

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт
комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»**

На правах рукописи

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

14.03.03 – патологическая физиология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Лисаченко Геннадий Васильевич

Кемерово – 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1 Репарация миокарда после инфаркта.....	10
1.2 Ангиогенез и его роль в восстановлении постинфарктного миокарда	14
1.2.1 Васкулогенез, ангиогенез. Артериогенез.....	14
1.2.2. Регуляция ангиогенеза	17
1.2.3 Терапевтический ангиогенез	21
1.3. Липосомы как средство доставки биологически активных веществ.....	24
1.3.1. Общая характеристика липосомальных препаратов.....	24
1.3.2. Перспективы и преимущества применения липосомальных форм препаратов.....	26
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	30
2.1. Терапевтические агенты, используемые в работе	30
2.2. Проведение экспериментов <i>in vitro</i>	32
2.2.1. Подготовка клеточного материала	32
2.2.2. Оценка жизнеспособности клеток после культивирования с липосомами в неблагоприятных условиях	33
2.2.3. Оценка взаимодействия культуры клеток с липосомами различного типа	34
2.3. Проведение экспериментов <i>in vivo</i>	35
2.3.1. Моделирование инфаркта миокарда.....	35
2.3.2. Группы исследования и схема эксперимента.	36
2.3.3. Оценка органного распределения липосом	37
2.3.4. Гистологическое исследование миокарда.....	37
2.3.5. Оценка васкуляризации миокарда	38
2.3.6. Оценка экспрессии сосудисто-эндотелиального ростового фактора в миокарде	38
2.3.7. Анализ апоптоза кардиомиоцитов методом TUNEL	39
2.3.8. Иммуноферментный анализ	40

2.4. Статистическая обработка результатов	42
ГЛАВА 3. ОЦЕНКА IN VITRO ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ	43
3.1. Оценка взаимодействия клеток с липосомами различного состава	43
3.2. Протективный эффект липосом в условиях сывороточной депривации	47
ГЛАВА 4. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА СПОСОБОВ ДОСТАВКИ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ VEGF	51
ГЛАВА 5. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПОСЛЕ ИНФАРКТА МИОКАРДА	57
5.1. Оценка экспрессии VEGF в образцах миокарда крыс	57
5.2. Анализ содержания VEGF в сыворотке крови крыс	60
5.3. Васкуляризация миокарда после введения препаратов VEGF	63
5.4. Оценка содержания белка, связывающего жирные кислоты, в сыворотке крови крыс	67
5.5. Гистологическая оценка морфологических изменений миокарда крыс после введения VEGF	70
5.6. Оценка выраженности апоптоза в миокарде крыс после введения VEGF	74
5.7. Содержание некоторых про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови крыс	81
5.7.1. Оценка содержания TGF- β в сыворотке крови крыс	82
5.7.2. Оценка содержания IL-1 в сыворотке крови крыс	86
5.7.3. Оценка содержания TNF- α в сыворотке крови крыс	89
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	91
ВЫВОДЫ	96
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ	97
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	98

ВВЕДЕНИЕ

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 [43]. В основе терапевтического ангиогенеза лежит воздействие на факторы-регуляторы образования кровеносных сосудов. В исследованиях наиболее часто используется сосудисто-эндотелиальный ростовой фактор (VEGF) как основной стимулятор неоваскулогенеза [11]. 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 ангиогенеза [26, 111]. Однако клиническое применение VEGF ограничено низкой продолжительностью действия ростового фактора, которая влечет за собой формирование незрелых и нестабильных кровеносных сосудов, а также возможными побочными действиями. Потенциальные стратегии по решению этих проблем предполагают использование систем контролируемой доставки, которые позволяют осуществлять длительную ангиогенную стимуляцию для образования стабильных кровеносных сосудов [111].

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 инкапсу-

лированное лекарственное вещество от инактивации под действием физиологической среды, а также увеличивают его биодоступность [53]. 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 [11]. 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, при этом большинство исследований направлено на разработку препаратов для антиоксидантной защиты миокарда [35]. 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 с клетками липосом и их цитопро-теktivное действие в зависимости от концентрации включенного в их состав со-судисто-эндотелиального ростового фактора
2. Определить оптимальный путь доставки липосомальной формы сосуди-сто-эндотелиального ростового фактора к ишемизированному миокарду.
3. Оценить выраженность ангиогенеза в тканях миокарда при использо-вании свободной и липосомальной форм сосудисто-эндотелиального ростового фактора в терапии экспериментального инфаркта миокарда.
4. Оценить степень повреждения миокарда и выраженность процессов репа-рации после интрамиокардиального введения свободной и липосомальной форм сосудисто-эндотелиального ростового фактора на фоне моделированного инфарк-та 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 VEGF.

Изучена зависимость ангиогенного и антиишемического эффекта от коли-чества VEGF в составе липосом. Липосомы, содержащие 12,5 нг VEGF, обладают ярко выраженным ангиогенным действием, а также уменьшают ишемическое по-вреждение миокарда и выраженность апоптоза. При уменьшении количества VEGF до 2,5 нг требуемый терапевтический эффект не достигается.

Доказана возможность использования липосомальной формы сосудисто-эндотелиального ростового фактора в количестве 12,5 нг 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.

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 12,5 нг VEGF. Полученные результаты могут быть использованы в дальнейших исследованиях при разработке фармацевтических препаратов, обладающих ангиогенным и кардиопротективным эффектами.

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 количестве 12,5 нг, 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 12,5 нг сосудисто-эндотелиальный ростовой фактор, образуют депо в межклеточном пространстве миокарда и таким образом обеспечивают пролонгированную доставку ростового фактора до 7 суток после инъекции.

3. Оптимальной дозой эффективного действия липосомальной формы сосудисто-эндотелиального ростового фактора является 12,5 нг. Интрамиокардиальное введение липосом, содержащих 12,5 нг сосудисто-эндотелиального ростового фактора, увеличивает плотность сосудистой сети, оказывает антиишемическое действие и уменьшает отек ткани, увеличивает количество жизнеспособных кардиомиоцитов.

Апробация материалов диссертации

Материалы диссертации доложены на:

1. Областном молодежном форуме «СТАРТ-2010», 17.11.2010, г. Кемерово
2. Ежегодной научной сессии молодых ученых НИИ КПССЗ СО РАМН «Наука практике!» (9.06.11., г. Кемерово)
3. Второй научной сессии молодых ученых Кузбасса «Наука-Практике» в НИИ КПССЗ СО РАМН (08.06.2012 г., г. Кемерово)
4. Инновационном конвенте «КУЗБАСС: ОБРАЗОВАНИЕ, НАУКА, ИННОВАЦИИ», 5-6.12.2013, г. Кемерово
5. Межрегиональной научно-практической конференции молодых ученых и студентов «Проблемы медицины и биологии», 17-18 апреля 2014г., г. Кемерово
6. Международной конференции «Materials, Methods and Technologies», 11-15 June 2014, Elenite, Bulgaria
7. Всероссийской конференции молодых ученых «Регенеративная медицина – медицина будущего», 24-25 сентября 2014, г. Томск

Публикации

По результатам диссертационного исследования опубликовано 10 работ в форме научных статей и тезисов в журналах, материалах научных съездов и конференций (из них 2 статьи в журналах, рецензируемых ВАК).

Объем и структура диссертации

Работа состоит из введения, обзора литературы, 3 глав результатов собственных исследований, заключения, выводов. Диссертация изложена на 112 страницах текста, содержит 5 таблиц и 14 рисунков. Указатель использованной литературы содержит 128 источников.

Анализ данных литературы по теме диссертации, исследования (люминесцентная микроскопия, иммунофлуоресцентная микроскопия, иммуноферментный анализ, TUNEL), оценка и статистическая обработка результатов, написание диссертации выполнены лично автором. Липосомальные препараты, используемые в работе, предоставлены к.б.н. Мухамадияровым Р.А.; гистологические исследования выполнены к.м.н. А.Ю. Бураго, эксперименты на лабораторных животных проведены совместно с д.м.н. Головкиным А.С., к.б.н. Тороповой Я.Г.

Автор выражает искреннюю признательность научному руководителю работы д.м.н. Лисаченко Г.В., заведующему отделом экспериментальной и клинической кардиологии д.м.н. Головкину А.С., а также к.б.н. Я.Г.Тороповой и сотрудникам лаборатории клеточных технологий ФГБУ НИИ КПССЗ СО РАМН: к.м.н. В.Г.Матвеевой, к.м.н. Л.В. Антоновой за неоценимый вклад в работу и помощь в подготовке диссертации.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Репарация миокарда после инфаркта

Как известно, инфаркт миокарда вызывает заметные изменения сердечной структуры, наиболее явным из которых является рубцевание инфаркта [115]. Постинфарктные изменения принято объединять под названием «ремоделирование», которое представляет собой совокупность структурных и геометрических изменений сердца. Степень ремоделирования сердца считается основным фактором, определяющим развитие сердечной недостаточности [83]. Ремоделирование ассоциировано с воспалительной реакцией и последующим образованием рубца на месте инфаркта [110]. Структурные изменения после инфаркта распространяются также на жизнеспособный миокард и включают гипертрофию кардиомиоцитов, рост капиллярной сети и увеличение интерстициального коллагена.

После инфаркта миокарда активируются как краткосрочные, так и долгосрочные компенсационные механизмы. Хотя их активация необходима в ранние сроки после инфаркта, они могут оказывать неблагоприятное воздействие, если продолжаются более длительное время [115]. Замещение погибших кардиомиоцитов фиброзной тканью является необходимым этапом репарации миокарда, поскольку способствует сохранению его структурной целостности. Однако реконструкция жизнеспособного миокарда может иметь негативные последствия в отношении сердечной функции [110].

Нарушение функции сердца после инфаркта связано с двумя основными проблемами: массивная потеря кардиомиоцитов, составляющих основу сократительной функции, и вследствие этого изменения структуры ткани в результате формирования рубцовой ткани [115]. Очевидно, что сердечная функция и структура неразрывно связаны между собой, поэтому вмешательство в постинфарктную репарацию миокарда, несомненно, влияет на функцию сердца [87]. Вы-

раженность повреждения тканей и гибели кардиомиоцитов, вызванных ишемией, зависит от нескольких факторов: исходного размера инфаркта, длительности ишемии, эффективности реперфузии [44].

В целом репарация миокарда представляет собой совокупность связанных между собой некротических и восстановительных процессов и разделяется на несколько фаз.

На первом этапе происходит гибель кардиомиоцитов. Гибель клеток является ключевым звеном в ремоделировании миокарда, поскольку приводит к потере сократительного материала, вследствие чего развивается компенсаторная гипертрофия кардиомиоцитов и фиброз ткани [12]. Поскольку сердце млекопитающих не может производить достаточно энергии в анаэробных условиях для протекания необходимых клеточных процессов, постоянный приток кислорода необходим для поддержания жизнеспособности сердца и его нормального функционирования. Ишемия приводит к уменьшению кислорода в клетке и последующему снижению окислительного фосфорилирования и генерации АТФ. Истощение АТФ приводит к выходу из строя натрий-калиевого насоса, потере калия, притоку натрия и воды и оттоку клетки. Необратимое повреждение кардиомиоцитов развивается после 20-40 мин ишемии [48] и сопровождается выбросом в кровь белка, связывающего жирные кислоты (БСЖК), тропонина Т и креатинкиназы, сыворотки глутаминовой щавелевоуксусной трансаминазы (SGOT), что используется в качестве раннего маркера гибели кардиомиоцитов.

Гибель кардиомиоцитов в результате окклюзии коронарной артерии реализуется через апоптоз и некроз [115]. Пик апоптоза кардиомиоцитов наблюдается через 6-8 ч после инфаркта (у человека и крысы). По-видимому, апоптоз является основным источником потерь миоцитов после инфаркта [63].

Большинство апоптотических клеток после инфаркта не фагоцитируются соседними клетками, и в течение 12ч – 4 дней после инфаркта развивается вторичный некроз [63]. При некрозе кардиомиоцитов высвобождается их внутриклеточное содержимое, что инициирует интенсивную воспалительную реакцию и активизирует врожденные иммунные механизмы [61]. Следствием этого является

следующая фаза репарации миокарда – развитие раннего воспалительного ответа. Одной из его особенностей является активация системы комплемента, и секреция цитокинов, таких как интерлейкин 6 и интерлейкин 8, которая у человека инициируется в течение 12-16 ч после начала ишемии.

Также этот процесс сопровождается активацией матриксных металлопротеиназ (ММП), которые разрушают внеклеточный матрикс. Их протеолитическая активность снижается к концу 1-й недели инфаркта, на фоне повышения экспрессии TIMP (тканевых ингибиторов ММП) [110].

Вскоре после инфаркта в зону повреждения мигрируют нейтрофильные гранулоциты, которые удаляют погибшие кардиомиоциты [115]. Инфильтрация гранулоцитов сопровождается притоком других воспалительных клеток, таких как макрофаги, которые также вносят вклад в протеолитическое расщепление и фагоцитоз некротизированной ткани [110]. Макрофаги являются важным источником местной продукции цитокинов и факторов роста, например TGF- β , который необходим для перехода процесса репарации от фазы воспаления к фиброзу [83]. Пик воспалительного процесса наблюдается в течение 1-2 недели после инфаркта, затем воспалительные клетки удаляются из инфарктной зоны посредством апоптоза [110].

Через 2-3 дня после инфаркта начинают откладываться белки внеклеточного матрикса, сначала в периинфарктной зоне, затем в центральной области инфаркта. Это означает начало формирования грануляционной ткани. В первую очередь откладывается фибрин, затем следует осаждение других белков внеклеточного матрикса, таких как фибронектин. В течение нескольких дней после инфаркта в зоне повреждения скапливаются миофибробласты, которые синтезируют коллаген. Коллагеновые волокна начинают определяться в 1 неделю после инфаркта, затем проявляется их сборка и формирование рубцовой ткани, которая продолжается до 8 недель.

Грануляционная ткань характеризуется высокой васкуляризованностью. В течение нескольких дней после инфаркта в зоне повреждения начинают появляться новые кровеносные сосуды. Они образуются из предсуществующих сосу-

дов или из эндотелиальных клеток, которые мигрируют из пограничной зоны [110]. Формирование новых сосудов потенциально способствует сохранению ишемизированного миокарда на ранних стадиях после инфаркта миокарда, а также имеет значение при долгосрочном ремоделировании левого желудочка для предотвращения развития сердечной недостаточности [104]. Хотя ангиогенез происходит в грануляционной ткани, которая, в конечном счете, формирует рубец, неоваскуляризация окружающего, жизнеспособного миокарда в пограничной зоне инфаркта также имеет решающее значение в ходе процесса ремоделирования ткани [44]. Взаимное влияние эндотелиальных клеток и кардиомиоцитов также способствует фармакологической защите миокарда после ишемии и реперфузии посредством синтезируемого эндотелиальными клетками оксида азота [54].

Впоследствии клетки, за исключением большинства миофибробластов [113], начинают исчезать из зоны повреждения, что является основной характеристикой последнего периода репарации миокарда – периода формирования рубцовой ткани. В этот период не только происходит элиминация клеток, скорее всего, путем апоптоза [30], но также завершается сшивка коллагена. Образованный таким образом рубец является постоянным по причине отсутствия регенерации кардиомиоцитов.

После инфаркта интерстициальный/периваскулярный фиброз также развивается вне инфарктной области на поздней стадии инфаркта. Основным вклад в формирование фиброза в жизнеспособном миокарда вносят прежде всего интерстициальные фибробласты [110].

Все указанные сроки репарации постинфарктного миокарда характерны для человека. У небольших животных – мыши, крысы – время восстановления миокарда сокращается [115]. Так, при моделировании инфаркта миокарда у мышей путем лигирования коронарных артерий инфильтрация нейтрофилов в пограничной зоне наблюдалась в 1-2 день, инфильтрация макрофагов - на 4 день, лимфоцитов – на 7-14 день. Массивная пролиферация фибробластов, накопление коллагена отмечалась на 7-14 сутки, формирование рубца завершалось к 21 суткам [84].

Таким образом, процесс заживления инфаркта миокарда является многофакторным событием, которое требует участия различных типов клеток. Кровообращение в области инфаркта должно быть восстановлено путем модернизации сосудистой сети, и должна быть сформирована рубцовая ткань для укрепления поврежденной области. На клеточном уровне эти процессы включают пролиферацию, дифференцировку и апоптоз, с участием большого числа факторов роста, митогенных факторов и т.д. [115].

1.2 Ангиогенез и его роль в восстановлении постинфарктного миокарда

1.2.1 Васкулогенез, ангиогенез. Артериогенез

Достаточное кровоснабжение является необходимым условием для нормального функционирования всех органов и тканей, поэтому формирование новых сосудов и поддержание имеющейся сосудистой сети – один из наиболее распространенных процессов, происходящих в организме млекопитающих. В процессе образования сосудов принято разделять васкулогенез, ангиогенез и артериогенез.

Васкулогенез – процесс образования кровеносных сосудов *de novo*, наиболее характерный для эмбрионального развития. Ведущую роль в васкулогенезе играют эндотелиальные прогениторные клетки (ЭПК). Эмбриональный васкулогенез предполагает формирование множественных эмбриональных кровяных островков, содержащих в центре гемопоэтические стволовые клетки, в дальнейшем образующие циркулирующие клетки крови, и расположенные на периферии эндотелиальные прогениторные клетки, образующие сосуд [112]. В результате васкулогенеза образуется примитивная сеть сосудов – первичное сосудистое сплетение [88]. Долгое время считалось, что васкулогенез не наблюдается в постнатальном

периоде, однако после обнаружения в крови ЭПК и доказательства их участия в неоваскуляризации эта точка зрения была опровергнута. Механизмы участия ЭПК в формировании новых сосудов включают в себя их мобилизацию из костного мозга под влиянием цитокинов, образующихся в зонах ишемии, воспаления, злокачественного роста, миграцию к зоне повреждения и включение в вновь формирующиеся сосуды. Однако на сегодняшний день не ясна окончательно значимость васкулогенеза для восстановления кровотока в ишемизированной ткани. [11, 90]. Сеть эндотелиальных клеток, образованная в процессе васкулогенеза, в дальнейшем служит каркасом для ангиогенеза [10].

Ангиогенез – процесс образования новых капилляров на основе предсуществующих сосудов [11]. Он представляет собой сложный многоэтапный процесс, который активируется под действием гипоксии, ишемии или воспаления [112]. На ранних этапах эмбрионального развития образованное первичное сосудистое сплетение в процессе ангиогенеза разрастается и разветвляется с формированием сосудистой сети, обеспечивая необходимое кровоснабжение для роста и развития органов [60]. Описаны два различных механизма ангиогенеза: прорастание и инвагинация [98]. Ангиогенез путем инвагинации предполагает расщепление предсуществующего сосуда с образованием сосудистой вставки в его просвет. Последующий рост и стабилизация этих вставочных трубок приводит к реконструкции сосуда [112]. Процесс ангиогенеза путем прорастания разделяют на несколько этапов: деградация базальной мембраны, миграция и пролиферация эндотелиальных клеток (ЭК), формирование и стабилизация сосудистой трубки, синтез базальной мембраны.

- Дегградация базальной мембраны. Под влиянием ангиогенных факторов стимулируется синтез протеаз, коллагеназ и активаторов плазминогена, которые разрушают базальную мембрану капилляра.

- Миграция и пролиферация эндотелиальных клеток. Под влиянием хемотаксических факторов, которые выделяются фибробластами и многими другими клетками, происходит привлечение ЭК в область формирования сосуда и их интенсивная пролиферация.

- Дифференциация ЭК. Прекращается пролиферация. Формируются межклеточные контакты и образуется просвет сосуда (сосудистая трубка)
- Образование базального матрикса – синтез эндотелиальными клетками и перицитами
- Формирование и стабилизация сосуда [1].

В норме во взрослом организме ангиогенез наблюдается только в рамках овариального цикла, в плаценте и при физиологической регенерации [75]. Ангиогенез также является участником патологических процессов, таких как травматическое повреждение, воспаление. Недостаточный рост сосудов или их регрессия является причиной инсульта, ишемических повреждений, болезни Альцгеймера и др. заболеваний. С избыточной активностью ангиогенеза ассоциированы ревматоидный артрит, ретинопатия и т.д. [41]. Патологическая активация ангиогенеза характерна для злокачественных опухолей [10]. Стимулом для ангиогенеза является гипоксия, механическое повреждение и воспаление, однако во взрослом организме лишь 1-6 % эндотелиальных клеток способны вызывать образование новых сосудов [112].

Артериогенез – образование коллатеральных сосудов из нефункционирующих артериолярных соединений.

Артериогенез предполагает образование зрелых артерий из соединительных артериол после артериальной окклюзии. Артериогенез ранее считали вариантом ангиогенеза, однако и механизм и конечный результат этих процессов различен. Одно из основных различий между этими двумя путями образования сосудов состоит в том, что ангиогенез индуцируется в ответ на тканевую ишемию/гипоксию, тогда как артериогенез реализуется в условиях нормоксии [37]. Обеспечивая кровоток в обход места окклюзии, артериогенез является наиболее эффективным с точки зрения восстановления кровоснабжения [11].

1.2.2. Регуляция ангиогенеза

Основным фактором, индуцирующим ангиогенез, является недостаток кислорода. При этом посредником клеточной адаптации к гипоксии выступает гипоксией индуцированный фактор 1-а (HIF-1a), который управляет эмбриональным и неонатальным ангиогенезом [94]. HIF-1 начинает экспрессироваться при гипоксии и, в свою очередь, вызывает экспрессию ангиогенных факторов [11]. HIF-1a и соответствующие изоформы HIF-2a экспрессируются в кардиомиоцитах, эндотелиальных и воспалительных клетках в ранние сроки после инфаркта миокарда; их экспрессия может сохраняться до 4 недель после инфаркта (у крыс). У мышей с постоянной экспрессией HIF-1a в кардиомиоцитах наблюдается улучшенная функция сердца после инфаркта миокарда, связанная с повышенной экспрессией VEGF в миокарде [70].

HIF-2a также способен индуцировать экспрессию различных ангиогенных факторов, таких как VEGF или ангиопоэтины, но изучение его роли в постнатальном ангиогенезе до недавнего времени ограничивалось моделями опухолей. Тем не менее, недавно было показано, что эндотелий-специфичный HIF-2a необходим для ишемией-индуцированного ангиогенеза [55].

На разных этапах ангиогенеза в его регуляции принимают участие большое количество биологически активных молекул. Тогда как ангиогенные факторы роста – VEGF и FGFs – выступают в качестве стимуляторов процесса и имеют важное значение для фазы роста сосудов, другие ростовые факторы, такие как TGF- β , PDGF- β , ангиопоэтин-1 и их соответствующие рецепторы, имеют важное значение для стабилизации вновь образованных сосудов. Дополнительные положительные и отрицательные модуляторы ангиогенеза влияют на этот процесс посредством воздействия на уровни экспрессии факторов роста и их рецепторов, а также через взаимодействие с внеклеточным матриксом. Это обеспечивает «ангиогенный баланс», в котором экспрессия и активность ангиогенных и антиангиогенных факторов контролируют активацию или ингибирование ангиогенеза

[96, 112]. Воздействие на факторы-регуляторы ангиогенеза на сегодняшний день рассматривается как метод терапии многих заболеваний [11]. Показано, что применение факторов роста стимулирует образование сосудов различного калибра, от среднего размера артерий до капилляров, с преобладанием артерий малого диаметра [71].

Среди цитокинов, принимающих участие в регуляции ангиогенеза, основную роль играет сосудисто-эндотелиальный ростовой фактор. Он является незаменимым регулятором практически всех этапов ангиогенеза. VEGF – специфический митоген ЭК, который обеспечивает их миграцию и пролиферацию. Показано, что присутствие VEGF необходимо для стабилизации формирующегося сосуда даже на поздних этапах ангиогенеза, в противном случае вновь образованные сосуды деградируют.

VEGF – это большое семейство факторов роста, включающее в себя VEGF-A (или VEGF), плацентарный ростовой фактор (PlGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D и VEGF-E (вирусный) [69], VEGF-F [47].

VEGF-A – фундаментальный медиатор физиологического и патофизиологического ангиогенеза. Также его называют фактором проницаемости сосудов (vascular permeability factor, VPF). В результате альтернативного сплайсинга образуются 6 изоформ VEGF, отличающихся количеством аминокислот - VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ и VEGF₂₀₆ (у человека; VEGF мыши и крысы короче, чем соответствующие человеческие изоформы на 1 аминокислоту: VEGF-A₁₂₀, VEGFA₁₄₄, VEGF-A₁₆₄, и VEGF-A₁₈₈). Основной формой является VEGF-A₁₆₅. Также обнаружен ингибирующий вариант VEGF-A₁₆₅ - VEGF-A_{165b}. [47]. Изоформы отличаются гепарин-связывающей способностью. В отличие от других ангиогенных факторов роста, все VEGF-изоформы содержат секреторную сигнальную последовательность, которая обеспечивает их активное выделение из неповрежденных клеток [112].

VEGF играет ключевую роль в формировании сосудистых структур как в эмбриональном периоде, так и у взрослого организма. Роль VEGF-A в эмбриональном развитии сосудов была продемонстрирована после открытия, что целевая

инактивация одного VEGF-аллеля у мышей вызывает летальное нарушение ангиогенеза [67].

Помимо стимуляции пролиферации и миграции эндотелиальных клеток, VEGF также ингибирует апоптоз эндотелиальных клеток посредством индукции экспрессии антиапоптотических генов Bcl-2 и A1, и таким образом играет роль в стабилизации сосудистой сети [59]. Таким образом, VEGF является фактором выживания для эндотелиальных клеток в условиях *in vitro* и *in vivo* [58]. *In vitro*, VEGF предотвращает апоптоз, индуцированный сывороточным голоданием [75].

