

Головнева Е.С.¹, Рейдман В.Р.¹, Кравченко Т.Г.²**Исследование экспрессии фактора роста сосудистого эндотелия в поврежденном миокарде после лазерного воздействия на зоны локализации костного мозга**

Golovneva E.S., Reidman V.R., Kravchenko T.G.

Vascular endothelial growth factor expression in damaged myocardium after laser exposure of bone marrow localization zones¹ ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России», г. Челябинск;² ГБУЗ «Многопрофильный центр лазерной медицины», г. Челябинск

Целью исследования являлось изучение влияния лазерной стимуляции красного костного мозга на экспрессию фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) в поврежденном миокарде. Исследование проведено на 90 крысах с моделью диффузного и локального повреждения миокарда. *Материалы и методы.* Использовали лазерное воздействие с длиной волны 980 и 670 нм на зоны локализации красного костного мозга в течение 10 суток, мощность 1 Вт, по 1 минуте на зону. VEGF выявляли в гистологических парафиновых срезах иммуногистохимическим методом. *Результаты.* Отмечалось достоверное усиление экспрессии VEGF в поврежденном миокарде в 1-е и 10-е сутки после окончания сеансов лазерного воздействия на костный мозг. Максимальные показатели экспрессии VEGF достигались в группе животных с диффузным повреждением миокарда. Достоверных отличий между группами получавших лазерное воздействие с разной длиной волны не выявлено. Ранее нами было показано ускорение репарации и нормализации микроциркуляции в миокарде с диффузным и локальным повреждением после лазерной стимуляции костного мозга, поэтому повышение экспрессии VEGF может являться свидетельством паракринной активации мигрирующими стволовыми клетками локальных процессов неогенеза и заживления тканей сердца. *Ключевые слова:* миокард, факторы роста, неогенез, репарация, лазер.

The aim of the present work was to study the effectiveness of laser stimulation of red bone marrow at the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in damaged myocardium. 90 rats with diffuse and local myocardial damage were used as a model. Laser light with wavelength 980 nm or 670 nm, power 1 W was applied to the zones of red bone marrow location for 10 days, exposure one minute per zone. VEGF was detected in an immunostained paraffin section with the immunohistochemical test. Results: There was a significant increase in VEGF expression in the damaged myocardium on days 1 and 10 after laser sessions. The maximal VEGF expression was achieved in animals with diffuse myocardial damage. There was no significant difference between the groups exposed to laser light with different wavelengths. Previously, we demonstrated the accelerated reparation and normalization of microcirculation in the myocardium with diffuse and local injuries after laser stimulation of the bone marrow, so the increase in VEGF expression may be the evidence of paracrine activation with migrating stem cells of local neoangiogenesis and heart tissue healing. *Key words:* myocardium, growth factors, neoangiogenesis, reparation, laser.

Введение

Клеточные технологии, позволяющие заместить возникший дефект ткани клетками из собственных либо аллогенных стволовых предшественников, успешно применяются в кардиологии, в том числе в комбинации с лазерным облучением, что значительно улучшает состояние поврежденного миокарда и может успешно использоваться при лечении инфарктов и хронической сердечной недостаточности [1, 2, 9, 10, 14]. Известно, что при тяжелых повреждениях тканей наблюдается дефицит циркулирующих стволовых клеток крови (ЦСК), еще более усиливающийся при старении организма. В ЦСК выявлен пул цитокинов и факторов роста, паракринно влияющих на восстановление поврежденных тканей и заживление ран, ингибирующих апоптоз и стимулирующих пролиферацию эндотелиальных клеток [5, 10, 13, 15].

Для увеличения концентрации ЦСК в крови используются различные физические факторы (ультразвук, термическое воздействие, лазерное излучение и др.) стимулирующие их выход из костного мозга в периферическую кровь. В 1985 г. Скобелкин О.К. с соавторами показали, что у онкологических больных после инфракрасного лазерного воздействия на зоны грудины, метафизов трубчатых костей, тел позвонков, проекции селезенки и вилочковой железы уменьшается количество

послеоперационных осложнений [11]. Позднее было установлено, что воздействие определенных режимов лазерного излучения на зоны локализации костного мозга способствует выходу циркулирующих стволовых клеток в периферическую кровь, где их содержание увеличивается в 6–10 раз [5]. В эксперименте мы показали, что повышение концентрации ЦСК в крови путем лазерного воздействия на костный мозг может быть использовано для активации неогенеза в поврежденном миокарде, где происходит усиление микроциркуляции и перестройка сосудистого русла [10]. Успешный неогенез невозможен без достаточной концентрации факторов роста [2–4, 6], поэтому исследование динамики локальной экспрессии фактора роста сосудистого эндотелия необходимо для понимания механизмов происходящей перестройки тканей.

