

Морфологическая характеристика течения экспериментального инфаркта миокарда под воздействием гранулоцитарного колониестимулирующего фактора

Т.Х. Нутфуллина, А.Н. Крутиков, Х.К. Аминева

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П.Павлова, кафедра факультетской терапии

Резюме

Исследовалось влияние Г-КСФ на процессы репарации миокарда у крыс. Оценивалась зона ишемического поражения и плотность сосудистой сети грануляционной ткани к 7-м суткам развития инфаркта. Протяженность инфаркта миокарда в группе животных, получавших Г-КСФ, и в контрольной группе была одинакова. В то же время количество капилляров и недифференцированных сосудов в формирующейся грануляционной ткани было существенно больше у животных, получавших препарат. Это подтверждает участие Г-КСФ в стимуляции ангиогенеза.

Ключевые слова: Г-КСФ, инфаркт миокарда, ангиогенез.

Morphological characteristics of experimental myocardial infarction after granulocyte growth factor injection

T.H. Nutfullina, A.N. Krutikov, H.K. Amineva

Resume

G-CSF effects on experimental myocardial infarction in rats have been studied. Morphometrical evaluation was performed of the infarcted zone as well as of the density of capillary and undifferentiated vessels in the surrounding granulation tissue. By day 7 G-CSF had no influence on the size of the infarcted area, but the vessel density was substantially increased following administration of G-CSF. Existing data on G-CSF effects on angiogenesis are controversial. The results obtained favor stimulatory effect of G-CSF on angiogenesis in healing of the myocardial infarction.

Key words: G-CSF, myocardial infarction, angiogenesis.

Статья поступила в редакцию: 12.11.06. и принята к печати: 15.12.06.

Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ) относится к одним из гематологических факторов роста и отвечает за продукцию, созревание гемопоэтических стволовых клеток в костном мозге. Кроме того, Г-КСФ способствует выходу стволовых клеток из костного мозга, тем самым увеличивая их количество в периферической крови. Поэтому использование Г-КСФ рассматривается во многих областях медицины как возможность неинвазивного способа увеличения количества собственных циркулирующих стволовых клеток.

В кардиологии применение Г-КСФ обосновано его способностью к мобилизации стволовых клеток из костного мозга и вероятной миграции их в пораженную инфарктом область сердца. Предполагается, что они участвуют в репарации миокарда, в т.ч. способны дифференцироваться в кардиомиоциты [1, 2]. Одной из первых экспериментальных работ по использованию Г-КСФ в кардиологии, является работа Orlik с соавторами (2001 г.), где они оценивали влияние подкожно вводимых Г-КСФ и фактора стволовых клеток на течение экспериментального инфаркта миокарда у мышей. На 27 день течения инфаркта в опытной группе наблюдали ткань миокарда, включающую в

себя кардиомиоциты и сосуды, а в контрольной группе происходило замещение некротизированной зоны соединительной тканью. В дальнейших работах такого же положительного результата получено не было. Дифференцировка костно-мозговых стволовых клеток в кардиомиоциты и формирование миокарда на месте инфаркта другими авторами представляется весьма сомнительным [3,4,5, 6]. Однако выяснено, что Г-КСФ непосредственно оказывает антиапоптотический эффект на кардиомиоциты путем воздействия на собственный Г-КСФ рецептор [7] и участвует в стимуляции ангиогенеза [4, 5, 6]. В то же время не все авторы признают способность Г-КСФ влиять на пораженную зону миокарда. Есть исследования, по результатам которых не получено достоверных различий между контрольной группой и группой, получавших Г-КСФ [3, 8].