Хотя эндотелиальные клетки являются основным объектом воздействия VEGF, в некоторых исследованиях выявили его митогенное действие на некоторые неэндотелиальные клетки [121].

В высоких концентрациях VEGF также повышает проницаемость сосудов, в частности, вызывая фенестрации в эндотелиальном слое. Кроме того, он вызывает вазодилатацию, главным образом посредством синтезируемого эндотелиальными клетками оксида азота [121].

VEGF-B. В результате альтернативного сплайсинга образуются 2 формы VEGF-B: VEGF-B186 и VEGF-B167, содержащие 186 и 167 аминокислотных остатков соответственно [69]. По-видимому, гипоксия, регулирующая синтез VEGF-A, не оказывает влияния на экспрессию VEGF-B. VEGF-B очень распространен в сердце, скелетных мышцах и поджелудочной железе и необходим в васкуляризации скелетных мышц. Silvestre et al. (2003) продемонстрировали, что VEGF-B, частично через рецептор VEGFR-1, индуцирует ангиогенез, ассоциированный с активацией Akt и eNOS-связанными путями. [47]

Менее известные члены семейства - VEGF-C и VEGF-D – структурно и функционально сходны между собой. Они связываются с VEGFR2, в меньшей степени – с VEGFR3 [69].

VEGF-C был идентифицирован в качестве лиганда для рецептора тирозинкиназы VEGFR-3, который связан с образованием лимфатических сосудов. *In vivo* VEGF-C может стимулировать ангиогенез на модели ишемии задних конечностей у кролика. *In vitro* VEGF-C активирует пролиферацию и миграцию эндотели-

альных клеток, но в меньшей степени, чем VEGF-A. Трансфекция гена VEGF-C вызывает умеренно выраженный ангиогенез в скелетных мышцах кролика [47].

VEGF-D может активировать рецепторы VEGFR-2 и VEGFR-3 у людей и только VEGFR-3 у мышей. Он экспрессируется во многих тканях, включая печень, сердце, легкие, скелетную мускулатуру. VEGF-D является митогеном для эндотелиальных клеток *in vitro*, проявляет ангиогенные свойства в условиях *in vitro* и *in vivo* и лимфангиогенные – в опухолях.

VEGF-E был впервые идентифицирован в геноме NZ-7, NZ-2, и D1701 штаммов вируса ORF. Подобно VEGF-A165, VEGF-E обладает высоким сродством к VEGFR-1. Хотя VEGF-E не имеет гепарин-связывающего региона, его биологическая активность в отношении эндотелиальных клеток и проницаемости сосудов равна с основным ангиогенным фактором, VEGF-A165. Этот гомолог VEGF является мощным стимулятором ангиогенеза и может вызвать пролиферацию и миграцию сосудистых эндотелиальных клеток [47].

Плацентарный ростовой фактор (PLGF). В результате альтернативного сплайсинга синтезируются 4 формы PLGF: PLGF-1, PLGF-2, PLGF-3 и PLGF-4. Из них только PLGF-2 способен связывать гепарин. Гиперэкспрессия PLGF-2 в периваскулярной ткани увеличивает уровень VEGF-A165 и VEGF-A121 и значительно стимулирует ангиогенез [47]. PLGF преимущественно связывается с VEGFR1, активирует ангиогенез в ишемических тканях с помощью двух основных механизмов. Во-первых, PLGF-опосредованная активация VEGFR1 приводит к трансфосфорилированию VEGFR-2 и амплификации VEGF-зависимой сигнализации [100]. Во-вторых, PLGF способствует привлечению проангиогенных клеток [96].

Биологический эффект VEGF реализуется посредством связывания с 3 тирозин-киназными рецепторами: VEGFR-1 (Flt-1) [114], VEGFR-2 (KDR или Flk-1) [71] и VEGFR-3 (Flt-4) [86]. VEGFR-1 и VEGFR-2 экспрессируются преимущественно на эндотелиальных клетках, хотя, как было показано, также обнаруживаются на некоторых других типах клеток [118], в том числе гладкомышечных и макрофагах [34, 59]. VEGFR-3 экспрессируется на эндотелии лимфатических сосудов

[46]. Хотя рецепторы VEGF преимущественно локализованы на поверхности клеток, также есть внутриклеточные VEGF-сигнальные рецепторы (VEGFR-2), которые вовлечены в процессы выживания эндотелиальных клеток [17].

Экспрессия VEGF-рецепторов также активируется с помощью гипоксии. Хотя VEGFR-1 является высокоафинным рецептором к VEGF, VEGFR-2, по видимому, является доминирующим медиатором ангиогенеза. VEGFR-2 отвечает за трансдукцию сигналов, необходимых для васкулогенеза и ангиогенеза. Хотя было высказано предположение, что VEGFR-1 может выступать как рецептор-"приманка", способный регулировать активность VEGF за счет его связывания и уменьшения доступности для VEGFR-2, недавние исследования показали, что VEGFR-1 генерирует сигналы для организации сборки эндотелиальных клеток в функциональные сосудистые трубки [60].

VEGFR-3 является посредником при лимфангиогенезе.

Недавно было обнаружено существование двух новых рецепторов, нейропилин-1 и нейропилин-2. Было показано, что они селективно связывают VEGF165 (а в случае нейропилина-2 также и VEGF145), но не VEGF121. Как предполагают, они повышают связывание VEGF165 на VEGFR-2 и в результате улучшают сигнал трансдукции [112].

1.2.3 Терапевтический ангиогенез

Стандартом лечения пациентов с ИБС, невосприимчивых к медикаментозной терапии, является аорто-коронарное шунтирование (АКШ), которое улучшает качество жизни и увеличивает выживаемость в долгосрочном периоде. Однако у части пациентов имеются противопоказания к проведению процедуры, в частности, таковыми могут быть диффузный атеросклероз, отсутствие подходящих сосудов для пересадки, сопутствующие заболевания и т.п. С учетом этого, терапевти-

ческий ангиогенез является перспективной стратегией лечения пациентов, которым не показано проведение обычных процедур реваскуляризации [112].

Терапевтический ангиогенез предполагает образование новых кровеносных сосудов, и таким образом развитие дополнительных коллатералей, которые бы выступали в качестве эндогенного шунта и обеспечивали кровоток в обход окклюзированной артерии [112]. Терапевтический ангиогенез может осуществляться как за счет непосредственного введения ангиогенного белка, так и с помощью генной терапии. Также к методам биологического шунтирования можно отнести трансплантацию стволовых клеток, которые синтезируют большое количество ангиогенных факторов. [11].

Начало терапевтическому ангиогенезу было положено в работе J.M. Inzer, который показал, что на модели ишемии задних конечностей у кролика однократное введение VEGF165 может стимулировать образование функциональных кровеносных сосудов [117].

Экспериментальные исследования продемонстрировали эффективность применения VEGF при ишемических повреждениях [99, 128]. В исследованиях результатов применения VEGF в сочетании с различными носителями на модели ишемии у животных отмечали улучшение функции левого желудочка, увеличение сосудистой плотности [26], улучшение регенерации ткани и снижение истончения стенок [33], усиление ангиогенеза и артериогенеза [111]. В исследованиях, особенно в клинике, часто используется трансфекция гена VEGF [118]. В исследованиях ишемии миокарда у свиньи интракоронарная и интрамиокардиальная инъекция гена VEGF позволяет улучшить фракцию выброса и в целом функцию сердца [122; 123]. По некоторым данным, в результате интракоронарного введения плазмиды с геном VEGF наблюдали значительное улучшение перфузии миокарда [101]. Эффективный ангиогенез, артериогенез и улучшение кровотока наблюдали после внутримышечной инъекции VEGF у кроликов [125]. Однако в целом клинические испытания продемонстрировали неоднозначные результаты [128, 99]. При исследовании внутрикоронового введения рекомбинантного VEGF больным ИБС не было обнаружено различий с результатами в группах плацебо [128].

С одной стороны, неудачи в клинике связаны с неадекватной дозировкой факторов роста – из опасения возможных осложнений применялись значительно меньшие дозы, чем в эксперименте. Необходимо отметить, что ожидания возможных осложнений от введения VEGF не беспочвенны. Показано, что VEGF в высоких дозах может быть причиной разного рода нарушений [112]. Рядом следователей указывается возможность развития побочных эффектов, связанных с местным или системным введением в организм большого количества ростовых факторов. Так, при внутрисердечном введении VEGF наблюдалось формирование очагового кардиосклероза в интактном миокарде [6]. Серьезный негативный эффект VEGF был отмечен после внутривенного введения мышам аденовируса, содержащего ген VEGF. Увеличение уровня VEGF в кровотоке вызвало увеличение проницаемости сосудов, что спровоцировало анасарку и, как следствие, гибель животных [27].

Кроме того, неоднократно высказывалось мнение, что бесконтрольное применение VEGF может стимулировать образование опухолей. Однако следует заметить, что, хотя ангиогенез является процессом, необходимым для роста опухоли, не было описано случаев начала опухолевого процесса в результате применения VEGF.

Еще одной проблемой при клинических исследованиях стало место и кратность введения. В некоторых исследованиях для терапии ИБС факторы роста вводили в системный кровоток. Однако показано, что в этом случае миокарда достигает очень небольшое количество VEGF [77]. Кроме того, проблемой является нестабильность факторов роста в кровотоке, поэтому они нуждаются в протеолитической защите [100].

Как уже говорилось, присутствие достаточной концентрации VEGF является необходимым условием для окончательной стабилизации вновь образованного сосуда. Таким образом, при терапевтическом ангиогенезе необходимо обеспечивать длительное присутствие фактора роста в ткани, иначе процесс образования сосудов повернется вспять.

Все вышеперечисленное приводит к необходимости разработки средства доставки VEGF к ишемизированным тканям которое обеспечит адресность доставки, а следовательно, уменьшение токсического действия за счет снижения дозировки, и защиту фактора роста от разрушающего действия крови.

1.3 Липосомы как средство доставки биологически активных веществ

1.3.1 Общая характеристика липосомальных препаратов

Липосомы были впервые описаны Vangham с соавторами в 1965. Они представляют собой везикулы размером от 20 нм до 10 мкм в диаметре, сформированные одним или несколькими липидными бислоями [76]. Существование липосом обуславливается способностью фосфолипидов к самосборке в водных растворах с образованием замкнутых структур.

Липосомальные структуры в основном состоят из амфифильных фосфолипидов (гликолипиды, фосфолипиды, и/или сфинголипиды), в сочетании с холестерином, мембранными белками, полимерами и т.п. Липидный состав мембран и содержание холестерина это ключевые факторы, определяющие стабильность липидного бислоя, эффективность включения и удержания препарата внутри липосомы, и в условиях *in vivo* распределение в ткани и скорость элиминации из плазмы крови. Так, холестерин влияет на жесткость, стабильность и проницаемость мембран липосом в условиях *in vitro* и *in vivo* [35].

Физико-химические свойства и стабильность липосом могут быть обусловлены изменением температуры, ионной силы, рН, типом загруженного препарата и, если используются анионные липиды, наличием двухвалентных катионов [78].

Учитывая их амфифильную природу, липосомы могут быть использованы для загрузки гидрофильных терапевтических агентов (например, метотрексат) во

внутреннюю водную фазу, и водонерастворимых или гидрофобных лекарственных веществ (актиномицин D) в липидный бислои [31].

Липосомы, состоящие из смеси фосфолипидов и холестерина, принято считать классическими. При введении в организм они характеризуются коротким временем циркуляции в крови и тенденцией к быстрому поглощению клетками ретикулоэндотелиальной системы [109]. В дальнейшем мембрану липосом стали модифицировать с целью целенаправленного изменения их свойств. Так, появились липосомы с добавлением полиэтиленгликоля («стелс»-липосомы) с увеличенным сроком циркуляции в крови, липосомы с включением в состав мембраны антител для направленной доставки к определенным органам и тканям и др.

В зависимости от метода получения, липосомы обладают различной структурой. Различают следующие типы липосом:

- мультиламеллярные, стенка которых образована несколькими липидными бислоями
- моноламеллярные, или однослойные
- мультивезикулярные, которые включают в свой состав несколько везикулярных структур [97].

По размеру липосомы можно условно разделить на мелкие (20-100 нм), большие (100-1000 нм), гигантские (>1 мкм). Однако на сегодняшний день не существует общепринятой классификации липосомных везикул по размеру, и критерии, используемые разными исследователями, могут несколько отличаться [109].

Механизм терапевтического действия липосом зависит от их контакта с тканями и клетками-мишенями. Различают 4 типа взаимодействия липосом с клетками:

1. Адгезия. Ассоциация липосом с поверхностью клетки без их слияния. Адсорбция может быть опосредована как неспецифическими механизмами (электростатическое взаимодействие, гидрофобные свойства), так и специфическими (поверхностные рецепторы, антитела).

2. Эндоцитоз. Поглощение целостных липосом с образованием эндоцитозного пузырька. Как правило, в процессе эндоцитоза липосомы доставляются к лизосомальному аппарату, однако также содержимое липосом может выходить в цитоплазму.

3. Слияние липидного бислоя с плазматической мембраной с последующим выходом содержимого липосом в цитоплазму клетки. Некоторое количество включенного во внутреннюю фазу вещества может попадать в межклеточное пространство.

4. Обмен липидами. Происходит обмен липидными молекулами между мембранами липосомы и клетки, не затрагивающий внутреннее содержимое липосом [87].

1.3.2 Перспективы и преимущества применения липосомальных форм препаратов

Липосомы тщательно исследуются уже более 30 лет с точки зрения их потенциального использования в качестве транспортной системы широкого спектра терапевтических агентов [53]. На основе липосомальных препаратов разрабатываются химиотерапевтические агенты, средства визуализации, антигены, иммуномодуляторы, средства доставки генетического материала и т.п.

Целью любой системы доставки лекарственных средств является оптимизация фармакокинетики и/или тканевого распределения лекарственного препарата. Липосомальные формы доставки вызывают интерес, поскольку их структурные особенности позволяют включать в их состав большое разнообразие терапевтических агентов, они универсальны и доказана безопасность их компонентов [92]. Основные преимущества использования липосом в качестве носителей лекарственных веществ таковы:

Направленность. Липосомы могут целенаправленно доставлять лекарственный препарат к предполагаемому его месту действия в организме, тем самым повышая его терапевтическую эффективность. Может реализовываться как за счет пассивного направления, обусловленного структурными особенностями поврежденного органа/ткани (например, накопление липосом в местах воспаления за счет изменения проницаемости капилляров в этих местах) или специфичностью взаимодействия липосом с клетками-мишенями (липосомы активно поглощаются из кровотока клетками ретикулоэндотелиальной системы и интенсивно накапливаются в селезенке и печени). Также известен направленный транспорт липосом, с помощью использования антител [109].

Также липосомы позволяют избежать токсического воздействия препарата на чувствительные к нему органы. Так, например, в обычных условиях липосомы не накапливаются в сердце, головном мозге, почках и некоторых других органах. Это позволяет избежать их повреждения при загрузке липосом высокотоксичными препаратами при химиотерапии.

Продолжительность. Липосомы могут действовать как депо, из которого включенный в их состав препарат постепенно выходит в кровоток. Такой постепенный процесс высвобождения препарата может быть использован для поддержания терапевтического уровня лекарственного препарата в ткани или крови в течение длительного периода времени. Таким образом достигается увеличение продолжительности действия и уменьшение частоты введения препарата.

Защита. Включенные во внутреннюю фазу липосомы биологически активные вещества не контактируют с внутренней средой организма и таким образом защищены от действия разрушающих факторов (например, ферментов), присутствующих в организме пациента.

Интернализация. В организме могут реализовываться различные пути взаимодействия липосом с клетками, некоторые из которых позволяют обеспечить внутриклеточную доставку лекарств, неспособных в других условиях проникать внутрь клетки (например, молекулы ДНК) [109].

В более широком смысле, липосомы позволяют решить проблему доставки препаратов, которые сложно обеспечить в организме в силу их ограниченной способности проникать в определенные органы. Примером является гематоэнцефалический барьер, который осложняет доставку гидрофильных лекарственных веществ к головному мозгу.

Преимуществом липосомальной системы доставки можно считать широкие возможности изменения структуры и физико-химических характеристик. Это позволяет варьировать свойства и «поведение» липосом в организме, в соответствии с актуальными задачами. Все многообразие липосом можно условно разделить на 4 основных типа, отличающихся между собой как по структурным характеристикам, так и по способу их применения.

Классические липосомы. Исторически были первыми используемыми в качестве транспорта, представляют собой везикулы на основе липидного бислоя, окружающего водную фазу. Состоят из фосфолипидов, к которым для улучшения жесткостных характеристик добавляют холестерин. Их физико-химические свойства, такие как размер, липидный состав, заряд поверхности и жесткость липидного слоя, варьируют в широких пределах, что дает большие возможности для влияния на их стабильность или распределение в организме. Однако есть некоторые общие особенности. Обычные липосомы характеризуются коротким сроком циркуляции в крови. При введении в организм они быстро поглощаются фагоцитирующими клетками ретикулоэндотелиальной системы. В основном, они накапливаются в печени и селезенке, что объясняется большим количеством макрофагов и интенсивным кровоснабжением.

Длительно циркулирующие липосомы. Также их называют «стелс»-липосомы, или пространственно стабилизированные. Их поверхность модифицирована присоединением полиэтиленгликоля [25]. Присутствие гидрофильного полимера позволяет защитить липосомы от поглощения макрофагами, что значительно увеличивает время их существования в кровотоке (время полураспада 48 ч).

Иммунолипосомы несут на своей поверхности антитела. Это обеспечивает их адресную доставку к органам-мишеням [28].

Катионные липосомы предназначены для переноса генетического материала. Они формируют комплексы с молекулой ДНК, обеспечивая их проникновение в клетку.

Несмотря на широкое распространение липосом, особенно в сфере онкологических лекарственных препаратов, очень мало представлено липосомальных препаратов, предназначенных для терапии сердечно-сосудистых заболеваний, в частности ишемических состояний. Не изучена возможность использования липосомальных препаратов для улучшения микроциркуляции миокарда.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Терапевтические агенты, используемые в работе

Приготовление препарата VEGF в свободной форме. В эксперименте использовали коммерческий рекомбинантный сосудисто-эндотелиальный ростовой фактор крысы (R&D). Перед использованием его разводили физиологическим раствором до необходимой концентрации (25 нг/мл и 5 нг/мл). VEGF вводили крысам: в группе V12,5 – в дозе 12,5 нг (из расчета 38,5 нг/кг веса животного); в группе V2,5 – в дозе 2,5 нг (из расчета 7,7 нг/кг).

Приготовление препарата VEGF в липосомальной форме. 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. Для оценки органного распределения использовали флуоресцентно меченые липосомы, к которым на этапе формирования липидной пленки добавляли липофильный краситель PKH2 в молярном соотношении краситель:липид 1:15000. Для оценки внутриклеточного включения использовали липосомы с введенным в состав липидной мембраны флуоресцентно меченного липида Aсу1 06:0 NBD PC в соотношении 1:200.

Полученную пленку подвергали гидратации 0,9% раствором NaCl и встряхивали до образования мультиламеллярных везикул (МЛВ). Раствор сосудисто-эндотелиального ростового фактора включали в состав липосом методом замораживания/оттаивания. Для получения липосом заданного размера взвесь МЛВ 10 раз пропускали через экструдер (Lipex Biomembranes Inc., Канада) с использованием поликарбонатных фильтров (Costar) с диаметром пор 50 и 100 нм.

Для исследований *in vivo* липосомальные препараты готовили на основе физиологического раствора («пустые» липосомы) или раствора VEGF в концентрации 25 нг/мл (группа V+Л12,5) и 5 нг/мл (группа V+Л2,5), конечная концентрация липосом в препарате составила 2,5 мг/мл в пересчете на липиды. Животным препараты

вводились из расчета дозы содержащегося в липосомах VEGF аналогично группам с введением свободной формы ростового фактора (12,5 нг и 2,5 нг). Для исследований *in vitro* указанные препараты разбавлялись культуральной средой в 10 раз.

Краткая характеристика липосомальных препаратов, используемых в работе, представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Липосомы, использованные в исследовании

Характеристика липосом					область применения
условное обозначение	липидный состав мембраны	краситель	размер липосом, нм	внутренняя фаза	
ПЛ*	лецитин:холестерин (7:2)	Acyl 06:0 NBD PC	100	0,9% NaCl	Оценка взаимодействия клеток с липосомами
2,5V+Л*				5 нг/мл VEGF	
12,5V+Л*				25 нг/мл VEGF	
ПЛ	лецитин:холестерин (7:5)	нет	100	0,9% NaCl	Оценка цитопро-тективного действия липосом
Л-VEGF				5 нг/мл VEGF	
	лецитин:холестерин (7:3)	PKH2	50	5 нг/мл VEGF	Оценка органного распределения липосом
			100		
V+Л2,5	лецитин:холестерин (7:5)	нет	100	5 нг/мл VEGF	Оценка ангиогенного, антиишемического действия липосом
V+Л12,5				25 нг/мл VEGF	

Примечание: Acyl 06:0 NBD PC – 1-acyl-2-{6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl}-sn-glycero-3-phosphocholine 810121 (Avanti Polar Lipids, США)

2.2 Проведение экспериментов *in vitro*

2.2.1 Подготовка клеточного материала

Эксперименты *in vitro* проводили на культуре фибробластоподобных клеток кожи крысы и мезенхимальных стволовых клеток крысы (МСК).

Выделение и культивирование МСК крысы. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) выделяли из костного мозга бедренных и большеберцовых костей крыс. Животных умерщвляли, задние конечности отделяли и помещали в физиологический раствор с добавлением антибиотиков. В стерильных условиях выделяли бедренные и большеберцовые кости, удаляли эпифизы, а диафизы промывали средой культивирования (DMEM (Gibco, США), содержащей 1 мМ/мл HEPES буфера, 10% бычьей эмбриональной сыворотки, 2 мМ/мл L-глутамина, 100 ЕД/мл пенициллина, 0,1 мкг/мл стрептомицина, 0,1 мкг/мл амфотерицина В (Sigma Aldrich, США)). Полученный смыв высевали на культуральные флаконы с площадью поверхности 25см² (Greiner, Германия), культивировали при 37°C и 5% CO₂. Через 24 часа после посева клетки отмывали культуральной средой от форменных элементов крови, находящихся в суспензии, затем продолжали культивирование в 5 мл культуральной среды до достижения монослоя. Замену питательной среды проводили каждые 3 суток. Адгезированную фракцию клеток снимали 0,5% раствором трипсина-ЭДТА (Sigma Aldrich, США) и ресуспендировали в 0,9 % растворе NaCl. Первый пересев МСК проводили через 7 суток после посева, в дальнейшем клетки пассировали по достижении монослоя (в среднем каждые 14 суток).

Выделение и культивирование фибробластоподобных клеток крысы. Фибробластоподобные клетки кожи крыс получали методом миграции. У умерщвленных животных проводили забор образцов кожи с абдоминальной поверхности и помещали в физиологический раствор с добавлением антибиотиков. В усло-

виях стерильного бокса образцы кожи помещали в лунки 6-луночного культурального планшета, накрывали стерильным покровным стеклом. Культивировали в питательной среде DMEM (Gibco, США), содержащей 1 мМ/мл HEPES буфера, 10% бычьей эмбриональной сыворотки, 2 мМ/мл L-глутамин, 100 ЕД/мл пенициллина, 0,1 мкг/мл стрептомицина, 0,1 мкг/мл амфотерицина В (Sigma Aldrich, США) при 37°C и 5% CO₂ до получения конфлюэнтного слоя. Замену питательной среды проводили каждые 3 суток. Адгезированную фракцию клеток снимали 0,5% раствором трипсина-ЭДТА (Sigma Aldrich, США) и ресуспендировали в 0,9 % растворе NaCl.

2.2.2 Оценка жизнеспособности клеток после культивирования с липосомами в неблагоприятных условиях

Для проведения эксперимента фибробластоподобные клетки кожи засеивали в лунки 6-луночного планшета. В качестве стресс-фактора, провоцирующего апоптоз и некроз, использовалась культивация в условиях депривации сыворотки.

В 1 группе клетки культивировали в полной питательной среде DMEM («К+ЭТС»). Во второй группе клетки культивировали в среде DMEM, не содержащей эмбриональную телячью сыворотку («К-ЭТС»). В группе 3 клетки культивировали в среде без ЭТС с добавлением пустых липосом диаметром 100 нм в концентрации 0,5мг/мл («ПЛ»). В группе 4 к культуральной среде без ЭТС добавляли липосомы, содержащие сосудисто-эндотелиальный ростовой фактор («Л-VEGF») в аналогичной концентрации. Все образцы дублировали, проводили серию аналогичных экспериментов.

Культивирование проводили в течение 48 часов, затем клетки снимали с планшета 0,5% раствором трипсина-ЭДТА, дважды отмывали PBS (фосфатно-солевой буфер, рН 7,4).

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. Принцип метода основан на трансляции мембранного фосфатидилсерина на наружный слой мембраны, где он становится доступен для реакции с аннексином V. Конъюгированный с флюорохромом фикоэритрином аннексин V таким образом служит в качестве маркера для обнаружения клеток на стадии апоптоза. Витальный краситель 7-амино-актиномицин (7-AAP) используется для идентификации необратимо поврежденных клеток. Жизнеспособные клетки с неповрежденной мембраной исключают 7-AAD, тогда как мембраны мертвых и поврежденных клеток проницаемы для 7-AAD.

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.

