотора, гены-регуляторы, сайт полиаденирования, терминирующий кодон и ген фактора роста эндотелиоцитов VEGF165 обладает способностью стимулировать ангиогенез.

2. Внеядерная локализация трансфицированного в миокардиоциты генного конструкта является достаточной для экспрессии гена VEGF165, образования фактора роста и проявления его ангиогенетического эффекта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Парфенова Е.В., Ткачук В.А. Перспективы генной терапии сердечно-сосудистых заболеваний // Вопросы медицинской химии. – 2000. - № 3. – с. 293-310.
2. Смолянинов А. Б., Арьев А. Л., Афанасьев Б. В., Кириллов Д. А., Кованько Г. Н. Современные методы в репаративной кардиологии: опыт применения клеточных технологий // Молекулярная медицина. – 2008. - № 1. – с. 7-14.
3. Шумаков В.И., Шевченко О.П., Орлова О.В., Онищенко Н.А., Гуреев С.В. Связь воспаления и апоптоза с эффективностью трансплантации клеток костного мозга больным с хронической сердечной недостаточностью // Вестник Российской АМН. – 2006. - № 11. – с. 14-21.

4. Baek S., March K.L. Angiogenesis by gene therapy: a new horizon for myocardial revascularization? //Circ. Res. – 1998. – vol. 82. – p. 295-305.
5. Baumgartner I., Pieczek A., Manor O., et al. Constitutive Expression of phVEGF165 After Intramuscular Gene Transfer Promotes Collateral Vessel Development in Patients With Critical Limb Ischemia Circulation //Diabet Med. – 1998. - vol. 97. – p. 1114-1123.
5. Baumgartner I. Therapeutic angiogenesis: theoretic problems using vascular endothelial growth factor //Curr. Cardiol. Rep. - 2000 Jan. - vol. 2(1). – p. 24-28
6. Dichek D.A., Anderson J., Kelly A.B., et al. Enhanced In Vivo Antithrombotic Effects of Endothelial Cells Expressing Recombinant Plasminogen Activators Transduced With Retroviral Vectors //Circulation. - 1996. – vol. 93. – p. 201-209.
7. Dunn P.F., Newman K.D., Jones M. et al. Seeding of Vascular Grafts With Genetically Modified Endothelial Cells : Secretion of Recombinant TPA Results in Decreased Seeded Cell Retention In Vitro and In Vivo //Circulation. – 1998. vol. 93. – p. 1439-1446.
8. Helisch A., Ware A. Myocardial regeneration induced by granulocyte-colony-stimulating factor //Thrombosis Haemostasis. – 1999. – vol. 82. – p. 772-780.
9. Kloner R.A., Dowl J., Chung G., et al. Intramyocardial Injection of DNA Encoding Vascular Endothelial Growth Factor in a Myocardial Infarction Model //Journal of Thrombosis and Thrombolysis -2004. - vol.10 (3) – p. 1004-1009.
10. Kolsut P, Malecki M, Zelazny P, et al. Gene therapy of coronary artery disease with phvegf165-early outcome. (Clinical Trial)//Kardiol Pol.- 2003. – vol. 59(11). – p. 373-384.
11. Leeuw K.d., Kusumanto Y., Smit A. J., et al. Hospers Skin capillary permeability in the diabetic foot with critical limb ischaemia: the effects of a phVEGF165 gene product //Diabet Med. – 2008. - vol. 10. – p. 1241-1244.
12. Lewis B.S., Flugelman M.Y., Weisz A. et al. Angiogenesis by gene therapy: a new horizon for myocardial revascularization? //Cardiovascular Res. – 1997. - vol. 35. – p. 480-489.
13. Melillo G., Scocianti M., Kovesdi I. et al. Gene therapy for collateral vessel development //Cardiovascular Res. – 1997. - vol. 35. – p. 490-497.
14. Sarkar N, Rück A, Källner G, Y-Hassan S, et al., Effects of intramyocardial injection of phVEGF-A165 as sole therapy in patients with refractory coronary artery disease-12-month follow-up: angiogenic gene therapy //J. Intern. Med. - 2001 Nov/ - vol. 250(5). – p. 373-381.
15. Schwarz E.R., Speakman M.T., Patterson M., et al. Evaluation of the effects of intramyocardial injection of DNA expressing vascular endothelial growth factor (VEGF) in a myocardial infarction model in the rat-angiogenesis and angioma formation //J. Am. Coll. Cardiol. - 2000 Apr. - vol. 35(5). – p. 1323-1330.
16. Takeshita S., Weir L., Chen D. et al. Evidence That Implicates the Parathyroid Hormone-Related Peptide in Vascular Stenosis Increased Gene Expression in the Intima of Injured Rat Carotid Arteries and Human Restenotic Coronary Lesions //Biochem. Biophys. Res. Commun. -1996. – vol. 227. – p. 628-635.
17. Van Belle T., Tio F.O., Chen D. et al. Myoblast-mediated gene transfer for therapeutic angiogenesis and arteriogenesis //J. Am. Cell. Cardiol. – 1997. – vol. 29. – p. 1371-1379.
18. Zhang D, Gai L, Fan R, Dong W, Wen Y . Efficacy and safety of therapeutic angiogenesis from direct myocardial administration of an adenoviral vector expressing vascular endothelial growth factor 165 //Chin. Med. J. (Engl). - 2002.- vol. 115(5). – p. 643-648.