

М.Г. Шурыгин, И.А. Шурыгина, Н.Н. Дремина, О.В. Кая

ЭКСПРЕССИЯ ЭНДОТЕЛИНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА В УСЛОВИЯХ ИЗМЕНЕННОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ФИБРОБЛАСТИЧЕСКОГО И ВАЗОЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО ФАКТОРОВ РОСТА

ФГБУ «Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии» СО РАМН (Иркутск)
ФГБУН Иркутский научный центр СО РАМН (Иркутск)

Целью исследования являлось изучение экспрессии эндотелина при экспериментальном инфаркте миокарда и оценка влияния на нее измененных концентраций факторов роста.

Исследования проводили на модели инфаркта миокарда. Эксперимент проведен на 150 самках крыс линии Wistar. Исследовано 5 групп животных: контрольная группа, повышенная концентрация FGF2 или VEGF, сниженная концентрация FGF или VEGF. Выведение животных из эксперимента проводили в сроки от 1 до 30 суток после моделирования инфаркта миокарда. Сердце экспериментального животного фиксировали в растворе 10 % нейтрального формалина. Применяли гистохимический метод окрашивания. В качестве первичных антител применяли антитела к эндотелину ET-1/2/3 (H-38) rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz, Cat. N Sc-98727, Lot # G2209).

Выявлено, что у животных контрольной группы наблюдалась нежная окраска на эндотелин в зоне инфаркта миокарда и перинфарктной зоне с 1-х по 7-е сутки с максимумом на 3-и сутки. Применение факторов роста резко усиливало окраску пограничной и инфарктной зон с 1-х по 14-е сутки с максимумом на 3-и сутки. Применение антител к факторам роста снижало интенсивность окраски инфарктной и перинфарктной зон в ранние сроки после моделирования инфаркта миокарда (с 1-х по 3-и сутки), к 7-м суткам интенсивность окраски резко нарастала, достигая максимума, а к 14-м суткам вновь снижалась. Таким образом, нами установлена динамика экспрессии эндотелина в миокарде при его ишемическом повреждении и инфаркте, а также установлено значительное стимулирующее воздействие факторов роста FGF2 и VEGF на экспрессию эндотелина в зоне ишемического повреждения и перинфарктной зоне при экспериментальном инфаркте миокарда.

Ключевые слова: инфаркт миокарда, VEGF, FGF, эндотелин

EXPRESSION OF ENDOTHELIN IN EXPERIMENTAL MYOCARDIAL INFARCTION IN A CHANGED CONCENTRATION OF FGF AND VEGF

М.Г. Shurygin, I.A. Shurygina, N.N. Dremina, O.V. Kanya

Scientific Center of Reconstructive and Restorative Surgery SB RAMS, Irkutsk
Irkutsk Scientific Center SB RAS, Irkutsk

The objective of the work was to study the expression of endothelin in experimental myocardial infarction and to assess the impact on its altered concentrations of growth factors.

The study was performed on a model of myocardial infarction. The experiment was conducted on 150 female Wistar rats. Five groups of animals were studied: control group, the increased concentration FGF2 and VEGF, the decreased concentration of FGF or VEGF. Excretion of animal experiments were conducted in the period from 1 to 30 days. The heart of the experimental animal was fixed in a solution of 10 % neutral formalin. Histochemical staining was used. Primary antibodies to endothelin ET-1/2/3 (H-38) rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz, Cat. N Sc-98727, Lot # G2209).

We determined that in control group there was a stain on endothelin in the area of myocardial infarction from the 1st to the 7th day with a peak on day 3. The use of growth factors increased the staining of the border and infarct zones on the 1st to the 14th days with a maximum of day 3. The use of antibodies to growth factors reduced the stain of the infarcted area early after myocardial infarction (days 1 to 3), to the 7th day of the stain intensity increases sharply, reaching a maximum, and to the 14th day again declined. Thus, we established the dynamics of expression of endothelin in the myocardium when the ischemic injury and heart attack, as well as the significant stimulatory effect of growth factors FGF2 and VEGF on the expression of endothelin in the area of ischemic damage at experimental myocardial infarction.