2.2.3 Оценка взаимодействия культуры клеток с липосомами различного типа

Мезенхимальные стволовые клетки культивировали с липосомами различного состава («пустые» липосомы; V+Л12,5, V+Л12,5), несущих флуоресцентную метку РКН2. Для этого МСК высевали на культуральные 6-луночные планшеты, к культуральной среде добавляли липосомы в концентрации 0,5 мг/мл в пересчете на липиды. Инкубацию проводили в течение 1, 2 и 4 часов при 37°C и 5% CO². Затем клетки отмывали физиологическим раствором, анализировали с помощью инвертированного микроскопа AxioObserver. Для улучшения качества изображения использовали программный модуль ApoTome. Регистрировали интенсивность флуоресцентного сигнала клеток. Оценивали выраженность свечения флуорес-

центной метки, однородность окрашивания культуры (наличие в культуре клеток с разной степенью интенсивности сигнала) и равномерность окрашивания клеток (наличие в клетке участков, окрашенных с разной интенсивностью). Интенсивность окрашивания клеток и внутриклеточное распределение метки после инкубации с флуоресцентно мечеными липосомами отражает степень поглощения, а также особенности внутриклеточного везикул

2.3 Проведение экспериментов *in vivo*

2.3.1 Моделирование инфаркта миокарда

Исследование проводилось на самцах лабораторных крыс субпопуляции Вистар массой 300-350г. Животных содержали в условиях вивария при свободном доступе к пище и воде на рационе питания, соответствующем нормативам ГОСТа. 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). Инфаркт миокарда у животных моделировали посредством перевязки нисходящей ветви левой коронарной артерии по методу по методу Selye с модификацией [105]. Крыс наркотизировали внутрибрюшинным введением этиминала натрия (30 мг/мл). На левой стороне груди крысы разрезали кожу, раздвигали грудные мышцы и рассекали ребро. Затем извлекали сердце из грудной полости, перевязывали левую коронарную артерию и возвращали сердце в грудную полость. Рану

ушивали послойно. Наличие инфаркта миокарда у животных подтверждали макроскопически и по результатам гистологического анализа.

2.3.2 Группы исследования и схема эксперимента.

Для оценки органного распределения липосом животным проводили моделирование инфаркта миокарда. Через 3 суток выполняли интрамиокардиальную инъекцию 0,5 мл флуоресцентно меченных липосом, содержащих VEGF, или инъекцию липосомального препарата в хвостовую вену. Животных выводили из эксперимента на 3 сутки после повторной операции, извлекали сердце, легкие, печень, почки, селезенку, головной мозг, замораживали в жидком азоте.

Для оценки эффективности различных форм доставки VEGF на первом этапе исследования всем животным моделировали инфаркт миокарда. 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. V2,5. Интрамиокардиальное введение сосудисто-эндотелиального ростового фактора в дозировке 2,5 нг.
3. V+L2,5. Интрамиокардиальное введение липосомальной формы сосудисто-эндотелиального ростового фактора в дозировке 2,5 нг.
4. V12,5. Интрамиокардиальное введение сосудисто-эндотелиального ростового фактора в дозировке 12,5 нг.
5. V+L12,5. Интрамиокардиальное введение липосомальной формы сосудисто-эндотелиального ростового фактора в дозировке 12,5 нг.

Лекарственные препараты вводили посредством 3-4 инъекций в периинфарктную зону в объеме 0,5 мл.

Животных выводили из эксперимента на 3, 7 и 14 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.

2.3.3 Оценка органного распределения липосом

Извлеченные на 3 сутки после интрамиокардиального и системного введения флуоресцентно меченных липосом сердце, легкие, печень, почку, селезенку, головной мозг замораживали в жидком азоте. Изготавливали криостатные срезы органов толщиной 8 мкм, промывали PBS и анализировали с помощью люминесцентного микроскопа AxioImager.A1, оценивали выраженность и распределение флуоресцентной метки. На основании интенсивности свечения флуоресцентной метки оценивали особенности органного распределения и накопления липосомального препарата.

2.3.4 Гистологическое исследование миокарда

Оценка морфологических изменений миокарда выполнялась по гистологическим срезам после окраски гематоксилином-эозином и по Ван-Гизону по стандартной методике.

2.3.5 Оценка васкуляризации миокарда

Из замороженных образцов миокарда изготавливали криостатные срезы миокарда толщиной 8 мкм. Для блокировки неспецифического связывания срезы инкубировали в растворе 1% BSA. Затем на срезы наносили раствор первичных антител (мышинные антитела к CD31 крысы, Millipore, США) и инкубировали во влажной камере в течение часа. Отмывали срезы в PBS три раза. Затем на срезы наносили вторичные антитела (овечьи антитела против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с родамином, Millipore, США), инкубировали во влажной камере в темноте в течение часа. Отмывали трижды в PBS, заключали монтирующей средой BioMount (Bio-optica, Италия). Визуализацию осуществляли на люминесцентном микроскопе «Axio Imager.A1» (Carl Zeiss, Германия). Для контроля неспецифического связывания использовали срезы, инкубированные только с вторичными антителами. Для оценки васкуляризации миокарда подсчитывали количество сосудов в поле зрения при увеличении в 200 раз, анализировали 10 случайно выбранных полей зрения.

2.3.6 Оценка экспрессии сосудисто-эндотелиального ростового фактора в миокарде

Из замороженных образцов миокарда изготавливали криостатные срезы миокарда толщиной 8 мкм. Для блокировки неспецифического связывания срезы инкубировали в растворе 1% BSA. Затем на срезы наносили раствор первичных антител (кроличьи антитела к VEGF крысы, Millipore, США) и инкубировали во влажной камере в течение часа. Отмывали срезы в PBS три раза. Затем на срезы наносили вторичные антитела (ослиные антитела против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с FITC, Millipore, США), инкубировали во влажной каме-

ре в темноте в течение часа. Отмывали трижды в PBS, заключали монтирующей средой BioMount (Bio-optica, Италия). Визуализацию осуществляли на люминесцентном микроскопе «Axio Imager.A1» (Carl Zeiss, Германия). В качестве контроля использовали неокрашенные срезы, промытые PBS (контроль собственной флуоресценции ткани) и срезы, инкубированные только с вторичными антителами (контроль неспецифического связывания).

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.

2.3.7 Анализ апоптоза кардиомиоцитов методом TUNEL

Исследование апоптоза кардиомиоцитов проводили путем постановки на криостатных срезах миокарда реакции TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling) с использованием стандартного набора реактивов Millipore (USA). Принцип метода основан на выявлении 3'-ОН концов в молекуле ядерной ДНК, образующихся при её фрагментации в клетках, находящихся на стадии апоптоза. 3'-Урацил, конъюгированный с биотином, с помощью терминальной дезоксирибонуклеотидил трансферазы (TdT) включается в фрагменты ДНК. Далее биотинилированный нуклеотид выявляют с помощью стрептавидина, несущего флуоресцентную метку. 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.

2.3.8 Иммуноферментный анализ

Интерлейкин-1b. Содержание в сыворотке крови IL-1b определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа.

Для анализа использовали микропланшет с адсорбированными на дне лунки антителами к IL-1b крысы. При добавлении в лунки образцов сыворотки содержащийся в них IL-1b адсорбировался в лунках. При добавлении биотина, конъюгированного с антителами к IL-1b, он также соединялся с IL-1b. После двухчасовой инкубации лунки промывали, удаляя неприкрепившийся биотин. Добавляли конъюгат стрептавидин-пероксидаза, который в процессе инкубирования связывается с биотином, конъюгированном с IL-1b. После инкубации несвязавшийся стрептавидиновый конъюгат удаляли промыванием лунок. В лунки добавляли субстратный раствор, который взаимодействует с ферментным комплексом с образованием окрашенного раствора. Интенсивность окраски, измеренная на длине волны 450 нм, прямо пропорциональна концентрации IL-1b, присутствующего в образцах. Концентрация IL-1b в образцах определяется по стандартной кривой, построенной по 7 приготовленным разведениям стандарта.

Трансформирующий фактор роста-1b. Содержание в сыворотке крови TGF-1b определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа типа сэндвич.

Для анализа использовали микропланшет, покрытый моноклональными антителами к TGF-b1. При добавлении стандартов и образцов сыворотки, содержащийся в них TGF-1b связывается с иммобилизованными в лунках антителами. После промывания в лунки вносится биотин, конъюгированный с антителами к TGF-1b, который связывается с иммобилизованным TGF-1b. После удаления избытка биотинилированных антител добавляется стрептавидин-пероксидаза, которая связывается с биотином. После инкубации в процессе промывки удаляется несвязавшийся фермент, после чего добавляется субстратный раствор. В процессе инкубации он взаимодействует с ферментом с образованием окрашенного ком-

плекса. Интенсивность окраски раствора прямо пропорциональна концентрации TGF-1b, присутствующего в образце. Концентрация TGF-1b в образцах определяется по стандартной кривой, построенной по приготовленным разведениям стандарта.

Фактор некроза опухоли а. Содержание в сыворотке крови TNF-а определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа.

Для анализа использовали микропланшет с адсорбированными на дне лунки антителами к TNF-а крысы. При добавлении в лунки образцов сыворотки содержащийся в них TNF-а адсорбировался в лунках. При добавлении биотина, конъюгированного с антителами к TNF-а, он также соединялся с TNF-а. После двухчасовой инкубации лунки промывали, удаляя неприкрепившийся биотин. Добавляли конъюгат стрептавидин-пероксидаза, который в процессе инкубирования связывается с биотином, конъюгированном с TNF-а. После инкубации несвязавшийся стрептавидиновый конъюгат удаляли промыванием лунок. В лунки добавляли субстратный раствор, который взаимодействует с ферментным комплексом с образованием окрашенного раствора. Интенсивность окраски, измеренная на длине волны 450 нм, прямо пропорциональна концентрации TNF-а, присутствующего в образцах. Концентрация TNF-а в образцах определяется по стандартной кривой, построенной по приготовленным разведениям стандарта.

Белок, связывающий жирные кислоты. Содержание в сыворотке крови БСЖК определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа типа сэндвич.

Образцы сыворотки и стандарты вносятся в лунки микропланшета и связываются с адсорбированными антителами к БСЖК. Затем добавляли биотин, конъюгированный с антителами к БСЖК, который связывается с иммобилизованным БСЖК. После удаления избытка биотинилированных антител добавляется стрептавидин-пероксидаза, которая связывается с биотином. После инкубации в процессе промывки удаляется несвязавшийся фермент, после чего добавляется субстратный раствор. В процессе инкубации он взаимодействует с ферментом с образованием окрашенного комплекса. Интенсивность окраски раствора прямо

пропорциональна концентрации БСЖК, присутствующего в образце. Концентрация БСЖК в образцах определяется по стандартной кривой, построенной по приготовленным разведениям стандарта.

Сосудисто-эндотелиальный фактор роста. Содержание в сыворотке крови VEGF определяли методом иммуноферментного анализа типа сэндвич. Стандарты и образцы сыворотки вносили в лунки планшета с иммобилизованными антителами. Присутствующий в них VEGF связывался с адсорбированными антителами. После отмывки фермент-конъюгированные антитела добавляли в лунки. После инкубации и удаления несвязавшихся антител, в лунки планшета добавляли раствор субстрата. Ферментативная реакция дает синий раствор, который становится желтым после остановки реакции. Интенсивность окраски раствора пропорциональна количеству VEGF, содержащегося в образцах. Количество VEGF определяли по стандартной кривой, построенной по приготовленным разведениям стандарта.

2.4 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. Для описания признаков с отличным от нормального распределением указывали медиану и 25-й и 75-й процентиля (Me (25%–75%)). Для оценки межгрупповых различий использовали критерий Манна-Уитни. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3 ОЦЕНКА IN VITRO ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

3.1 Оценка взаимодействия клеток с липосомами различного состава

Липосомы широко известны в медицине как средство доставки биологически активных веществ. Показано, что липосомальная форма доставки значительно изменяет фармакокинетику и фармакодинамику препарата, что дает возможность за счет направленного транспорта увеличить его эффективность.

Ключевую роль в обеспечении эффективности использования липосом в качестве средства доставки играет характер их взаимодействия с клетками-мишенями. Известно несколько типов взаимодействия липосом с клетками: адсорбция, эндоцитоз, слияние с мембраной клетки и обмен компонентами мембран. В зависимости от условий, может реализовываться один или несколько механизмов одновременно [79]. К определяющим факторам в первую очередь относятся физико-химические характеристики липосом: размер, состав липидной оболочки, заряд, биологически активные вещества, включенные в состав липосом, и т.п. [22].

В данном эксперименте для предварительной оценки взаимодействия с клетками липосом различного состава, несущих флуоресцентную метку, их инкубировали с мезенхимальными стволовыми клетками крыс. После 1, 2 и 4 часов инкубации культуру клеток анализировали с помощью микроскопа AxioObserver с применением программного модуля ApoTome, регистрировали интенсивность флуоресцентного сигнала клеток. Оценивали выраженность свечения флуоресцентной метки, однородность окрашивания культуры (наличие в культуре клеток с разной степенью интенсивности сигнала) и равномерность окрашивания клеток (наличие в клетке участков, окрашенных с разной интен-

сивностью). Интенсивность окрашивания клеток и внутриклеточное распределение метки после инкубации с флуоресцентно мечеными липосомами отражает степень поглощения, а также особенности внутриклеточного везикул.

После 1 часа инкубации с «пустыми» липосомами отмечалось окрашивание культуры клеток, что свидетельствует об аккумуляции липосом в мембране клетки (рисунок 1). Культура МСК окрашивалась неоднородно, преобладали клетки с невысоким уровнем свечения флуоресцентной метки. Для всех клеток культуры характерно равномерное окрашивание без выраженной субклеточной локализации метки.

После 2х часовой инкубации нарастала интенсивность флуоресцентного сигнала, регистрируемого на клетках; окрашивание культуры относительно однородное. По-видимому, в это время продолжается накопление липосом из культуральной среды. Во многих клетках отмечается неравномерность окрашивания (для периферической области клетки характерно более низкая интенсивность свечения метки).

После 4 часов культивирования с «пустыми» липосомами отмечалась неоднородность окрашивания культуры: у части клеток уровень свечения метки был ниже, по сравнению с 2-х часовой инкубацией, при этом сохранялось яркое свечение в краевой области. У некоторых клеток интенсивность флуоресцентного сигнала сохранялась на прежнем уровне, при этом наблюдались внутриклеточные включения с большей интенсивностью свечения метки.

После 1 часа культивации клеток в присутствии липосом с VEGF (2,5 нг) наблюдалось более выраженное свечение клеток по сравнению с группой «пустых» липосом (рисунок 1). Интенсивность свечения культуры однородная. В некоторых случаях клетки окрашены неравномерно, отмечаются участки мембраны с большей интенсивностью свечения.

1 час

2 часа

4 часа

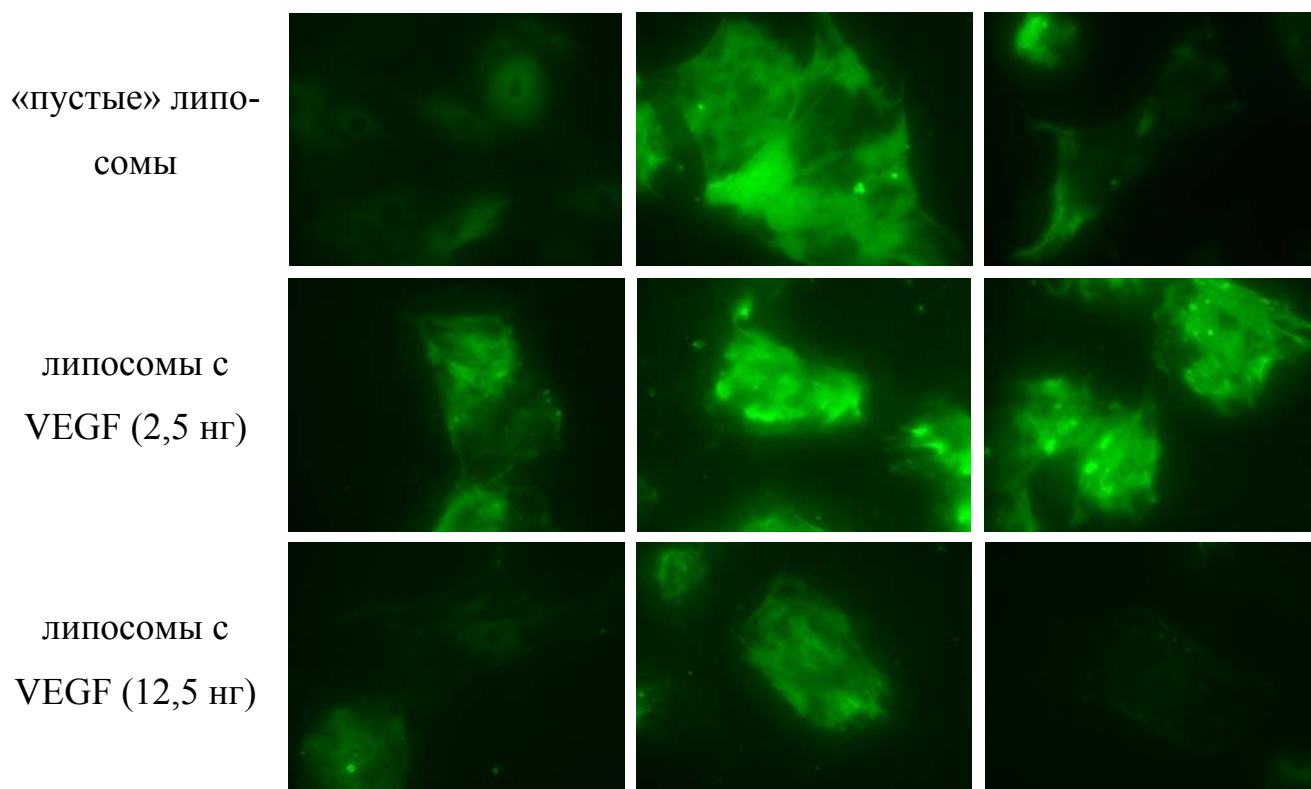


Рисунок 1 – Фибробласты, инкубированные в присутствии флуоресцентно меченных липосом, ув. x200

После 2х часов инкубирования в целом сохраняются те же характеристики окрашивания, что и ранее, однако для клеток характерно более равномерное и интенсивное свечение метки.

После 4 часов инкубации свечение клеток сохраняется на прежнем уровне. Окрашивание клеток преимущественно равномерное, с отдельными внутриклеточными включениями с большей интенсивностью сигнала. По сравнению с клетками, проинкубированными с «пустыми» липосомами, необходимо отметить менее выраженное внутриклеточное перераспределение сигнала.

При культивировании с липосомами с VEGF (12,5 нг) в течение 1 часа культура клеток окрашивалась неоднородно, наблюдались клетки с низким и средним уровнем сигнала. Окрашивание клеток равномерное, внутриклеточных включений не наблюдалось.

Через 2 часа инкубации наблюдалось более интенсивное окрашивание клеток. Культура окрашивалась однородно, свечение метки внутри клетки распределялось равномерно.

Через 4 часа инкубации отмечалось выраженное снижение интенсивности сигнала. Все клетки культуры характеризовались низким уровнем свечения метки, окрашивание клеток равномерное с сохранением внутриклеточных включений с большей интенсивностью сигнала.

По результатам проведенного анализа можно сказать, что липосомы всех типов успешно взаимодействовали с клетками. Однако, различия в окрашивании клеток, продемонстрированные в разных группах, позволяют говорить о разных механизмах взаимодействия между липосомами и клетками.

В случае с пустыми липосомами ко 2-му часу инкубации регистрировалось яркое свечение клеток, что говорит о выраженном поглощении клетками меченных липосом. Изменения характера окрашивания к 4-му часу (неравномерность окрашивания, внутриклеточные включения) позволяют говорить о выраженном внутриклеточном перераспределении меченных липидов. В случае использования липосом с VEGF в низкой дозе подобные различия в окрашивании мало выражены даже через 4 часа наблюдения. Можно предположить, что это отчасти связано с другим характером взаимодействия липосом с клетками: липосомы в меньшей степени поглощаются, а в большей степени связываются с поверхностью мембраны клетки. В таком случае, очевидно, то включенный в состав липосом ростовой фактор изменяет их свойства (возможно, заряд поверхности или жесткость липидного слоя), что отражается на взаимодействии липидных везикул с клеточной мембраной. Например, известно, что увеличение жесткости мембраны липосом стабилизирует их и увеличивает время циркуляции за счет меньшего поглощения клетками крови [80]; возможно, изменение жесткости мембраны в целом оказывает влияние на характер взаимодействия с окружающими клетками. Также, по данным литературы, заряд поверхности является фактором, определяющим направленность липосом к клеткам [31].

Поскольку на протяжении эксперимента клетки, инкубированные с липосомами с VEGF (12,5 нг), обладали равномерным окрашиванием, и не отмечалось внутриклеточное перераспределение флуоресцентно меченных липидов, можно предположить, что при этом липосомы также преимущественно агрегировали на

внешней мембране клетки, не включаясь в состав мембраны клетки или клеточных органелл. После длительной, в течение 4 часов, инкубации наблюдалось выраженное уменьшение флуоресцентного сигнала. Предположительно, это говорит о том, что происходит открепление липосом от поверхности клетки. Однако наличие при этом внутриклеточных включений и остаточного свечения мембраны свидетельствует о том, что часть липосом поглотилась клеткой. Также возможна вероятность обмена липидами между липосомой и клеточной мембраной.

Таким образом, результаты, полученные в данном эксперименте, позволяют говорить о разном характере взаимодействия клеток с липосомами различного состава. «Пустые» липосомы интенсивно поглощаются клетками и включаются в метаболизм липидов. Липосомы, содержащие в своем составе VEGF в низкой дозе могут как поглощаться клетками и накапливаться внутри них, так и прикрепляться к мембране клеток. Липосомы с VEGF в количестве 12,5 нг преимущественно оседают на мембране клеток. При этом также наблюдается поглощение меченных липидов и их накопление, однако менее выраженное.

3.2 Протективный эффект липосом в условиях сывороточной депривации

Помимо использования в качестве средства доставки лекарственных веществ, липосомы могут рассматриваться как самостоятельный терапевтический агент. Поскольку клеточная мембрана играет регулируемую роль за счет расположенных в ней рецепторов и ионных каналов, изменение ее состава при поглощении липосом может оказывать выраженное влияние на метаболическую активность клетки [22].

Наряду с гипоксией, снижение поступления питательных веществ является одним из компонентов ишемии. Поэтому в экспериментах *in vivo* исключение сыворотки и/или глюкозы используется как модель для изучения ишемических повреждений клеток [116]. В нашем исследовании для оценки цитопротективного

эффекта липосом проводили оценку жизнеспособности фибробластов, культивированных в присутствии липосом в условиях сывороточной депривации. В качестве контролей использовались клетки, инкубированные в нормальных условиях и культуры, инкубированные в условиях депривации сыворотки. Через 2 суток определяли уровень апоптоза и некроза методом проточной цитофлуориметрии с окраской клеток аннексином и 7AAD.

По результатам настоящего исследования, в группе контроля при нормальных условиях культивирования количество жизнеспособных клеток составило 92,7%; на стадии раннего апоптоза находилось 2,4%, позднего апоптоза – 3,65%, некроза – 1,2% фибробластов (таблица 2).

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) *
V2,5	26,35 (19,94; 31,64) ***/#	1,40 (0,00; 2,08) */***	0,00 (0,00; 0,00) */***
V+Л2,5	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+Л 12,5	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+Л12,5;

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

Культивирование фибробластов в условиях сывороточной депривации приводило к выраженному снижению количества жизнеспособных клеток до 40,25%. Уменьшение происходило преимущественно за счет увеличения доли клеток, находящихся на стадии раннего апоптоза (48,0%). Также наблюдалось увеличение частоты возникновения позднего апоптоза (9,05%) и некроза (2,7%).

При культивировании фибробластов в присутствии «пустых липосом» на фоне сывороточной депривации отмечалось сохранение числа жизнеспособных клеток. При этом достаточно высокой оставалась частота возникновения раннего апоптоза – 27,2%. Уровень позднего апоптоза и некроза составлял 4,9% и 1,6% соответственно, что близко значениям контроля.

В группе с добавлением липосом, содержащих VEGF, также отмечалось улучшение выживаемости клеток в неблагоприятных условиях, количество жизнеспособных клеток составило 53,1%. При этом сохранение жизнеспособных клеток реализовывалось за счет уменьшения количества клеток на стадии раннего апоптоза (19,7%). Частота возникновения позднего апоптоза (9,6%) и некроза (2,4%) соотносилась со значениями в группе с сывороточной депривацией.

В нашем эксперименте гибель клеток в неблагоприятных условиях реализовывалась преимущественно за счет апоптоза, частота возникновения некроза была значительно ниже, что согласуется с данными литературы. В ряде исследований было показано, что в условиях исключения сыворотки из состава культуральной среды наблюдается гибель клеток путем апоптоза [103].

Из полученных результатов можно заключить, что культивирование фибробластов с липосомами увеличивает жизнеспособность клеток в неблагоприятных условиях, а именно при нехватке питательного субстрата. При этом наиболее выраженное влияние проявляется в отношении клеток на стадии раннего апоптоза. Необходимо отметить, что «пустые» липосомы оказывают несколько более выраженный протективный эффект, чем липосомы, содержащие VEGF. Как было показано ранее, эти виды липосом демонстрируют различный характер взаимодействия с клетками. Таким образом, менее выраженный протективный эффект липосом с VEGF возможно связан с меньшим поглощением липидов.

Предположительно, цитопротективное действие липосом реализуется за счет входящих в их состав эссенциальных фосфолипидов, которые являются основным компонентом клеточных мембран. Показано, что фосфолипиды могут быть использованы для улучшения выживания клеток в неблагоприятных условиях, они являются действующим веществом некоторых коммерческих протектив-

ных препаратов [7]. Фосфолипиды изменяют процессы метаболизма клетки, обеспечивая торможение процессов перекисного окисления липидов; способствуют ускорению регенерации поврежденных клеточных мембран [20]. Возможно, липосомы выступают в качестве доноров липидов, необходимых для обеспечения нормального строения и функционирования клеточных мембран. Поскольку многие патологические состояния, ишемия в частности, сопровождаются повреждением мембран и нарушением их проницаемости, восстановление ее структуры и функции является возможным путем обеспечения выживания клетки в неблагоприятных условиях.