Возможную репарацию миокарда после повреждения связывают с наличием стволовых клеток сердца. Ранее считалось, что сердце не способно отвечать на любые поражения путем деления и пролиферации кардиомиоцитов. Количество сердечных клеток устанавливается с рождения и остается постоянным в течение всей жизни. Согласно этой точке зрения, воз-

раст кардиомиоцитов соответствует возрасту организма и сердце не имеет резервных механизмов. В последнее время доказано существование стволовых клеток сердца — CSC—c—kit+lin(–), расположенных преимущественно в предсердиях и способных дифференцироваться в кардиомиоциты, эндотелиальные и гладкомышечные клетки, которые участвуют в формировании сосудистой стенки. Стимуляция ростовыми факторами способствует ускорению процесса регенерации миокарда, что, возможно, связано с непосредственным воздействием ростовых факторов на стволовые клетки сердца [9].

Много работ посвящено изучению влияния Г–КСФ на процессы ангиогенеза. Но, не смотря на это, результаты этих исследований противоречивы. Поэтому целью нашей экспериментальной работы стало изучение стромально-сосудистого компонента инфаркта миокарда под воздействием Г–КСФ. Крысам вводили Г–КСФ подкожно 10 мкг/кг веса в течение первых пяти дней течения инфаркта миокарда, на седьмой день крысы были выведены из опыта. Оценивалась величина распространности зоны ишемического поражения миокарда и плотность сосудистой сети в репаративной зоне инфаркта миокарда у крыс, получавших и не получавших Г–КСФ. Репаративная зона представлена грануляционной тканью, содержащей в себе недифференцированные сосуды. К 7 суткам организации инфаркта можно выделить капилляры, сосуды артериального и венозного колена. В зрелой рубцовой ткани число сосудов уменьшается, так как часть сосудов спадается, а часть превращается в синусы.

Полученные нами результаты показывают, что, протяженность инфаркта миокарда у двух групп животных была одинакова (доля пораженного инфарктом левого желудочка в контрольной группе 32,5 %, группе с введением Г–КСФ 35,8 %). В то время как количество капилляров (в контрольной группе 470, опытной 710 на 1 мм²; $p < 0,05$), и недифференцированных сосудов (в контрольной группе 180, опытной 250 на 1 мм², $p < 0,05$) существенно больше в группе, получавших Г–КСФ. К тому же, в опытной группе сохраняются островки переживающих кардиомиоцитов, а перифокальные повреждения миокарда менее выражены, чем в контрольной.

Основываясь на положительных результатах экспериментальных исследований, предполагается, что терапия Г–КСФ приведет к улучшению показателей функции сердца. Однако, полученные результаты проведенных клинических исследований не однозначны. Применение Г–КСФ изучается у пациентов с различными заболеваниями сердца — ИБС (стенокардия напряжения, инфаркт миокарда), кардиомиопатиями, декомпенсированными пороками сердца, сопровождавшимися сердечной недостаточностью.

Большое количество работ посвящено изучению влияния Г–КСФ на течение инфаркта миокарда. Проведены крупные, рандомизированные, плацебо контролируемые исследования пациентам с инфарктом миокарда (с элевацией сегмента ST). После выполнения больным ангиопластики с постановкой стента, к проводимой стандартной терапии инфаркта миокарда дополнительно вводили Г–КСФ подкожно 10 мкг/кг веса

больного в течение первых 5 дней. Наблюдали уменьшение зоны инфаркта миокарда по данным сцинтиграфии [10]. В исследовании FIRSTLINE–AMI получено значительное улучшение показателей к 4 месяцу течения инфаркта миокарда у пациентов, получавших Г–КСФ по сравнению с контрольной группой. Увеличилось систолическое утолщение стенки левого желудочка — $(1.11 \pm 0.260, \text{ по сравнению } 29 \pm 0.22)$, возросла фракция выброса $(54 \% \pm 8 \text{ по сравнению } 48 \% \pm 4)$, конечно-диастолический диаметр левого желудочка не изменился (55 ± 5) [11]. По этим показателям получено улучшение и у других авторов [10]. Также отмечалось уменьшение индекса нарушения локальной сократимости (WMSI) $(1.41 \pm 0.25, \text{ через } 4 \text{ месяца } 1.17 \pm 0.22)$ [6]. Помимо этого, больным проводили стресс-тест с добутином на четвертый месяц течения инфаркта миокарда. По его результатам: систолическое утолщение стенки левого желудочка возросло в группе с введением Г–КСФ $(1.24 \pm 0.31 \text{ по сравнению с } 0.46 \pm 0.25)$, увеличилась фракция выброса $(59 \% \pm 7 \text{ по сравнению с } 54 \% \pm 5)$, уменьшился индекс нарушения локальной сократимости $(1.35 \pm 0.24 \text{ по сравнению с } 1.66 \pm 0.23)$. [11]. Кроме того, по данным позитронно-эмиссионной томографии в группе, получавших Г–КСФ отмечено повышение захвата F¹⁸-дезоксиглюкозы в зоне инфаркта миокарда, в то время как в контрольной группе наблюдалось незначительное понижение захвата F¹⁸-дезоксиглюкозы [11].

