

*На правах рукописи*

**РИСБЕРГ РОМАН ЮРЬЕВИЧ**

**СТИМУЛЯЦИЯ НЕОАНГИОГЕНЕЗА  
ПРИ ОСТРОМ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА  
(экспериментальное исследование)**

**14.01.17 – хирургия**

**Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук**

**Уфа – 2012**

Работа выполнена Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

**Научный руководитель:** доктор медицинских наук, профессор,  
**Плечев Владимир Вячеславович**

**Официальные оппоненты:** **Галимов Олег Владимирович**, доктор медицинских наук, профессор, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, заведующий кафедрой хирургических болезней и новых технологий;

**Бакиров Анвар Акрамович**, доктор медицинских наук, профессор, Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Республиканский противотуберкулезный диспансер» г. Уфа, главный врач.

**Ведущая организация:** Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Уральская государственная медицинская академия» Министерства Здравоохранения и социального развития Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «\_\_\_» октября 2012 года в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д.208.06.02 при Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (450000, г. Уфа, ул. Ленина, 3). С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации.

Автореферат разослан «\_\_\_» сентября 2012 года

Ученый секретарь

диссертационного совета

**Федоров Сергей Владимирович**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Ишемическая болезнь сердца остается одной из главных причин, определяющих высокий уровень инвалидизации и смертности работоспособного населения во всём мире. Высокий уровень летальности при инфаркте миокарда во многом определяется особенностями регенерации миокарда. У человека на поздних стадиях онтогенеза кардиомиоциты утрачивают способность к регенерации. В результате этого погибшие в ходе ишемии кардиомиоциты замещаются соединительной тканью. Необратимое повреждение кардиомиоцитов и сосудистых структур вследствие ишемии миокарда приводит к нарушению функции сердца и, в конечном итоге, сердечной недостаточности. Используемые в настоящее время консервативные и оперативные методы лечения ишемии миокарда не всегда эффективны или не могут быть применены по ряду причин. Так, например, у больных с дистальным поражением и диффузными изменениями в коронарных артериях достичь реваскуляризации миокарда с помощью методов хирургической коррекции становится невозможным. (Репин В.С., 1998; Потапов И.В. с соавт., 2001; Шевченко Ю.Л., 2006). В связи с этим разрабатываются новые способы регенерации пораженного миокарда на основе современных достижений молекулярной и клеточной биологии. Таким новым направлением в кардиологии и кардиохирургии является использование клеток костного мозга. Растущее число экспериментальных работ демонстрирует положительный эффект трансплантации этих клеток на регенерацию поврежденного миокарда (Aceves J.L. et al., 2006; Piao H. et al., 2005; Gao L.R. et al., 2006; Krausgrill B. et al., Meluzin J. et al., 2006). Однако введение данных клеток не лишено недостатков: необходимость иммуносупрессивной терапии, риск развития неопластических процессов, а также этические и юридические проблемы.

Все перечисленное диктует необходимость разработки новых подходов к улучшению реваскуляризации миокарда путем стимуляции неоангиогенеза.

**Цель работы.** Экспериментально изучить возможность применения препаратов «Иммурег» (5-оксиметилурацил) и «Аллоплант» для стимуляции неоангиогенеза при остром инфаркте миокарда.

**Задачи исследования:**

1. Разработать модель острого инфаркта миокарда в эксперименте на кроликах.

2. Изучить морфологические изменения в зоне ишемического повреждения миокарда при применении препаратов «Иммурег» и «Аллоплант – стимулятор васкулогенеза» в эксперименте.

3. Изучить динамику плотности сосудистой сети по периферии зоны ишемического повреждения миокарда при применении препаратов «Иммурег» и «Аллоплант – стимулятор васкулогенеза» в эксперименте.

4. Исследовать влияние препаратов «Иммурег» и «Аллоплант – стимулятор васкулогенеза» на экспрессию матричной РНК белков – стимуляторов ангиогенеза при экспериментальном инфаркте миокарда.

**Научная новизна:**

1. Впервые разработана экспериментальная модель острого инфаркта миокарда на кроликах, не требующая применения ИВЛ.

2. Впервые изучен неоангиогенез в условиях перорального применения препарата «Иммурег» и интрамиокардиального введения препарата «Аллоплант – стимулятор васкулогенеза» на светооптическом уровне при остром экспериментальном инфаркте миокарда в различные сроки наблюдения.

3. Впервые на молекулярно-биологическом уровне проведен анализ эффективности препарата «Иммурег» и препарата «Аллоплант – стимулятор васкулогенеза» для стимуляции экспрессии матричной РНК белков-стимуляторов ангиогенеза при экспериментальном инфаркте миокарда.

4. Получены новые данные о перестройке микроангиоархитектоники в процессе заживления участка некроза миокарда, характеризующиеся ростом количества вновь выявленных сосудов, и неравномерным распределением последних в поле зрения.

### **Положения выносимые на защиту:**

1. Разработанная модель острого инфаркта миокарда позволяет воспроизвести трансмуральный инфаркт в 92% случаев, с небольшой летальностью экспериментальных животных.

2. Комплексные клинико-функциональные, морфологические, молекулярно-биологические исследования позволяют дать адекватную оценку индуцированному неоангиогенезу в зоне ишемического повреждения миокарда:

- при пероральном воздействии препарата «Иммурег»;
- при интромаиокардиальном введении препарата «Аллоплант – стимулятор васкулогенеза»;
- при комбинированном воздействии препаратов «Иммурег» и «Аллоплант – стимулятор васкулогенеза».

3. Направленный на рост новых сосудов в зоне ишемического повреждения миокарда наибольший эффект оказывает суммарное воздействие препаратов «Иммурег» и «Аллоплант – стимулятор васкулогенеза», что подтверждается комплексными морфологическими и молекулярно-биологическими исследованиями.

**Практическая значимость работы.** Данные, полученные в исследовании, являются теоретической основой для внедрения новых методов стимуляции неоангиогенеза в клиническую практику. Внедрение в клинику результатов экспериментальных исследований позволит улучшить исходы лечения пациентов с ишемической болезнью сердца, снизить летальность, инвалидизацию населения, привести к более быстрому и полноценному возвращению их к трудовой деятельности.

**Внедрение результатов работы в практику.** Результаты морфологического и молекулярно-биологического исследования процессов неоангиогенеза в миокарде внедрены в учебный процесс кафедры патологической анатомии и гистологии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Башкирского государственного университета» Министерства социального развития России.

**Апробация работы.** Основные положения выполненных исследований доложены и обсуждены на XV Всероссийском съезде сердечно-сосудистых хирургов (Москва, 2009), 60-м Международном конгрессе Европейского общества сердечно-сосудистой и эндоваскулярной хирургии (Москва, 2011); на 14-й ежегодной сессии НЦ ССХ им. Бакулева РАМН с Всероссийской конференцией молодых ученых (Москва, 2010). По теме диссертации опубликовано 11 работ, получено 1 положительное решение о выдаче Патента РФ на изобретение.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 162 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, двух глав собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, практических рекомендаций и указателя литературы.