Таким образом, липосомы способствуют улучшению выживаемости клеток в условиях сывороточной депривации. При этом цитопротективный эффект липосом, содержащих VEGF, менее выражен по сравнению с «пустыми» липосомами, что объясняется разным характером их взаимодействия с клетками.

ГЛАВА 4 СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА СПОСОБОВ ДОСТАВКИ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ VEGF

Известно, что при включении биологически активного вещества в состав липосом меняется его фармакокинетика. В свою очередь, свойства липосом в значительной степени зависят от размера и заряда липидных частиц, включенных в их состав препаратов и состава липидной оболочки. Изменяя эти параметры, можно корректировать параметры доставки лекарственного препарата.

Для определения оптимального способа доставки липосомальной формы VEGF к ишемизированному миокарду проводили эксперимент с введением флуоресцентно меченных липосом разного диаметра (100 нм и 50 нм), содержащих VEGF, в миокард и в хвостовую вену. Непосредственно после введения липосом криостатные срезы миокарда анализировали с использованием микроскопа AxioImager, оценивали содержание липосом в различных органах на основании интенсивности свечения флуоресцентной метки; также изучали срезы образцов органов (сердце, легкие, печень, почки, селезенка, головной мозг) на 3 сутки после инъекции.

В течение 30 минут после введения липосом анализировали срезы миокарда (рисунок 2). Отмечалось интенсивное свечение метки в межклеточном пространстве и в кровеносных сосудах. Окрашивание кардиомиоцитов не определялось.

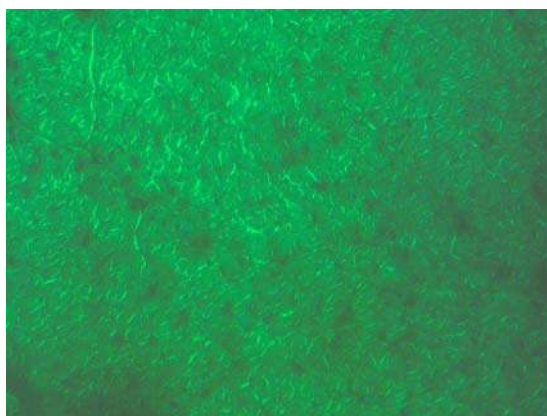
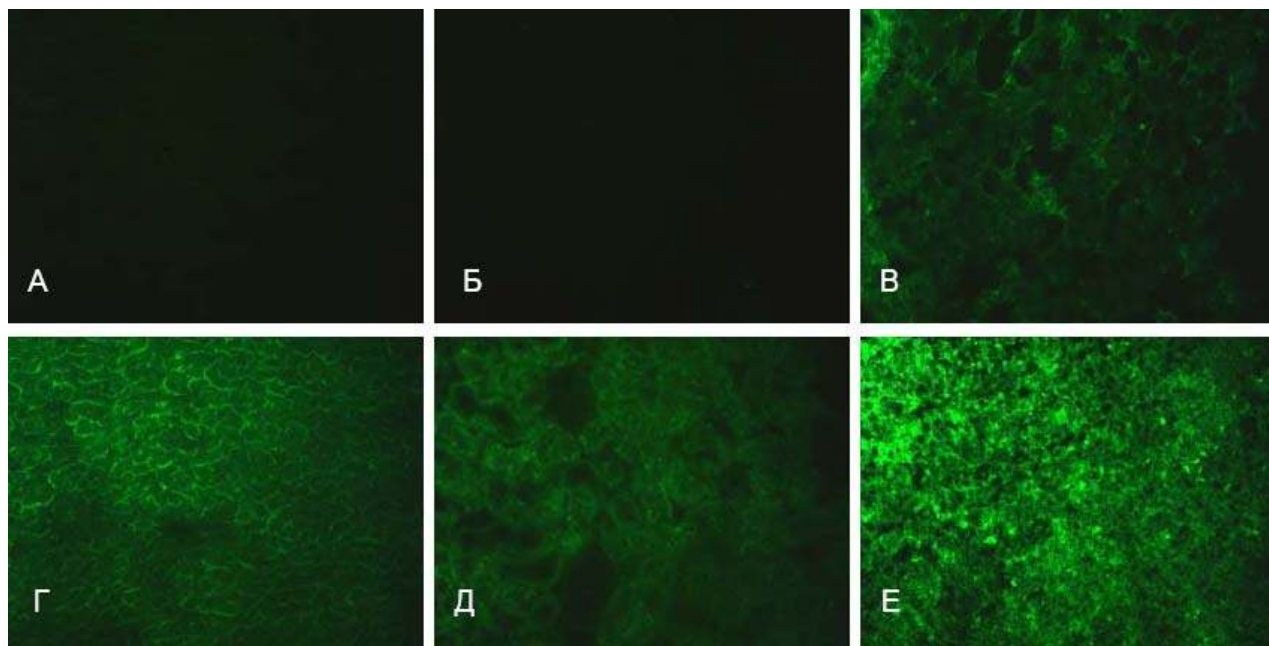


Рисунок 2 – Миокард после введения флуоресцентно меченных липосом, ув.

x200

При введении липосом размером 50 нм в хвостовую вену в миокарде свечения метки не наблюдалось (рисунок 3). В головном мозге также флуоресцентный сигнал не регистрировался. В легких наблюдалось равномерное умеренное накопление метки. В печени отмечалась интенсивная окраска паренхимы. В почках регистрировалось умеренно выраженное свечение флуоресцентной метки, ткани окрашивались равномерно. Наиболее интенсивное окрашивание наблюдалось в паренхиме селезенки.



А – миокард,

Б – головной мозг,

В – легкие,

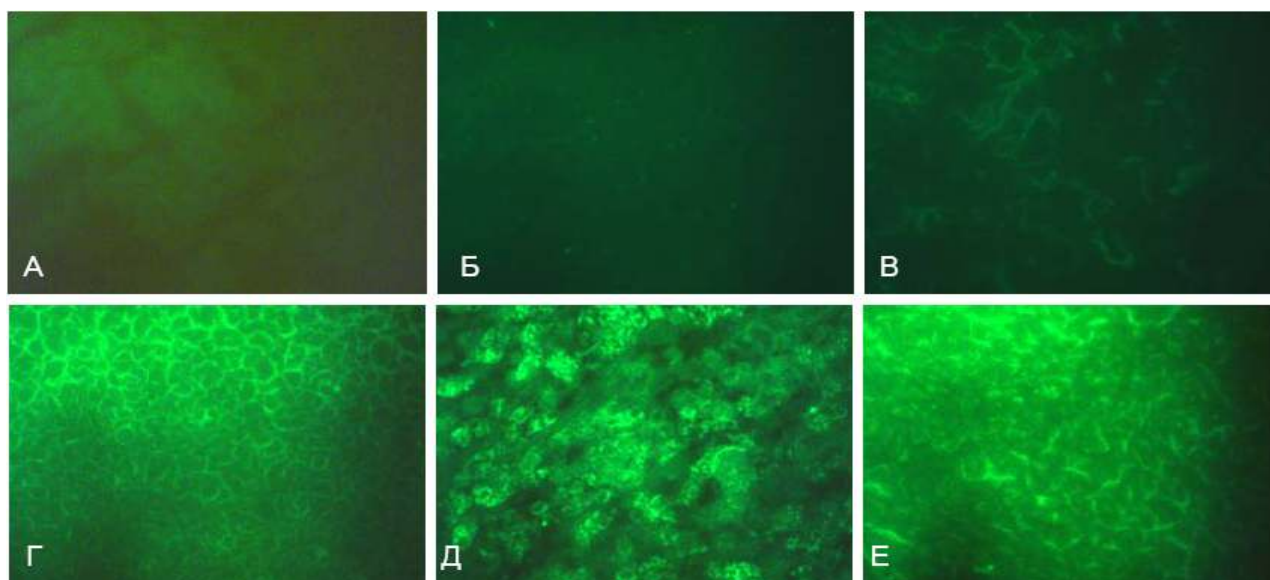
Г – печень,

Д – почка,

Е – селезенка

Рисунок 3 – Органное распределение флуоресцентно меченных липосом размером 50 нм через 3 суток после системного введения, ув. х200

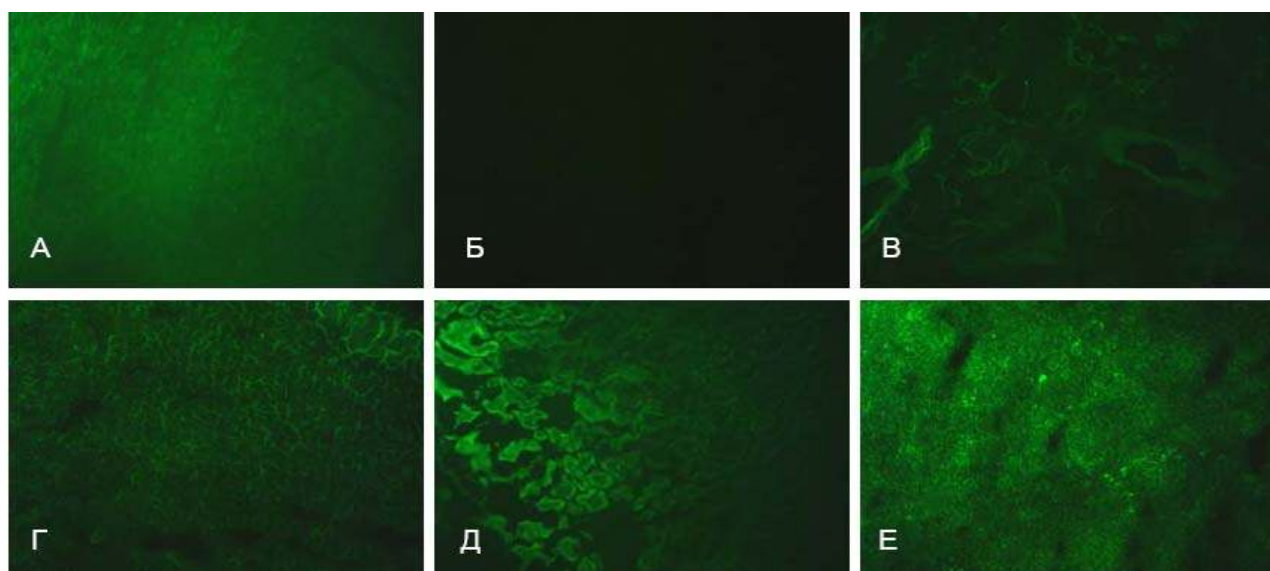
Через 3 суток после инъекции липосом размером 100 нм в хвостовую вену не наблюдалось флуоресцентной метки в тканях сердца (рисунок 4). В тканях головного мозга флуоресцентный сигнал также не регистрировался. В легких окрашивался только эндотелий сосудов. Наиболее выраженное свечение наблюдалось в печени, почках, селезенке.



А – миокард,
 Б – головной мозг,
 В – легкие,
 Г – печень,
 Д – почка,
 Е – селезенка

Рисунок 4 – Органное распределение флуоресцентно меченных липосом размером 100 нм через 3 суток после введения в хвостовую вену, ув. x200

Через 3 суток после местного введения липосом диаметром 50 нм в миокарде обнаруживалось умеренно выраженное свечение флуоресцентной метки (рисунок 5).

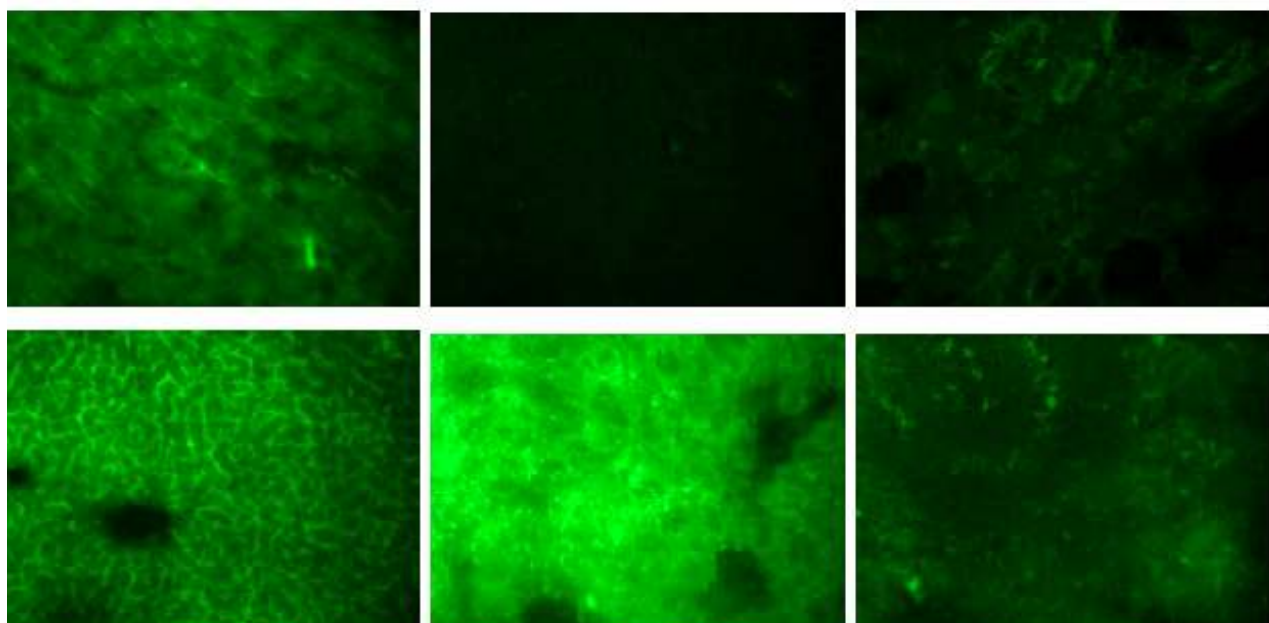


А – миокард,
 Б – головной мозг,
 В – легкие,
 Г – печень,
 Д – почка,
 Е – селезенка

Рисунок 5 – Органное распределение флуоресцентно меченных липосом размером 50 нм через 3 суток после интрамиокардиального введения, ув. x200

Отмечалось относительно равномерное окрашивание кардиомиоцитов. В головном мозге флуоресцентный сигнал не отмечался. В легких наблюдалось выраженное окрашивание эндотелия сосудов. В печени наблюдалось умеренное свечение флуоресцентной метки. Окрашивались преимущественно краевые зоны клеток паренхимы. В почках отмечали умеренно выраженный флуоресцентный сигнал. В селезенке наблюдалось равномерное интенсивное окрашивание клеток паренхимы.

На 3 сутки после интрамиокардиального введения липосом диаметром 100 нм определялось умеренное свечение флуоресцентной метки в миокарде (рисунок 6, А). Отмечалось выраженное неравномерное окрашивание кардиомиоцитов. Также наблюдалось сохранение в некоторых случаях красителя в межклеточном пространстве и в эндотелии сосудов.



А – миокард,

Б – головной мозг,

В – легкие,

Г – печень,

Д – почка,

Е – селезенка

Рисунок 6 – Органное распределение флуоресцентно меченных липосом размером 100 нм через 3 суток после интрамиокардиального введения, ув. x200

В головном мозге не наблюдалось присутствия флуоресцентной метки. В легких флуоресцентный сигнал регистрировался только в эндотелии сосудов. В

печени отмечалась наибольшая концентрация флуоресцентной метки. Сигнал регистрировался преимущественно на мембранах клеток паренхимы (рисунок 6, Г). Также выраженное свечение наблюдалось в почках, хорошо прокрашивалось корковое вещество (рисунок 6, Д); в мозговом веществе сигнал не наблюдался. В селезенке наблюдалось неравномерное, средней интенсивности окрашивание ткани.

При введении препарата в системный кровоток, он разносится по организму, в том числе попадая в печень и селезенку. В этих органах содержится большое количество клеток ретикулоэндотелиальной системы, которые, согласно литературным данным, активно выводят липосомы из кровотока [53]. Наши результаты соотносятся с данными литературы: вне зависимости от размера липосом, после их введения в системный кровоток обнаруживалось яркое свечение в печени и селезенке, что свидетельствует об интенсивном поглощении липосом этими органами. Также выраженное окрашивание обнаруживалось в корковом слое почек, что говорит об инфильтрации липосом из крови. При прохождении тока крови через сердце не наблюдается заметного поглощения липосом тканями миокарда, однако часть липосом проходит через малый круг кровообращения, накапливаясь в эндотелии легочных сосудов. По полученным нами результатам, не отмечалось накопления липосом в головном мозге. В литературных источниках существуют различные мнения о способности липосом проходить через гематоэнцефалический барьер. С одной стороны, отмечалось потенциальная возможность использовать их в качестве носителей лекарственных средств к головному мозгу за счет их липофильных свойств. С другой стороны, показано, что для успешного прохождения гематоэнцефалического барьера необходимо специализированное введение липосомального препарата (например, в сонную артерию). Кроме того, влияние на это могут оказывать факторы самих липосом, такие как размер, заряд поверхности, состав и т.п. В целом, можно сказать, что липосомы, используемые в нашем эксперименте, не проходят гематоэнцефалический барьер, либо их концентрация в крови после системного введения не обеспечивает их заметного накопления в тканях мозга. В любом случае, можно заключить, что используемые липосомальные препараты не оказывают влияния на головной мозг.

При интрамиокардиальном введении липосом в общем динамика накопления препарата оставалась аналогичной, что говорит о сходной фармакокинетике препарата. Особенностью явилось несколько менее выраженная интенсивность свечения метки в печени и селезенке, по-видимому, связанная с меньшей концентрацией липосом в кровотоке после местного введения. Необходимо отметить, что при местном введении часть липосом поглощалась в миокарде, о чем свидетельствует окрашивание кардиомиоцитов. При этом при введении липосом размером 100 нм отмечалось накопление метки в межклеточном пространстве, что может быть следствием менее интенсивного поглощения клетками липосом большего диаметра. Таким образом, можно говорить об эффекте депонирования липосом, что согласуется с данными литературы [22]. Накопление липосом в ткани является эффективным с точки зрения пролонгированной доставки препарата, поскольку постепенное разрушение депонированных липосом будет обеспечивать постепенный выход включенных в их состав ростовых факторов в окружающие ткани.

Таким образом, можно сказать, что как местное, так и системное введение липосом размером 50 и 100 нм приводит к их распространению по системам организма с током крови. Однако их активное накопление наблюдается только в печени, селезенке и почках. При местном введении липосом размером 100 нм происходит их частичное депонирование в тканях миокарда.

ГЛАВА 5 СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПОСЛЕ ИНФАРКТА МИОКАРДА

5.1 Оценка экспрессии VEGF в образцах миокарда крыс

Известно, что гипоксия является фактором, инициирующим секрецию VEGF, и таким образом стимулирующим образование новых сосудов. Однако при этом показано, что несмотря на состояние ишемии, развивающееся в миокарде, уровень естественного ангиогенеза очень низок. Это связывают с тем, что состояние ишемии в миокарде оказывается преходящим, и недостаточным для выраженной стимуляции выработки VEGF. Показано также, что после инфаркта миокарда уровень VEGF значительно повышается, однако быстро снижается до исходных значений, по разным оценкам – в течение 1-3 суток [5, 52]. При этом необходимо учитывать, что VEGF является необходимым участником всех стадий процесса ангиогенеза; в случае его недостатка на стадии формирования сосудистой трубки происходит элиминация вновь образованных зачатков кровеносных сосудов. Таким образом, очевидно, что для эффективного ангиогенеза недостаточно разового повышения уровня VEGF и необходимо его присутствие в ткани в течение длительного времени, поэтому обеспечение пролонгированного присутствия остового фактора в ткани является критерием эффективности стимуляции ангиогенеза.

Для оценки эффективности доставки VEGF к миокарду проводили иммунофлуоресцентный анализ с использованием первичных антител к VEGF. Содержание ростового фактора оценивали по интенсивности свечения флуоресцентного красителя с помощью программы AxioVision.

В группе с ложной операцией на 3 сутки на срезах миокарда не отмечалась экспрессия VEGF. На 7 сутки наблюдалось статистически значимое увеличение

свечения метки (107,5 у.ед.), частично сохранявшееся на 14 сутки (15,73 у.ед) (таблица 3).

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)
V2,5	3,87 (1,36; 12,00)	0,00 (0,00; 4,68)	0,00 (0,00; 14,19)
V+Л2,5	7,40 (3,53; 9,27)	0,00 (0,00;0,00)*	0,00 (0,00;0,00)*/**
V12,5	0,00 (0,00; 4,68)	5,46 (3,42; 6,76)**/***	0,00 (0,00;0,00)
V+Л 12,5	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

В группе V2,5 на 3 сутки наблюдалось выраженное флуоресцентное окрашивание (26,35 у.ед.). К 7 суткам интенсивность свечения метки уменьшалась (1,40 у.ед.); на 14 сутки окрашивания не обнаруживалось.

В группе V+Л2,5 на 3 сутки флуоресцентный сигнал не регистрировался. На 7 сутки появлялось свечение метки (6,87 у.ед.), исчезающее к 14 суткам.

В группе V12,5 свечение метки не было отмечено на 3 сутки после инъекции. Флуоресцентный сигнал регистрировался на 7 сутки (15,68 у.ед.), снижаясь к 14 суткам до неопределяемого минимума.

В группе V+Л 12,5 окрашивание наблюдалось на 3 сутки (19,10 у.ед.). К 7 суткам интенсивность свечения снижалась (8,0 у.ед.). На 14 сутки флуоресцентного сигнала не отмечалось.

Повышение уровня VEGF в ткани зависит от многих факторов. Основным стимулом для секреции VEGF является гипоксия. Также секреция ростового фактора увеличивается при воспалении. Помимо этого, в нашем эксперименте VEGF может обнаруживаться как в результате его постепенного выхода из депо липо-

сом, так и вследствие реакции ткани на инъекцию ростового фактора. Очевидно, что введение экзогенного ростового фактора в миокард оказывает неоднозначное воздействие; поскольку известно, что VEGF оказывает антиишемический эффект и уменьшает местное воспаление, такое искусственное повышение содержания VEGF может косвенно оказывать ингибирующее действие в отношении собственной секреции фактора роста в миокарде.

Повышение уровня VEGF в контрольной группе, предположительно, является следствием гипоксии. Также, по-видимому, результатом реакции ткани на ишемию и/или воспаление можно считать повышение уровня ростового фактора в отдаленные сроки наблюдения, что отмечалось в группах V+Л12,5 и V12,5. Очевидно, что в этих случаях непосредственное влияние введенного VEGF распространилось на не очень продолжительный срок, что объясняется быстрой элиминацией из кровотока как чистого VEGF, так по-видимому, и липосом с VEGF в низкой концентрации.

Интерес представляет повышение экспрессии ростового фактора в группе V2,5 на 3 и 7 сутки наблюдения. Можно предположить, что в связи с низкой дозировкой, в данном случае антиишемический и противовоспалительный эффект VEGF выражен слабо. В таком случае, относительно высокое содержание VEGF является ответом на воспаление и механическое повреждение миокарда во время выполнения инъекции ростового фактора.

Сходными причинами можно объяснить экспрессию VEGF на 3 и 7 сутки в группе V+Л12,5. Однако с учетом более высокой концентрации ростового фактора в это случае, более вероятным представляется постепенный выход VEGF. Как было показано ранее, липосомы способны депонироваться в миокарде. При постепенном разрушении липосом в этом случае будет происходить выход из них ростового фактора. В таком случае, с учетом полученных результатов можно сказать, что применение липосом с 12,5 нг VEGF может обеспечить повышение уровня ростового фактора в ткани на срок до 7 суток после введения.

В заключение, необходимо отметить, что с точки зрения стимуляции ангиогенеза, наиболее значимым можно считать повышение уровня VEGF в ранние сроки наблюдения. Поскольку исследования показали, что после инфаркта миокарда происходит кратковременное увеличение секреции VEGF, более эффективным будет обеспечение непрерывного присутствия VEGF в ткани. С этой точки зрения, наиболее перспективным представляются группы V2,5 и V+Л12,5, поскольку в этих случаях наблюдалось увеличение содержания ростового фактора на 3 сутки наблюдения.

Таким образом, во всех исследуемых группах в разные сроки наблюдается усиление экспрессии VEGF в миокарде. Однако с точки зрения ангиогенеза наиболее значимыми представляется введение VEGF 2,5 нг и липосом с VEGF 12,5 нг, которые потенциально обеспечивают непрерывное поддержание повышенного уровня VEGF в миокарде.

5.2 Анализ содержания VEGF в сыворотке крови крыс

Одной из проблем клинического применения VEGF принято считать возможное токсическое действие ростового фактора. Показано, что VEGF обладает рядом негативных побочных эффектов [32]. Также необходимо учитывать, что липосомальная форма может увеличивать время существования VEGF в кровотоке. Поэтому, для исключения возможного системного действия VEGF, введенного в миокард, оценивали содержание ростового фактора в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа.

Методом иммуноферментного анализа в сыворотке крови интактных крыс VEGF не обнаруживается.

По результатам иммуноферментного анализа, в контрольной группе VEGF наблюдался только на 14 сутки после операции и составил 2,7 пг/мл (таблица 4).

