

На правах рукописи

Великанова Елена Анатольевна

**ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ
СПОСОБОВ ДОСТАВКИ РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ
ПРИ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА
(экспериментальное исследование)**

14.03.03 – патологическая физиология

Автореферат

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Иркутск – 2014

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,
профессор

Лисаченко Геннадий Васильевич

Официальные оппоненты:

Лепехова Светлана Александровна – доктор биологических наук, ФГБУ «Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, научный отдел экспериментальной хирургии с виварием, заведующая

Корытов Леонид Иннокентьевич – доктор медицинских наук, профессор, ФГБУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра нормальной физиологии, профессор

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга», г. Томск

Защита состоится «29» января 2015 года в 2.00. часов на заседании диссертационного совета Д 001.038.02 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» по адресу: 664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» и на сайте <http://www.nzmedek.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2014 года

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Шолохов Леонид Федорович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Ишемическая болезнь сердца и ее осложнения, в частности инфаркт миокарда, занимают лидирующее положение среди причин смертности и инвалидизации населения развитых стран. Таким образом, актуальной остается проблема разработки новых и улучшения существующих методов лечения.

Среди новых подходов к лечению ишемических повреждений наиболее перспективным является терапевтический ангиогенез, который представляет собой тактику улучшения перфузии ишемизированной ткани за счет усиления естественных процессов неоваскуляризации (Chu H., 2012). В основе терапевтического ангиогенеза лежит воздействие на факторы-регуляторы образования кровеносных сосудов. В исследованиях наиболее часто используется сосуристо-эндотелиальный ростовой фактор (VEGF) как основной стимулятор неоваскулогенеза (Парфенова Е.В., 2007). Возможность использования VEGF для стимуляции ангиогенеза была показана ранее в многочисленных экспериментальных исследованиях на лабораторных животных. Введение ростовых факторов после моделированного инфаркта миокарда приводит к достоверному увеличению количества сосудов в миокарде, уменьшению зоны инфаркта, улучшению функции левого желудочка, стимуляции артериогенеза (Formiga F.R., 2010; Gao J., 2011). Однако клиническое применение VEGF ограничено низкой продолжительностью действия ростового фактора, что влечет за собой формирование незрелых и нестабильных кровеносных сосудов, а также возможные побочные действия. Потенциальные стратегии по решению этих проблем предполагают использование систем контролируемой доставки, которые позволяют осуществлять длительную ангиогенную стимуляцию для образования стабильных кровеносных сосудов (Chu H., 2012).

В качестве системы доставки для оптимизации терапевтического эффекта ростового фактора могут быть использованы липосомы. Потенциальная эффективность их использования обусловлена тем, что липосомы значительно изменяют фармакокинетику препарата, включенного в их состав. Они

защищают инкапсулированное лекарственное вещество от инактивации под действием физиологической среды, а также увеличивают его биодоступность (Elbayoumi T.A., 2010). 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.

Степень разработанности темы

На сегодняшний день в ходе многочисленных экспериментов показана потенциальная возможность применения VEGF для стимуляции неоваскуляризации ишемизированной ткани (Парфенова Е.В., 2007). Однако неудовлетворительные результаты клинических испытаний продемонстрировали, что в этой области остается много нерешенных вопросов. В частности, не определена оптимальная доза ростового фактора, слабо изучены пути доставки препарата к миокарду. Кроме того, дополнительные сложности создают возможные побочные действия ростового фактора и его нестабильность в кровотоке.

На сегодняшний день не разработана система доставки или оптимизация терапии VEGF, которая позволила бы решить указанные проблемы. В качестве такой системы доставки в настоящем исследовании предложено использовать липосомы. Липосомы на сегодняшний день применяются достаточно широко, однако область их использования сосредоточена преимущественно в сфере терапии онкологических заболеваний. В области лечения сердечно-сосудистых заболеваний липосомы представлены слабо, большинство исследований направлено на разработку препаратов для антиоксидантной защиты миокарда (Bowey K., 2012). Не существует разработок, в которых липосомы рассматривались бы как средство пролонгированной доставки ростовых факторов для стимуляции ангиогенеза в ишемизированной ткани.

Все вышеизложенное позволило сформулировать цель диссертационного исследования.

Цель исследования

Патогенетическое обоснование эффективности разных вариантов доставки сосудисто-эндотелиального ростового фактора при экспериментальном инфаркте миокарда.

Задачи исследования:

1. Изучить механизмы взаимодействия липосом с клетками и их цитопротективное действие в зависимости от концентрации включенного в их состав сосудисто-эндотелиального ростового фактора.
2. Определить оптимальный путь доставки липосомальной формы сосудисто-эндотелиального ростового фактора к ишемизированному миокарду.
3. Оценить выраженность ангиогенеза в тканях миокарда при использовании свободной и липосомальной форм сосудисто-эндотелиального ростового фактора в терапии экспериментального инфаркта миокарда.
4. Оценить степень повреждения миокарда и выраженность процессов репарации после интрамиокардиального введения свободной и липосомальной форм VEGF на фоне моделированного инфаркта миокарда.

Научная новизна

Проведена оценка органного распределения липосом в зависимости от пути введения препарата. Показано, что при интрамиокардиальном введении липосом, содержащих VEGF, они депонируются в межклеточном пространстве миокарда, обеспечивая пролонгированную доставку ростового фактора.

Изучена зависимость ангиогенного и антиишемического эффекта от количества VEGF в составе липосом. Липосомы, содержащие VEGF в концентрации 25 нг/мл, обладают ярко выраженным ангиогенным действием, а также уменьшают ишемическое повреждение миокарда и выраженность апоптоза. При введении липосом, содержащих VEGF в концентрации 5 нг/мл, требуемый терапевтический эффект не достигается.