Текст работы иллюстрирован 22 таблицами и 61 рисунками, в том числе 14 микрофотографиями, макрофотографиями 14. Указатель литературы имеет 291 источника, из них 20 на русском языке и 271 на иностранном языке.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Материалы и методы исследования.** Экспериментальный острый инфаркт миокарда вызывался у 112 кроликов-самцов породы Шиншилла, средняя массы от 2,0 кг. Животные содержались в соответствии с санитарными правилами в виварии. Хирургическое вмешательство проводилось в операционной на базе вивария БГМУ.

Анестезиологическое пособие осуществлялось путем внутримышечной инъекции раствора кетамина из расчета 75–100 мг/кг. При этом у кроликов сохранялось самостоятельное дыхание, что исключало применение искусственной вентиляции легких.

Подопытным животным выполнялась продольная стернотомия, после чего рассекался перикард, обнажалось сердце. Затем перевязывалась передняя межжелудочковая артерия.

Для определения границ инфаркта миокарда в краевую вену уха вводили болюсно раствор тетрациклина, из расчета 100 мг на 1 кг тела животного (тетрациклин обладает способностью к флуоресценции в лучах ультрафиолетового света), после чего при освещении сердца лампой Вуда в темном помещении определяется яркая желто-зеленая флуоресценция сердца с дефектом перфузии в области кровоснабжения передней нисходящей артерии. Также наличие инфаркта подтверждалось изменением сегмента ST по данным ЭКГ в 2 стандартном отведении.

Интраоперационно после создания модели инфаркта миокарда и определения очага некроза все животные были разделены на 4 группы в зависимости от приводимого лечебного воздействия:

1 группа (25 животных) – контрольная – по границе очага инфаркта миокарда эндомиокардиально из нескольких вколов вводился «Плацебо» – физиологический раствор, лечение «Иммурегом» после операции не проводили.

2 группа (29 животных) – группа «Аллопланта» – по границе очага инфаркта миокарда эндомиокардиально из нескольких вколов вводили препарат «Аллоплант» – стимулятор васкулогенеза в дозе 50 мг разведенный на 1 мл физиологического раствора, лечение «Иммурегом» после операции не проводили.

3 группа (28 животных) – группа «Иммурега» – по границе очага инфаркта миокарда эндомиокардиально из нескольких вколов, вводился «Плацебо» – физиологический раствор, также животные получали препарат «Иммурег» перорально в дозе 25 мг на килограмм живого веса 3 раза в день на протяжении 14 дней.

4 группа (30 кроликов) – группа сочетанного применения «Аллопланта» и «Иммурега» – по границе очага инфаркта миокарда эндомиокардиально из нескольких вколов, вводили препарат «Аллоплант – стимулятор васкулогенеза по указанной схеме и дополнительно животные получали «Иммурег» перорально, 3 раза в день в расчетных дозировках в течение 14 дней.

Первым этапом было проведено морфологическое исследование с количественной оценкой реваскуляризации.

После эвтаназии сердце кролика ниже лигатуры разрезали в поперечном направлении с помощью специального устройства на 3 сегмента одинаковой толщины – апикальный, средний, базальный. После фиксации каждый помещали в 10% раствор нейтрального формалина на 4-е суток. Затем каждый сегмент сердца заливали в парафин и изготавливали срезы толщиной 7 мкм по общепринятой методике.

Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином и пикрофуксином по Ван Гизону. При этом выполнялась качественная и количественная оценка структурных изменений в очагах инфаркта, рубца, в пограничных к инфаркту и рубцу участках. Количественная оценка реваскуляризации проводилась в пограничной с рубцом зоне. В каждом препарате в пяти последовательных полях зрения при увеличении  $\times 400$ , производился подсчет количества всех сосудов: артериол, капилляров, венул, вен и синусов.

Вторым этапом было проведено молекулярно-биологическое исследование. В качестве наиболее перспективных эндогенных регуляторов формирования новых кровеносных сосудов, в особенности в гладкой мускулатуре сердца нами были рассмотрены различные факторы роста сосудов такие как – фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), факторы роста фибробластов (FGF1), фактор роста гепатоцитов (HGF) и инсулиноподобный фактор роста первого типа (IGF1).

Оценку экспрессии данных генов у разных групп сравнения проводили методом количественной ПЦР обратной транскрипции в реальном времени. Изменения в уровнях экспрессии генов рассчитывали с использованием значений пороговых циклов с помощью специализированной программы REST Tool V2.0.7 (Corbett Research, США), обладающей возможностью статистической обработки данных. В данной программе для определения разницы в экспрессии гена между опытными и контрольными группами используется значения пороговых циклов исследуемого гена и гена «домашнего хозяйства».

Для обработки результатов исследования и графической презентации статистических данных использовался пакет статистических программ STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc.).

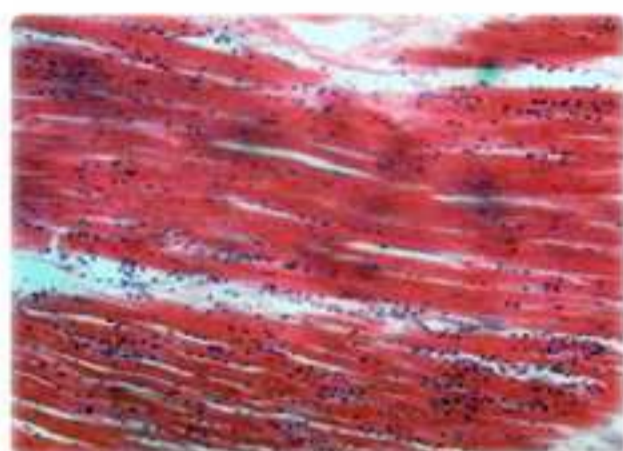
Оценка нормальности распределений переменных проводилась путем визуального анализа гистограмм распределения их значений, а также коэффициентов асимметрии, эксцесса и критерия Шапиро-Уилка. При соответствии распределения признака закону нормального распределения использовались методы параметрической статистики: вычисление среднего значения ( $M$ ), среднеквадратичного отклонения ( $SD$ ), стандартной ошибки среднего ( $SE$ ). При отличии распределения изучаемого признака от нормального использовались вычисление медианы ( $Me$ ), межквартильного размаха [ $lq;uq$ ]; в ряде случаев подобный подход применялся и для нормальных распределенных признаков. Определялось равенство дисперсий распределений признаков в сравниваемых группах с помощью критерия Левина. Достоверность различий результатов между группами устанавливалась с помощью  $t$ -критерия Стьюдента для независимых выборок, для непараметрических данных – с использованием  $U$ -критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферрони (для парных сравнений). При сопоставлении трех и более групп непараметрических показателей привлекался метод рангового анализа вариаций по Крускалу-Уоллису. Сравнение групп по качественному признаку осуществлялось путем построения и анализа таблиц сопряженности с использованием максимального правдоподобия хи-квадрат.