Таблица 4 – Содержание VEGF в сыворотке крови крыс (пг/мл)

Группа	Сроки наблюдения		
	3 сутки	7 сутки	14 сутки
Контроль	0,00 (0,00;0,00)	0,00 (0,00;0,00)	2,70 (1,35; 8,31)
V2,5	3,87 (1,36; 12,00)	0,00 (0,00; 4,68)	0,00 (0,00; 14,19)
V+Л2,5	7,40 (3,53; 9,27)	0,00 (0,00;0,00)*	0,00 (0,00;0,00)*/**
V12,5	0,00 (0,00; 4,68)	5,46 (3,42; 6,76)**/***	0,00 (0,00;0,00)
V+Л 12,5	0,00 (0,00; 0,58)	6,33 (1,66; 11,00)	0,00 (0,00; 2,04)

* – различия по сравнению с 3 сутками наблюдения статистически значимы, $p < 0,05$

** – различия по сравнению с контрольной группой статистически значимы, $p < 0,05$

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

В группе V2,5 отмечалось содержание ростового фактора в количестве 3,87 пг/мл; на 7 и 14 сутки в среднем в группе содержание VEGF опускалось ниже определяемого минимума и регистрировалось только у отдельных особей.

В группе V+Л2,5 содержание VEGF было выше и составило 7,4. Также на 7 и 14 сутки VEGF не определялся.

В группе V12,5 на 3 сутки после инъекции содержание фактора роста отмечалось только у некоторых особей; к 7 суткам наблюдалось значительное повышение уровня VEGF во всей группе в среднем до 5,46 пг/мл, что достоверно превышало значение показателя в группе контроля ($p < 0,05$). К 14 суткам у всех особей значение показателя опускалось ниже определяемого минимума.

В группе V+Л12,5 на 3 сутки после инъекции присутствие в сыворотке фактора роста также отмечалось только в отдельных случаях. Максимальное значение показателя отмечалось на 7 сутки, различия с группой контроля статистически значимы ($p < 0,05$). У некоторых особей определялось содержание ростового фактора на 14 сутки после повторной операции.

Известно, что VEGF быстро реагирует на ишемию и в некоторой степени может служить сигналом развития ишемического поражения тканей. В исследо-

ваниях показано, что повышение уровня VEGF наблюдается в подострой фазе инфаркта и у больных с ишемической болезнью сердца. С другой стороны, повышение VEGF также может являться маркером ангиогенеза [9].

По результатам проведенного эксперимента можно заключить, что у крыс с проведенной ложной операцией увеличение содержания VEGF происходит только к концу наблюдаемого периода, что может быть следствием ишемии ткани. Введение как свободной, так и липосомальной формы VEGF в низкой дозировке вызывает увеличение содержания ростового фактора до 3 суток наблюдения, затем значение показателя снижается. При введении любой формы VEGF в высокой дозировке наблюдается отсроченное повышение концентрации ростового фактора, на 7 сутки. При этом в отдельных случаях VEGF регистрировался также на 3 и 14 сутки после введения липосом с VEGF (12,5 нг). Предположительно, это может быть следствием реакции ткани на введение высокой концентрации VEGF или пролонгированный выход препарата в кровь при постепенном разрушении липосом.

Кроме того, необходимо учитывать, что VEGF не является специфическим кардиогенным маркером. Поскольку, помимо всего прочего, VEGF активно участвует в процессах заживления ран. Таким образом, закономерным является его повышение в сыворотке крови животных, находящихся в послеоперационном периоде.

В целом, можно сказать, что наблюдалось умеренное увеличение содержания VEGF в сыворотке крови, которое значимо не превышало максимальные его значения у контрольных животных. Таким образом, можно заключить, что введение в миокард ростового фактора не приводит к значительному повышению его уровня в сыворотке крови, следовательно, негативный системный эффект VEGF не ожидается.

5.3 Васкуляризация миокарда после введения препаратов VEGF

Накопление в тканях гипоксией индуцированного фактора и последующая активация синтеза проангиогенных факторов это естественный механизм, направленный на компенсацию ишемического состояния за счет формирования новых кровеносных сосудов и улучшения микроциркуляции. Однако исследования показали, что плотность сосудов при ишемии может увеличиваться незначительно, а при хронической ишемии – даже уменьшаться. Причины этого эффекта обсуждаются, однако очевидно, что ишемия миокарда может быть фактором, блокирующим ангиогенез [64]. Предполагается, что механизмом в данном случае является нарушение связи между накоплением HIF и индукцией синтеза проангиогенных факторов.

Поэтому для оценки эффективности стимуляции ангиогенеза в ишемизированном миокарде препаратами VEGF проводили оценку плотности сосудов в срезах миокарда.

В группе контроля на 3 сутки после ложной операции количество сосудов составило 1,2 ед. в поле зрения (рисунок 7). На 7 сутки отмечена тенденция к снижению уровня показателя (0,96 ед.). На 14 сутки наблюдается выраженное уменьшение количества сосудов в поле зрения (0,56 ед), различия по сравнению с 7 сутками статистически значимы ($p=0,048$).

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 снижается (0,60 ед), затем вновь повышается на 14 сутки (0,84). Однако статистически значимых отличий как внутри группы, так и в сравнении с группой контроля не наблюдалось.

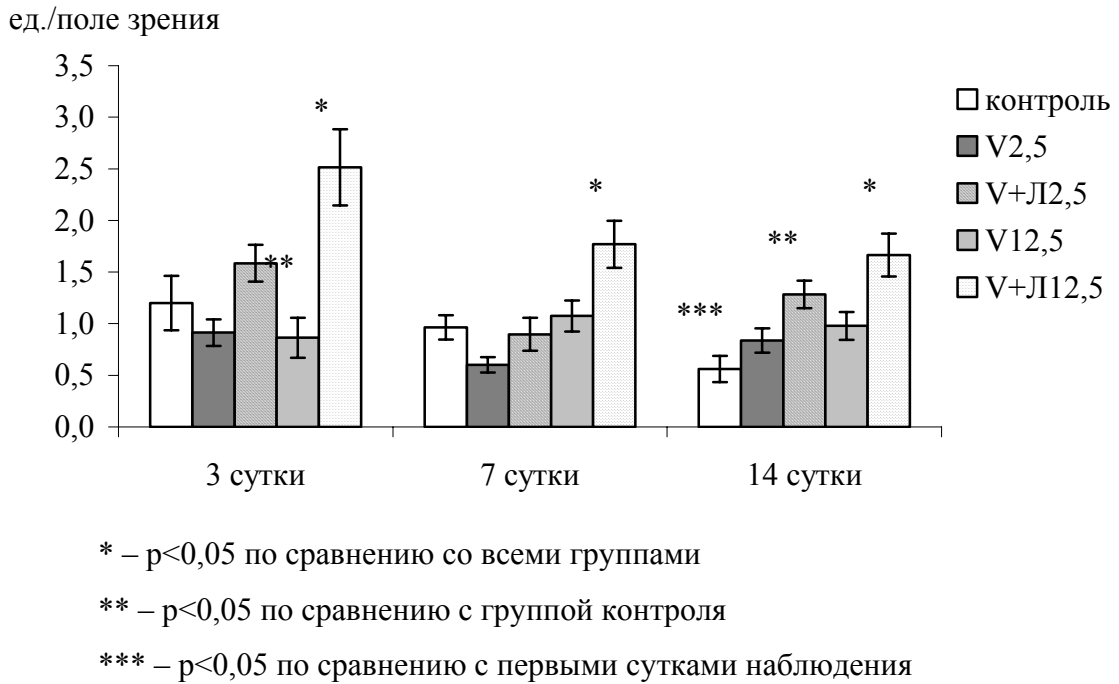


Рисунок 7 – Количество сосудов в миокарде

В группе V+I12,5 количество сосудов на 3 сутки несколько превышает значение в контрольной группе – 1,58 ед. На 7 сутки отмечалось значимое уменьшение плотности капилляров – 0,9 ед ($p=0,026$). К 14 суткам наблюдалась тенденция к увеличению сосудистой плотности до 1,28 ед.

В группе V12,5 на 3 сутки количество сосудов невелико – 0,86 ед. В течение всего периода наблюдения отмечаются небольшие колебания значения показателя – 1,07 и 0,98 ед. на 7 и 14 сутки соответственно. Статистически значимых отличий не наблюдается.

В группе V+I12,5 количество сосудов на 3 сутки значительно превышало остальные группы – 2,65 ед. Различия с группой контроля статистически достоверны. К 7 суткам отмечена тенденция к уменьшению количества сосудов – 1,77 ед. На 14 сутки значение показателя продолжает снижаться - 1,66 ед. Различия с группой контроля статистически значимы в течение всего периода наблюдения.

По данным литературы, после инфаркта миокарда под действием ишемии инициируется продукция VEGF. Таким образом, происходит запуск процесса ангиогенеза. Однако естественный ангиогенез в таких условиях зачастую недоста-

точно эффективен. Известно, что продукция VEGF на фоне инфаркта носит кратковременный характер, содержание ростового фактора снижается до нормальных значений через сутки после повреждения миокарда [23, 49]. Поскольку присутствие VEGF необходимо для стабилизации сосудистой трубки, при снижении его продукции значительная часть вновь образованной сосудистой сети деградирует.

Полученные нами результаты соотносятся с литературными данными. 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 дозировке не отмечено выраженной динамики количества сосудов. Очевидно, что разовое введение данного количества ростового фактора не оказывает значимого влияния на ангиогенез.

При этом при введении V+Л12,5 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, с одной стороны, может говорить о том, что липосомальная форма VEGF более доступна для клеток и таким образом оказывает более эффективное воздействие по сравнению со свободной формой VEGF в той же концентрации. С другой стороны, за счет эффекта депонирования липосом в тканях миокарда и их постепенного разрушения, может осуществляться пролонгированная доставка ростового фактора. Это может обеспечить присутствие в ткани ростового фактора, необходимое 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. Введение V+Л12,5 не приводит к значимому увеличению количества сосудов, по-видимому, такая дозировка недостаточна для индукции ангиогенеза.

Таким образом, интрамиокардиальное введение V+Л12,5 является эффективным стимулятором ангиогенеза и приводит к выраженному увеличению плотности сосудистой сети в миокарде.

Суммируя полученные результаты, можно сказать, что само по себе повышение уровня VEGF в миокарде не обязательно влечет за собой увеличение количества сосудов, особенно в тех случаях, когда такое повышение зарегистрировано только в одной из точек наблюдения. Хотя на сегодняшний день доказанным является тот факт, что для эффективного ангиогенеза необходимо присутствие VEGF в процессе формирования и стабилизации сосуда, в литературе нет данных о необходимой для этого концентрации ростового фактора в ткани или длительности его воздействия. Применительно к нашим исследованиям, можно сказать, что с учетом короткого времени циркуляции VEGF в крови, а также данных о естественном повышении его уровня после инфаркта, наиболее эффективной может считаться ситуация, когда введение VEGF в сочетании с его пролонгированной доставкой посредством липосом будет обеспечивать непрерывное поддержание повышенного уровня VEGF. По полученным данным, введение V+Л12,5 более эффективно в отношении ангиогенеза. Ранее был описан предполагаемый механизм депонирования липосом в миокарде с последующим постепенным выходом заключенного в них препарата. С учетом данного эффекта пролонгированной доставки препарата и исходя из полученных результатов о динамике экспрессии VEGF, в этом случае есть основания предполагать непрерывное присутствие VEGF в миокарде, тогда как в случае с V2,5, предположительно, может иметь место разовое повышение уровня VEGF на 3 суток вследствие реакции ткани на повреждение. При этом в других группах на 3 суток не отмечалось экспрессии VEGF в миокарде и, очевидно, не достигалось непрерывного присутствия ростового фактора. Таким образом, они недостаточно эффективны в отношении доставки ростового фактора для стимуляции ангиогенеза, что подтверждается низкими значениями плотности сосудистого русла.

По полученным нами результатам, не было выявлено связи между сывороточным и миокардиальным уровнями VEGF. Также не было отмечено зависимо-

сти плотности капилляров от содержания VEGF в сыворотке крови. Необходимо признать, что уровень ростового фактора в крови не может считаться достоверным маркером исключительно постинфарктного ангиогенеза. Однако поскольку именно содержание VEGF в крови позволяет сделать вывод о потенциальной возможности влияния интрамиокардиального VEGF на другие органы, можно заключить, что введение VEGF в указанных дозировках не оказывает выраженного системного воздействия.

5.4 Оценка содержания белка, связывающего жирные кислоты, в сыворотке крови крыс

БСЖК – цитоплазматический низкомолекулярный белок, относящийся к семейству белков-транспортеров жирных кислот, активно изучаемый в последние годы как маркер некроза кардиомиоцитов. Наибольшее количество кБСЖК содержится в миокарде. В ограниченных количествах он также присутствует в скелетных мышцах (преимущественно в диафрагме), а также в аорте [73]

При инфаркте миокарда в результате некроза кардиомиоцитов БСЖК выходит в кровь. Известно, что повышение содержания БСЖК в крови начинает регистрироваться в течение 2-3 часов после развития ИМ. Максимальные значения определяются через 12 часов, затем уровень БСЖК вновь снижается, достигая нормальных значений к исходу первых суток после начала ишемии [8]. Тканеспецифичность кБСЖК и его высокая чувствительность в ранний период повреждения миокарда определяет его значимость для диагностики в ранний период развития инфаркта миокарда [67].

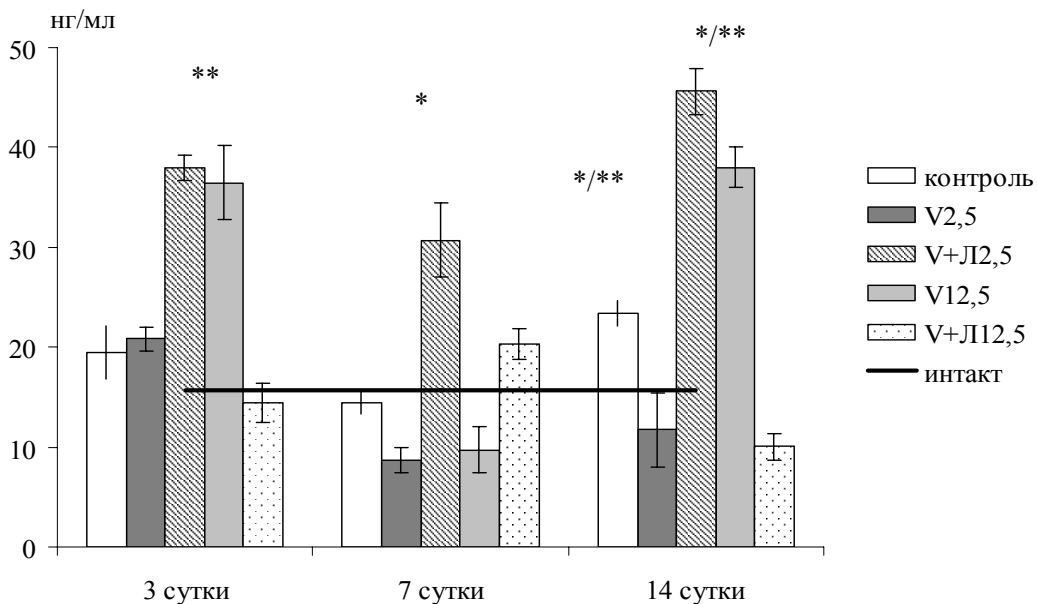
Однако в последнее время появились данные, что выход кБСЖК в кровь может наблюдаться не только в первые часы после развития ИМ. В различных исследованиях увеличение содержания БСЖК в сыворотке крови наблюдали в период до 3 суток после ИМ [13, 19], в течение 2 недель после госпитализации у па-

циентов с сердечной недостаточностью [15], у пациентов с инфарктом миокарда в течение 2х недель после выписки [54]. В этих исследованиях зарегистрировали связь между повышением уровня БСЖК в отдаленные сроки и риском смерти.

Предположительно, в таком случае повышение уровня кБСЖК связано с развитием в миокарде состояния станнинга [19]. При этом происходит нарушение проницаемости мембран кардиомиоцитов, что сопровождается выходом в кровь БСЖК.

Таким образом, длительное увеличение содержания БСЖК в сыворотке крови свидетельствует о продолжающейся ишемии миокарда.

В контрольной группе на 3 сутки после повторной операции уровень БСЖК незначительно превышает значение показателя у интактных животных. К 7 суткам этот показатель снижается до значений, сравнимых со значением в группе интактных животных (рисунок 8). На 14 сутки наблюдается выраженный подъем значения БСЖК. В динамике уровня БСЖК в группе контроля не наблюдается статистически значимых отличий, однако отмечается тенденция к его повышению в конце срока наблюдения. Предположительно, это может быть вызвано нарастающей ишемией миокарда.



* – $p < 0,05$ по сравнению с V2,5

** – $p < 0,05$ сравнению с V+I12,5

Рисунок 8 – Содержание белка, связывающего жирные кислоты, в сыворотке крови крыс, нг/мл

В группе V2,5 уровень БСЖК на 3 сутки незначительно превышает значение уровня у интактных животных. На 7 сутки отмечено выраженное снижение значения показателя. Он незначительно повышается на 14 сутки, однако достоверно ниже значения в группе контроля.

В группе V+Л2,5 уже на 3 сутки отмечается значительно повышенный уровень БСЖК. Он несколько снижается к 7 суткам, а на 14 сутки отмечена тенденция к повышению показателя.

В группе V12,5 на 3 сутки отмечается повышенное значение показателя. На 7 сутки наблюдается резкое снижение уровня БСЖК ($p < 0,05$), затем к 14 суткам восстановление до исходных значений. На 14 сутки почти в 4 раза превышает значение показателя в группе с введением липосомальной формы VEGF в аналогичной концентрации, различия статистически значимы.

В группе V+Л12,5 уровень БСЖК сравним со значением у интактных животных. Несколько повышается на 7 сутки, и снижается на 14. На 14 сутки уровень БСЖК более чем в 2 раза ниже, чем в группе контроля; различия статистически достоверны.

К концу периода наблюдения отмечается тенденция к увеличению уровня БСЖК в группе контроля. Предположительно, это свидетельствует о нарастании ишемии в миокарде. Полученные данные соотносятся с результатами оценки плотности сосудистой сети: к 14 суткам количество сосудов в миокарде в этой группе снижается, что может быть связано с деградацией части вновь образованной сосудистой сети с последующим ухудшением кровоснабжения.

В группе V+Л2,5 уровень БСЖК значительно превышает значение в группе контроля в течение всего периода наблюдения. С одной стороны, отсутствие положительной динамики явно свидетельствует о неэффективности данной формы препарата с точки зрения улучшения кровоснабжения и уменьшения ишемии. С другой стороны, вызывает вопрос значительное ухудшение ситуации по сравнению с нелечеными животными.

При этом на фоне введения свободного VEGF в той же концентрации не отмечается негативного эффекта, что может быть связано с различной биодоступностью свободной и липосомальной форм ростового фактора. По-видимому, дозировка препарата 2,5нг недостаточна для проявления как негативного, так и положительного эффекта препарата в свободной форме.

Обращает на себя внимание динамика БСЖК в группе с введением свободной формы VEGF в количестве 12,5. Увеличение значения показателя, с одной стороны, может являться следствием ишемии. Однако поскольку значения в группе животных с ложной операцией значительно ниже, возможно, это свидетельствует о повреждающем действии высокой дозировки VEGF. К 7 суткам количество БСЖК значительно уменьшается, возможно, вследствие уменьшения влияния введенного VEGF. Повторное повышение содержания БСЖК на 14 сутки может быть следствием гипоксии ткани.

Необходимо отметить, что в группе с введением липосомальной формы VEGF в высокой дозе содержание БСЖК значительно снижено. Оно сравнимо с уровнем показателя у интактных животных, повышаясь только на 7 сутки наблюдения. Таким образом, можно сказать, что липосомы значительно снижают негативный эффект включенного в их состав вещества и/или уменьшают проявления ишемии.

5.5 Гистологическая оценка морфологических изменений миокарда крыс после введения VEGF

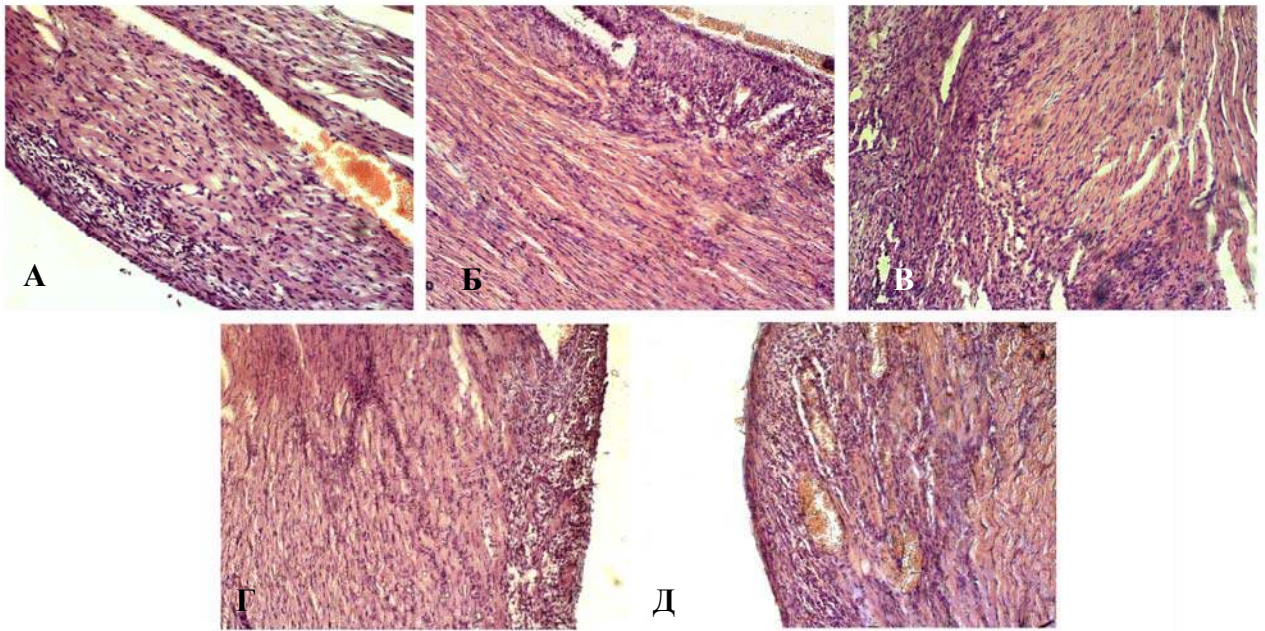
Лигирование коронарных артерий является распространенной моделью инфаркта миокарда у крыс. Подобно людям, крыса имеет дефицитное коллатеральное кровообращение, поэтому окклюзия коронарной артерии вызывает трансмуральный инфаркт миокарда; в редких случаях (около 3%) наблюдается

субэндокардиальный инфаркт. При этом морфологические и функциональные изменения, вызванные инфарктом, аналогичны таковым у человека. [57]. Особенностью данной модели является то, что в связи со скоростью метаболизма фазы развития инфаркта – некроз, репарация, ремоделирование – протекают быстро, что уменьшает время наблюдения исследования [57]. К 3 суткам после моделированного инфаркта наблюдается зона некротических клеток, выраженная воспалительная реакция с привлечением полиморфноядерных и мононуклеарных клеток. На 5 сутки наблюдается грануляционная ткань. Через 7 суток снижается клеточная инфильтрация, отмечается ранняя стадия формирования рубца [68].

Для оценки повреждения и выраженности процессов репарации после интрамиокардиального введения препаратов VEGF на фоне инфаркта миокарда проводили гистологический анализ миокарда.

В нашем исследовании в контрольной группе на 3 сутки субэпикардиально определяется умеренная лимфо-, лейкоцитарная инфильтрация (рисунок 9). Кардиомиоциты с розовой цитоплазмой с вытянутыми нормохромными ядрами, расположены местами рыхло, местами плотно. Капилляры полнокровные. На 7 суткисохраняется аналогичная картина. К 14 суткам наблюдается уменьшение лимфоцитарной инфильтрации.

В группе V2,5 в эпикарде и субэпикардиально отмечается густая диффузная лимфо-гистиоцитарная инфильтрация (в отдельных случаях – очаговая, умеренно выраженная). Кардиомиоциты с розовой цитоплазмой, с вытянутыми нормохромными ядрами. На 7 сутки группа неоднородная, наблюдается варьирование выраженности лимфоцитарной инфильтрации от густой диффузно-очаговой до слабой очаговой у разных животных внутри группы. К 14 суткам сохраняется слабая очаговая лимфо-гистиоцитарная инфильтрация.



А – контроль;

Б – V2,5;

В – V+L2,5;

Г – V12,5;

Д – V+L12,5

Рисунок 9 – Гистологическая картина миокарда на 3 сутки после повторной операции в пограничной зоне инфаркта. Окраска гематоксилин-эозином, ув. x200

При введении V+L2,5 на 3 сутки наблюдается густая лимфоцитарная инфильтрация, полнокровие капилляров. Кардиомиоциты плотно расположены. На 7 сутки наблюдения отмечается умеренная лимфоцитарная инфильтрация. На отдельных участках эпикарда очаги склероза.

К 14 суткам сохраняется умеренная инфильтрация под эпикардом, в миокарде отмечаются мелкие лимфо-гистиоцитарные инфильтраты. Сохраняется полнокровие капилляров.

В группе V12,5 на 3 сутки в эпикарде и в поверхностных отделах миокарда отмечается густая диффузная лимфо-гистиоцитарная инфильтрация. В миокарде мелкие лимфоцитарные инфильтраты. Кардиомиоциты с розоватой цитоплазмой, с вытянутыми нормохромными ядрами. К 7 суткам инфильтрация клеточными элементами уменьшается; на 14 сутки сохраняется слабая диффузно-очаговая лимфоцитарная инфильтрация.

В группе V+Л12,5 на 3 сутки под эпикардом наблюдается густая диффузная лимфо-, гистиоцитарная инфильтрация, на некоторых участках распространяющаяся в ткань миокарда. Миокардиоциты с розовой цитоплазмой, с вытянутыми нормохромными ядрами. В эпикарде и в миокарде мелкоочаговые кровоизлияния. На 7 сутки наблюдается умеренная лимфоцитарная инфильтрация, очаговые кровоизлияния. На 14 сутки сохраняется умеренная инфильтрация.