Key words: myocardial infarction, VEGF, FGF, endothelin

Эндотелины — группа биологически активных пептидов широкого спектра действия, являющихся одним из важнейших регуляторов функционального состояния эндотелия. Впервые эндотелин был идентифицирован в 1988 г. в культуре эндотелиальных клеток аорты свиньи и рассматривался как эндотелиевый фактор с высокой вазомоторной активностью [8, 9, 14].

Хорошо известно, что проэндотелин (Big-эндотелин) секретируется эндотелием сосудов и состоит из 38 аминокислотных остатков. В

дальнейшем, благодаря эндотелинпревращающему ферменту, который находится внутри и на поверхности эндотелия, образуются три эндотелиновых изомера: эндотелин-1, эндотелин-2 и эндотелин-3 [12, 15]. Состоят эндотелины из 21 аминокислотного остатка с двумя бисульфидными связями. Известно, что после расщепления Big-эндотелина его вазомоторная активность повышается в 140 раз.

Идентифицированы эндотелины в таких тканях, как легкие, почки, мозг, периферические

эндокринные ткани, плацента. Эндотелин-1, в отличие от эндотелина-2 и эндотелина-3, продуцируется эндотелиальными клетками и может обнаруживаться на поверхности подлежащих гладкомышечных клеток, нейронах, астроцитах, эндометрии, гепатоцитах, мезангиоцитах, клетках Сертоли, эндотелиоцитах молочных желез, тканевых базофилах [2]. Эндотелин-2 присутствует в почках, кишечнике, миокарде, плаценте, матке, а эндотелин-3 считается относительно специфичным для головного мозга, где он образуется в наибольшем количестве [1]. Эндотелин-1 не накапливается в эндотелиальных клетках, но очень быстро образуется под воздействием многих факторов: адреналина, ангиотензина-II, вазопрессина, тромбина, цитокинов и механических воздействий.

В физиологических концентрациях эндотелин действует на эндотелиальные рецепторы, вызывая высвобождение факторов релаксации, а в более высоких — активирует рецепторы на гладкомышечных клетках, стимулируя стойкую вазоконстрикцию [10]. Таким образом, при помощи одного и того же фактора реализуются две противоположные сосудистые реакции (сокращение и расслабление), вызываемые различными механизмами.

Самым распространенным из эндотелинов считается эндотелин-1. Именно он является маркером коронарного атеросклероза и коронарной эндотелиальной дисфункции, нарушения функционирования печени, снижения функции почек. Кроме того, высокий уровень эндотелина в плазме наблюдается при таких состояниях, как ишемическая болезнь сердца, острый инфаркт миокарда, нарушение ритма сердца, а также после гемодиализа и эпизодов значительного подъема артериального давления [4].

Основными активаторами синтеза эндотелина-1 в организме являются гипоксия, ишемия, стресс [13]. Эти факторы активируют транскрипцию иРНК и синтез предшественников эндотелина через механизмы, связанные с белками цитоплазматической мембраны эндотелиоцитов [3]. В то же время катехоламины, ангиотензин II, липопротеины высокой плотности, факторы роста, тромбин, тромбосан A_2 , Ca^{2+} -ионофор активируют внутриклеточные механизмы синтеза эндотелина-1 [11].

К ингибиторам синтеза эндотелина-1 и эндотелина-2 относят натрийуретические пептиды, а синтеза эндотелина-3 — простагландин E_2 , простаглицлин и оксид азота (NO).

Достаточно много работ посвящено изменению уровня эндотелина в периферической крови при сердечно-сосудистой патологии, в частности при инфаркте миокарда. В частности установлено, что при острой ишемии миокарда повышается уровень эндотелина-1 в периферической крови, а его концентрация коррелирует с тяжестью патологического процесса [4]. При осложненном течении инфаркта миокарда уровень эндотелина-1

в плазме сохраняется в высокой концентрации и в подострый период [7].

Однако работ, посвященных тканевому распределению эндотелина при инфаркте миокарда, в доступной литературе нами не найдено.

Цель исследования: изучить экспрессию эндотелина при экспериментальном инфаркте миокарда и оценить влияние на нее измененных концентраций факторов роста.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Инфаркт миокарда моделировали методом диатермокоагуляции околоконусной межжелудочковой артерии крысы [5]. Эксперимент выполнялся в соответствии с нормами гуманного обращения с животными, которые регламентированы «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. № 755), согласно протоколу, одобренному Комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «НЦРВХ» СО РАМН.