Непрерывные величины представлены как средние значения  $\pm$  стандартное отклонение среднего ( $M \pm SD$ ), либо  $Me$  [ $lq;uq$ ].

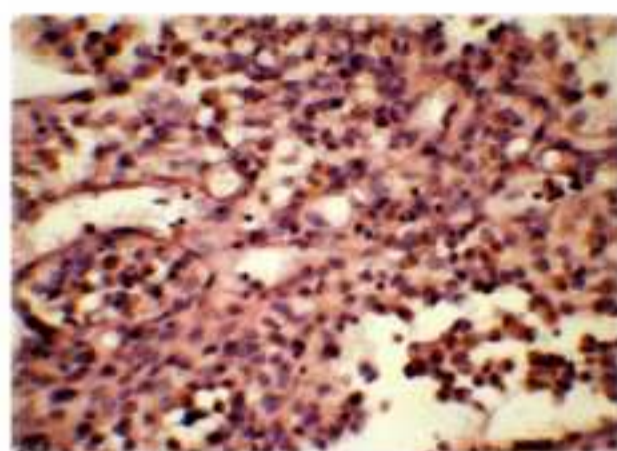
Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

**Результаты исследований и их обсуждение.** Первым этапом анализировалась течение инфаркта миокарда у животных контрольной группы. В первую неделю эксперимента в контрольной группе в центре препарата выявляется очаг некроза кардиомиоцитов, представленный однородной гомогенной структурой. В пограничной зоне лейкоцитарная инфильтрация и отек стромы (рис. 1а). Во вторую неделю опыта в микропрепарате видна зона инфаркта, замещенная грануляционной тканью. В поле зрения множество тонкостенных сосудов и инфильтрация круглоклеточных элементов – фибробластов, плазматических клеток, лимфоцитов и макрофагов с примесью лейкоцитов (рис. 1б). На четвертую неделю на-

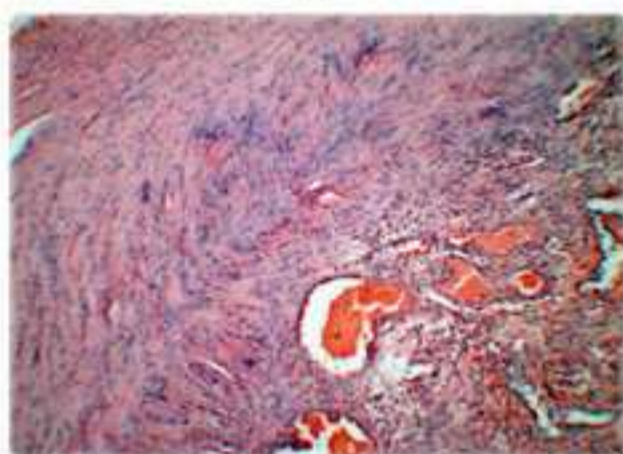
блюдения выявлялась зона сформированной соединительной ткани, определялся очаг грануляционной ткани поздней стадии, отмечались тонкостенные сосуды, значительное число фибробластов с примесью круглоклеточных элементов (рис. 1в). В восьмую неделю выявляется зрелая рубцовая ткань (рис. 1г).



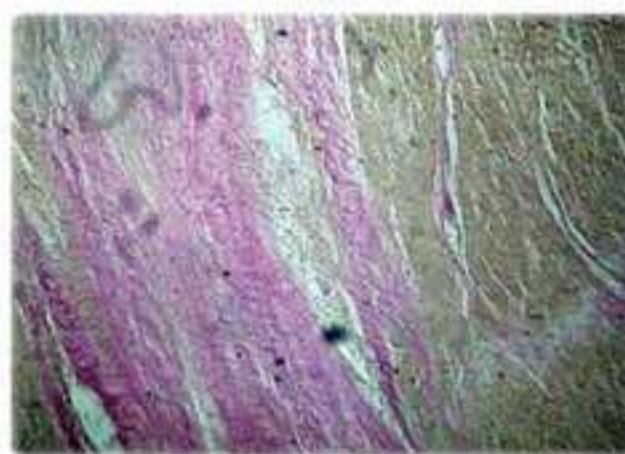
а



б



в

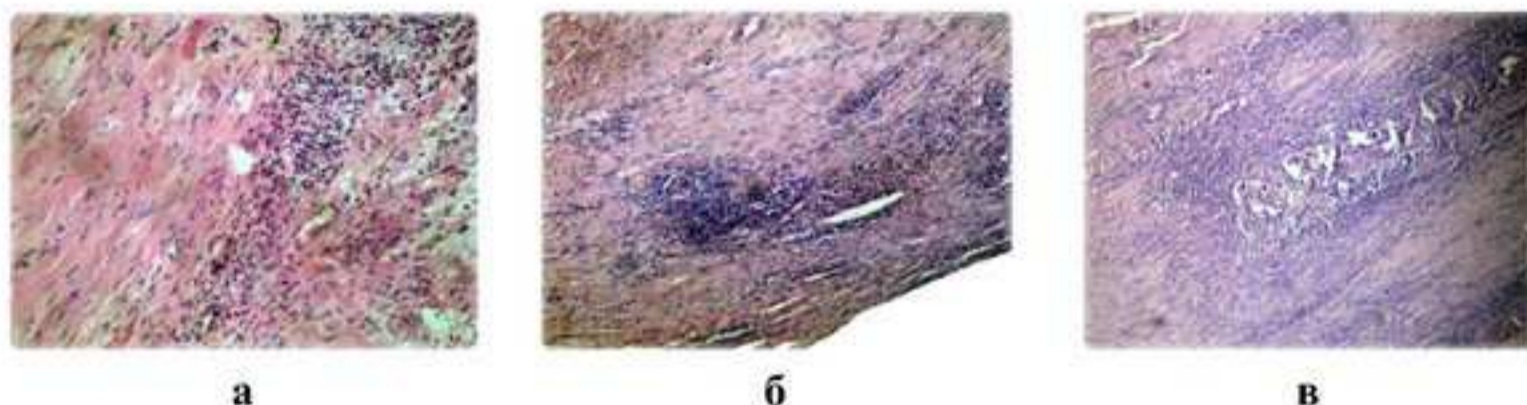


г

*Рис. 1.* Микрофото. Экспериментальный острый инфаркт миокарда кролика (контрольная группа): А – 1 неделя, окраска гематоксилин и эозин, х400; Б – 2 недели, окраска гематоксилин и эозин, х400; В – 4 недели, окраска гематоксилин и эозин, х200; Г – 8 недель, окраска пикрофуксином по Ван Гизону, х200

В первую неделю эксперимента на микроскопическом уровне видимой разницы в гистологической картине контрольной и опытных групп не определялось. На микроскопическом уровне выявились некротизированные кардиомиоциты, ядра, которых были лизированы и обнаруживались лишь контуры клеток. В пограничной инфаркту зоне определялись единичные полнокровные сосуды, перифокальные кровоизлияния, сохранялись очаги некроза и демаркационное воспаление (рис 2 а,б,в).