В целом по результатам исследования можно сказать, что во всех группах наблюдается некоторое «затягивание» процессов репарации миокарда в сравнении с данными литературы [68]. При этом для всех экспериментальных групп характерно увеличение интенсивности воспалительного процесса на 3 сутки наблюдения, что, по всей видимости, является следствием механического повреждения миокарда при инъекции ростовых факторов. В дальнейшем наблюдалось «выравнивание» групп по отношению к контрольной. Необходимо отметить, что у животных в группах с введением липосомальной формы VEGF в разных дозах на 7 сутки инфильтрация воспалительными элементами была более выражена по сравнению с остальными и сохранялась к 14 суткам наблюдения. Таким образом, наблюдалось увеличение продолжительности воспалительного процесса по сравнению с контрольной группой.

В контрольной группе на всех этапах наблюдения обнаруживалось полнокровие сосудов, что свидетельствует об ишемии ткани. Помимо контрольной, полнокровие капилляров отмечалось только в группе V+Л12,5. Это свидетельствует о выраженном антиишемическом действии VEGF, который может быть обусловлен как прямым действием ростового фактора, так и VEGF-стимулированным раскрытием коллатеральных сосудов [24], образованием капилляров и в целом улучшением микроциркуляции. Противоишемический эффект VEGF слабо выражен в группе с введением липосом, содержащих VEGF в низкой дозировке. Можно предположить, что в случае с липосомальной формой ростового фактора это является «побочным эффектом» увеличения ее биодоступности. При введении в организм часть липосом могут разрушаться клет-

ками крови [18]. Кроме того, как было показано ранее, часть липосом поглощаются кардиомиоцитами и не достигают клеток-мишеней. В результате количество активного VEGF, оставшегося в ткани, оказывается ниже минимума, необходимого для оказания терапевтического эффекта. Однако подобной тенденции не наблюдается при введении липосом с 12.5 нг VEGF. Как нами было показано в тестах *in vitro*, липосомы с VEGF в высокой дозировке меньше поглощаются клетками, и более склонны агрегировать на мембране клетки. Таким образом, предположительно, липосомы такого состава меньше выводятся клетками крови и кардиомиоцитами, в большей степени будут депонироваться в межклеточном пространстве миокарда.

Таким образом, введение VEGF, в особенности в липосомальной форме, способствует увеличению выраженности и продолжительности воспаления. При этом отмечается антиишемическое действие свободного VEGF и липосомальной формы VEGF в высокой дозировке.

При анализе препаратов, окрашенных по Ван-Гизону не было выявлено выраженных различий между группами.

5.6 Оценка выраженности апоптоза в миокарде крыс после введения VEGF

Несмотря на то, что основные процессы при инфаркте миокарда связаны с некрозом кардиомиоцитов, исследования как на животных моделях, так и у людей демонстрируют высокую значимость апоптоза в патогенезе инфаркта. Показано, что апоптоз с высокой частотой возникает в зоне ишемии в первые сутки после инфаркта и, по-видимому, апоптоз является основной формой гибели клеток в первые часы после развития инфаркта [39]. В некоторых исследованиях показано также увеличение уровня апоптоза в миокарде вне зоны инфаркта. При этом частота возникновения апоптоза зависит от возраста: в экспе-

рименте на мышцах показано, что кардиомиоциты у старых животных более восприимчивы к ишемическому повреждению и демонстрируют более высокий уровень апоптоза [29].

Максимальный уровень апоптоза наблюдается в периинфарктной области. Со временем уровень апоптоза постепенно снижается, однако остается высоким, по крайней мере, в течение 4 недель. По-видимому, именно уровень апоптоза кардиомиоцитов в периинфарктной зоне является клинически значимым [39].

Для оценки выраженности апоптоза проводили TUNEL-анализ (метод TdT-опосредованной метки dUTP-конца разрыва цепи ДНК). В ходе анализа возникающие в процессе апоптоза множественные разрывы ДНК детектируются присоединением к образовавшимся свободным концам нитей ДНК олигонуклеотидов, несущих флуоресцентную метку. Ядра всех клеток докрашивают ядерным красителем. Подсчитывая отношение числа TUNEL-позитивных ядер к общему количеству ядер, оценивают интенсивность апоптоза в ткани.

В настоящем исследовании в группе контроля на 3 сутки отмечались лишь единичные TUNEL-положительные ядра кардиомиоцитов. В общем в группе индекс апоптоза составил 0,00 (таблица 5). На 7 сутки отмечается резкое увеличение апоптотически измененных ядер, что сопровождается повышением индекса апоптоза до 0,32 ($p < 0,05$). К 14 суткам значение показателя несколько снижалось и составило 0,24, различия с 3 сутками статистически значимы.

В группе V2,5 на 3 сутки после инъекции индекс апоптоза также был равен 0. На 7 сутки отмечалось появление апоптотически измененных ядер, индекс апоптоза составил 0,04, достоверно отличаясь от группы контроля. К 14 суткам значение показателя оставалось стабильным (0,05), различия с группой контроля оставались статистически значимыми.

Таблица 5 – 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**
V2,5	0,00	0,04±0,02*	0,06±0,04*
V+Л2,5	0,02±0,01	0,00*	0,15±0,06
V12,5	0,24±0,11*	0,29±0,12	0,11±0,85
V+Л12,5	0,12±0,06	0,00*	0,05±0,04*
Интakтные животные	0,00		

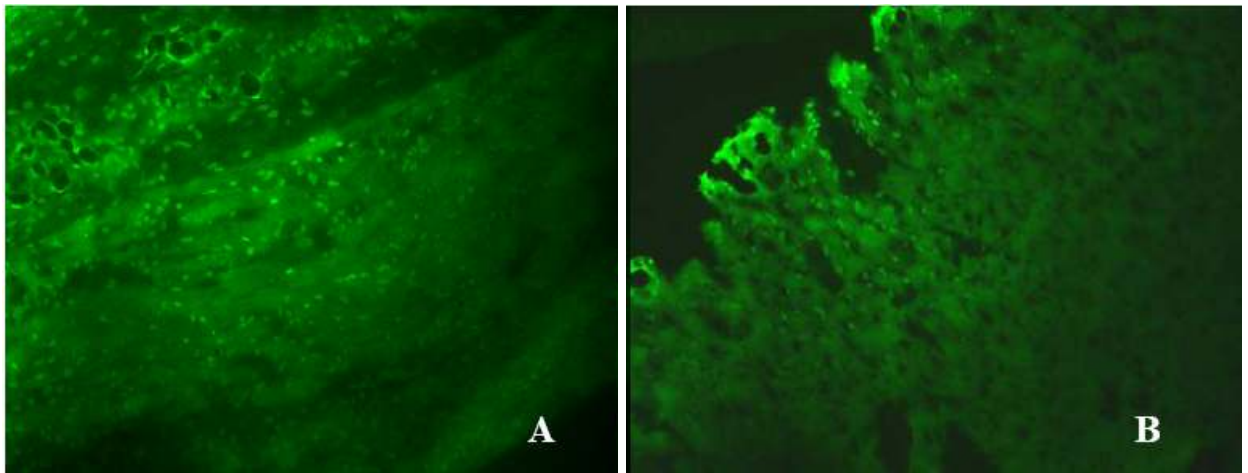
Примечания: * – $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой;

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

В группе V+Л2,5 на 3 сутки отмечалось небольшое количество TUNEL-позитивных ядер; индекс апоптоза был невелик – 0,02. На 7 сутки клетки на стадии апоптоза практически не обнаруживались. На 14 сутки наблюдалось выраженное увеличение индекса апоптоза до 0,13.

В группе V12,5 на 3 сутки наблюдения отмечается высокое значение индекса апоптоза – 0,22, достоверно отличающееся от контроля. К 7 суткам уровень апоптоза повышается (0,26). На 14 сутки отмечается уменьшение выраженности апоптоза до 0,1.

В группе V+Л12,5 на 3 сутки после инъекции наблюдается значительное количество апоптотически измененных ядер кардиомиоцитов, индекс апоптоза составил 0,11. К 7 суткам количество TUNEL-позитивных кардиомиоцитов значительно уменьшается, индекс апоптоза равен 0. На 14 сутки отмечается незначительное увеличение индекса апоптоза, до 0,05. Различия с группой контроля на 7 и 14 сутки наблюдения статистически значимы ($p < 0,05$).



А – контрольная группа

В – группа V+Л12,5

Рисунок 10 – TUNEL-реакция в миокарде на 14 сутки наблюдения, ув. x200

В нашем эксперименте мы отмечали увеличение апоптотически измененных клеток в контроле на отдаленных сроках наблюдения. Это не согласуется с данными литературы, согласно которым на начальных этапах наблюдения наблюдается наиболее высокая интенсивность апоптоза в зоне ишемии и пограничной зоне начиная с 1 суток после моделирования инфаркта.

Преобладает мнение, что VEGF является регулятором исключительно клеток эндотелия. Однако недавние исследования показали, что кардиомиоциты способны экспрессировать рецепторы VEGFR1, VEGFR2 [40]. Таким образом, может реализовываться непосредственное воздействие VEGF на кардиомиоциты.

В экспериментах *in vitro* показан антиапоптотический эффект, который напрямую оказывает VEGF-A на кардиомиоциты [40]. Это несколько противоречит результатам, полученным в нашем исследовании. Действительно, в любой точке наблюдения уровень апоптоза в экспериментальных группах был ниже максимального уровня апоптоза в контрольной группе (0,32). Однако на 3 сутки в большинстве экспериментальных группах наблюдалось повышенное значение индекса апоптоза относительно контрольной группы. Создается впечатление, что VEGF обладает как про- так и антиапоптотическим действием в отношении кардиомиоцитов.

Общая динамика проявления апоптоза заметно отличается в экспериментальных группах. При введении V2.5 в целом уровень апоптоза очень низок на всех этапах наблюдения. При введении V+Л12,5 уровень апоптоза незначительно повышен на 3 сутки наблюдения; отличием от предыдущей группы является тенденция к повышению значения апоптоза на 14 сутки наблюдения. При введении V12,5 отмечается максимальный среди экспериментальных групп уровень апоптоза на всех этапах наблюдения. Наконец, введение V+Л12,5 значительно уменьшает проявления апоптоза по сравнению с предыдущей группой.

Обобщая вышеописанную тенденцию, можно сказать, что VEGF в низкой дозировке обладает выраженным антиапоптотическим действием на всех сроках наблюдения. Использование его липосомальной формы доставки незначительно уменьшает его эффективность, особенно в отдаленные сроки наблюдения. В противоположность этому, VEGF в высокой дозе стимулирует апоптоз на ранних этапах наблюдения и ингибирует его на поздних сроках. По сравнению с этим, применение его липосомальной формы значительно уменьшает проявление апоптоза на всех сроках наблюдения, уменьшая повреждающее действие и увеличивая антиапоптотический эффект.

В литературе нет данных о прямом апоптотическом действии VEGF в отношении кардиомиоцитов. Однако в исследовании Giovanni Ferragì показано, что VEGF совместно с TGF стимулирует апоптоз эндотелиоцитов через VEGFR-2 [124]. Поскольку в недавних исследованиях было показано, что кардиомиоциты экспрессируют рецепторы к VEGF, в частности VEGFR-2, можно предположить существование аналогичного механизма стимуляции апоптоза в миокарде.

С другой стороны, известно, что VEGF обладает антиапоптотическим действием в отношении кардиомиоцитов. Этот эффект может реализовываться за счет различных механизмов. Во-первых, описано прямое воздействие на кардиомиоциты, ингибирующее апоптоз [40]. Во-вторых, VEGF может способствовать сохранению жизнеспособности опосредованно через уменьшение ишемии. VEGF способствует раскрытию существующих коллатеральных сосудов, а также стимулирует образование новых, что в конечном итоге улучшает кровоснабжение ткани

и уменьшает повреждение клеток вследствие ишемии. Применительно к нашему исследованию, этот механизм, видимо, будет играть ключевую роль на поздних этапах наблюдения.

Помимо действия VEGF необходимо также принимать во внимание протективное действие липосом. По литературным данным, липосомы являются самостоятельным терапевтическим агентом за счет фосфолипидов, входящих в их состав [16]. Также в тестах *in vitro* нами было показано, что липосомы улучшают выживаемость клеток в неблагоприятных условиях. Таким образом, липосомы также вносят вклад в уменьшение уровня апоптоза кардиомиоцитов. Помимо этого, липосомы обеспечивают пролонгированную доставку препарата, что объясняет антиапоптотический эффект VEGF в высокой дозировке в липосомальной форме в отдаленные сроки наблюдения. А также липосомы снижают токсическое действие высокой дозы VEGF на ранних этапах наблюдения за счет постепенного выхода препарата из липосом.

Таким образом, низкая доза VEGF обладает антиапоптотическим эффектом в отношении миокарда; применение высоких доз VEGF стимулирует апоптоз. Применение липосомальной формы высокой дозировки VEGF уменьшает повреждающее действие ростового фактора и обеспечивает длительное антиапоптотическое действие.

Резюме

Обобщая результаты по исследованию влияния препаратов VEGF на жизнеспособность постинфарктного миокарда, можно сказать, что, в зависимости от формы и концентрации, ростовой фактор может оказывать как повреждающее, так и протективное действие.

При сравнении результатов динамики содержания БСЖК и выраженности апоптоза в миокарде, очевидно, что повышение уровня БСЖК не всегда сопровождается увеличением количества нежизнеспособных клеток. В большинстве случаев принято считать, что выход в кровь БСЖК является маркером гибели кардиомиоцитов, однако по литературным данным известно, что, благодаря небольшим размерам, молекулы БСЖК могут проходить через мембрану живых клеток, нахо-

дящихся в неблагоприятных условиях; предположительно, это связано с изменением проницаемости мембраны [4]. Таким образом, увеличение БСЖК следует рассматривать как маркер неблагоприятного состояния миокарда, и прогностический маркер ухудшения ситуации, даже 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. На последних сроках наблюдения также увеличивается содержание клеток в состоянии апоптоза, а по результатам гистологического анализа, наблюдаются признаки ишемии, что в общем говорит о неблагоприятном развитии постинфарктного миокарда.

Применение свободного VEGF 12,5 нг 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.

Наиболее благоприятные результаты были получены в результате применения свободного VEGF 2,5 нг и липосомальной формы VEGF в высокой дозировке. 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 с свободной формой ростового фактора в аналогичной концентрации. Таким образом, применение липосомальной формы доставки уменьшает проявление токсичности включенного в ее состав препарата.

В отдаленный период наблюдения отмечалось снижение показателей апоптоза и БСЖК в группах с введением VEGF 2,5 и липосом, содержащих VEGF 12,5 по сравнению с остальными экспериментальными группами и группой контроля. Также в них не отмечалось признаков ишемии. Таким образом, по итогам 14 су-

ток наблюдения, в этих группах наблюдается более успешное течение процессов репарации миокарда после инфаркта.

5.7 Содержание некоторых про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови крыс

Инфаркт миокарда сопровождается инициацией воспалительного процесса. Поскольку при этом обеспечивается элиминация погибших клеток и активация репаративных процессов, воспаление является необходимым этапом постинфарктового восстановления миокарда. С другой стороны, избыточное воспаление провоцирует деградацию внеклеточного матрикса, апоптоз кардиомиоцитов. Поскольку решающую роль в инициации и ингибировании воспалительного каскада играют цитокины, их баланс имеет решающее значение для защиты миокарда от усугубления постинфарктного повреждения и дальнейшей дисфункции [42]. Наиболее значимы в патогенезе ИБС и инфаркта миокарда ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-1b, TNF-а [3], ИЛ-10, TGF- β [42].

Кроме этого, многие из этих цитокинов являются регуляторами неоангиогенеза. Одни напрямую влияют на жизнедеятельность эндотелиальных клеток, обеспечивая как их апоптоз, так и пролиферацию и миграцию. Другие воздействуют на синтез про- и антиангиогенных агентов эндотелиальными клетками и клетками окружения. Помимо ростовых факторов (VEGF, PDGF, bFGF), наиболее значимы для разных этапов ангиогенеза TNF, TGF, GM-CSF, некоторые интерлейкины (IL-1, IL-4, IL-13) и др [21].

Таким образом, процесс ангиогенеза, так же как и ремоделирование и репарация постинфарктного миокарда, контролируются большим количеством различных цитокинов. Поскольку все они связаны между собой сложной сетью взаимодействия и взаимной регуляции, добавление экзогенного VEGF может оказать влияние на цитокиновый баланс, и как следствие, на процессы восстановле-

ния миокарда. Принципиальная схема взаимодействия VEGF с цитокинами в миокарде представлена на рисунке 11. Поэтому для анализа как непосредственных эффектов интрамиокардиального введения VEGF, так и возможного системного влияния ростового фактора в сыворотке крови крыс определяли содержание некоторых про- и противовоспалительных цитокинов.

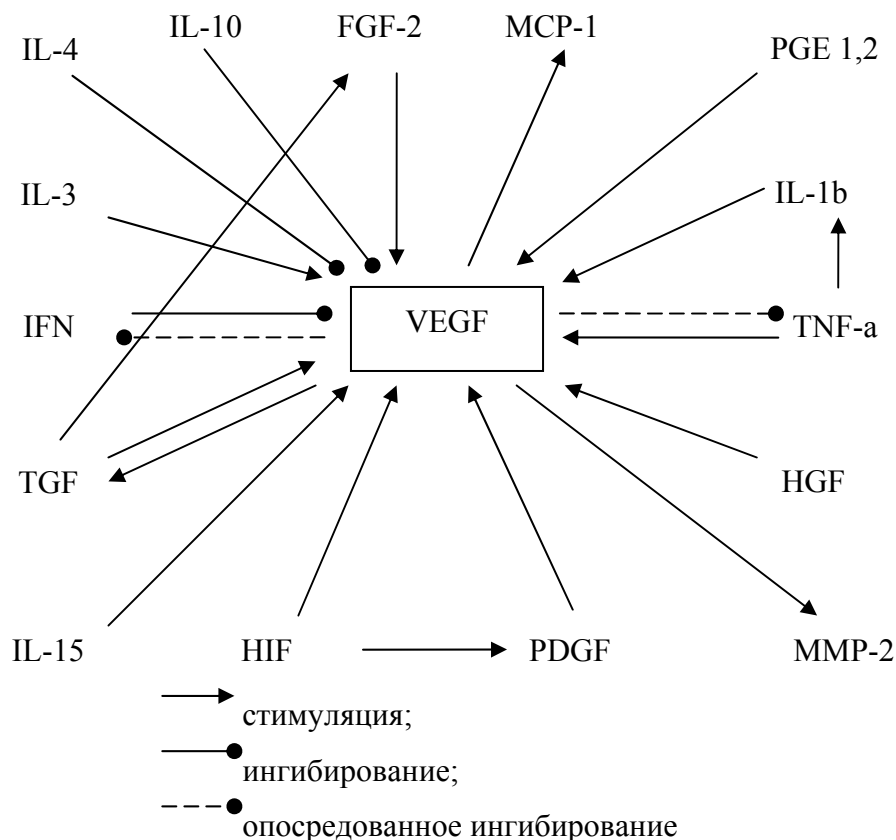


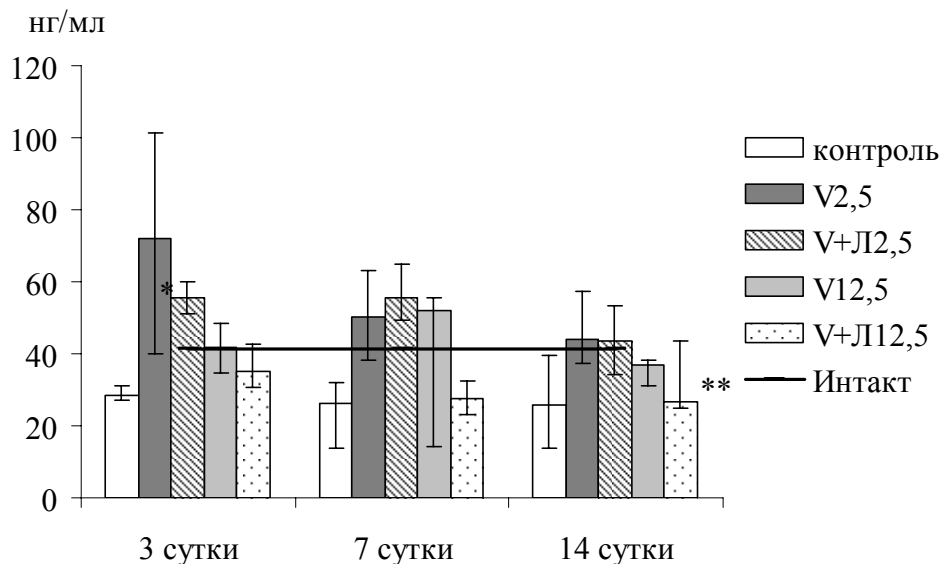
Рисунок 11 – Схема взаимодействия VEGF с основными цитокинами в миокарде.

5.7.1 Оценка содержания TGF- β в сыворотке крови крыс

Трансформирующий ростовой фактор это мультифункциональный белок, который контролирует пролиферацию, дифференцировку и апоптоз различных типов клеток, а также участвует в модуляции иммунного ответа [66]. Источником секреции TGF- β могут являться различные клетки, в первую очередь макрофаги, а

также эндотелиальные клетки, кардиомиоциты, и др. Поскольку TGF- β является активным регулятором интенсивности воспалительного процесса, а также проявляет антиапоптотическое действие в отношении кардиомиоцитов и играет ключевую роль в активации фибробластов и ремоделировании внеклеточного матрикса, он является важным участником репарации постинфарктного миокарда. Кроме того, TGF- β является одним из регуляторов процесса неоангиогенеза, на разных его этапах играя роль как про-, так и антиангиогенного цитокина. Таким образом, оценка содержания TGF- β представляется необходимым этапом при анализе эффективности терапевтического ангиогенеза.

У интактных животных уровень TGF- β составил 41,12 нг/мл. (рисунок 12). В группе контроля уровень TGF- β значительно снижен по сравнению со значением у интактных животных. На протяжении всего периода наблюдения содержание TGF- β остается стабильным, отмечаются лишь небольшие колебания значения показателя (макс – 28,53 нг/мл; мин - 25,91 нг/мл).



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

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

Рисунок 12 – Содержание TGF- β в сыворотке крови крыс, нг/мл

В группе с введением свободного VEGF в количестве 2,5 нг отмечается максимальный уровень TGF- β на 3 сутки, в 2,5 раза превышающий значения в

группе контроля ($p < 0,05$). В течение периода наблюдения содержание TGF- β в сыворотке снижается, на 14 сутки, приближаясь к значениям у интактных животных. Однако статистически значимых отличий внутри группы не наблюдается.

В группе с введением липосом с VEGF 2,5 нг на 3 сутки наблюдения отмечается повышенный уровень TGF- β , в 1,9 раза превышающий значение показателя в группе контроля ($p < 0,05$). На 7 сутки он остается на прежнем уровне, а к 14 суткам отмечена тенденция к снижению практически до значений интактных животных.

В группе с VEGF 12,5 на 3 сутки значение TGF- β сравнимо со значением у интактных животных, различия с группой контроля статистически значимы. На 7 сутки наблюдается тенденция к увеличению содержания TGF- β . На 14 сутки происходит статистически значимое снижение уровня показателя.

На 3 сутки после введения липосом, содержащих 12,5 нг VEGF уровень TGF- β несколько ниже, чем у интактных животных. К 7 суткам содержание TGF- β незначительно снижается, не изменяясь к 14 суткам наблюдения. В целом, в течение всего периода наблюдения уровень TGF- β в этой группе сопоставим со значением в группе контроля и значительно снижен по сравнению с показателем у интактных животных.

Таким образом, повышение секреции TGF- β наблюдается в группах с введением различных форм VEGF. Исключением является только группа V+Л12,5, в которой содержание TGF- β на протяжении всего срока наблюдения остается на уровне значений у группы с ложной операцией и ниже значения у интактных животных.

Влияние TGF- β на постинфарктное ремоделирование миокарда исследователями оценивается неоднозначно. С одной стороны, в эксперименте показано, что блокирование TGF- β при помощи растворимого рецептора TGF- β улучшает сердечную функцию, уменьшает размер зоны инфаркта [2]. С другой стороны, ингибирование TGF- β на ранних этапах воспалительной фазы инфаркта приводит к усугублению местной воспалительной реакции [36].

По литературным данным, после инфаркта миокарда наблюдается увеличение содержания TGF- β . По результатам анализа мРНК TGF- β , увеличение экспрессии ростового фактора наблюдается с 4 суток и продолжается до 8 недель после инфаркта [120]. При этом необходимо учитывать, что иммуноферментный анализ значительно менее чувствителен к уровню TGF; показано, что он может не отражать действительной динамики [74]. В нашем исследовании не наблюдается увеличения содержания TGF- β в контрольной группе, напротив, уровень ростового фактора в этой группе ниже, чем в группе интактных животных. Возможно, имеет место угнетение секреторной функции миокарда в отношении TGF- β вследствие травмирующего влияния операционных вмешательств. При этом восстановления секреции не наблюдается до конца периода наблюдения. Однако при введении препаратов VEGF в различной форме в большинстве случаев наблюдается статистически значимое увеличение секреции TGF- β . При этом статистически значимых отличий в динамике и между экспериментальными группами не отмечается, но наблюдалась сходная для большинства экспериментальных групп тенденция к уменьшению содержания ростового фактора к концу периода наблюдения.

Предположительно, на динамику TGF оказывает влияние механическое повреждение миокарда на этапе инъекции ростового фактора. Это провоцирует дополнительное усиление воспаления, что отражается в повышении уровня цитокинов.