В эксперименте использовали 150 самок крыс линии Wistar весом 220 — 250 г. в возрасте 9 месяцев. Исследование проведено у 5 групп животных:

- контрольная группа (30 животных) — моделирование инфаркта миокарда, изучение естественного течения постинфарктного периода;
- группа животных FGF — моделирование инфаркта миокарда, введение FGF2 (Sigma, Cat. N F0291, Lot 124K0797) внутрисердечно в полость левого желудочка в дозе 100 нг (объем инъекции 0,1 мл) однократно через 1,5 ч. после операции по моделированию инфаркта миокарда (30 животных);
- группа животных антиFGF — моделирование инфаркта миокарда, введение блокатора активности FGF2 (моноклональных антител к FGF2 — Sigma, Cat. N F6162, Lot 025K4835) в дозе 2 мкг (объем инъекции 0,1 мл) внутрисердечно в полость левого желудочка трёхкратно — через 1,5, 6 часов и 3 суток после моделирования инфаркта миокарда (30 животных).
- группа животных VEGF — моделирование инфаркта миокарда, введение VEGF (VEGF164 rat recombinant, Sigma, Cat. N V3638-10UG, Lot 064K1239) внутрисердечно в полость левого желудочка в дозе 100 нг (объем инъекции 0,1 мл) однократно через 1,5 ч. после операции по моделированию инфаркта миокарда (30 животных);
- группа животных антиVEGF — моделирование инфаркта миокарда, введение блокатора активности VEGF (моноклональных антител к VEGF — Sigma, Cat. N V1253, Lot 044K1711) в дозе 1 мкг (объем инъекции 0,1 мл) внутрисердечно в полость левого желудочка трёхкратно через 1,5, 6 часов и 3 суток после моделирования инфаркта миокарда (30 животных).

Выведение животных из эксперимента проводили в сроки от 1 до 30 суток (1-е, 3-е, 7-е, 14-е и 30-е сутки) после моделирования инфаркта миокарда. Сердце экспериментального животного фиксировали в растворе 10% нейтрального формалина

для дальнейшего гистохимического исследования. Применяли гистохимический метод окрашивания по методике, описанной нами ранее [6]. В качестве первичных антител применяли антитела к эндотелину ET-1/2/3 (H-38) rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz, Cat. N Sc-98727, Lot # G2209) в рабочем разведении 1 : 300.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Нами изучена экспрессия эндотелина в миокарде при экспериментальном инфаркте миокарда в условиях искусственно измененных концентраций факторов роста и при естественном течении процесса. Как известно, эндотелиальные клетки увеличивают продукцию эндотелина в ответ на гипоксию, окисленные формы липопротеидов низкой плотности, провоспалительные цитокины. Выделение эндотелина из эндотелиальных клеток регулирует рост и выживаемость как их самих, так и окружающих клеток.

Выявлено, что у животных контрольной группы наблюдалась нежная окраска на эндотелин в зоне инфаркта миокарда и перинфарктной зоне, начиная с 1-х суток после моделирования патологического процесса, пик окраски наблюдался на 3-и сутки, когда выявлялась достаточно яркая окраска в области грануляций (рис. 1). К 7-м суткам интенсивность окраски значительно снижалась, в этот срок отмечалась подчеркнутость сосудов в пограничной и инфарктной зонах. В более поздние сроки специфическая окраска не регистрировалась. В интактной зоне специфическая окраска не регистрировалась в течение всего периода наблюдения.

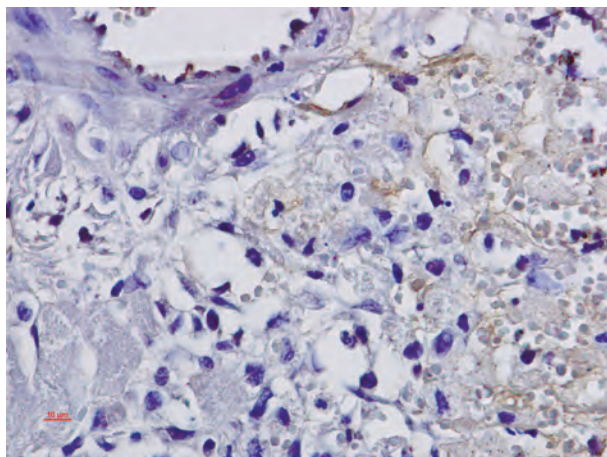


Рис. 1. Контрольная группа, 3 суток, нежная неяркая окраска на эндотелин в пограничной зоне. Иммуногистохимия (краситель DAB, первичные антитела к ET-1/2/3, докрашивание гематоксилином).