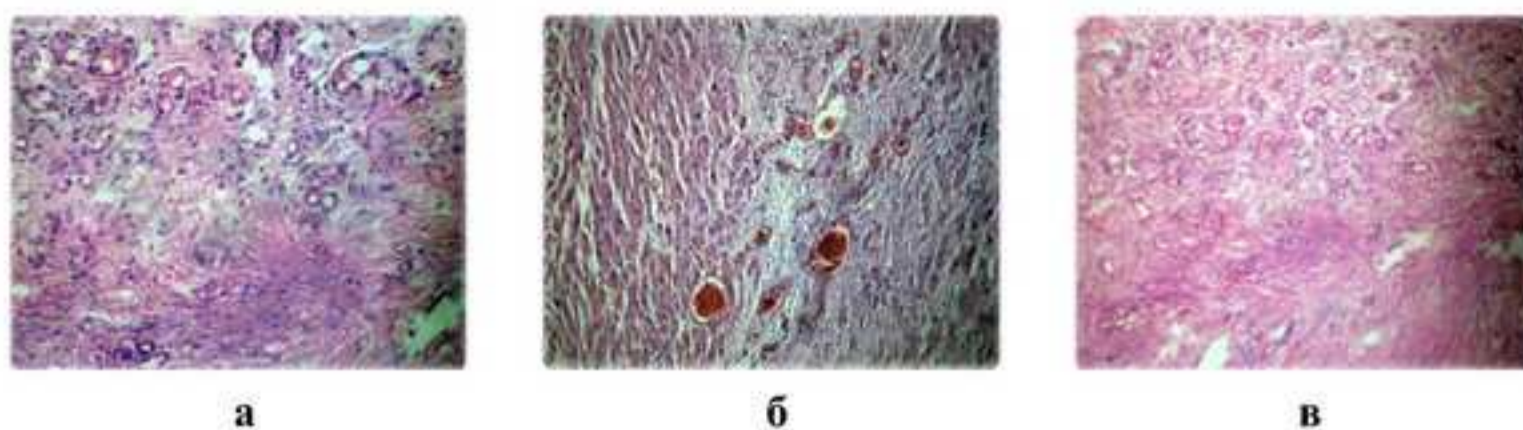
К первому месяцу наблюдения во всех группах площадь некроза погибшей ткани резко уменьшилась вследствие макрофагальной резорбции, определялись лишь единичные фрагменты разрушенных кардиомиоцитов.



*Рис. 2.* Микрофото. Экспериментальный острый инфаркт миокарда кролика на сроке 1 неделя (опытные группы «Иммурег», «Аллоплант» и совместное применение «Иммурег» и «Аллоплант»). А – группа «Иммурег», окраска гематоксилин и эозин, х400; Б – группа «Аллоплант», окраска гематоксилин и эозин, х400; В – группа «Иммурег» и «Аллоплант», окраска гематоксилин и эозин, х400

Более интенсивно эти процессы протекали в группе «Аллопланта» и комплексного применения «Аллопланта и Иммурега» вследствие более выраженной воспалительной реакции. Продолжалось созревание грануляционной ткани с формированием большого количества полнокровных сосудов и рубца с умеренным количеством фибробластов, аморфного соединительно-тканного матрикса с волокнами коллагена. Следует отметить, что процессы васкуляризации в препаратах группы «Аллоплант» в отличие от других групп сопровождались более активным замещением его волокнистой соединительной тканью. Терминальное сосудистое русло в около инфарктной зоне достигало максимальной плотности. Причем в группах «Иммурега» и совместного применения «Аллопланта и Иммурега» количество новообразованных сосудов достигало наибольшего значения в сравнении с контрольной серией и группой «Аллоплант» (рис. 3а,б,в).

К 1,5–2,0 – месяцам наблюдения во всех группах на микроскопическом уровне выявлялся рубец, состоящий из коллагеновых волокон с небольшим количеством фибробластов. Особенно данный процесс был выражен в группе «Аллоплант», группа комплексного применения обоих препаратов была сопоставима с контрольной.

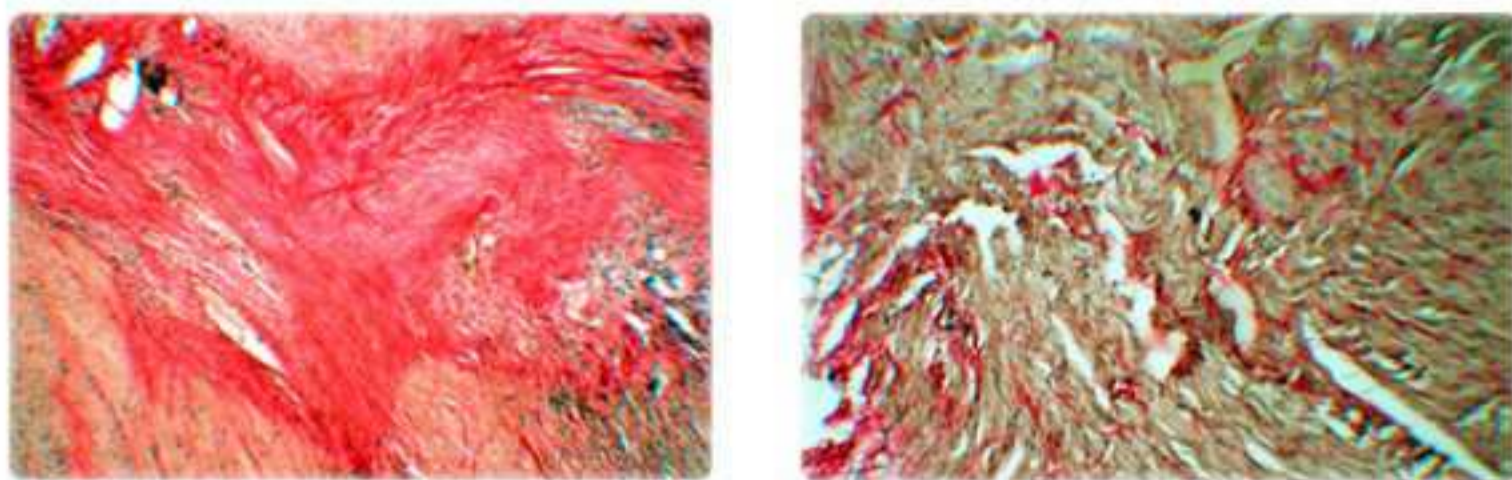


*Рис. 3.* Микрофото. Экспериментальный острый инфаркт миокарда кролика на сроке 4 недели (опытные группы «Иммурег», «Аллоплант» и совместное применение «Иммурег» и «Аллоплант»). А – группа «Иммурег», окраска гематоксилин и эозин, х400; Б – группа «Аллоплант», окраска гематоксилин и эозин, х400; В – группа «Иммурег» и «Аллоплант», окраска гематоксилин и эозин, х400

Наименьшие склеротические процессы наблюдались в группе «Иммурег». Становилась явной и нарастала в последующие сроки редукция капиллярной сети. Особенно выраженная в контрольной группе и более плавная и пролонгированная во всех опытных группах. Как и ожидалось, по периферии определялись гипертрофированные кардиомиоциты. Наиболее выраженные в группе «Иммурег» и в группе совместного применения обоих препаратов. В межточной ткани вокруг зоны некроза встречались склеротические процессы, особенно выраженные в группе «Аллоплант» (рис. 4а,б).