Доказана возможность использования липосом, содержащих сосудисто-эндотелиальный ростовой фактор в концентрации 25 нг/мл, в терапии инфаркта миокарда в эксперименте. Показано, что липосомальная форма

доставки VEGF значительно увеличивает терапевтический (ангиогенный, противоишемический) эффект по сравнению со свободной формой ростового фактора.

Теоретическая и практическая значимость работы

На экспериментальной модели ишемизированного миокарда определена оптимальная лекарственная форма, концентрация и путь введения сосудисто-эндотелиального ростового фактора для оказания ангиогенного, антиишемического и кардиопротективного эффекта в отношении постинфарктного миокарда. Оптимальным является интрамиокардиальное введение липосом, содержащих VEGF в концентрации 25 нг/мл. Полученные результаты могут быть использованы в дальнейших исследованиях при разработке фармацевтических препаратов, обладающих ангиогенным и кардиопротективным эффектами.

Методология и методы исследования

Проведенное экспериментальное исследование включало в себя комплексную оценку препаратов сосудисто-эндотелиального ростового фактора в тестах *in vivo* и *in vitro* и базировалось на использовании цитологического, иммунофлуоресцентного, люминесцентного, иммуноферментного, гистологических методов исследования. Эксперименты *in vitro* проводились на культуре фибробластободобных клеток кожи и мезенхимальных стволовых клеток крыс. Эксперименты *in vivo* проводились на модели инфаркта миокарда у крыс субпопуляции Вистар.

Положения, выносимые на защиту:

1. Характер взаимодействия липосом с клетками зависит от количества включенного в их состав сосудисто-эндотелиального ростового фактора. Липосомы, содержащие сосудисто-эндотелиальный ростовой фактор в концентрации 25 нг/мл, преимущественно адсорбируются на мембране клеток и таким образом являются эффективной системой доставки препарата к тканям. Липосомы, содержащие сосудисто-эндотелиальный ростовой фактор, оказывают цитопротективное действие *in vitro*.

2. Интрамиокардиальное введение липосом диаметром 100 нм является оптимальным способом доставки сосудисто-эндотелиального ростового фактора к ишемизированному миокарду. При этом липосомы, содержащие сосудисто-эндотелиальный ростовой фактор в концентрации 25 нг/мл, образуют депо в межклеточном пространстве миокарда и таким образом обеспечивают пролонгированную доставку ростового фактора до 7 суток после инъекции.

3. Наиболее эффективным действием обладают липосомы, содержащие сосудисто-эндотелиальный ростовой фактор в концентрации 25 нг/мл. Интрамиокардиальное введение липосом, содержащих сосудисто-эндотелиальный ростовой фактор в концентрации 25 нг/мл, увеличивает плотность сосудистой сети, оказывает антиишемическое действие и уменьшает отек ткани, увеличивает количество жизнеспособных кардиомиоцитов.

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Достоверность полученных результатов подтверждается достаточным объемом наблюдений (80 крыс), широким спектром выполненных исследований, использованием современных методов. Анализ полученных результатов, статистическая обработка данных проведены в соответствии с принципами доказательной медицины.

Апробация материалов диссертации

Материалы диссертации доложены на Областном молодежном форуме «СТАРТ-2010» (Кемерово, 2010), Ежегодной научной сессии молодых ученых НИИ КПССЗ СО РАМН «Наука практике!» (Кемерово, 2011), Второй научной сессии молодых ученых Кузбасса «Наука – Практике» в НИИ КПССЗ СО РАМН (Кемерово, 2012), Инновационном конвенте «Кузбасс: образование, наука, инновации» (Кемерово, 2013), Межрегиональной научно-практической конференции молодых ученых и студентов «Проблемы медицины и биологии» (Кемерово, 2014), Международной конференции «Materials, Methods and Technologies» (Elenite, Bulgaria, 2014), Всероссийской конференции молодых ученых «Регенеративная медицина – медицина будущего» (Томск, 2014).

Публикации

По результатам диссертационного исследования опубликовано 10 работ в форме научных статей и тезисов в журналах, материалах научных съездов и конференций, в том числе 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК для публикации материалов диссертаций на соискание ученых степеней кандидата и доктора наук.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 112 страницах текста, содержит 5 таблиц и 14 рисунков. Указатель использованной литературы содержит 129 источников. Работа состоит из введения, обзора литературы, 3 глав результатов собственных исследований, заключения, выводов.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в планировании исследования, определении цели и задач, выборе необходимых методов для их решения. Анализ данных литературы по теме диссертации, проведение исследований (флуоресцентная микроскопия, иммуноферментный анализ, TUNEL), обработка и интерпретация полученных данных, написание диссертации выполнены лично автором.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Терапевтические агенты. В исследовании были использованы «пустые» липосомы, свободная форма VEGF в концентрации 5 нг/мл и 25 нг/мл и липосомы, содержащие VEGF в аналогичных концентрациях. Концентрации VEGF, применяемые в работе, были определены эмпирически с учетом литературных данных.

Подготовка клеточного материала. Тесты *in vitro* проводили на культуре фибробластоподобных клеток кожи крысы и мезенхимальных стволовых клеток крысы. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) выделяли из костного мозга бедренных и большеберцовых костей животных. Фибробластоподобные клетки получали из образцов кожи методом миграции. Все культуры выращивали в питательной среде DMEM (Gibco, США), содержащей HEPES буфер, эмбриональную телячью сыворотку, L-глутамин,

пенициллин, стрептомицин, амфотерицина В (Sigma Aldrich, США) при 37 °C и 5% CO₂ до получения конфлюэнтного слоя.