Применение факторов роста резко усиливало окраску пограничной и инфарктной зон уже через 1 сутки после моделирования инфаркта миокарда. К 3-м суткам интенсивность окраски резко нарастала (рис. 2, 3), затем медленно снижалась и регистрировалась до 14 суток, причем в группе VEGF в срок 1 и 3 суток регистрировалась окраска сосудов в интактном миокарде.

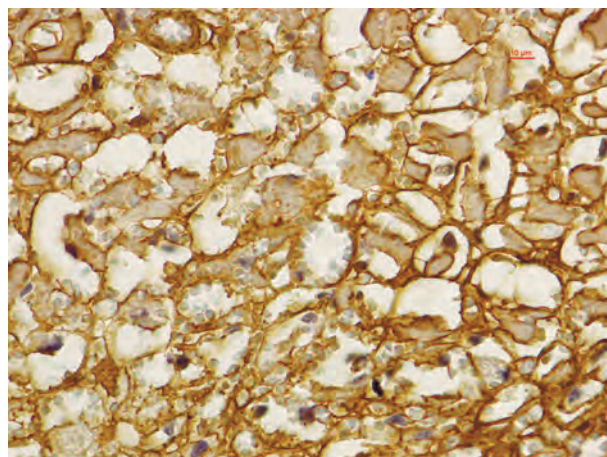


Рис. 2. Группа VEGF, 3 суток, яркая окраска на эндотелин в зоне инфаркта миокарда. Иммуногистохимия (краситель DAB, первичные антитела к ET-1/2/3, докрашивание гематоксилином).

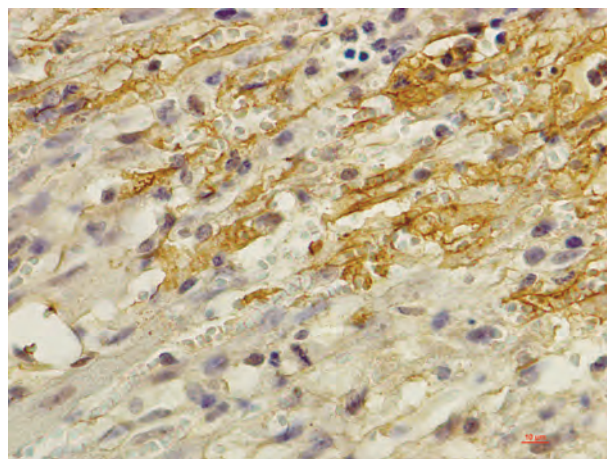


Рис. 3. Группа VEGF, 3 суток, яркая окраска на эндотелин в пограничной зоне. Иммуногистохимия (краситель DAB, первичные антитела к ET-1/2/3, докрашивание гематоксилином).

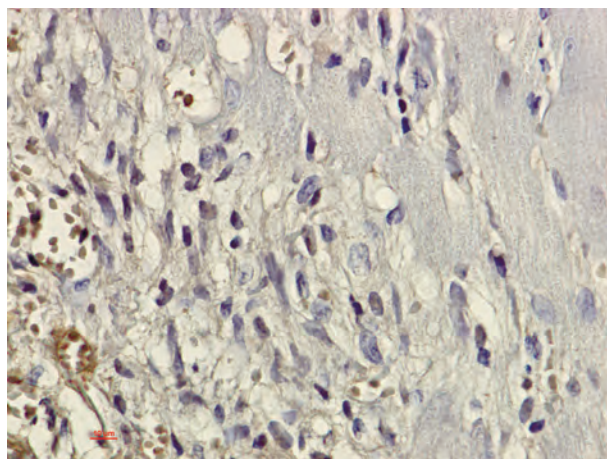


Рис. 4. Группа антиVEGF, 3 суток, слабо выраженная окраска на эндотелин в пограничной зоне. Иммуногистохимия (краситель DAB, первичные антитела к ET-1/2/3, докрашивание гематоксилином).