Кроме того, необходимо принимать во внимание возможное взаимное регулирование. Биологически активных молекул. По литературным данным, TGF оказывает стимулирующее влияние на синтез VEGF [119, 51], в том числе и в условиях отсутствия гипоксии [85]. В эксперименте также было показано, что в свою очередь, VEGF стимулирует экспрессию TGF [89]. В нашем эксперименте, предположительно, VEGF в низкой дозе оказывает стимулирующее влияние на продукцию TGF, причем отдаленный эффект наблюдается в течение длительного времени, действие ростового фактора нивелируется к 14 суткам наблюдения.

Значительно отличается динамика содержания TGF- β в группе V+Л12,5: значение показателя у этих животных в течение всего периода наблюдения ниже, чем у интактных животных. Поскольку при введении свободного VEGF в количестве 12,5 нг на 3 сутки наблюдения также наблюдается снижение уровня TGF- β , можно предположить, что в высокой дозе VEGF напротив, обладает ингибирующим действием в отношении TGF- β . При этом при введении свободного VEGF его ингибирующее влияние на миокард относительно непродолжительно; к 7 суткам секреторная функция восстанавливается.

При введении липосом, содержащих 12,5 нг VEGF влияние ростового фактора более выражено. Как было описано ранее, в отношении данной формы ростового фактора наблюдается эффект депонирования в ткани миокарда. В этом случае при постепенном разрушении липосом наблюдается выход в кровоток включенного в их состав VEGF. Пролонгированная доставка ростового фактора в данном случае приводит к длительному (до 14 суток наблюдения) ингибированию секреции TGF.

Таким образом, введение низких доз VEGF вызывает повышенную секрецию TGF-В по сравнению с группой контроля. VEGF в высокой дозировке приводит к ингибированию TGF на ранних этапах наблюдения; липосомальная форма VEGF обладает более длительным ингибирующим действием.

5.7.2 Оценка содержания ИЛ-1 в сыворотке крови крыс

ИЛ-1 – провоспалительный цитокин, в миокарде синтезирующийся преимущественно макрофагами и фибробластами [2]. ИЛ-1 является основным медиатором воспалительных реакций, в том числе при повреждении тканей [50]. В отношении постинфарктной репарации миокарда роль ИЛ-1 обусловлена обеспечении воспалительной реакции на ранних этапах. Предполагается также, что он принимает некоторое участие в процессе развитии фиброза миокарда и ремоделирова-

нии внеклеточного матрикса [72]. В отношении процессов ангиогенеза ИЛ-1 выступает в качестве стимулятора пролиферации эндотелиальных клеток, а также оказывает выраженное влияние на синтез многих проангиогенных цитокинов как эндотелием, так и клетками окружения [21].

В нашем эксперименте уровень ИЛ-1 у интактных животных составил 20,14 пг/мл. (рисунок 13)

В группе с ложной операцией на 3 сутки содержание ИЛ-1 составило 31,36 пг/мл. На 7 сутки это значение оставалось практически неизменным, к 14 суткам уровень интерлейкина увеличивался до 33,42 пг/мл.

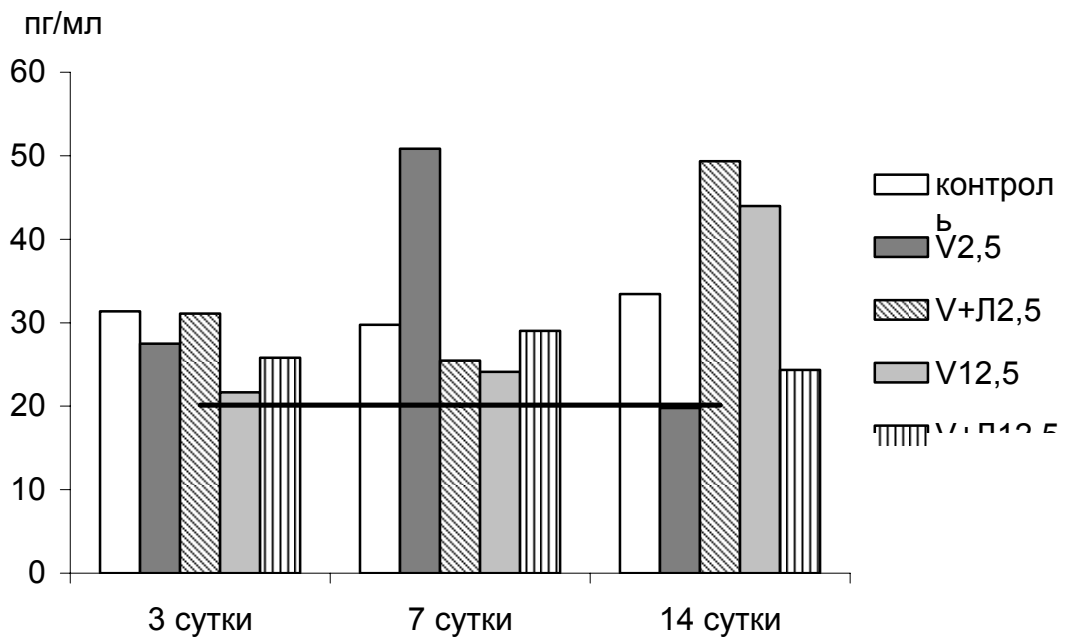


Рисунок 13 – Содержание ИЛ-1b в сыворотке крови крыс, пг/мл

В группе с введением свободной формы VEGF в количестве 2,5 нг уровень ИЛ-1 составил 27,48 пг/мл; в дальнейшем наблюдалось незначительное увеличение значения показателя на 7 сутки (31,36 пг/мл) с последующим снижением на 14 сутки до 19,78 пг/мл.

При введении липосомальной формы VEGF в низкой дозе динамика показателя отличалась: на 3 сутки уровень ИЛ-1 был сопоставим со значением в контрольной группе (31,08 пг/мл). На 3 сутки отмечалось некоторое снижение значения показателя, затем на 14 сутки – резкое увеличение до 49,36 пг/мл.

В группе с введением свободного VEGF в высокой дозировке (12,5нг) уровень ИЛ-1 приближался к значению у интактных животных и составил 21,65 пг/мл. К 14 суткам наблюдалось увеличение содержания интерлейкина до 43,98 пг/мл.

В группе V+Л12,5 в течение периода наблюдения отмечались лишь незначительные колебания уровня интерлейкина, с максимальным значением на 7 сутки (29,01 пг/мл) и минимальным на 14 сутки (24,34 пг/мл).

При анализе концентрации интерлейкина-1 в экспериментальных группах не было отмечено статистически значимых различий между группами и с контрольными значениями.

По данным литературы, уровень ИЛ-1 повышается в первые несколько часов после развития инфаркта [38]. Затем к 3 суткам значения снижаются до уровня ложнооперированных животных. Полученные нами результаты в целом соотносятся с литературными данными: в контрольной и в большинстве экспериментальных групп не наблюдается выраженного изменения содержания ИЛ-1 в течение всего периода наблюдения. Наблюдается тенденция к увеличению содержания ИЛ-1 на 14 сутки в группах с введением липосом, содержащих 2,5 нг VEGF и свободного VEGF 12,5 нг. Однако с учетом отдаленности времени подъема ИЛ-1 от времени инъекции ростового фактора, отмеченный эффект нельзя считать следствием непосредственного действия VEGF.

Кроме того, ИЛ-1 регулирует в первую очередь развитие местной реакции; в крови отслеживаются следовые количества цитокина, которые могут быть недостаточно информативными и не отражать в полной мере процессы, происходящие в миокарде. Предположительно, повышение ИЛ-1 в отдаленные сроки наблюдения может быть проявлением воспалительной реакции на фоне ишемии миокарда; однако данные о динамике провоспалительных цитокинов при ИБС неполны и противоречивы.

Также на уровень ИЛ-1 оказывает влияние содержание других цитокинов. ИЛ-1 является важным регулятором ангиогенеза; показано, что ИЛ-1 оказывает стимулирующее влияние на выработку VEGF [91]. С другой стороны, VEGF

уменьшает интенсивность воспаления, и таким образом может оказывать косвенное ингибирующее влияние на секрецию IL-1.

Таким образом, введение разных доз VEGF как в свободной, так и в липосомальной форме, не оказывает влияния на уровень IL-1 в указанный период наблюдения.

5.7.3 Оценка содержания TNF- α в сыворотке крови крыс

TNF- α медиатор воспаления, синтезирующийся преимущественно моноцитами/макрофагами [21]. Повышенное содержание TNF- α обуславливает клеточные изменения, способствующие патологическому ремоделированию сердца, включая гипертрофию КМЦ, апоптоз, а также изменения состава внеклеточного матрикса [2]. В отношении эндотелиальных клеток TNF- α выступает в качестве регулятора экспрессии адгезионных молекул, синтеза цитокинов. В зависимости от количества и времени экспозиции, TNF- α проявляет как про- так и антиангиогенные свойства за счет индукции апоптоза эндотелиальных клеток с одной стороны, и участия в деградации базальной мембраны на ранних этапах ангиогенеза, с другой [21].

В отсутствие патологических процессов в сыворотке крови не отмечается содержание TNF- α .

В нашем эксперименте в большинстве случаев уровень TNF- α оказывался ниже определяемого минимума (таблица 6). На 3 сутки наблюдения увеличение содержания TNF- α отмечалось только в группе с введением свободного VEGF в высокой дозировке. На 7 сутки наблюдалось повышение уровня цитокина в группе V2,5, на 14 сутки – в группе V+I2,5.

Статистически значимых различий в динамике и между группами не отмечается.

Таблица 6 – Содержание TNF-а в сыворотке крови крыс

Группы	Сроки наблюдения		
	3 сутки	7 сутки	14 сутки
Контроль	0,00 (0,00;0,00)	0,00 (0;00; 11,22)	0,00 (0,00;0,00)
V2,5	0,00 (0,00; 36,56)	26,62(0;00; 245,6)	0,00 (0,00;0,00)
V+Л2,5	0,00 (0,00; 1,95)	0,00 (0,00;0,00)	2,29 (0,00;23,33)
V12.5	10,11 (0,00; 20,60)	0,00 (0,00;0,00)	0,00 (0,00; 16,21)
V+Л12.5	0,00 (0,00;0,00)	0,00 (0,00;0,00)	0,00 (0,00;9,23)
Интакт	0,00 (0,00;0,00)		

Хотя по данным литературы постинфарктное ремоделирование миокарда сопровождается повышенным содержанием TNF в нашем эксперименте мы не обнаруживали увеличения содержания цитокина. Наблюдаемые изменения динамики TNF в целом носят бессистемный характер. Это может объясняться как невысокой интенсивностью воспаления после повреждения миокарда, так и ингибирующим влиянием операционных вмешательств. Кроме того, известно, что VEGF проявляет противовоспалительный эффект. Следствием этого может быть снижение уровня провоспалительных цитокинов. В целом, прослеживается слабо выраженная тенденция обратной зависимости сывороточного содержания VEGF и TNF. Можно предположительно говорить об отрицательной обратной связи между ними.

Таким образом, интрамиокардиальное введение VEGF не оказывает выраженного влияния на сывороточный уровень TNF- α .

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ишемическая болезнь сердца и ее осложнения занимают лидирующее место среди причин смертности и инвалидизации населения в развитых странах. Поэтому одной из актуальных задач на сегодняшний день остается разработка новых и улучшение эффективности существующих методов лечения сердечно-сосудистых заболеваний. Одним из эффективных подходов к улучшению кровоснабжения ишемизированной ткани заключается в применении ростовых факторов для стимуляции естественного процесса образования и роста сосудов. Так, многочисленные экспериментальные исследования продемонстрировали потенциальную эффективность применения VEGF в терапии ишемических поражений. Однако результаты клинических испытаний показали неоднозначные результаты. Кроме того, применение ростовых факторов, особенно в высокой дозировке, может быть сопряжено с различными побочными эффектами. Также, в связи с очень небольшим временем циркуляции VEGF в кровотоке необходимо решить проблему пролонгированной доставки ростового фактора к миокарду.

Для оптимизации применения VEGF могут быть использованы системы доставки, такие как липосомы. Известно, что липосомы меняют фармакокинетику включенных в их состав фармакологических агентов, позволяя уменьшить дозировку активного вещества, исключить негативные побочные эффекты, сохранив при этом терапевтическую активность препарата.

Исходя из этого, целью нашего исследования явилась оценка эффективности применения липосомальной формы сосудисто-эндотелиального ростового фактора в терапии экспериментального инфаркта миокарда.

На первом этапе исследования была проведена оценка взаимодействия липосом с клетками в условиях *in vitro*. Показано, что включение VEGF в состав липосом значительно изменяет их свойства. Действительно, при длительной инкубации «пустых» липосом с клетками наблюдалось значительное их поглощение и внутриклеточное накопление. При включении VEGF в состав липосом сохраняется эффект поглощения липосом, однако в большей степени наблюдалась их адгезия

к клеточной мембране. При этом указанная закономерность проявлялась более выражено при увеличении количества VEGF: для липосом, содержащих 12,5 нг VEGF, более характерно прилипание к поверхности клеточной мембраны, однако также наблюдается незначительное поглощение или обмен липидами между липосомой и клеточной мембраной.

При оценке органного распределения липосом показано, что данный эффект обеспечивает депонирование липосом после их интрамиокардиального введения. Липосомы относительно слабо поглощаются близлежащими клетками и таким образом сохраняются в межклеточном пространстве миокарда на срок, по меньшей мере, до 3 суток после инъекции. При этом данный эффект зависит от размера липосом: депонирования липосом в миокарде не наблюдалось при использовании липосом размером 50 нм. Липосомы меньшего размера более интенсивно взаимодействуют с клетками, поэтому при введении в миокард в значительной степени поглощаются кардиомиоцитами. Также было показано, что при введении липосом в системный кровоток не наблюдается накопления их в миокарде вне зависимости от их размера. Следовательно, интрамиокардиальное введение следует считать оптимальным путем доставки используемых липосомальных препаратов к ишемизированному миокарду, при этом липосомы размером 100 нм являются наиболее эффективной системой доставки ростового фактора. Также липосомы при любом способе введения в значительной степени поглощаются клетками печени и селезенки и, по-видимому, выводятся почками.

Депонированные в миокарде липосомы постепенно разрушаются, и заключенный в их внутренней фазе VEGF выходит в окружающие ткани. Введение препарата ростового фактора на 3 суток после инфаркта позволяет поддерживать естественный повышенный в результате гипоксии уровень VEGF. 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 12,5 нг VEGF, наблюдается повышение уровня ростового фактора на срок до 7 суток после инъекции. Для сравнения, при введении свободной формы VEGF в разных дозировках и липосом, содержащих 2,5 нг VEGF, отмеча-

лось увеличение содержания VEGF в отдаленные сроки наблюдения, 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.

Следствием длительного увеличения содержания VEGF является стимуляция процесса ангиогенеза. Действительно, нами показано значительный прирост сосудистой плотности уже на 3 сутки после интрамиокардиального введения V+Л12,5. При этом наблюдалось большое количество мелких сосудов, что свидетельствует об интенсивном процессе неоваскуляризации. Уровень сосудов значительно превышал показания в группе контроля в течение всего периода наблюдения. Подобный результат мы не наблюдали при введении свободной формы VEGF в аналогичной дозе и при использовании более низкой дозы VEGF. Таким образом, интрамиокардиальное введение V+Л12,5 в сочетании с естественным повышением уровня VEGF после инфаркта, обеспечивает значительную активацию процесса образования сосудов и, следовательно, является эффективным средством улучшения кровоснабжения ишемизированной ткани.

При оценке системного уровня VEGF не было обнаружено связи с выраженностью неоваскуляризации в миокарде. Кроме того, в литературе есть указания, что сывороточный уровень VEGF не следует рассматривать как однозначный маркер ангиогенеза. По результатам анализа можно заключить, что уровень VEGF в экспериментальных группах не превышал таковой в группе контроля. Таким образом, интрамиокардиальное введение препаратов VEGF не влечет за собой значительного повышения уровня рогового фактора в сыворотке крови по сравнению с его естественным уровнем. Следовательно, можно признать низкой вероятность развития системных VEGF-ассоциированных осложнений.

В тестах *in vitro* было показано, что как «пустые» липосомы, так и липосомы с VEGF увеличивают выживаемость клеток в неблагоприятных условиях. Липосомы могут рассматриваться в качестве самостоятельного фармакологического агента, так как входящие в их состав фосфолипиды обладают выраженными мембраностабилизирующими свойствами. Поскольку развитие ишемических повреждений ткани ассоциировано с нарушением проницаемости и функционирования

клеточных мембран, применение липосом является средством сохранения жизнеспособности ткани.

Влияние липосомальных препаратов на жизнеспособность постинфарктного миокарда продемонстрировано в исследовании уровня апоптоза кардиомиоцитов и сывороточного уровня БСЖК. Поскольку БСЖК рассматривается не только как маркер некроза кардиомиоцитов, но и ишемии, повышение его уровня является признаком неблагоприятного течения репарации миокарда.

В ходе исследования было показано, что невысокая доза VEGF уменьшает ишемическое повреждение миокарда. Это доказывается низким значением индекса апоптоза, а также пониженным уровнем БСЖК в сыворотке крови. С другой стороны, его включение в состав липосом позволяет сохранить антиапоптотический эффект, однако приводит к значительному повышению уровня БСЖК, в том числе и в отдаленном периоде, что является неблагоприятным прогнозом.

Анализ результатов применения VEGF 12,5 показал, что высокая доза VEGF обладает повреждающим действием, о чем свидетельствует повышение количества апоптоз-измененных кардиомиоцитов и увеличение содержания БСЖК на раннем этапе наблюдения. Увеличение БСЖК в отдаленные сроки наблюдения позволяет сделать вывод о нарастании ишемии в ткани, и, следовательно, недостаточной перфузии. При этом включение VEGF в аналогичной дозировке позволило значительно снизить повреждающий эффект ростового фактора. Достоверно значимое уменьшение апоптоза кардиомиоцитов к концу периода наблюдения говорит о возможности сохранения жизнеспособного миокарда при применении липосом с 12,5 нг VEGF. Значительное снижение уровня БСЖК также позволяет говорить о снижении ишемической нагрузки на миокард.

Инъекция препаратов в миокард неизбежно сопровождается воспалительной реакцией в ответ на механическое повреждение, что подтверждается данными гистологического исследования. В большей степени этот эффект выражен при введении липосомальных форм VEGF. Однако в большинстве экспериментальных групп к концу периода наблюдения отмечалось уменьшение воспаления до уровня контрольной группы. В контрольной группе наблюдались признаки ишемии

миокарда. Среди экспериментальных групп такое состояние отмечалось только при введении липосом, содержащих 2,5 нг VEGF.

При анализе уровня про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови было отмечено, что введение низких доз VEGF вызывает повышенную секрецию TGF-В по сравнению с группой контроля. Введение свободной формы VEGF в количестве 12,5 нг приводит к ингибированию TGF на ранних этапах наблюдения. Использование липосомальной формы VEGF в той же дозировке обеспечивает поступление в миокард VEGF в течение более длительного промежутка времени, и таким образом приводит к более длительному ингибирующему эффекту в отношении TGF.

Полученные результаты позволили сформулировать гипотезу о механизме действия липосомальной формы VEGF на миокард в условиях экспериментального инфаркта (рисунок 14).

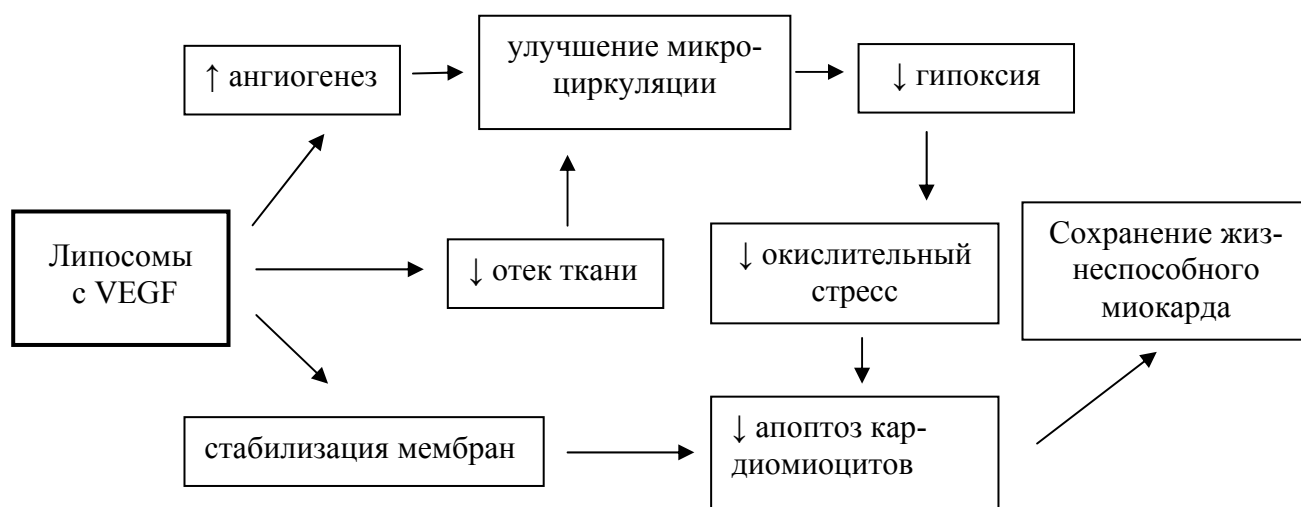


Рисунок 14 – Схема механизма кардиопротективного действия липосомальной формы VEGF на постинфарктный миокард.

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 липосомы, содержащие VEGF 12,5 нг, образуют 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 с VEGF 12,5 нг уменьшает степень повреждения миокарда после инфаркта. Это выражается в увеличении количества жизнеспособных кардиомиоцитов, снижении показателей ишемии миокарда (уровень БСЖК, полнокровие сосудов); уменьшении отека ткани..

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- АКШ – аорто-коронарное шунтирование
- АТФ - аденозинтрифосфат
- БСЖК – белок, связывающий жирные кислоты
- ИБС – ишемическая болезнь сердца
- МСК – мезенхимальные стволовые клетки
- ПЛ – «пустые» липосомы
- ЭК – эндотелиальные клетки
- ЭПК – эндотелиальные прогениторные клетки
- ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка
- DMEM – Dulbecco modified Eagle's medium, модифицированная по способу Дульбекко среда Игла
- FGF-b – Basic Fibroblast Growth Factor, фактор роста фибробластов, основная форма
- HIF – Hypoxia-inducible factor, индуцируемый гипоксией фактор
- IL-1b – Interleukin-1 beta, интерлейкин-1 бета
- MMP – matrix metalloproteinase, матриксная металлопротеиназа
- PDGF-b – Platelet-derived growth factor, фактор роста тромбоцитов
- PLGF – placental growth factor, плацентарный фактор роста
- PBS – фосфатно-солевой буфер
- TGF-b – Transforming growth factor, трансформирующий ростовой фактор
- TIMP – tissue inhibitor of matrix metalloprotease-1, тканевой ингибитор металлопротеиназ-1
- TNF-a – Tumor necrosis factor, фактор некроза опухоли
- TUNEL – Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling, метод TdT-опосредованной метки dUTP-конца разрыва цепи ДНК
- VEGF – Vascular endothelial growth factor, фактор роста эндотелия сосудов

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ангиогенез как антиишемический механизм / Ю. И. Бузиашвили, Е. Picano, С. Г. Амбатьелло и др. // Кардиология. – 2000. – № 12. – С. 82–86.
2. Беловол, А. Н. Клеточные, молекулярные и структурные механизмы ремоделирования левого желудочка при сердечной недостаточности / А. Н. Беловол, И. И. Князькова // Практична ангіологія. – 2013. – № 4. – С. 53–65.
3. Богова, О. Т. Инфаркт миокарда. Воспаление и прогноз / О. Т. Богова, И. И. Чукаева // Российский кардиолог. журн. – 2003. – № 4. – С. 56–61.
4. Динамика уровня белка, связывающего жирные кислоты, и мозгового натрийуретического пептида у больных ишемической болезнью сердца на фоне нагрузочной пробы и баллонной коронарной ангиопластики / И. В. Сергиенко, В. П. Масенко, А. Е. Семенова и др. // Кардиология. – 2000. – № 12. – С. 26–29.
5. Динамика уровня эндогенных регуляторов клеточного роста и ее взаимосвязь с интенсивностью цитолитического процесса при инфаркте миокарда [Электронный ресурс] / М. Г. Шурыгин, И. А. Шурыгина, Н. Н. Дремина и др. // ЭскулаБ : электрон. бюл. – 2009. – № 1 (1). – URL : http://conf.sqlab.ru/css_menu.php (21.04.2014).
6. Дремина, Н. Н. Изменение микроциркуляторного компонента миокарда под воздействием фактора роста эндотелия сосудов в постинфарктный период / Н. Н. Дремина, М. Г. Шурыгин, И. А. Шурыгина // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2008. – № 4 (62). – С. 73–75.
7. Ипатова, О. М. Фосфоглив : механизм действия и применение в клинике / О. М. Ипатова; под ред. академика РАМН А. И. Арчакова. – М. : Изд-во ГУ НИИ биомедицинской химии РАМН, 2005. – 318 с.
8. Кардиоспецифические биомаркеры в кардиологии и кардиохирургии. Часть 1. Общая характеристика биомаркеров / М. А. Черная, И. И. Дементьева, Ю. А. Морозов и др. // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. – 2010. – № 3. – С. 26–33.

9. Коваль, С. Н. Семейство васкулоэндотелиального фактора роста и его возможная роль в патогенезе артериальных гипертензий [Электронный ресурс] / С. Н. Коваль, И. А. Снегурская, О. В. Мысниченко // Артериальная гипертензия. – 2012. – № 4 (24). – URL : <http://www.mif-ua.com/archive/article/33320> (16.05.2014).