Оценка жизнеспособности клеток. Фибробластоподобные клетки кожи культивировали в присутствии липосом в нормальных условиях и в условиях депривации сыворотки. Уровень апоптоза и некроза в культурах определяли методом проточной цитофлуориметрии по окраске клеток аннексином V-PE и 7AAD с помощью Apoptosis detection Kit (Bekton Dickinson) согласно инструкции производителя. Оценивали процентное содержание живых клеток (Annexin V⁻7AAD⁻), уровень раннего апоптоза (Annexin V⁺7AAD⁻), позднего апоптоза (Annexin V⁺7AAD⁺) и некроза (Annexin V⁻7AAD⁺). Все образцы анализировали в дублях, вычисляли среднее значение.

Оценка взаимодействия в системе «липосома-клетка». МСК культивировали в течение 1, 2 и 4 часов с липосомами различного состава, несущими флуоресцентную метку PKH2. Затем клетки отмывали физиологическим раствором, анализировали с помощью инвертированного микроскопа AxioObserver. Регистрировали интенсивность флуоресцентного сигнала клеток.

Моделирование инфаркта миокарда. Исследование проводилось на самцах лабораторных крыс субпопуляции Вистар массой 300–350 г. Все работы с животными были одобрены этическим комитетом ФГБУ «НИИ КПССЗ» СО РАМН и соответствовали «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных», «Контролю за проведением работ с использованием экспериментальных животных» (Приказы № 742 и № 48 Министерства высшего и среднего специального образования СССР от 13.11.1984 г. и от 23.01.1985 г.) и «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (Страсбург, 18.03.1986).

Оценка особенностей органного распределения липосомальной формы VEGF на фоне инфаркта миокарда. Всем животным моделировали инфаркт миокарда. Через 3 суток флуоресцентно меченные липосомы размером 50 и 100 нм, содержащие VEGF, вводили в перинфарктную зону или в хвостовую вену. Через 3 суток извлекали сердце, легкие, печень, почку,

селезенку, головной мозг, изготавливали криостатные срезы, анализировали с помощью люминесцентного микроскопа AxioImager.A1.

Оценка эффективности применения свободной и липосомальной форм VEGF при инфаркте миокарда. На первом этапе исследования всем животным моделировали инфаркт миокарда путем лигирования коронарной артерии. Через 3 суток проводили повторную операцию с целью интрамиокардиальной инъекции терапевтических препаратов. В эксперименте участвовали следующие группы животных: 1 – Контроль; на 3 сутки после инфаркта миокарда проводили ложную повторную операцию. 2 – V5; интрамиокардиальное введение сосудисто-эндотелиального ростового фактора в концентрации 5 нг/мл (из расчета 7,7 нг/кг веса животного). 3 – V+Л5; интрамиокардиальное введение липосом, содержащих VEGF в концентрации 5 нг/мл (из расчета 7,7 нг/кг веса животного). Концентрация липосом в препарате составила 2,5 мг/мл в пересчете на липиды (3,85 мг/кг веса животного). 4 – V25; интрамиокардиальное введение сосудисто-эндотелиального ростового фактора в концентрации 25 нг/мл (из расчета 38,5 нг/кг веса животного). 5 – V+Л25; интрамиокардиальное введение липосом, содержащих VEGF в концентрации 25 нг/мл (из расчета 38,5 нг/кг веса животного). Концентрация липосом в препарате составила 2,5 мг/мл в пересчете на липиды (3,85 мг/кг веса животного).

Лекарственные препараты в объеме 0,5 мл вводили в периинфарктную зону посредством 3–4 инъекций. Животных выводили из эксперимента на 3-и, 7-е и 14-е сутки после повторной операции. Проводили забор крови. Извлекали сердце, разделяли на 2 части по продольной линии через зону инфаркта. Одну часть замораживали в жидком азоте, вторую фиксировали в формалине для гистологического исследования по стандартной методике.

Гистологическое исследование миокарда. Оценка морфологических изменений миокарда после введения препаратов VEGF выполнялась по гистологическим срезам после окраски гематоксилином-эозином и по Ван-Гизону по стандартной методике.

Оценка васкуляризации миокарда. Проводили иммунофлуоресцентное специфическое окрашивание на CD31. Для оценки васкуляризации миокарда

подсчитывали количество сосудов в поле зрения при увеличении в 200 раз, анализировали 10 случайно выбранных полей зрения.

Оценка экспрессии сосудисто-эндотелиального ростового фактора в миокарде. Проводили иммунофлуоресцентное специфическое окрашивание на VEGF. 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.

Анализ апоптоза кардиомиоцитов методом TUNEL. Исследование апоптоза кардиомиоцитов проводили путем постановки на криостатных срезах миокарда реакции TUNEL (метод TdT-опосредованной метки dUTP-конца разрыва цепи ДНК) с использованием стандартного набора реактивов Millipore (США). Дополнительно проводили окрашивание ядер клеток красителем DAPI. Анализировали препараты с помощью люминесцентного микроскопа «Axio Imager.A1» (Carl Zeiss, Германия). Для оценки выраженности апоптоза рассчитывали индекс апоптоза по формуле:

$$ИА = Na : N ,$$

где Na – количество TUNEL-позитивных клеток в поле зрения,

N – общее количество клеток в поле зрения.