Применение антител к факторам роста снижало интенсивность окраски инфарктной и перинфарктной зон в ранние сроки после моделирования инфаркта миокарда (с 1-х по 3-и

сутки), особенно это явление было характерно для животных группы анти-VEGF. Так, на 3-и сутки в группе анти-VEGR регистрировалась очень бледная окраска инфарктной и перинфарктной зон (рис. 4) и чуть более яркая — в группе анти-FGF (рис. 5). К 7-м суткам интенсивность окраски резко нарастала, достигая максимума, а к 14-м суткам вновь снижалась, причем у животных группы анти-VEGR зафиксирована окраска сосудов в зоне интактного миокарда (рис. 6).

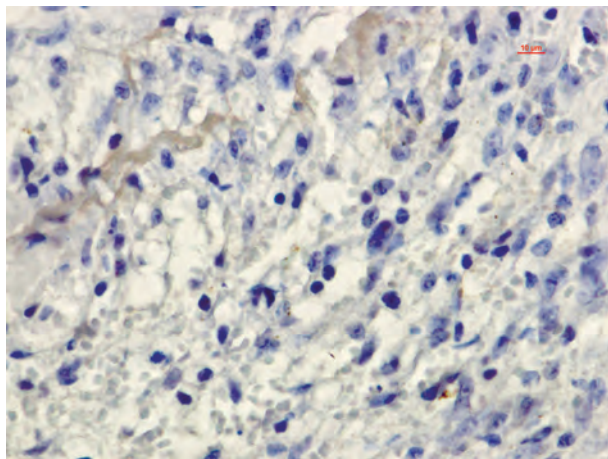


Рис. 5. Группа антиFGF, 3 суток, очень слабо выраженная окраска на эндотелин в зоне инфаркта. Иммуногистохимия (краситель DAB, первичные антитела к ET-1/2/3, докрасшивание гематоксилином).

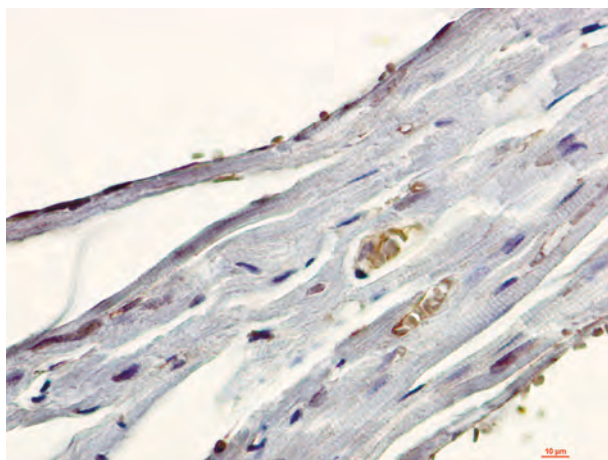


Рис. 6. Группа антиVEGF, 7 суток, окрашивание на эндотелин сосудов в интактном миокарде. Иммуногистохимия (краситель DAB, первичные антитела к ET-1/2/3, докрасшивание гематоксилином).

Изменение динамики выработки эндотелина в ответ на введение факторов роста свидетельствует о сдвиге и повышении экспрессии этого регулятора на более ранние этапы репарации миокарда после факта его ишемического повреждения. Вероятно, это объясняется, с одной стороны, большей сохранностью клеток в зоне ишемического повреждения при высоких концентрациях ростовых факторов, способностью их к ответу на стимуляцию в условиях гипоксии, а с другой стороны — повышением готовности генного аппарата клеток к ответу на стимулы, активирующие транскрипцию генов в ответ на экстрацеллюлярные сигналы. С учетом

эффекта взаимодействия данного лиганда с ET_v рецепторами эндотелиальных клеток, приводящего к вазодилатации, выявленная динамика свидетельствует об увеличении объемного кровотока в зоне повреждения и прилежащих к ней областях миокарда.