В то же время в ряде исследований не выявлено влияния Г–КСФ на течение инфаркта миокарда. Увеличение фракции выброса было одинаковым в контрольной группе и у лиц, получавших Г–КСФ [12, 13]. Zohlhofer et al. сообщают, что по данным сцинтиграфии распространенность инфаркта миокарда к 4 месяцу не различалась [13], а Ripa et al. не обнаружили существенных отличий показателей систолической толщины стенки левого желудочка к 6 месяцу в двух группах [12].

Следует отметить, что побочные эффекты терапии Г–КСФ наблюдались в виде ускорения процесса рестенозирования коронарных стентов [10], мышечного дискомфорта и болей в костях [13]. Однако по данным других авторов процент повторной окклюзии наблюдался примерно с одинаковой частотой независимо от применения Г–КСФ [11, 12, 13].

Результаты двух крупных, рандомизированных исследований FIRSTLINE–AMI и REVIVAL2 значительно отличаются. FIRSTLINE–AMI сообщают о сохранности и эффективности терапии Г–КСФ пациентам с инфарктом миокарда, в то время как REVIVAL2 об отсутствии влияния Г–КСФ на течение инфаркта миокарда, не смотря на вовремя проведенную ангиопластику. Этот вопрос обсуждался на третьем международном симпозиуме генной и клеточной терапии, посвященный сердечно-сосудистым заболеваниям. Обнаружены существенные различия между двумя исследованиями. Основные из них — возраст пациентов и время начала терапии Г–КСФ. В FIRSTLINE–AMI участвовали пациенты на 10 лет моложе пациентов исследования REVIVAL2, что играет важную роль в кардиопротекции. В экспериментальных работах показаны более выраженные процессы репарации миокарда

у молодых крыс по сравнению с крысами старшего возраста [14]. Можно предположить, что возраст организма определяет не только выраженность реакции костного мозга на введение Г-КСФ, но и резервные механизмы самого сердца, в т.ч. количество стволовых клеток сердца и способность к репарации после поражения. Помимо этого, в работе FIRSTLINE-AMI подкожное введение Г-КСФ производилось в первые 89 ± 35 мин после реперфузии, т.е. раньше, чем REVIVAL2. Успешность более раннего воздействия Г-КСФ на пораженный миокард объясняется прямым, временно-зависимым, кардиопротективным эффектом Г-КСФ на кардиомиоциты [7]. Полагается, что непосредственное влияние Г-КСФ на ткани миокарда развивается быстрее, чем мобилизация стволовых клеток.