Иммуноферментный анализ. В сыворотке крови определяли количественное содержание сосудисто-эндотелиального ростового фактора, белка, связывающего жирные кислоты (БСЖК), трансформирующего ростового фактора- b (TGF-b), фактора некроза опухоли-а (TNF-a), интерлейкина-1b (IL-1b) с помощью твердофазного иммуноферментного анализа.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку результатов эксперимента проводили с помощью пакета прикладных программ STATISTICA 6.0. Для оценки нормальности распределения данных использовали критерий Колмогорова–Смирнова. Указывали медиану и 25-й и 75-й процентиля (Me (25%; 75%)) для описания признаков с отличным от нормального распределением и среднее значение±стандартное отклонение для описания признаков с нормальным распределением. Для оценки межгрупповых

различий использовали критерии Манна–Уитни и Краскела–Уоллиса. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка взаимодействия клеток с липосомами различного состава.

Показано, что включение VEGF в состав липосом значительно изменяет характер их взаимодействия с клетками. При длительной инкубации «пустых» липосом с клетками наблюдалось значительное их поглощение и внутриклеточное накопление. При включении VEGF в состав липосом сохранялся эффект поглощения липосом, однако в большей степени наблюдалась их адгезия к клеточной мембране. При этом наблюдался дозависимый эффект: для липосом, содержащих VEGF в концентрации 25 нг/мл, более характерно прилипание к поверхности клеточной мембраны, однако также наблюдается незначительное поглощение или обмен липидами между липосомой и клеточной мембраной.

Протективный эффект липосом в условиях сывороточной депривации. В тестах *in vitro* было показано, что как «пустые» липосомы, так и липосомы с VEGF увеличивают выживаемость клеток в неблагоприятных условиях (таблица 1).

Таблица 1 – Показатели жизнеспособности культуры фибробластоподобных клеток при различных условиях культивирования, % (Me (25%; 75%))

Условия эксперимента	AnV ⁻ 7AAD ⁻ Живые клетки	AnV ⁺ 7AAD ⁻ Ранний апоптоз	AnV ⁺ 7AAD ⁺ Поздний апоптоз	AnV ⁻ 7AAD ⁺ Некроз
Контроль	92,70 (84,80;93,00)	2,40 (2,30;6,80)	3,65 (3,14;7,80)	1,20 (1,00;1,30)
Депривация сыворотки	40,25 (16,20;6,30)	48,00 (32,50;63,50)	9,05 (2,00;16,10)	2,70 (1,20;4,20)
Депривация сыворотки + «пустые» липосомы	66,30 (60,10;83,20)	27,20 (12,50;28,20)	4,90 (1,80;11,20)	1,60 (0,50;2,50)

Депривация сыворотки + липосомы с VEGF	53,10 (51,90;82,10)	19,70 (14,90;36,10)	9,60 (1,60;21,90)	2,40 (1,40;5,30)
---	------------------------	------------------------	----------------------	---------------------

Добавление «пустых» липосом к культуральной среде значительно увеличивало выживаемость клеток в условиях сывороточной депривации. Липосомы, содержащие VEGF, обладали несколько менее выраженным цитопротективным действием, предположительно, по причине меньшего их поглощения клетками. Таким образом, применение липосом является средством сохранения жизнеспособности ткани.

Сравнительная оценка способов доставки липосомальной формы VEGF. Проведен анализ органного распределения липосом разного размера, содержащих VEGF, после их местного и системного введения. Показано, что при любом способе введения значительная часть липосом накапливается в печени, селезенке, почках. Однако при интрамиокардиальном введении липосом размером 100 нм они также депонировались в межклеточном пространстве миокарда. По-видимому, это связано с особенностями их взаимодействия с клетками: липосомы относительно слабо поглощались близлежащими кардиомиоцитами и таким образом сохранялись в межклеточном пространстве миокарда на срок, по меньшей мере, до 3 суток после инъекции. Интересно, что данный эффект зависел от размера липосом: депонирование в миокарде наблюдалось при использовании липосом диаметром 100 нм, но не 50 нм. Очевидно, липосомы меньшего размера более интенсивно взаимодействуют с клетками, поэтому при введении в миокард в значительной степени поглощались кардиомиоцитами. Также было показано, что при введении липосом в системный кровоток вне зависимости от их размера не наблюдалось их накопления в миокарде.

Таким образом, интрамиокардиальное введение липосом размером 100 нм, содержащих VEGF, следует считать оптимальным путем доставки ростового фактора.

Оценка экспрессии VEGF в образцах миокарда крыс. Депонированные в миокарде липосомы постепенно разрушаются, и

заклученный в их внутренней фазе VEGF выходит в окружающие ткани. Таким образом обеспечивается пролонгированная доставка ростового фактора, которая способствует длительному повышению уровня VEGF в миокарде. Это подтверждается анализом экспрессии VEGF в миокарде, который показал, что при введении липосом, содержащих VEGF в концентрации 25 нг/мл, наблюдается повышение уровня ростового фактора на срок до 7 суток после инъекции (таблица 2).

Для сравнения: при введении свободной формы VEGF в аналогичной концентрации, и свободной и липосомальной форм VEGF в низкой концентрации (5нг/мл) отмечалось увеличение содержания VEGF в отдаленные сроки наблюдения (начиная с 7-х суток), что предположительно является следствием ишемии или воспаления. Необходимо отметить, что очень высокая экспрессия VEGF в позднем периоде наблюдения отмечалась в группе контроля, что говорит о высоком уровне ишемии миокарда.

Таблица 2 – Экспрессия VEGF в миокарде, усл. ед.