В первую неделю васкуляризация околоинфарктной зоны во всех группах имела примерно одинаковые значения. Динамика изменения в последующие периоды тоже была сходной, но отличалась количественными показателями. На второй недели в группе «Иммурег» васкуляризация в околоинфарктной зоне несколько превышала остальные группы, группа аллопланта и иммурега находилась на 2-м месте. На четвертой неделе показатели васкуляризации во всех опытных группах достоверно превышали показатели контрольной группы, при этом в динамике скорость реваскуляризации распределялась в следующем порядке: аллоплант, иммурег, совместное применение препаратов.

Максимальные показатели при этом были достигнуты в группе «Аллоплант» и «Иммурег».

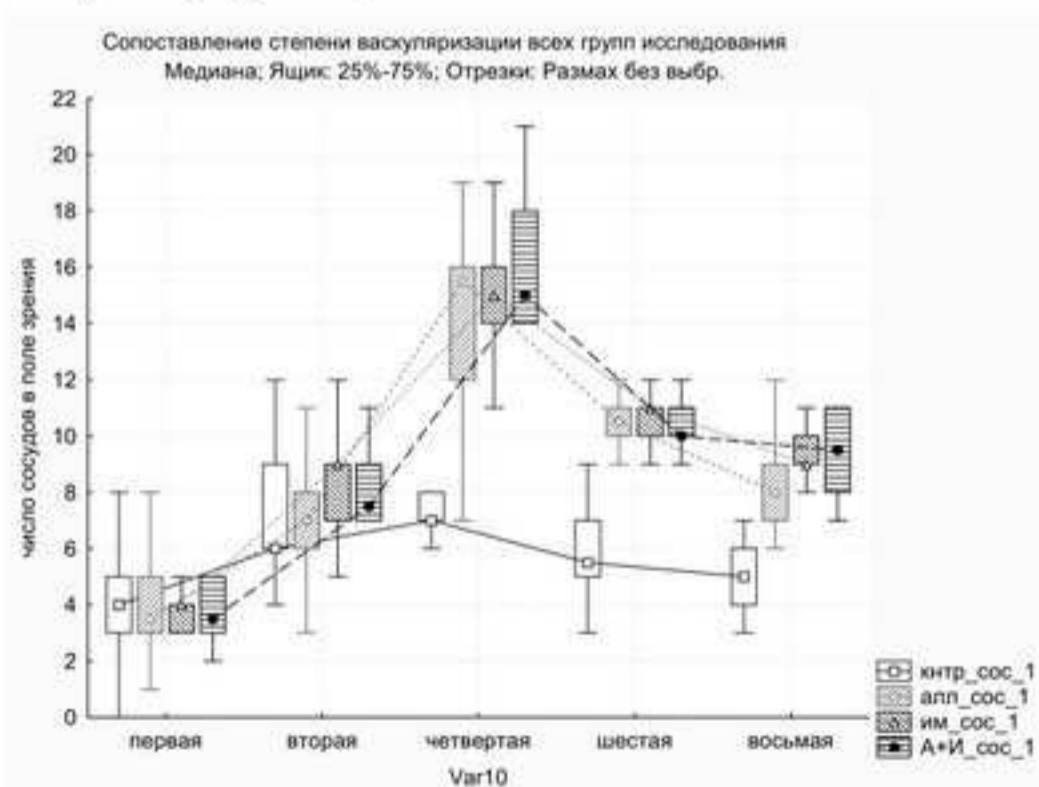


**а**

**б**

*Рис. 4.* Микрофото. Экспериментальный острый инфаркт миокарда кролика на сроке 4 недели (опытные группы «Иммурег», «Аллоплант»). А – группа «Аллоплант», окраска гематоксилин и эозин, х400; Б – группа «Иммурег», окраска пи-рофуксином по Ван Гизону, х400

В период на 6- и 8-й недели наблюдалась постепенное угасание степени реваскуляризации околоинфарктной зоны во всех четырех группах, скорость которого была различной. Самое резкое снижение наблюдалось в группе «Аллоплант». В остальных двух группах снижение носило более плавный, и продолжительный характер (рис. 5).



*Рис. 5.* Динамика васкуляризации в исследуемых группах животных на сроках 7-, 14-, 30-, 45- и 60-и суток

Вторым этапом нами было проведено молекулярно-биологическое исследование. Изучалась экспрессия основных генов факторов роста сосудов на фоне экспериментальной ишемии миокарда через 24 часа после эвтаназии животных. На рис. 6. представлен уровень мРНК генов роста *fgf2*, *vegf*, *hgf* и *igf* кардиомиоцитов кроликов в ответ на моделирование ишемии сердца. Достоверно повышается уровни мРНК гена *hgf* на 245% ( $p < 0,001$ ), *igf-1* на 137% ( $p < 0,001$ ) и *vegf* на 114% ( $p < 0,001$ ).

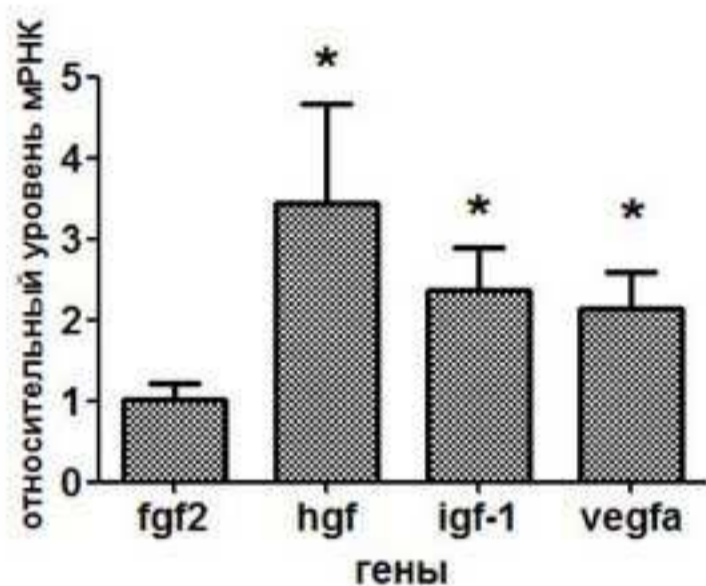


Рис. 6. Уровень мРНК генов факторов роста *fgf2*, *vegf*, *hgf* и *igf* кардиомиоцитов кроликов на фоне экспериментальной модели ишемии сердца. Контроль – уровень мРНК генов роста *fgf2*, *vegf*, *hgf* и *igf* кардиомиоцитов условно здоровых кроликов

Достоверно изменяются уровни мРНК всех генов факторов роста *fgf2*, *igf-1*, *vegfa* и *hgf* кардиомиоцитов кроликов в ответ на действие «Иммурег» на фоне экспериментальной модели ишемии сердца (рис. 7а). Через 24 часа после моделирования ишемии сердца на фоне действия «Иммурег» наблюдается индукция гена, кодирующего базовый фактор роста фибробластов (*fgf2*) на 27% ( $p = 0,003$ ), индукция фактора роста гепатоцитов (*hgf*) на 450% ( $p = 0,001$ ), индукция фактора роста эндотелия сосудов на 390% ( $p = 0,001$ ), а так же индукция инсулиноподобного фактора роста-1 (*igf-1*) на 170% ( $p = 0,001$ ).