10. Коненков, В. И. Ангиогенез и васкулогенез при сахарном диабете: новые концепции патогенеза и лечения сосудистых осложнений / В. И. Коненков, В. В. Климонтов // Сахарный диабет. – 2012. – № 4. – С. 17–27.

11. Парфенова, Е. В. Терапевтический ангиогенез: достижения, проблемы, перспективы / Е. В. Парфенова, В. А. Ткачук // Кардиологический вестн. – 2007. – № 2. – С. 5–15.

12. Патогенетические аспекты постинфарктного ремоделирования миокарда / Н. П. Митьковская, О. Г. Нижникова, Т. В. Статкевич и др. // Медицинский журн. – 2013. – № 1. – С. 12–18.

13. Повышенный уровень белка, связывающего жирные кислоты, как предиктор осложнений острого инфаркта миокарда / Б. Г. Андрюков, В. Г. Сейидов, Т. П. Габасова и др. // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2012. – № 01-02 (47-48). – С. 173–176.

14. Провоспалительные цитокины у больных с острым ишемическим инсультом и инфарктом миокарда / В. И. Скворцова, Е. В. Константинова, М. Х. Шурдумова и др. // Неврологический вестн. – 2007. – № 1. – С. 22–25.

15. Прогностическое значение белка, связывающего жирные кислоты, у госпитализированных из-за ухудшения сердечной недостаточности больных. Результаты 6-12-месячного наблюдения / О. Л. Мазовец, И. Р. Трифонов, А. Г. Катруха и др. // Кардиология. – 2008. – Т. 48, № 1. – С. 24–29.

16. Селищева, А. А. Принципы создания новых форм лекарственных препаратов и биологически активных соединений солюбилизацией липосомами : автореф. дис. ... д-ра химич. наук : 03.00.23 / А. А. Селищева. – М., 2007. – 21 с.

17. Терапевтический ангиогенез при заболеваниях внутренних органов – возможности и перспективы / С. Н. Коваль, Д. К. Милославский, И. А. Снегурская и др. // Вестн. проблем биологии и медицины. – 2013. – № 4 (1). – С. 1–8.

18. Третьякова, О. С. Нанотехнологии в практике кардиолога. Часть I. Липосомы как идеальные средства доставки лекарственных препаратов [Электронный ресурс] / О. С. Третьякова, И. В. Заднипряный // Здоровье ребенка. – 2009. – № 3 (18). – URL : <http://www.mif-ua.com/archive/article/8716> (18.07.2014).

19. Уровень в крови белка, связывающего жирные кислоты в первые часы после острой ишемии миокарда после проведения успешного тромболиза : прогноз и рискметрия осложнений / Б. Г. Андрюков, Е. А. Гельман, Т. В. Габасова и др. // Фундаментальные исследования. – 2008. – № 2 – С. 25–27.

20. Ушкалова, Е. А. Место эссенциальных фосфолипидов в современной медицине / Е. А. Ушкалова // Фарматека. – 2003. – № 10 (73). – С. 10–15.

21. 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.

22. Шимановский, Н. Л. Молекулярная и нанофармакология / Н. Л. Шимановский, М. А. Епинетов, М. Я. Мельников. – М. : ФИЗМАТЛИТ, 2010. – 624 с.

23. 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.

24. Эффективность и безопасность применения препарата «Неоваскулген» в комплексной терапии пациентов с хронической ишемией нижних конечностей (IIb-III фаза клинических испытаний) / П. Г. Швальб, А. В. Гавриленко, Р. Е. Калинин и др. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – № VI (3). – С. 76–83.

25. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes / A. L. Klibanov, K. Maruyama, V. P. Torchilin, L. Huang // FEBS Lett. – 1990. – Vol.268. – P.235–237

26. A myocardial patch made of collagen membranes loaded with collagen-binding human vascular endothelial growth factor accelerates healing of the injured rabbit heart / J. Gao, J. Liu, Y. Gao et al. // *Tissue Eng. Part A.* – 2011. – Vol. 17, № 21-22. – P. 2739–2747.

27. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage / G. Thurston, J. S. Rudge, E. Ioffe et al. // *Nat. Med.* – 2000. – Vol. 6, № 4. – P. 460–463.

28. Antibody-targeted liposomes: increase in specific toxicity of methotrexate-gamma-aspartate / T. D. Heath, J. A. Montgomery, J. R. Piper, D. Papahadjopoulos // *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* – 1983. Vol.80. – P.1377–1381

29. Apoptosis in myocardial ischemia and infarction / P. A. Krijnen, R. Nijmeijer, C. J. Meijer et al. // *J. Clin. Pathol.* – 2002. – Vol. 55, № 11. – P. 801–811.

30. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar / A. Desmouliere, M. Redard, I. Darby et al. // *Am. J. Pathol.* – 1995. – Vol. 146, № 1. – P. 56–66.

31. Arias, J. L. Liposomes in drug delivery: a patent review / J. L. Arias // *Expert Opin. Ther. Pat.* – 2013. – Vol. 23, № 11. – P. 1399–1414.

32. Baumgartner, I. Angiogenesis and cardiovascular disease : what are the risks? / I. Baumgartner // *Dialogues in Cardiovascular Medicine.* – 2001. – Vol. 6, № 3. – P. 182–189.

33. Biodegradable collagen patch with covalently immobilized VEGF for myocardial repair / Y. Miyagi, L. L. Chiu, M. Cimini et al. // *Biomaterials.* – 2011. – Vol. 32, № 5. – P. 1280–1290.

34. Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues / L. B. Jakeman, J. Winer, G. L. Bennett, C. A. Altar, N. Ferrara // *J. Clin. Invest.* – 1992. – Vol.89. – P.244–253

35. Bowey, K. Liposome technology for cardiovascular disease treatment and diagnosis / K. Bowey, J. F. Tanguay, M. Tabrizian // *Expert Opin. Drug Deliv.* – 2012. – Vol. 9, № 2. – P. 249–265.

36. Bujak, M. The role of TGF- β signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling / M. Bujak, N. G. Frangogiannis // *Cardiovasc. Res.* – 2007. – Vol. 74, № 2. – P. 184–195.
37. Cai, W. Mechanisms of arteriogenesis / W. Cai, W. Schaper // *Acta Biochim. Biophys. Sin.* – 2008. – Vol. 40, № 8. – P. 681–692.
38. Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. Experimental studies in rats / A. Deten, H. C. Volz, W. Briest et al. // *Cardiovasc Res.* – 2002. – Vol. 55, № 2. – P. 329–340.
39. Cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling after myocardial infarction in rats / E. Palojoki, A. Saraste, A. Eriksson et al. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2001. – Vol. 280, № 6. – P. H2726–H2731.
40. Cardiomyocyte VEGFR-1 activation by VEGF-B induces compensatory hypertrophy and preserves cardiac function after myocardial infarction / L. Zentilin, U. Puligadda, V. Lionetti et al. // *FASEB J.* – 2010. – Vol. 24, № 5. – P. 1467–1478.
41. Carmeliet, P. Angiogenesis in life, disease and medicine / P. Carmeliet // *Nature.* – 2005. – Vol. 438. – P. 932–936.
42. Christia, P. Targeting inflammatory pathways in myocardial infarction / P. Christia, N. G. Frangogiannis // *Eur. J. Clin. Invest.* – 2013. – Vol. 43, № 9. – P. 986–995.
43. Chu, H. Therapeutic angiogenesis: controlled delivery of angiogenic factors / H. Chu, Y. Wang // *Ther. Deliv.* – 2012. – Vol. 3, № 6. – P. 693–714.
44. Cochain, C. Angiogenesis in the Infarcted Myocardium / C. Cochain, K. M. Channon, J. S. Silvestre // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2013. – Vol. 18, № 9. – P. 1100–1113.
45. Complementary therapeutic effects of dual delivery of insulin-like growth factor-1 and vascular endothelial growth factor by gelatin microspheres in experimental heart failure / A. Cittadini, M. G. Monti, V. Petrillo et al. // *Eur. J. Heart Fail.* – 2011. – Vol. 13, № 12. – P. 1264–1274.
46. Cross, M. J. FGF and VEGF function in angiogenesis / M. J. Cross, L. Claesson-Welsh // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2001. – Vol. 22, № 4. – P. 201–207.

47. Dai, J. VEGF : an Essential Mediator of Both Angiogenesis and Endochondral Ossification / J. Dai, A. B. Rabie // *J. Dent. Res.* – 2007. – Vol. 86, № 10. – P. 937–950.

48. Development of cell injury in sustained acute ischemia / R. B. Jennings, C. E. Murry, C. Jr. Steenbergen et al. // *Circulation.* – 1990. – Vol. 82, 3 suppl. – P. II2–12.

49. Differential expression of vascular endothelial growth factor isoforms and receptor subtypes in the infarcted heart / T. Zhao, W. Zhao, Y. Chen et al. // *Int. J. Cardiol.* – 2013. – Vol. 167, № 6. – P. 2638–2645.

50. Dinarello, C. A. Proinflammatory cytokines / C. A. Dinarello // *Chest.* – 2000. – Vol. 118, № 2. – P. 503–508.

51. Distortion of autocrine transforming growth factor beta signal accelerates malignant potential by enhancing cell growth as well as PAI-1 and VEGF production in human hepatocellular carcinoma cells / Y. Sugano, K. Matsuzaki, Y. Tahashi et al. // *Oncogene.* – 2003. – Vol. 22, № 15. – P. 2309–2321.

52. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction / S. H. Lee, P. L. Wolf, R. Escudero et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2000. – Vol. 342, № 9. – P. 626–633.

53. Elbayoumi, T. A. Current Trends in Liposome Research / T. A. Elbayoumi, V. P. Torchilin // *Methods Mol. Biol.* – 2010. – № 605. – P. 1–27.

54. Elevated Serum Heart-Type Fatty Acid-Binding Protein in the Convalescent Stage Predicts Long-Term Outcome in Patients Surviving Acute Myocardial Infarction / S. Matsumoto, D. Nakatani, Y. Sakata et al. // *Circ. J.* – 2013. – Vol. 77, № 4. – P. 1026–1032.

55. Endothelial HIF-2alpha regulates murine pathological angiogenesis and revascularization processes / N. Skuli, A. J. Majmundar, B. L. Krock et al. // *J. Clin. Invest.* – 2012. – Vol. 122, № 4. – P. 1427–1443.

56. Endothelial-cardiomyocyte crosstalk enhances pharmacological cardioprotection / T. M. Leucker, M. Bienengraeber, M. Muravyeva et al. // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 2011. – Vol. 51, № 5. – P. 803–811.

57. Experimental myocardium infarction in rats: analysis of the model / L. A. Zornoff, S. A. Paiva, M. F. Minicucci et al. // *Arq. Bras. Cardiol.* – 2009. – Vol. 93, № 4. – P. 434–440, 426–432.
58. Ferrara, N. The biology of VEGF and its receptors / N. Ferrara, H. P. Gerber, J. Le Couter // *Nat. Med.* – 2003. – Vol. 9, № 6. – P. 669–676.
59. Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium / T. P. Quinn, K. G. Peters, C. de Vries et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1993. – Vol. 90. – P. 7533–7537
60. Folkman, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid, and other disease / J. Folkman // *Nat. Med.* – 1995. – Vol. 1, № 1. – P. 27–31.
61. Frangogiannis, N. G. The Mechanistic Basis of Infarct Healing / N. G. Frangogiannis // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2006. – Vol. 8, № 11-12. – P. 1907–1939.
62. Gerber, H. P. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells / H. P. Gerber, V. Dixit, N. Ferrara // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273, № 21. – P. 13313–13316.
63. Haunstetter, A. Apoptosis : basic mechanisms and implications for cardiovascular disease / A. Haunstetter, S. Izumo // *Circ. Res.* – 1998. – Vol. 82, № 11. – P. 1111–1129.
64. He, W. Ischemia-induced copper loss and suppression of angiogenesis in the pathogenesis of myocardial infarction / W. He, Y. James Kang // *Cardiovasc. Toxicol.* – 2013. – Vol. 13, № 1. – P. 1–8.
65. Heart-type fatty acid-binding protein may exclude acute myocardial infarction on admission to emergency department for chest pain / F. Cappellini, S. Da Molin, S. Signorini et al. // *Acute Card. Care.* – 2013 – Vol. 15, № 4. – P. 83–87.
66. Heldin, C-H. TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins / C-H. Heldin, K. Miyazono, P. Dijke // *Nature.* – 1997. – Vol. 390, № 6659. – P. 465–471.
67. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene / N. Ferrara, K. Carver Moore, H. Chen et al. // *Nature.* – 1996. – Vol. 380, № 6573. – P. 439–442.

68. Hochman, J. S. Expansion of acute myocardial infarction: an experimental study / J. S. Hochman, B. H. Bulkley // *Circulation*. – 1982. – Vol. 65, № 7. – P. 1446–1450.

69. Holmes, D. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease / D. I. Holmes, I. Zach // *Genome Biol.* – 2005. – Vol. 6, № 2. – P. 209.

70. Hypoxia-inducible factor 1-alpha reduces infarction and attenuates progression of cardiac dysfunction after myocardial infarction in the mouse / M. Kido, L. Du, C. C. Sullivan et al. // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2005. – Vol. 46, № 11. – P. 2116–2124.

71. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor / B. I. Terman, M. Dougher-Vermazen, M. E. Carrion // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1992. – Vol. 187. – P. 1579–1586

72. IL-1 induces proinflammatory leukocyte infiltration and regulates fibroblast phenotype in the infarcted myocardium / A. Saxena, W. Chen, Y. Su et al. // *J. Immunol.* – 2013. – Vol. 191, № 9. – P. 4838–4848.

73. Immunohistochemical distribution of heart-type fatty acid-binding protein immunoreactivity in normal human tissues and in acute myocardial infarct / K. Watanabe, H. Wakabayashi, J. H. Veerkamp et al. // *J. Pathol.* – 1993. – Vol. 170, № 1. – P. 59–65.

74. Khan, S. Quantification of active and total transforming growth factor- β levels in serum and solid organ tissues by bioassay / S. A. Khan, J. Joyce, T. Tsuda // *BMC Res. Notes*. – 2012. – № 5. – P. 636.

75. Klagsbrun, M. Regulators of angiogenesis / M. Klagsbrun, P. D'Amore // *Annu. Rev. Physiol.* – 1991. – № 53. – P. 217–239.

76. Knight, C. G. Liposomes : from physical structure to therapeutic applications / C. G. Knight. – Elsevier, 1981. – 497 c.

77. Kornowski, R. Catheter-based transendocardial gene delivery for therapeutic myocardial angiogenesis / R. Kornowski, S. Fuchs // *Int. J. Cardiovasc. Intervent.* – 2000. – Vol. 3, № 2. – P. 67–70.

78. Lipid-based drug delivery systems for cancer treatment / J. L. Arias, B. Clares, M. E. Morales et al. // *Curr. Drug Targets.* – 2011. – Vol. 12, № 8. – P. 1151–1165.
79. Liposome : classification, preparation, and applications / A. Akbarzadeh, R. Rezaei-Sadabady, S. Davaran et al. // *Nanoscale Res. Lett.* – 2013. – Vol. 8, № 1. – P. 102.
80. Liposomes and other vesicular systems: structural characteristics, methods of preparation, and use in nanomedicine / E. Elizondo, E. Moreno, I. Cabrera et al. // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* – 2011. – № 104. – P. 1–52.
81. Mac Gabhann, F. Systems Biology of Vascular Endothelial Growth Factors / F. Mac Gabhann, A. S. Popel // *Microcirculation.* – 2008. – Vol. 15, № 8. – P. 715–738.
82. Menaschյ, P. Cardiac reparation: fixing the heart with cells, new vessels and genes / P. Menaschյ, M. Desnos // *Eur. Heart J. Suppl.* – 2002. – № 4, suppl D. – P. D73–D81.
83. Molecular and cellular mechanisms involved in cardiac remodeling after acute myocardial infarction / G. Vilahur, O. Juan-Babot, E. Peca et al. // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 2011. – Vol. 50, № 3. – P. 522–533.
84. Myocardial infarction and cardiac remodelling in mice / F. Yang, Y. H. Liu, X. P. Yang et al. // *Exp. Physiol.* – 2002. – Vol. 87, № 5. – P. 547–555.
85. Opposite functions of HIF- β isoforms in VEGF induction by TGF- β 1 under non-hypoxic conditions / K. S. Chae, M. J. Kang, J. H. Lee et al. // *Oncogene.* – 2011. – Vol. 30, № 10. – P. 1213–1228.
86. Oshima, M., Oshima, H., Taketo, M. M. TGF- γ receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis / M. Oshima, H. Oshima, M. M. Taketo // *Dev. Biol.* – 1996. – Vol. 179. – P. 297–302
87. Pagano, R. E. Interactions of liposomes with mammalian cells / R. E. Pagano, J. N. Weinstein // *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* – 1978. – № 7. – P. 435–468.

88. Papetti, M. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis / M. Papetti, I. M. Herman // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2002. – Vol. 282, № 5. – P. 947–970.
89. Park, H. Y. VEGF induces TGF- β 1 expression and myofibroblast transformation after glaucoma surgery / H. Y. Park, J. H. Kim, C. K. Park // *Am. J. Pathol.* – 2013. – Vol. 182, № 6. – P. 2147–2154.
90. Patan, S. Vasculogenesis and angiogenesis / S. Patan // *Cancer Treat. Res.* – 2004. – № 117. – P. 3–32.
91. Pharmacodynamics of basic fibroblast growth factor: route of administration determines myocardial and systemic distribution / D. F. Lazarous, M. Shou, J.A. Stiber et al. // *Cardiovasc Res.* – 1997. – Vol.36, №1. – P.78–85
92. pH sensitive liposomes: Acid-induced liposome fusion / J. Connor, M. B. Yatvin, L. Huang // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 1986. – Vol.81. – P.1715–1718
93. Polverini, P.J. The pathophysiology of angiogenesis / P. J. Polverini // *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* – Vol.6. – 230–247.
94. Pugh, C. W. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system / C. W. Pugh, P. J. Ratcliffe // *Nat. Med.* – 2003. – Vol. 9, № 6. – P. 677–684.
95. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human gastric cancer cells by interleukin-1 β / M. Kawaguchi, M. Akagi, M. J. Gray et al. // *Surgery.* – 2004. – Vol. 136, № 3. – P. 686–692.
96. Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1 / A. Luttun, M. Tjwa, L. Moons et al. // *Nat. Med.* – 2002. – Vol. 8, № 8. – P. 831–840.
97. Physical (in) stability of liposomes upon chemical hydrolysis: the role of lysophospholipids and fatty acids / N. J. Zuidam, H. K. E. M. Gouw, Y. Barenholz, D. J. A. Crommelin // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* – 1995.– Vol. 1240 № 1. – P. 101–110
98. Risau, W. Mechanisms of angiogenesis / Risau W. // *Nature.* – 1997. – Vol. 386, № 6626. – P. 671–674.

99. Rissanen, T. T. Current status of cardiovascular gene therapy / T. T. Rissanen, S. Yla-Herttuala // *Mol. Ther.* – 2007. – Vol. 15, № 7. – P. 1233–1247.

100. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1 / M. Autiero, J. Waltenberger, D. Communi et al. // *Nat. Med.* – 2003. – Vol. 9, № 7. – P. 936–943.

101. Safety and feasibility of catheter-based local intracoronary vascular endothelial growth factor gene transfer in the prevention of postangioplasty and in-stent restenosis and in the treatment of chronic myocardial ischemia / M. Hedman, J. Hartikainen, M. Syvanne et al. // *Circulation.* – 2003. – Vol. 107, № 21. – P. 2677–2683.

102. Said, S. S. Advances in Growth Factor Delivery for Therapeutic Angiogenesis / S. S. Said, J. G. Pickering, K. Mequanint // *J. Vasc. Res.* – 2013. – Vol. 50, № 1. – P. 35–51.

103. Serum depletion induces cell loss of rat cardiac fibroblasts and increased expression of extracellular matrix proteins in surviving cells / M. Leicht, W. Briest, A. Hülzl et al. // *Cardiovasc. Res.* – 2001. – Vol. 52, № 3. – P. 429–437.

104. Shah, A. M. In search of new therapeutic targets and strategies for heart failure: recent advances in basic science / A. M. Shah, D. L. Mann // *Lancet.* – 2011. – Vol. 378, № 9792. – P. 704–712.

105. Simple techniques for the surgical occlusion of coronary vessels in the rat / H. Selye, E. Bajusz, S. Grasso, P. Mendell // *Angiology.* – 1960. – Vol. 11. – P. 398–407.

106. Soluble transforming growth factor-beta1 receptor II might inhibit transforming growth factor-beta-induced myofibroblast differentiation and improve ischemic cardiac function after myocardial infarction in rats / R. Lian, Y. Chen, Z. Xu et al. // *Coron. Artery. Dis.* – 2010. – Vol. 21, № 6. – P. 369–377.

107. Sommer, A. Interaction of heparin with human basic fibroblast growth factor: protection of the angiogenic protein from proteolytic degradation by a glycosaminoglycan / A. Sommer, D. B. Rifkin // *J Cell Physiol.* – 1989. – Vol. 138, № 1. – P. 215–220

108. Soonpaa, M. H. Potential approaches for myocardial regeneration / M. H. Soonpaa, A. I. Daud, G. Y. Koh et al. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 1995. – № 752. – P. 446–454.

109. Storm, G. Liposomes: quo vadis? / G. Storm, D. J. Crommelin // *Pharm. Sci. Technol. Today.* – 1998. – Vol. 1, № 1. – P. 19–31.

110. Sun, Y. Myocardial repair/remodelling following infarction: roles of local factors / Y. Sun // *Cardiovasc. Res.* – 2009. – Vol. 81, № 3. – P. 482–490.

111. Sustained release of VEGF through PLGA microparticles improves vasculogenesis and tissue remodeling in an acute myocardial ischemia-reperfusion model / F. R. Formiga, B. Pelacho, E. Garbayo et al. // *J. Control Release.* – 2010. – Vol. 147, № 1. – P. 30–37.

112. Syed, I. S. Therapeutic Angiogenesis : A Biologic Bypass / I. S. Syed, T. A. Sanborn, T. K. Rosengart // *Cardiology.* – 2004. – Vol. 101, № 1-3. – P. 131–143.

113. The alphasmooth muscle actin-positive cells in healing human myocardial scars / I. E. Willems, M. G. Havenith, J. G. De Mey et al. // *Am. J. Pathol.* – 1994. – Vol. 145, № 4. – P. 868–875.

114. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor / C. De Vries, J. A. Escobedo, H. Ueno // *Science.* – 1992. – Vol. 255. – P. 989–991

115. The infarcted myocardium: simply dead tissue, or a lively target for therapeutic interventions / J. P. Cleutjens, W. M. Blankesteyjn, M. J. Daemen et al. // *Cardiovasc Res.* – 1999. – Vol. 44, № 2. – P. 232–241.

116. The Mitochondrial Apoptotic Pathway Is Activated by Serum and Glucose Deprivation in Cardiac Myocytes / S. Bialik, V. L. Cryns, A. Drincic et al. // *Circ. Res.* – 1999. – Vol. 85, № 5. – P. 403–414.

117. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model / S. Takeshita, L. P. Zheng, E. Brogi et al. // *J. Clin. Invest.* – 1994. – Vol. 93, № 2. – P. 662–670.

118. Tongers, J. Therapeutic angiogenesis for critical limb ischemia / J. Tongers, J. G. Roncalli, D. W. Losordo // *Circulation*. – 2008. – Vol. 118, № 1. – P. 9–16.

119. Transforming Growth Factor- β 1 Stimulates Vascular Endothelial Growth Factor 164 via Mitogen-activated Protein Kinase Kinase 3-p38 β and p38 δ Mitogen-activated Protein Kinase-dependent Pathway in Murine Mesangial Cells / L. Wang, J. H. Kwak, S. Kim et al. // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279, № 32 – P. 33213–33219.

120. uPA, uPAR and TGF β 1 Expression during Early and Late Post Myocardial Infarction Period in Rat Myocardium / A. Stavropoulou, A. Philippou, A. Halapas et al. // *In Vivo*. – 2010. – Vol. 24, № 5. – P. 647–652.

121. Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries / D. D. Ku, J. K. Zaleski, S. Liu et al. // *Am. J. Physiol.* – 1993. – Vol. 265, № 2, Pt. 2 – P. H586–H592.

122. Vascular endothelial growth factor-B induces myocardium-specific angiogenesis and arteriogenesis via vascular endothelial growth factor receptor-1 and Neuropilin receptor-1 dependent mechanisms / J. E. Ldhteenvuo, M. T. Ldhteenvuo, A. Kivelд et al. // *Circulation*. – 2009. – Vol. 119, № 6. – P. 845–856.

123. Vascular endothelial growth factors. Biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine / S. Yla-Herttuala, T. T. Rissanen, I. Vajanto et al. // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2007. – Vol. 49, № 10. – P. 1015–1026

124. VEGF, a prosurvival factor, acts in concert with TGF- β 1 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.

125. VEGF-D is the strongest angiogenic and lymphangiogenic effector among VEGFs delivered into skeletal muscle via adenoviruses / T. T. Rissanen, J. E. Markkanen, M. Gruchala et al. // *Circ. Res.* – 2003. – Vol. 92, № 10. – P. 1098–1106.

126. Vemuri, S. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review / S. Vemuri, C. T. Rhodes // *Pharm. Acta. Helv.* – 1995. – Vol. 70, № 2. – P. 95–111.

127. Yla-Herttuala, S. Cardiovascular gene therapy with vascular endothelial growth factors / S. Yla-Herttuala // *Gene*. – 2013. – Vol. 525, № 2. – P. 217–229.

128. Yla-Herttuala, S. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical application in cardiovascular medicine / S. Yla-Herttuala, T. T. Rissanen, I. Vajanto // J. Am. Coll. Cardiol. – 2007. – Vol. 49, № 10. – P. 1015–1026.