Группы	Сроки наблюдения		
	3-и сутки	7-е сутки	14-е сутки
Контроль	0,00 (0,00; 0,00) ****	107,50 (71,87;139,18) */****	15,73 (0,00;156,53) *
V5	26,35 (19,94; 31,64) ****/****	1,40 (0,00; 2,08) */****	0,00 (0,00; 0,00) */****
V+Л5	0,00 (0,00; 3,11) ****/****	6,87 (3,51; 9,22) */****/****	0,00 (0,00; 0,00) */****
V25	0,00 (0,00; 0,00) ****	15,68 (15,13; 17,50) */****	0,00 (0,00; 1,21) ****/****
V+Л25	19,10 (10,35; 22,71) ****	8,00 (7,06; 10,19) */****	0,00 (0,00; 0,12) */****

Примечания: * – $p < 0,05$ по сравнению с 3-ми сутками наблюдения;

** – $p < 0,05$ по сравнению с предыдущим сроком наблюдения;

*** – $p < 0,05$ по сравнению с группой контроля;

**** – $p < 0,05$ по сравнению с группой V+Л25;

***** – $p < 0,05$ по сравнению с предыдущей группой.

Таким образом, липосомы, содержащие VEGF в концентрации 25 нг/мл, являются эффективным способом доставки ростового фактора в

ишемизированный миокард, обеспечивающим пролонгированную доставку ростового фактора.

Анализ содержания VEGF в сыворотке крови крыс.

Для исключения возможного системного действия VEGF, введенного в миокард, оценивали содержание ростового фактора в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа (таблица 3).

По результатам анализа можно заключить, что во всех экспериментальных группах на разных сроках наблюдения отмечалось умеренное увеличение содержания VEGF в сыворотке крови, которое значимо не превышало максимальные его значения у контрольных животных. Таким образом, введение в миокард ростового фактора не приводит к дополнительному увеличению его уровня в сыворотке крови выше физиологических значений в условиях инфаркта миокарда. Следовательно, нет оснований предполагать проявление негативного системного действия VEGF.

Таблица 3 – Содержание VEGF в сыворотке крови крыс (пг/мл)

Группа	Сроки наблюдения		
	3-и сутки	7-е сутки	14-е сутки
Контроль	0,00 (0,00;0,00)	0,00 (0,00;0,00)	2,70 (1,35; 8,31)
V5	3,87 (1,36; 12,00)	0,00 (0,00; 4,68)	0,00 (0,00; 14,19)
V+I5	7,40 (3,53; 9,27)	0,00 (0,00;0,00)*	0,00 (0,00;0,00)*/**
V25	0,00 (0,00; 4,68)	5,46 (3,42; 6,76)**/**	0,00 (0,00;0,00)
V+I25	0,00 (0,00; 0,58)	6,33 (1,66; 11,00)	0,00 (0,00; 2,04)

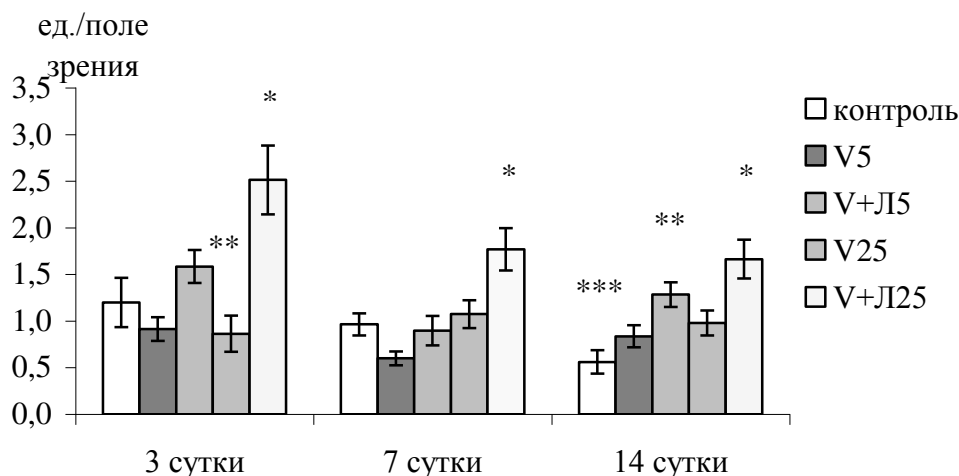
Примечания: * – $p < 0,05$ по сравнению с 3-ми сутками наблюдения;

** – $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой;

*** – $p < 0,05$ по сравнению с предыдущей группой

Васкуляризация миокарда после введения препаратов VEGF.

Следствием длительного увеличения содержания VEGF является стимуляция процесса ангиогенеза. По результатам наших исследований было показано, что интрамиокардиальное введение липосом, содержащих VEGF в концентрации 25 нг/мл, вызывает значимое увеличение сосудистой плотности уже на 3-и сутки (в 2,2 раза по сравнению с контрольной группой, $p < 0,05$) (рисунок 1). Подобный результат мы не наблюдали при введении свободной формы VEGF в аналогичной концентрации и при использовании более низкой дозы VEGF. Таким образом, интрамиокардиальное введение липосом, содержащих VEGF в концентрации 25 нг/мл, в сочетании с естественным повышением уровня VEGF после инфаркта, обеспечивает значительную активацию процесса образования сосудов и, следовательно, является эффективным средством улучшения кровоснабжения ишемизированной ткани.