Уровни мРНК генов факторов роста *fgf2*, *vegf*, *hgf* и *igf* кардиомиоцитов кроликов в ответ на действие аллопланта на фоне экспериментальной модели ишемии сердца (рис. 7б) практически не отличаются от уровней мРНК, полученных из группы «Ишемия». Экспрессия генов *hgf* и *igf-1* увеличивается на 517 и 360%, соответственно ( $p = 0,001$ ,  $p < 0,001$ ). Уровни мРНК генов *fgf2* и *vegfa* изменяются на 31 и 194% ( $p = 0,005$  и  $p < 0,001$ ).

Совместное 24-х часовое администрирование иммурег и аллопланта (рис. 7в) на фоне экспериментальной модели ишемии сердца индуцирует экспрессию гена *hgf* на 505% ( $p=0,001$ ), гена *igf-1* на 336% ( $p<0,001$ ), гена *vegfa* на 383% ( $p=0,001$ ).

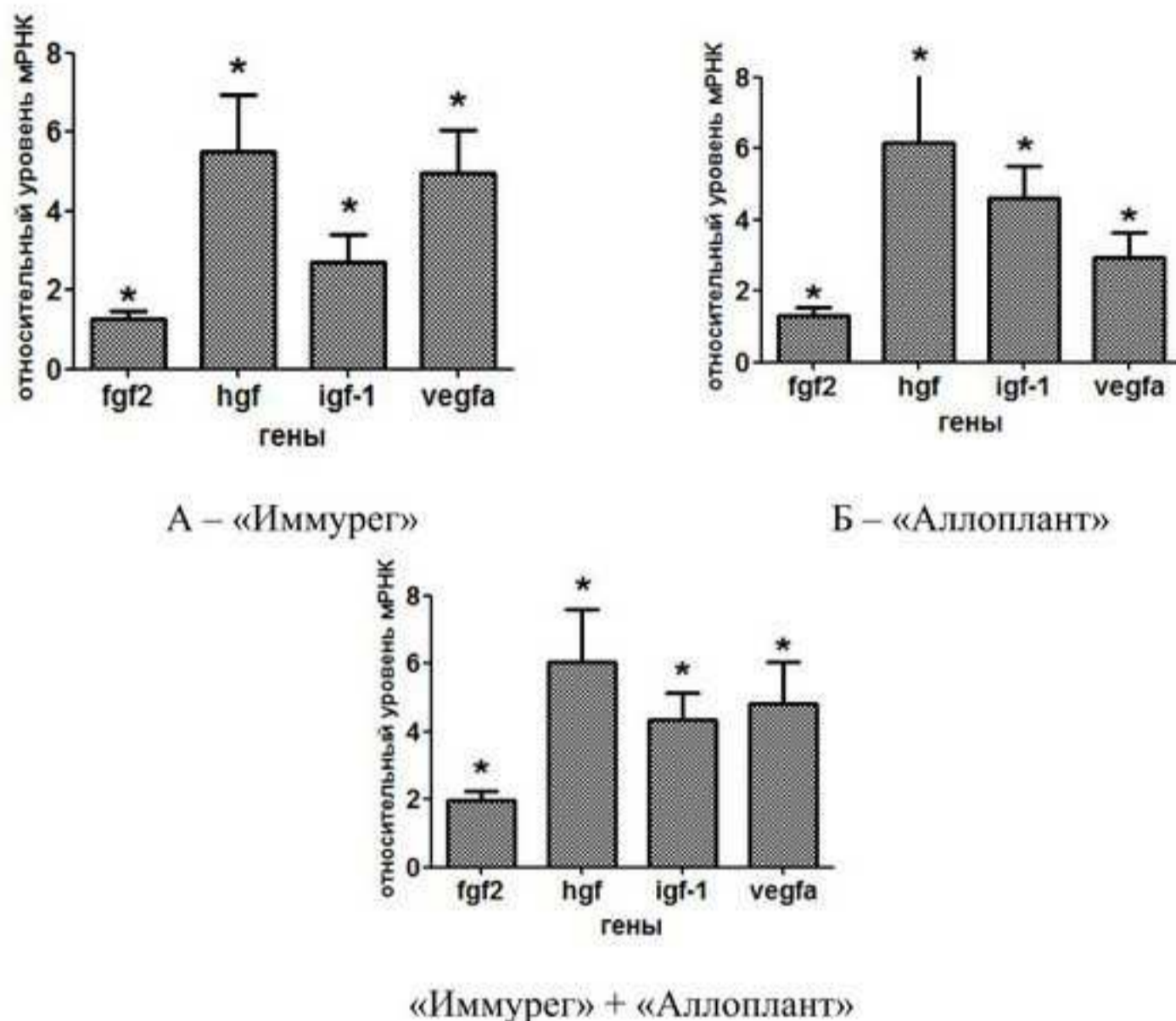


Рис. 7. Уровень мРНК генов фактора роста *fgf2*, *vegfa*, *hgf* и *igf* кардиомиоцитов кроликов в ответ на действие А – «Иммурег», Б – «Аллоплант», Б – совместное действие «Иммурег» и «Аллоплант» на фоне экспериментальной модели ишемии сердца. Контроль – уровень мРНК генов роста *fgf2*, *vegfa*, *hgf* и *igf* кардиомиоцитов условно-здоровых кроликов

Результаты анализа экспрессии генов факторов роста в кардиомиоцитах кроликов после локального введения препаратов иммурег и аллоплант в условиях экспериментальной модели ишемии сердца показали, что в условиях индуцированной ишемии максимальный уровень экспрессии по сравнению с контролем (актин) наблюдается в случае генов HGF (3,45), IGF-1 (2,37) и VEGF

(2,14), в то время как для FGF2 была выявлена слабая индукция, сравнимая с контролем. В случае использования иммурега, аллопланта и их комбинации активация транскрипции гена FGF2 также имеет наиболее низкие значения по сравнению с остальными генами. Например, комбинация двух препаратов показала экспрессию FGF2, превышающую контрольный уровень (ишемия) на 96%, что существенно меньше, чем аналогичные показатели для других факторов. Сравнительные данные, показывающие относительное усиление экспрессии изучаемых генов по сравнению с контролем (ишемия), представлены на рис. 8.