Целью исследования являлось изучение экспрессии фактора роста сосудистого эндотелия в поврежденном миокарде после лазерного воздействия на зоны локализации красного костного мозга у крыс.

Материалы и методы

Проведено экспериментальное исследование на 90 беспородных половозрелых крысах обоего пола массой 180–220 г. Распределение животных по трем экспериментальным группам.

I – Контрольные группы: 1 – интактные животные без лазерного воздействия; 2 – животные с диффузным стрессовым повреждением миокарда; 3 – животные с локальным повреждением миокарда. II – Лазерное облучение зон локализации костного мозга 980 нм, все вышеперечисленные группы. III – Лазерное облучение зон локализации костного мозга 670 нм, все вышеперечисленные группы.

Моделирование локального повреждения миокарда осуществлялось воздействием лазера в режиме коагуляции, что позволило получать очаг диаметром 0,2 см в бассейне нисходящей коронарной артерии. Диффузные ишемические изменения в миокарде крыс получали в условиях хронического гиподинамического стресса (1 месяц).

В качестве источников лазерного излучения использовали диодные лазеры «ИРЭ-Полус» 980 нм (Россия) и «Лакта» 670 нм (Россия). Лазерное воздействие проводилось ежедневно в течение 10 суток на зоны локализации красного костного мозга (бедренные, тазовые кости, пояснично-крестцовый отдел позвоночника, хвост), воздействие осуществлялось через кожу, мощность 1 Вт, по 1 минуте на зону. Выведение животных из опыта проводили через 1 и 10 суток после окончания облучения. Фиксацию препаратов сердца проводили в 10% растворе нейтрального формалина. Для оценки морфологии после стандартной гистологической проводки парафиновые срезы окрашивали гематоксилином-эозином. Определение экспрессии фактора роста сосудистого эндотелия осуществляли иммуногистохимическим методом с использованием антител к VEGF (Sigma) и системы Immu-mark™ (ICN). Морфометрические исследования проводили на комплексе Диаморф Цито® (Россия), с помощью программ Диаморф Ипсo®.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью пакета программ Statistica 6.0. Статистическая значимость различий сравниваемых признаков в группах определена с помощью U-теста Манна–Уитни (во всех группах $n = 5$). Данные представлены в виде Me (UQ; LQ).

Результаты исследования и их обсуждение

Как видно из табл. 1, экспрессия VEGF в поврежденном миокарде достоверно не отличалась от показателей интактного миокарда.

VEGF визуализировался как внутри-, так и внеклеточно. Яркую экспрессию VEGF мы наблюдали в эндотелиальных клетках мелких кровеносных сосудов. Положительная реакция также фиксировалась в макрофагах и тучных клетках, инфильтрировавших область повреждения, отмечалась в области базальных мембран, в рыхлой соединительной ткани, окружающей образующиеся сосуды.

Лазерное облучение костного мозга приводило к достоверному повышению уровня экспрессии VEGF в поврежденном миокарде на сроке 1 сутки и на 10-е сутки. Изменения наблюдались как в группе животных с диффузным повреждением миокарда, так и с локальным очагом. При этом статистически достоверных отличий в экспрессии этого фактора роста при воздействии лазеров с длиной волны 980 и 670 нм не было.

В группе животных с интактным миокардом после лазерного воздействия на костный мозг не наблюдалось изменений экспрессии VEGF, так как неповрежденный миокард не является местом притяжения для циркулирующих стволовых клеток.

По данным литературы, значимыми источниками фактора роста сосудистого эндотелия являются циркулирующие стволовые клетки, причем как гемопоэтические, так и мезенхимальные [13–15]. Увеличение содержания циркулирующих стволовых клеток в крови после лазерного воздействия на зоны локализации костного мозга позволяет повысить их хоуминг в зоны поврежденного миокарда, где эти клетки могут паракринно воздействовать на регуляцию сосудистого тонуса, пролиферацию, неоангиогенез и выживаемость кардиомиоцитов в ишемизированных зонах, за счет выделения факторов роста и ферментов.