* – $p < 0,05$ по сравнению со всеми группами

** – $p < 0,05$ по сравнению с группой контроля

*** – $p < 0,05$ по сравнению с первыми сутками наблюдения

Рисунок 1 – Количество сосудов в миокарде, ед./поле зрения

Оценка степени повреждения миокарда после интрамиокардиального введения препаратов VEGF на фоне инфаркта миокарда. При сравнении результатов динамики содержания БСЖК и выраженности апоптоза в миокарде очевидно, что повышение уровня БСЖК не всегда сопровождается увеличением количества нежизнеспособных клеток. Поскольку молекулы БСЖК могут проходить через мембрану живых клеток,

находящихся в условиях ишемии [№ 47], увеличение БСЖК следует рассматривать как маркер неблагоприятного состояния миокарда, и прогностический маркер ухудшения ситуации, даже в тех случаях, когда он не сопровождается увеличением уровня апоптоза. С этой точки зрения, неэффективным является применение липосомальной формы VEGF в низкой концентрации, которое сопровождается повышенным уровнем БСЖК в течение всего периода наблюдения (рисунок 2). На последних сроках наблюдения также увеличивается содержание клеток в состоянии апоптоза (таблица 4), а по результатам гистологического анализа наблюдаются признаки ишемии (рисунок 3), что в общем говорит о неблагоприятном течении постинфарктной репарации миокарда.

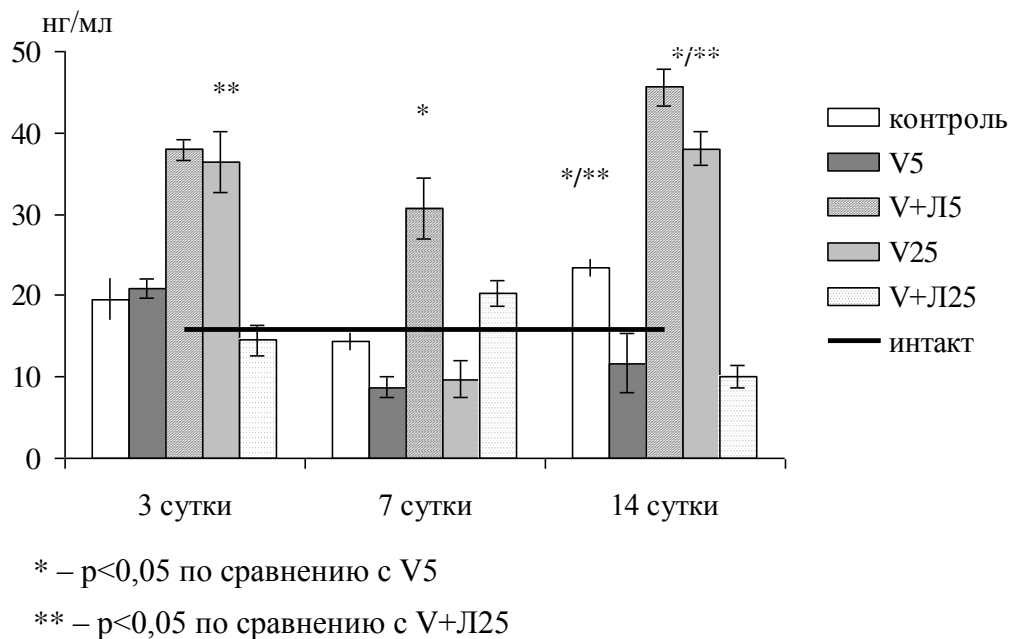


Рисунок 2 – Содержание белка, связывающего жирные кислоты, в сыворотке крови крыс, нг/мл

Введение свободного VEGF в концентрации 25 нг/мл оказывает повреждающее действие на миокард, о чем свидетельствует повышение уровней апоптоза и БСЖК на раннем этапе наблюдения. При этом на отдаленном этапе наблюдения, так же как и в контрольной группе, наблюдалось повышение уровня БСЖК, что говорит также о неэффективности противоишемического действия ростового фактора в данной концентрации.

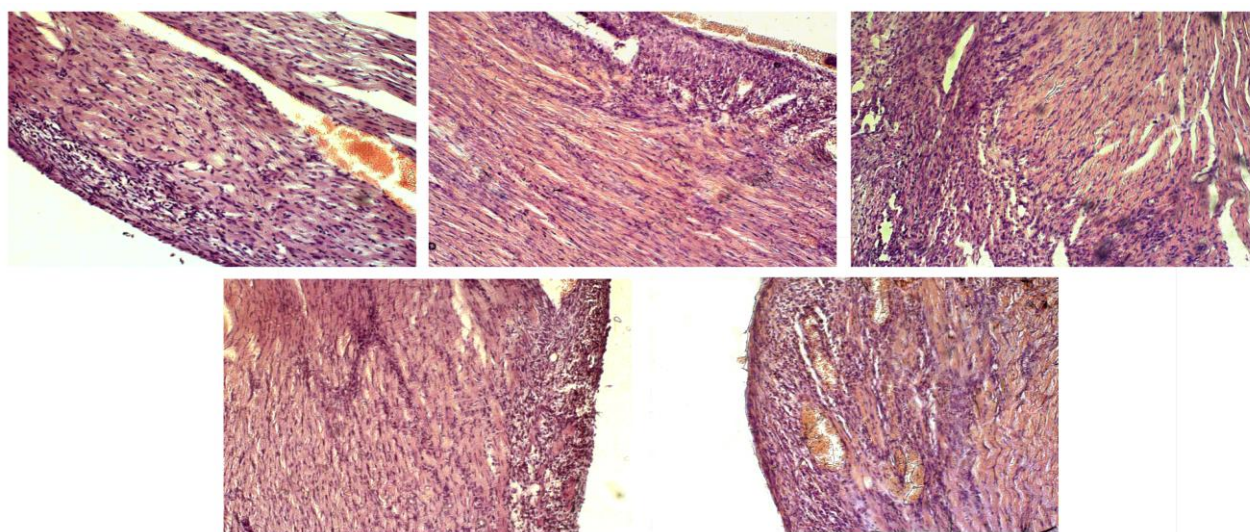
Таблица 4 – Индекс апоптоза кардиомиоцитов сердца крысы (отношение числа TUNEL-позитивных ядер к общему количеству ядер)