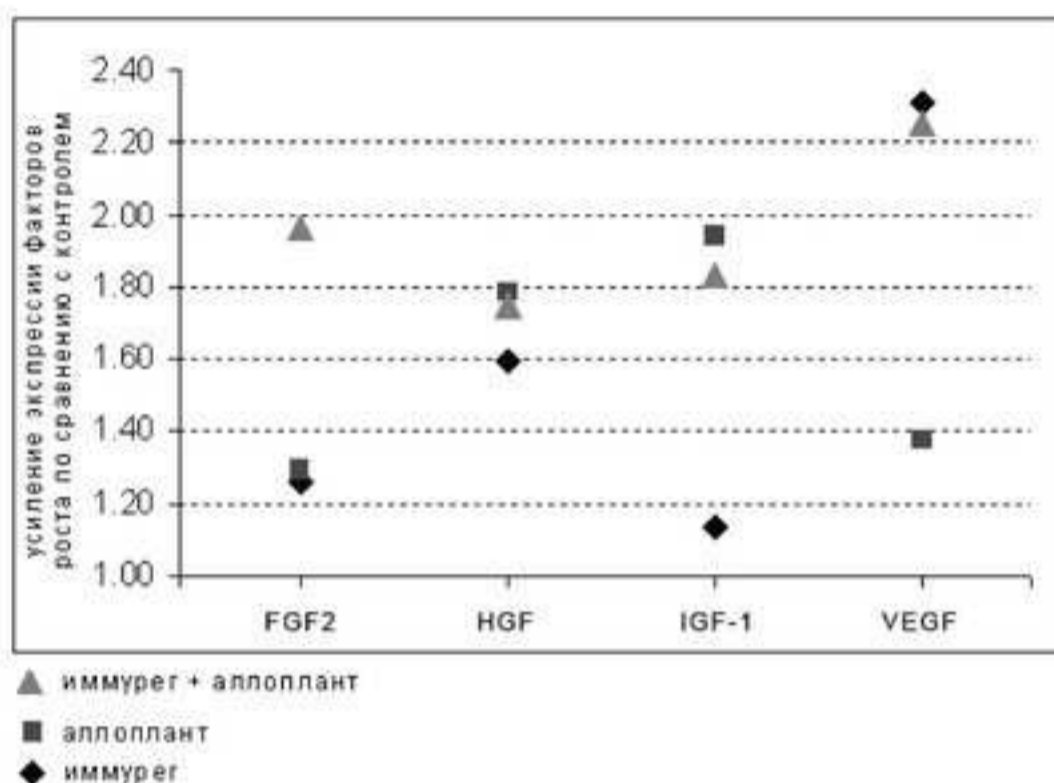


Рис. 8. Сравнительные данные по индуцированной экспрессии факторов роста

Как видно из представленного рисунка, наибольшим эффектом, более чем в два раза превышающим контроль, обладают иммурег и его комбинация с аллоплантом по отношению к экспрессии VEGF. В условиях монотерапии с применением аллопланта этот показатель составил 1,38, что сравнимо с контрольным образцом. Таким образом, можно предположить, что высокая экспрессия VEGF обусловлена исключительно антиоксидантной активностью иммурега с учетом того, что лекарственная комбинация показала близкое к иммурегу значение усиления, в 2,31 раза для иммурега и в 2,26 раза для смеси. В процентном отношении уровень экспрессии гена VEGF, индуцируемый иммурегом, превысил контрольный на 131%.

Полярная картина наблюдается в случае экспрессии гена IGF-1. Так, аллоплант и его комбинация с иммурегом показали близкие значения усиления, почти в два раза превышающие контрольные показания, 1,94 для аллопланта и 1,84 для смеси. В условиях монотерапии с применением иммурега этот показатель составил всего 1,14, что статистически не превосходит контрольные показания. Как и в предыдущем случае можно предположить, что усиление экспрессии гена IGF-1 в первую очередь связана с активностью именно аллопланта.

В случае экспрессии ростового фактора HGF, высокую активность показали оба препарата, а также их смесь. Для аллопланта было выявлено усиление экспрессии, более чем в полтора раза превышающее контрольные показания (1,79), для иммурега и лекарственной комбинации были получены близкие результаты, 1,60 и 1,75, соответственно. На основании полученных данных трудно судить об относительном вкладе отдельных препаратов в общий терапевтический эффект, поскольку для всех субстанций были получены близкие значения активности.

Иные результаты были получены для FGF2. Так, наибольшую активность показал именно комбинированный препарат, способный почти в два раза усиливать экспрессию целевого гена, в то время как в условиях монотерапии иммурег и аллоплант показали более низкие значения, 1,26 и 1,30, соответственно. Эти результаты свидетельствуют о синергическом эффекте именно смесевой композиции, нежели отдельного компонента как в случае VEGF и IGF-1.

На основании полученных данных можно предположить, что использование комбинированного препарата синергического действия эффективно исключительно в случае экспрессии гена FGF2. В случаях экспрессии VEGF и IGF-1 усиление экспрессии связано, скорее всего, с отдельным соединением, в то время как установить вклад в терапевтический эффект исследуемых препаратов в экспрессию HGF представляется невозможным. Несмотря на это, целесообразно применение именно комбинации аллопланта и иммурега, поскольку интегральный эффект на экспрессию указанных факторов в этом случае наиболее высокий, средний показатель по всем белкам составил 1,95, что на 22% больше,

чем для аллопланта и иммурега по отдельности. Также на основании полученных данных можно предположить субстратную специфичность аллопланта по отношению к факторам роста, наибольшим сродством обладают HGF и IGF-1, что может быть объяснено различной аффинностью GAGs в составе аллопланта к исследуемым белкам.

## **ВЫВОДЫ**

1. Предложенная модель острого инфаркта миокарда осуществляется в условиях самостоятельного дыхания, воспроизводится в 92% случаев, и не требует применения аппарата ИВЛ.

2. Динамические морфологические исследования (от 1 недели до 1,5–2 мес.) сердечной ткани после моделирования острого инфаркта миокарда у кроликов на фоне применения биоматериала «Аллоплант – стимулятор васкулогенеза» и препарата «Иммурег», и их комбинации демонстрируют позитивное влияние последних на элиминацию некротических масс и восстановительный процесс в миокарде.

3. Независимо от применяемого биоматериала и лекарственных средств для стимуляции ангиогенеза при экспериментальном остром инфаркте миокарда выявляется однонаправленный вектор воссоздания сосудистой сети, что намного превышает показатели сосудообразования в условиях естественного течения патологического процесса.