Тучные клетки также выступают источником VEGF, который может выделяться как при экзцитозе гранул, так и мерокринно в ответ на внешние воздействия и цитокиновую стимуляцию [3, 10]. Кроме этого в зоне повреждения ткани синтезировать VEGF могут активированные макрофаги и эндотелиальные клетки. Известно, что лазерное термическое воздействие на сердце, например при выполнении операции трансмиокардиальной реваскуляризации, значительно повышает концентрацию макрофагов и активирует неоангиогенез в

Таблица 1

Экспрессия фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) в миокарде после лазерного воздействия на костный мозг, усл. ед.

	Без лазерного воздействия		Лазерное облучение 980 нм		Лазерное облучение 670 нм	
	1 сутки	10 суток	1 сутки	10 суток	1 сутки	10 суток
Интактный миокард	11,6 (7,8; 15,1)		14,4 (9,6; 19,9) $p_1 = 0,347$ $p_3 = 0,917$	15,1 (10,3; 17,2) $p_1 = 0,294$ $p_3 = 0,347$	14,5 (9,9; 19,4) $p_2 = 0,347$	14,9 (9,7; 16,8) $p_2 = 0,347$
Диффузное повреждение	16,1 (11,5; 18,3) $p_4 = 0,175$	15,7 (14,7; 18,4) $p_4 = 0,075$	29,2 (19,9; 36,1) $p_1 = 0,009$ $p_3 = 0,894$ $p_4 = 0,009$	28,3 (21,3; 35,3) $p_1 = 0,009$ $p_3 = 0,916$ $p_4 = 0,009$	25,1 (20,1; 33,5) $p_2 = 0,009$ $p_4 = 0,009$	25,2 (19,2; 38,4) $p_2 = 0,009$ $p_4 = 0,009$
Локальное повреждение	17,1 (13,1; 18,8) $p_4 = 0,05$	16,2 (11,3; 19,1) $p_4 = 0,174$	29,8 (21,6; 39,9) $p_1 = 0,009$ $p_3 = 0,347$ $p_4 = 0,009$	25,3 (19,8; 32,7) $p_1 = 0,009$ $p_3 = 0,347$ $p_4 = 0,009$	25,5 (20,9; 39,4) $p_2 = 0,009$ $p_4 = 0,009$	27,4 (20,1; 35,4) $p_2 = 0,009$ $p_4 = 0,009$

Примечание. p_1 – между группами без лазерного воздействия и с лазерным воздействием 980 нм; p_2 – между группами без лазерного воздействия и с лазерным воздействием 670 нм; p_3 – между группами с лазерным воздействием 980 и 670 нм; p_4 – между группой интактного контроля и группами с повреждением миокарда.

прилежащих зонах [4, 7, 8]. Исходя из вышеизложенного, можно сделать вывод, что в поврежденном миокарде после лазерного воздействия на костный мозг тканевой пул VEGF может формироваться благодаря деятельности множества клеточных сообществ.

По литературным данным известно, что для индукции сосудистого роста необходимо соблюдение двух основных условий: во-первых, это адекватная концентрация факторов роста, что усиливает пролиферативную активность клеток, их способность к дифференцировке, и, во-вторых, необходима активация протеолитических ферментов для обеспечения процесса миграции клеток. При этом фактор роста сосудистого эндотелия является главным регулятором процессов взаимодействия ферментов и других факторов роста в процессе неоангиогенеза [2, 3, 12]. Несмотря на широкий круг клеток, которые могут его синтезировать, активация митотических возможностей под действием VEGF затрагивает только эндотелий и гладкие мышцы сосудов. Также известно, что VEGF воздействует на синтетические возможности как эндотелиальных, так и гладкомышечных сосудистых клеток, в том числе по производству ими активаторов плазминогена и матриксных металлопротеиназ в культуре [4]. VEGF предотвращает апоптоз различных клеток, особенно эндотелиальных, противодействует проапоптотическим эффектам TNF- α , который выделяется в зонах повреждения тканей [6, 13, 15, 16]. Показано, что после ишемического повреждения миокарда в условиях повышения концентрации VEGF увеличивается содержание клеток с фенотипом CD34⁺CD45⁺, описанных в литературе как прогениторные клетки с достаточно низким уровнем дифференцировки, которые в зависимости от направления дифференцировки могут выступать в качестве предшественников тканей мезенхимного происхождения, в том числе и сосудистых структур [6, 12].

Наблюдаемое после лазерного воздействия на костный мозг повышение уровня экспрессии VEGF в миокарде может стимулировать пролиферацию эндотелия и гладкомышечных клеток сосудистых стенок, что проявляется в увеличении относительной плотности сосудистого русла, нормализации сосудистого тонуса и приводит к улучшению микроциркуляции в поврежденном миокарде [2, 6, 10].