Группа	Сроки наблюдения		
	3-и сутки	7-е сутки	14-е сутки
Контроль	0,00	0,35±0,11**	0,27±0,10**
V5	0,00	0,04±0,02*	0,06±0,04*
V+Л5	0,02±0,01	0,00*	0,15±0,06
V25	0,24±0,11*	0,29±0,12	0,11±0,85
V+Л25	0,12±0,06	0,00*	0,05±0,04*
Интактные животные	0,00		

Примечания: * – $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой;

** – $p < 0,05$ по сравнению с 3-ми сутками наблюдения

Наиболее благоприятные результаты были получены в результате применения свободного VEGF в концентрации 5 нг/мл и липосомальной формы VEGF в высокой концентрации. На протяжении всего периода наблюдения отмечалось умеренное повышение уровня апоптоза и содержания БСЖК. При этом в случае липосомальной формы наблюдалось выраженное снижение уровня этих показателей по сравнению со свободной формой ростового фактора в аналогичной концентрации. Таким образом, применение липосомальной формы доставки уменьшает проявление токсичности включенного в ее состав препарата.



А – контроль;

Б – V5;

В – V+Л15;

Д – V+Л25

Г – V25;

Рисунок 3 – Гистологическая картина миокарда на 3-и сутки после повторной операции в пограничной зоне инфаркта. Окраска гематоксилин-эозином, ув. x200

В отдаленный период наблюдения отмечалось снижение показателей апоптоза и БСЖК в группах с введением V5 и V+Л25 по сравнению с остальными экспериментальными группами и группой контроля. Также в них не отмечалось признаков ишемии. Таким образом, по итогам 14 суток наблюдения, в этих группах наблюдается более успешное течение процессов репарации миокарда после инфаркта.

Содержание некоторых про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови крыс. При анализе уровня про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови было отмечено, что введение низких концентраций VEGF сопровождается повышенной секрецией TGF- β по сравнению с группой контроля. Введение V25 приводит к ингибированию TGF- β на ранних этапах наблюдения. Использование липосомальной формы VEGF в той же концентрации обеспечивает поступление в миокард VEGF в течение более длительного промежутка времени, и, таким образом, приводит к более длительному ингибирующему эффекту в отношении TGF- β .

Не было получено данных о влиянии введения VEGF на содержание в сыворотке крови интерлейкина-1 β и трансформирующего фактора роста-1b.

Заключение

Полученные в ходе данного исследования результаты демонстрируют, что интрамиокардиальное введение липосом, содержащих VEGF в концентрации 25 нг/мл, позволяет создать депо препарата в миокарде, обеспечивающее пролонгированную доставку VEGF. Показано, что липосомы, содержащие VEGF в концентрации 25 нг/мл, обладает ярко выраженным ангиогенным действием, а также уменьшает ишемическое повреждение миокарда и выраженность апоптоза. Доказан дозозависимый эффект VEGF в

составе липосом; показано, что большей эффективностью обладают липосомы, содержащие VEGF в концентрации 25 нг/мл. Свободная форма VEGF в концентрации 25 нг/мл не обладает эффективностью в отношении стимуляции ангиогенеза, однако оказывает повреждающее действие на миокард. Применение липосомальной формы VEGF той же концентрации позволяет значительно увеличить его эффективность и при этом уменьшить токсическое действие. Полученные результаты позволили сформулировать гипотезу о механизме действия липосомальной формы VEGF на миокард в условиях экспериментального инфаркта (рисунок 4).

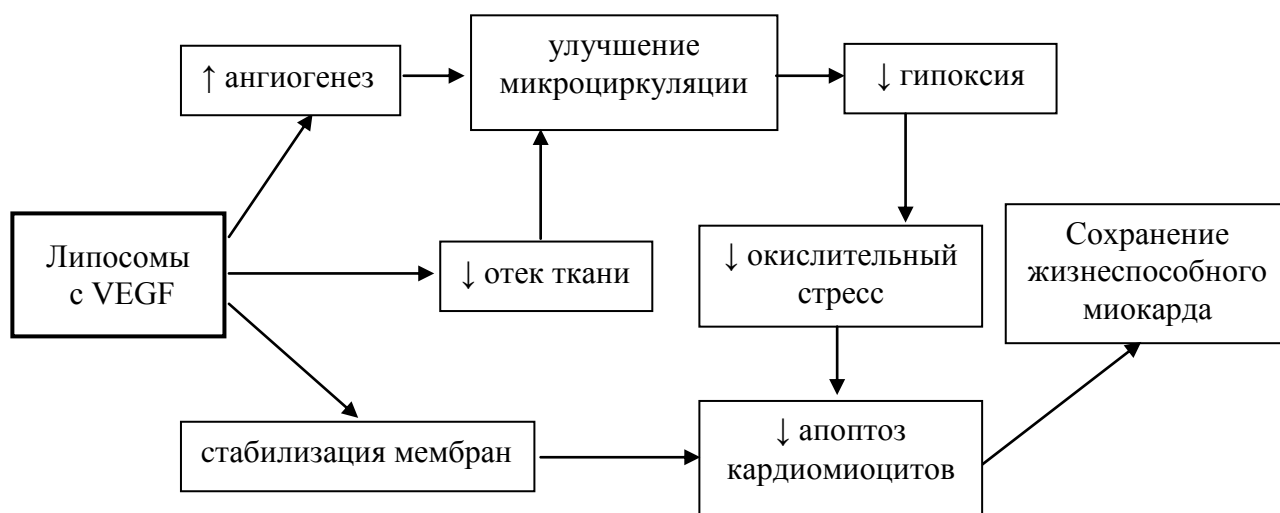


Рисунок 4 – Схема механизма кардиопротективного действия липосомальной формы VEGF на постинфарктный миокард