4. Препарат «Иммурег» на фоне необратимой ишемии миокарда в эксперименте способствует достоверному увеличению уровня экспрессии гена *fgf2* на 26%, гена *hgf* – на 60%, гена *vegfa* – на 131%, биоматериал «Аллоплант – стимулятор васкулогенеза» вызывает почти 2-х кратное увеличение экспрессии генов *hgf* и *igf*, а так же небольшое увеличение уровня экспрессии генов *fgf2* и *vegfa*, совместное администрирование «Иммурега» и «Аллопланта – стимулятор васкулогенеза» индуцирует экспрессию гена *hgf* на 505%, гена *igf-1* на 336%, гена *vegfa* на 383% в кардиомиоцитах по сравнению с уровнем экспрессии этих генов в условиях моделирования ишемии сердца без препарата.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Интрамиокардиальное введение биоматериала «Аллоплант – стимулятор васкулогенеза», пероральное применение препарата «Иммурега», и их комбинация могут быть рекомендованы для внедрения в клиническую практику для лечения больных с острым инфарктом миокарда, а также для стимуляции неоангиогенеза при ишемической болезни сердца.

2. Предложенная модель острого инфаркта миокарда у кроликов не требующая применения искусственной вентиляции легких является оптимальной и может быть рекомендовано для изучения процессов неоангиогенеза.

3. Исследование экспрессии генов стимуляторов неоангиогенеза VEGFA, HGF, FGF-2, IGF-1 может быть рекомендовано для оценки лечебного эффекта лекарственных препаратов на процессы неоангиогенеза в миокарде.

### **Список работ, опубликованный по теме диссертации**

1. Плечев В.В. Способ защиты миокарда путем применения антиоксидантного препарата 5-оксиметилурацила / В.В Плечев, Б.А. Олейник, Д.В. Плечева, Р.Ю. Рисберг // Тезисы в международной научно-практической конференции «Внедрение инновационных технологий в хирургическую практику», посвящ. памяти проф. В.К. Шмидта – 2009. – 88 с.

2. Плечев В.В. Инфарктлимитирующий эффект антиоксидантного препарата 5 – оксиметилурацил «Иммурег» / В.В. Плечев, Р.И. Ижбульдин, Б.А. Олейник, Д.В. Плечева, Р.Ю. Рисберг // Материалы республиканской конференции молодых ученых РБ с международным участием «Медицинская наука-2009», посвященная году поддержки и развитию молодежных инициатив. – 2009. С. 220–221.

3. Плечев В.В. Диагностическая ценность маркеров повреждения миокарда при моделировании экспериментального инфаркта миокарда у кроликов / В.В Плечев, Б.А. Олейник, Д.В. Плечева, Р.Ю. Рисберг, Г.Х Хупеева // Тезисы

докладов и сообщений 13-й ежегодной сессии НЦС СХ им. А.Н. Бакулева с Всероссийской конференцией молодых ученых. – 2009. – Т. 10. – № 3. – 51.

4. Плечев В.В. Инфарктилимитирующий эффект антиоксидантного препарата 5-оксиметилурацил «Иммурег» / В.В. Плечев, Б.А. Олейник, Д.В. Плечева, Р.Ю. Рисберг // Материалы XV Всероссийского съезда сердечно-сосудистых хирургов. Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. – 2009. – 83 с.

5. Лазарева Д.Н. Способ моделирования экспериментального инфаркта миокарда у кроликов / Д.Н. Лазарева, Б.А. Олейник, В.В. Плечев, Д.В. Плечева, Р.Ю. Рисберг // Тезисы докладов и сообщений 14-й ежегодной сессии НЦ ССХ им. Бакулева РАМН с Всероссийской конференцией молодых ученых «Сердечно-сосудистые заболевания» Бюллетень НЦССХ им. Бакулева РАМН, рецензируемый научно-практический журнал. – 2010. – Т. 11. – № 3. – 2010. – 191 с.

6. Plechev V.V. 5-oxymethyluracil stimulates expression of growth factors genes at myocardial infarction in rabbits / V.V. Plechev, B.A. Oleynik, I.E. Nikolaeva, R.Y. Risberg // Abstracts 60 th International Congress of European Society for Cardiovascular and Endovascular Surgery. – 2011. – 113 с.

7. Плечев В.В. 5-оксиметилурацил стимулирует экспрессию генов к ангиогенным факторам роста у кроликов / В.В. Плечев, Б.А. Олейник, Р.Ю. Рисберг, Р.С. Ямиданов // Тезисы 17-го Всероссийского съезда сердечно-сосудистых хирургов. Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. – 2011. – Т. 12. – № 6. – 261 с.

8. Плечев В.В. Профилактика бронхолегочных осложнений после операций хирургической реваскуляризации миокарда / В.В. Плечев, Б.А. Олейник, Р.И. Ижбульдин, В.М. Юнусов, Р.Ю. Рисберг // Сборник трудов XXI Национального конгресса по болезням органов дыхания. – 2011. – С. 162–163.

9. Плечев В.В. Модель острого инфаркта миокарда / В.В. Плечев, Р.Ю. Рисберг, Т.И. Мустафин, Б.А. Олейник, А.В. Двинских, Д.В. Плечева // **Медицинский вестник Башкортостана.** – 2012. – Т. 7. – № 1. – С. 112–116.

10. Плечев В.В. Значение неоангиогенеза при лечении острого инфаркта миокарда / В.В. Плечев, Р.Ю. Рисберг, Т.И. Мустафин, Б.А. Олейник,

Р.И. Ижбульдин, В.А. Сурков // **Медицинский вестник Башкортостана.** – 2012. – Т. 7. – № 2. – С. 116–119.

11. Плечев В.В. Новые возможности стимуляции неоангиогенеза при остром инфаркте миокарда у кроликов // В.В. Плечев, Б.А. Олейник, Р.Ю. Рисберг, Д.В. Плечева // **Медицинский вестник Башкортостана.** – 2012. – Т. 7. – № 4. – С. 54–57.

## **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

ИБС – ишемическая болезнь сердца

ИМ – инфаркт миокарда

ЭКГ – электрокардиография

FGF – фактор роста фибробластов

HGF – фактор роста гепатоцитов

IGF – инсулин-подобный фактор роста

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

VEGFR – рецептор VEGF

**Рисберг Роман Юрьевич**

**СТИМУЛЯЦИЯ НЕОАНГИОГЕНЕЗА  
ПРИ ОСТРОМ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА  
(экспериментальное исследование)**

**Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук**

Издательская лицензия № 06788 от 01.11.2001 г.  
ООО «Издательство «Здравоохранение Башкортостана»  
450000, РБ, г. Уфа, а/я 1293, тел. (347) 250-81-20, тел./факс (347) 250-13-82.

Подписано в печать 28.09.2012 г.  
Формат 60×84/16. Гарнитура Times New Roman.  
Бумага офсетная. Отпечатано на ризографе.  
Усл. печ. л. 1,4. Уч. изд. л. 1,5.  
Тираж 100. Заказ № 733.