Заключение

Таким образом, после лазерного воздействия на костный мозг в поврежденном миокарде отмечается увеличение экспрессии фактора роста сосудистого эндотелия, являющегося необходимой базой для активации неоангиогенеза.

Литература

1. Бокерия Л.А., Бершвили И.И., Солнышков И.В. Клеточная терапия: взгляд клинициста (нынешнее состояние проблемы и основные направления будущих исследований в кардиологии) // Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. Сердечно-сосудистые заболевания. – 2008. – Т. 9. – № 3. – С. 5–16.
2. Бокерия Л.А., Бершвили И.И., Вахромеева М.Н. и др. Терапевтический ангиогенез в лечении больных ишемической болезнью сердца: взгляд клинициста // Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. Сердечно-сосудистые заболевания. – 2008. – Т. 9. – № 3. – С. 52–63.
3. Головнева Е.С., Попов Г.К. Неоангиогенез как универсальный ответ тканей на высокоинтенсивное лазерное воздействие // В сборнике: Лазерные технологии в медицине. – Челябинск, 2001. – С. 108–112.
4. Головнева Е.С., Попов Г.К. Экспрессия фактора роста сосудистого эндотелия при формировании новой сосудистой сети под воздействием высокоинтенсивного лазерного излучения // Бюлл. эксп. биол. и мед. – 2003. – Т. 136. – № 12. – С. 624–626.
5. Головнева Е.С., Кравченко Т.Г., Кудрина М.Г. и др. Локальные эффекты системного лазерного облучения повышенной мощности // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2012. – № 2 (39). – С. 126–127.
6. Дремина Н.Н., Шурыгин М.Г. Влияние фактора роста эндотелия сосудов на ремоделирование миокарда при инфаркте левого желудочка // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2008. – № 2. – С. 86–87.
7. Елисеев В.И., Скобелкин О.К., Брехов Е.И. и др. Морфологические обоснования реваскуляризации миокарда лазерным излучением // Бюлл. эксп. биол. и мед. – 1984. – № 12. – С. 1730–1734.
8. Елисеев В.И., Корепанов В.И., Амбарцумян Р.В. и др. Лазерная трансмиокардиальная реваскуляризация миокарда при ишемической болезни сердца // Вестник хирургии. – 1997. – № 5. – С. 47–50.
9. Поповкина О.Е. Инфракрасное лазерное излучение и кардиомиоциты в лечении хронической сердечной недостаточности: Автореф. дисс. канд. мед. наук. – Обнинск, 2013. – 26 с.
10. Рейдман В.Р., Головнева Е.С., Кравченко Т.Г. Динамика репаративных процессов в миокарде после лазерного облучения зон локализации красного костного мозга // Лазерная медицина. – 2014. – Т. 18. – Вып. 2. – С. 36–39.
11. Скобелкин О.К., Михайлов В.А., Елисеев В.И., Денисов И.Н. Результаты лазерной терапии у онкологических больных // Новое в лазерной медицине и хирургии. – М., 1990. – Ч. 2. – С. 77–78.
12. Шурыгин М.Г., Шурыгина И.А., Дремина Н.Н., Каня О.В. Эндогенные прогениторы как источники клеточного материала для репарации зоны ишемического повреждения при экспериментальном инфаркте миокарда в условиях измененной концентрации вазоэндотелиального фактора роста // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2014. – № 4. – С. 212–215.
13. Majka M. Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34(+) cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner // Blood. – 2001. – Vol. 97 (10). – P. 3075–3085.
14. Tuby H., Maltz L., Oron U. Modulations of VEGF and iNOS in the rat heart by low level laser therapy are associated with cardioprotection and enhanced angiogenesis // Lasers Surg Med. – 2006. – Vol. 38 (7). – P. 682–688.
15. Yang Y., Chen Q.H., Liu A.R. Synergism of MSC-secreted HGF and VEGF in stabilising endothelial barrier function upon lipopolysaccharide stimulation via the Rac1 pathway // Stem Cell Res Ther. – 2015 Dec. 16. – Vol. 6 (1). – P. 250. doi: 10.1186/s13287-015-0257-0.
16. Yang Z., Wu Y., Zhang H. et al. Low-level laser irradiation alters cardiac cytokine expression following acute myocardial infarction: a potential mechanism for laser therapy // Photomed. Laser Surg. – 2011. – Vol. 29. – P. 391–398.

Поступила в редакцию 29.04.2017 г.

Для контактов: Головнева Елена Станиславовна
E-mail: micron30@mail.ru