ВЫВОДЫ

1. «Пустые» липосомы активно поглощаются клетками; при увеличении содержания VEGF липосомы в большей степени агрегируются на клеточной мембране. Как «пустые», так и липосомы с VEGF оказывают цитопротективный эффект в отношении клеток, находящихся в неблагоприятных условиях культивирования.

2. Интрамиокардиальная инъекция является оптимальным путем доставки липосом к миокарду, при этом накопление липосом в тканях миокарда максимально, а в отдаленных органах минимально. При интрамиокардиальном введении липосом, содержащих VEGF в концентрации 25 нг/мл, создается депо в межклеточном пространстве миокарда, обеспечивая пролонгированный выход ростового фактора в окружающие ткани.

3. Липосомы являются эффективным средством доставки VEGF к миокарду и обеспечивают повышение уровня VEGF в миокарде на срок до 7 суток после инъекции, что приводит к стимулированию ангиогенеза и увеличению плотности сосудистой сети в постинфарктном миокарде.

4. Интрамиокардиальное введение липосом, содержащих VEGF в концентрации 25 нг/мл, уменьшает степень повреждения миокарда после инфаркта. Это выражается в увеличении количества жизнеспособных кардиомиоцитов, снижении показателей ишемии миокарда (уровень БСЖК, полнокровие сосудов); уменьшении отека ткани.

ПЕРЕЧЕНЬ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в журналах, рекомендованных ВАК

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 (0,42 п.л.).

2. Влияние сосудисто-эндотелиального ростового фактора в свободной и липосомальной форме на ангиогенез в условиях экспериментального инфаркта миокарда / Е. А. Великанова, А. С. Головкин, Р. А. Мухамадияров // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 10 (3). – С. 482–486 (0,42 п.л.).

Публикации в других журналах

3. Evaluation of intracellular distribution of liposomes using the methods of fluorescence and confocal microscopy / R. A. Mukhamadiyrov, E. A. Velikanova,

I.G. Khaliulin et al. // Journal of International Scientific Publications: Materials, Methods & Technologies. – 2013. – № 7 (2). – P. 234–244 (0,83 п.л.).

4. Methodological approaches to evaluation of intracellular distribution of lipid and aqueous phase of liposomes using fluorescent probes / R. A. Mukhamadiyarov, I. G. Khaliulin, E. A. Velikanova et al. // Journal of International Scientific Publications: Materials, Methods and Technologies. – 2014. – Vol. 8. – P. 218–227 (0,83 п.л.).

Материалы конференций

5. Тихонова, А.С. Внутриклеточная доставка гидрофильных и гидрофобных веществ в составе липосом / А. С. Тихонова, М. А. Паутова, Е. А. Великанова // «Студент и научно-технический прогресс»: материалы 51-й международной научной студенческой конференции – Кемерово, 2014. – С. 211 (0,08 п.л.)

6. Цитопротективный эффект везикулярных наноструктур / Е. А. Великанова, В. Г. Матвеева, Л. В. Антонова и др. // «Кузбасс: образование, наука, инновации»: сборник трудов инновационного конвента. – Кемерово, 2011. – Т. 2. – С. 26–28 (0,25 п.л.)

7. Мухамадияров, Р. А. Визуализация липосом с использованием люминесцентной метки для изучения их распределения во внутренних органах / Р. А. Мухамадияров, Е. А. Великанова, М. А. Круч // «Современные наукоемкие технологии»: материалы конференции. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2012. – № 4. – С. 29–30. (0,16 п.л.)

8. Применение липосомальной формы VEGF для регуляции ангиогенеза при экспериментальном инфаркте миокарда крыс / Е. А. Великанова, А. С. Головкин, Р. А. Мухамадияров и др. // «Кузбасс: образование, наука, инновации»: сборник тезисов инновационного конвента – Кемерово, 2013. – С. 247 (0,08 п.л.)

9. Эффективность липосомальной формы доставки VEGF при инфаркте миокарда / Е. А. Великанова, А. С. Головкин, Р. А. Мухамадияров и др. // «Проблемы медицины и биологии»: материалы межрегиональной научно-практической конференции молодых ученых и студентов. – Кемерово, 2014. – С. 199 (0,08 п.л.)

10. Эффективность применения липосомальной формы VEGF в терапии экспериментального инфаркта миокарда / Е. А. Великанова, А. С. Головкин, Р. А. Мухамадияров и др. // Материалы всероссийской конференции молодых ученых «Регенеративная медицина – медицина будущего». – Томск, 2014. – С. 6–10 (0,33 п.л.)

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

VEGF – сосудисто-эндотелиальный ростовой фактор

МСК – мезенхимальные стволовые клетки

TUNEL – метод TdT-опосредованной метки dUTP-конца разрыва цепи ДНК

БСЖК – белок, связывающий жирные кислоты

TGF- β – трансформирующий ростовой фактор

TNF- α – фактор некроза опухоли

IL-1 β – интерлейкин-1 β