В России также было проведено рандомизированное исследование ROT-FRONT [15]. В нем участвовали пациенты с постинфарктным кардиосклерозом, сердечной недостаточностью (NYHA II–IV ФК) и фракцией выброса менее 40 %. Оценивалось 6-минутный тест с ходьбой, определение ФК ХСН, качества жизни (по Миннесотскому опроснику больных с ХСН), показатель по шкале оценки клинического состояния. Проводили полное инструментальное исследование, включающее ЭХОКГ, стресс-ЭХОКГ с добутамином, радионуклидное исследование, МРТ. У пациента относительно молодого возраста (48 лет), с невысоким классом СН (NYHA II), с выраженной лейкоцитарной реакцией (в 12 раз увеличилось количество лейкоцитов с появлением миелоцитов и миелобластов) наблюдали улучшение по всем исследуемым показателям. Остальные пациенты были в возрасте 60 лет, с высоким функциональным классом сердечной недостаточности и с менее выраженным лейкоцитозом (увеличение лейкоцитов в 6–8 раз). У двух пациентов, получавших Г-КСФ, изменения были по различным показателям, в целом течение ХСН оставалось стабильным, у одного пациента наступило ухудшение состояния. Следует отметить, что рубцовые изменения после перенесенного инфаркта, не изменились. Полученное улучшение течения сердечной недостаточности, авторы объясняют молодым возрастом пациентов, невысоким классом СН и хорошей лейкоцитарной реакцией на введение Г-КСФ [15]. Помимо этого, Г-КСФ рассматривается как цитокин с рядом гормональных малоизученных эффектов, оказываемых в т.ч. и на миокард [15].

Отмечено положительное действие Г-КСФ у пациентов с ИБС в виде уменьшения количества ангинозных приступов в день и, соответственно, потребности в нитроглицерине [16, 17].

Проведенные исследования показывают различное влияние Г-КСФ на течение сердечных заболеваний. Возможно, это связано с возрастом пациентов, способностью костного мозга реагировать на воздействие Г-КСФ и, соответственно, выраженностью лейкоцитоза, количеством мобилизованных клеток-предшественников; функциональным классом сердечной недостаточности; наличием сопутствующей патологии.

Многие исследователи обращают внимание на участие Г-КСФ в ангиогенезе. В нашей работе большее количество новообразованных сосудов в опытной

группе указывает на участие Г-КСФ в стимуляции ангиогенеза. Механизмы этого эффекта изучаются и до конца остаются неясными. Известно, что под влиянием Г-КСФ повышается количество клеток миелоидного ряда в кровотоке. В свою очередь нейтрофилы выделяют различные биологически активные вещества, среди которых и сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), который воздействует на костный мозг и вызывает мобилизацию клеток-предшественников эндотелиоцитов (EPS)-гемангиобластов, из них впоследствии образуются сосуды. Показано влияние Г-КСФ на увеличение количества циркулирующих VEGFR2+ EPCs [5]. Также Г-КСФ непосредственно влияет на костный мозг и приводит к мобилизации стволовых клеток, в т.ч. гемангиобластов, и миграцию их в зону инфаркта миокарда, которые в дальнейшем могут непосредственно становиться частью сосудистой стенки.

Помимо стимуляции ангиогенеза, Г-КСФ оказывает антиапоптотический эффект на кардиомиоциты путем воздействия на собственный Г-КСФ рецептор, расположенный на кардиомиоцитах. Связывание Г-КСФ со своим рецептором приводит к активации Jak-Stat сигнального пути на кардиомиоцитах — Jak2 и Stat3 пути. В результате этого повышается количество противорапоптотических белков в зоне инфаркта миокарда — Bcl-2 и Bcl-xL, за счет чего и осуществляется кардиопротективное действие [7, 18].

Рассмотренные основные эффекты, оказываемые Г-КСФ на течение инфаркта миокарда, могут существенно улучшить последствия организации миокарда после некроза. С одной стороны, происходит стимуляция ангиогенеза и образование сосудов артериального, венозного колена, капилляров. Новообразованные сосуды уменьшают ишемию миокарда. Это способствует выживанию кардиомиоцитов пограничной зоны, которые находятся в состоянии дистрофии, обусловленной в т.ч. и гипоксией. С другой стороны, Г-КСФ непосредственно оказывает антиапоптотический эффект на кардиомиоциты. Пережившие кардиомиоциты могут впоследствии гипертрофироваться, частично возмещая функцию погибших кардиомиоцитов, что способствует уменьшению ремоделирования миокарда, образования аневризмы.