Таким образом, нами установлена динамика экспрессии эндотелина в миокарде при его ишемическом повреждении и инфаркте, а также установлено значительное стимулирующее воздействие факторов роста FGF2 и VEGF на экспрессию эндотелина в зоне ишемического повреждения и перинфарктной зоне при экспериментальном инфаркте миокарда.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гозмаков О.А. Эндотелин в кардиологии: молекулярные, физиологические и патологические аспекты (обзор) // Кардиология. — 2001. — № 2. — С. 50 — 58.
2. Мордовин В.Ф., Рипп Т.М., Соколов С.Е. и др. Динамика показателей эндотелийзависимой вазодилатации и гипотензивная эффективность эналаприла у пациентов с артериальной гипертензией // Кардиология. — 2001. — № 6. — С. 31 — 33.
3. Патарая С.А., Преображенский Д.В., Сидоренко Б.А., Масенко В.П. Биохимия и физиология семейства эндотелинов // Кардиология. — 2000. — Т. 40, № 6. — С. 78 — 85.
4. Суворов А.В., Горева В.В., Суворов М.А. Изменение липидного профиля, пероксидазных свойств крови и уровня эндотелина-1 у больных стенокардией напряжения при лечении нифедипином GITS и фелодипином // Нижегородский мед. журн. — 2002. — № 3. — С. 7 — 11.
5. Шурыгин М.Г., Шурыгина И.А. Фактор роста фибробластов как стимулятор ангиогенеза при инфаркте миокарда // Бюл. СО РАМН. — 2010. — Т. 30, № 6. — С. 89 — 92.
6. Шурыгин М.Г., Шурыгина И.А., Каня О.В. Динамика плотности рецепторов к фактору роста фибробластов при экспериментальном инфаркте миокарда // Сибирский медицинский журнал. — 2010. — № 2. — С. 20 — 22.
7. Bohm F., Beltran E., Pernow J. Endothelin receptor blockade improves endothelial function in atherosclerotic patients on angiotensin converting enzyme inhibition // J. Intern. Med. — 2005. — Vol. 257. — P. 263 — 271.
8. Inoue A., Yanagisawa M., Kimura S. et al. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1989. — Vol. 86, N 8. — P. 2863 — 2867.
9. Itoh Y., Yanagisawa M., Ohkubo S. et al. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding the precursor of a human endothelium-derived vasoconstrictor peptide, endothelin: identity of human and porcine endothelin // FEBS Lett. — 1988. — Vol. 231, N 2. — P. 440 — 444.
10. Levin E.R. Endothelins // N. Engl. J. Med. — 1995. — Vol. 333, N 6. — P. 356 — 363.

11. Rothermund L., Pinto Y.M., Hoher B. et al. Cardiac endothelin system impairs left ventricular function in rennin-dependent hypertension via sarcoplasmic reticulum Ca_2^+ uptake // Circulation. — 2000. — Vol. 102. — P. 1582–1588.
12. Spinar J., Spinarova L., Vitovec J. et al. Big endothelin and chronic heart failure // Vnitr. Lek. — 2002. — Vol. 48. — P. 3–7.
13. Willey K.E. Davenport A.P. Nitric oxide-medulation of the endothelin-1 signaling pathway in the human cardiovascular system // Brit. J. Pharmacology. — 2001. — Vol. 132. — P. 213–220.
14. Yanagisawa M., Kurihara H., Kimura S., Tomobe Y. et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells // Nature. — 1988. — Vol. 332, N 6163. — P. 411–415.
15. Yanagisawa M., Masaki T. Molecular biology and biochemistry of the endothelins // Trend. Pharmacol. Sci. — 1989. — Vol. 10. — P. 374–378.

Сведения об авторах

Шурыгин Михаил Геннадьевич – доктор медицинских наук, заведующий научно-лабораторным отделом ФГБУ «Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии» СО РАМН, главный научный сотрудник отдела медико-биологических исследований и технологий ФГБУН Иркутский научный центр СО РАН (664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1; тел.: 8 (3952) 29-03-69; e-mail: mshurygin@gmail.com)

Шурыгина Ирина Александровна – доктор медицинских наук, заместитель директора ФГБУ «Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии» СО РАМН по научной и инновационной деятельности, главный научный сотрудник отдела медико-биологических исследований и технологий ФГБУН Иркутский научный центр СО РАН (664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1; тел.: 8 (3952) 29-03-38; e-mail: irinashurygin@gmail.com)

Дремина Наталья Николаевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории патоморфологии ФГБУ «Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии» СО РАМН (664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1; e-mail: drema76@mail.ru)

Каня Олег Витославович – аспирант ФГБУ «Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии» СО РАМН (664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1; e-mail: ole1587@gmail.com)