Основываясь на экспериментальных и клинических исследованиях, можно заключить, что воздействие Г-КСФ на течение инфаркта миокарда определяется многими факторами и до конца остается не ясным. Следует отметить, что значимых побочных эффектов не наблюдалось. Это позволяет продолжить дальнейшее изучение возможностей терапии Г-КСФ.

Литература

1. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S et al. Mobilised bone marrow cells repair the infarcted heart, improving functional and survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:10344–10349.
2. Fukuhara S, Tomita S, Yamashiro S et al. Direct cell-cell interaction of cardiomyocytes is key for bone marrow stromal cells to go into cardiac lineage in vitro. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 125: 1470–1480.
3. Deten, Volz HC, Clamors S et al. Hematopoietic stem cells do not repair the infarcted mouse heart. *Cardiovasc Res* 2005; 65(1): 52–63.

4. Lio KQ, Qi X, Du JP et al. Treatment of acute myocardial infarction with autologous bone marrow stem cells mobilization combined with recombinant growth factor in rat. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 2006; 18(8): 494–7.
5. Ohki Y, Heissing B, Sato Y et al. Granulocyte colony-stimulating factor promotes neovascularisation by releasing vascular endothelial growth factor from neutrophils. *FASEB J*. 2005; 19(14): 2005–7.
6. Ohtsuka M, Tacano H, Zou Y et al. Cytokine therapy prevents left ventricular remodeling and dysfunction after myocardial infarction through neovascularisation. *FASEB J*. 2004; 18: 851–853.
7. Harada M, Qin Y, Tacano H et al. G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jack-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nature Medicine* Volume 2005; 11(3): 305–11.
8. Sesti C, Hale SL, Lutzko C et al. Granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor improve contractile reserve of infarcted left ventricle independent of restoring muscle mass. *J Am Coll Cardiol*. 2005; 46(9): 1662–9.
9. Leri A, Kajstura J, Anversa P et al. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiol Rev* 2005; 85: 1373–1416.
10. Kang HJ, Kim HS, Zhang SY et al. MAGIC trial. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem cells mobilized with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: The MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet* 2004; 363: 751–756.
11. Ince H, Petzsch M, Kleine HD et al. FIRSTLINE-AMI trial. Preservation from left ventricular remodeling by front-intergrated revascularization and stem cell liberation in evolving acute myocardial infarction by use of granulocyte colony-stimulating factor. *Circulation* 2005; 112: 173–80.
12. Ripa RS, Jorgensen E, Wang Y et al. STEMMI trial. Stem cell mobilization induced by granulocyte colony-stimulating factor to improve cardiac regeneration after acute ST-elevation myocardial infarction. *Circulation*. 2006; 113(16):1983–92.
13. Zohnhofer D, Ott I, Mehilli J et al. REVIVAL-2 trial. Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2006; 295(9): 1003–10.
14. Lehrke S, Mazhari R, Durand DJ et al. Aging impairs the beneficial effect of granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor on post-myocardial infarction remodeling. *Circ Res* 2006; 99(5): 553–60.
15. Belenkov YUN, Ageev FT, Mareev VYU et al. ROT-FROMT trial. Mobilization of stem cells in the management of patients with heart failure. *Cardiologia* 2003; 43: 7–12.
16. Boyle AJ, Whitbourn R, Schlicht S et al. Intra-coronary high-dose CD34+ stem cells in patients with chronic ischemic heart disease: a 12-month follow-up. 2006. *Int J Cardiol*. 2006; 109(1): 21–7.
17. Wang Y, Kristina T, Ripa RS et al. Effect of mobilization of bone marrow stem cells by granulocyte colony-stimulating factor on clinical symptoms, left ventricular perfusion and function in patients with severe chronic ischemic heart disease. *Int J Cardiol*. 2005; 100(3): 477–83.
18. Tacano H, Qin Y, Hasegawa H et al. Effects of G-CSF on left ventricular remodeling and heart failure after acute myocardial infarction. *J Mol Med*. 2006; 84(3): 185–93.