

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЦИТОКИНОВ ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ НЕОАНГИОГЕНЕЗА И РЕГЕНЕРАЦИИ СЕРДЦА

Л. Н. Маслов, С. И. Сазонова¹

Систематизированы данные, касающиеся использования цитокинов для стимуляции неоангиогенеза и регенерации сердца. Выполнен анализ публикаций о том, что инсулиноподобный фактор роста может стимулировать пролиферацию кардиомиоцитов. Фактор роста гепатоцитов не оказывает эффекта на митотическую активность клеток сердца, но предупреждает постинфарктное ремоделирование сердца. Вазкулярный эндотелиальный фактор роста (VEGF) стимулирует пролиферацию эндотелиальных клеток *in vitro* и неоваскулогенез в ишемизированном сердце животных и человека. Фактор роста фибробластов может индуцировать неоваскулогенез в ишемизированном сердце. Выполнен анализ данных о том, что гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ) может мобилизовать из костного мозга стволовые клетки и клетки-предшественники эндотелиоцитов, которые участвуют в неоангиогенезе и регенерации сердца. Эритропоэтин также может мобилизовать из костного мозга стволовые клетки и клетки-предшественники эндотелиоцитов, а также индуцировать неоваскуляризацию ишемизированной ткани *in vivo*. Авторы полагают, что наиболее перспективными препаратами для стимуляции неоангиогенеза и регенерации сердца у пациентов с инфарктом миокарда являются VEGF, Г-КСФ и эритропоэтин.

Цитокинами называют регуляторные пептиды с большой молекулярной массой. Для сравнения, молекула вазкулярного эндотелиального фактора роста (VEGF, vascular endothelial growth factor) состоит из 165 аминокислотных остатков [12], а молекула адренокортикотропного гормона (АКТГ) “построена” из 39 аминокислот [7]. Цитокины действуют: (а) на клетку, которая их секретирует (аутокринно); (б) на соседние клетки (паракринно) [6]. Попадая в кровотоки в достаточно большом количестве, они могут действовать на органы-мишени подобно гормонам [6]. Именно так ведет себя эритропоэтин, который секретируется почками и стимулирует эритропоэз в костном мозге [34]. Роль цитокинов в регуляции иммунных реакций, пролиферации и дифференцировке клеток-предшественников (прекурсоров) лейкоцитов и эритроцитов хорошо изучена [6]. Однако в последнее время появились публикации о том, что цитокины могут стимулировать неоангиогенез и пролиферацию специализированных клеток, например, кардиомиоцитов и эндотелиоцитов [11, 27, 37 – 39, 48, 50, 56, 57]. Прежде чем перейти к обсуждению публикаций о роли цитокинов в неоваскулогенезе и пролиферации кардиомиоцитов, следует упомянуть о регенерации миокарда и стволовых клетках (СК). Здесь мы приводим лишь общие сведения по

этому вопросу. Заинтересованный читатель найдет более подробную информацию в наших обзорах [3, 4].

До недавнего времени в литературе была распространена точка зрения о том, что сердце не регенерирует, а кардиомиоциты являются терминально дифференцированными клетками, неспособными к пролиферации. Этот взгляд базировался на работах, выполненных еще в начале XX века немецкими и американскими морфологами, которые не смогли обнаружить делящиеся кардиомиоциты в миокарде. В конце XX века появилось новое оборудование, позволяющее существенно повысить эффективность обычных морфологических методик. Кроме того, появились новые более чувствительные методы оценки митотической активности клеток. Применение этого оборудования и этих методик позволило установить, что в миокарде здорового человека 11 – 14 кардиомиоцитов на миллион (митотический индекс) находятся в состоянии митоза. Это в сотни раз меньше митотического индекса для других тканей, чем, видимо, и объясняется тот факт, что деление кардиомиоцитов до недавнего времени не удавалось выявить. Исследование аутопсийного материала пациентов, погибших в первые дни инфаркта миокарда (ИМ), позволило установить, что митотическая активность кардиомиоцитов в пограничной зоне инфаркта увеличивалась в 70 раз, а в отдаленных участках миокарда — в 24 раза. Однако подобной пролиферативной активности недостаточно для того, чтобы обеспечить полноценную регенера-

¹ ГУ НИИ кардиологии ТНЦ, Томск, 634050, ул. Киевская 111; Томский государственный педагогический университет.

цию миокарда. Кроме того, делящиеся кардиомиоциты удается обнаружить только по периферии очага некроза, в зоне инфаркта их нет, там делятся только фибробласты, которые менее чувствительны к недостатку кислорода, чем кардиомиоциты. Активная пролиферация фибробластов обеспечивает замещение некротизированной ткани сердца рубцовой тканью, что в конечном итоге ведет к постинфарктному ремоделированию сердца, развитию сердечной недостаточности и формированию электрической нестабильности сердца. Очевидно, что для усиления регенерации миокарда в постинфарктном периоде необходимо: (а) стимулировать пролиферативную активность кардиомиоцитов; (б) увеличить оксигенацию инфарктированного участка сердца, что позволит клеткам сердца делиться и в очаге некроза. Добиться усиления кислородного обеспечения инфарктированного миокарда можно, стимулируя неоангиогенез. Таким образом, предупредить появление постинфарктного ремоделирования и добиться полноценной регенерации сердца можно, стимулируя деление кардиомиоцитов, либо стимулируя образование новых кровеносных сосудов в зоне инфаркта. Кроме того, существует, по меньшей мере, еще один подход к усилению регенерации сердца. Этот подход основан на трансплантации в зону инфаркта стволовых клеток (СК). Так называют низкокодифференцированные полипотентные клетки, способные к дифференцировке в различные специализированные клетки, в том числе кардиомиоциты и эндотелиоциты. В небольшом количестве подобные клетки присутствуют в сердце. Кроме того, доказано, что СК или, вернее говоря, клетки-предшественники, могут поступать в сердце из кровотока. Попав в миокард, эти клетки под воздействием микроокружения интенсивно делятся и дифференцируются в кардиомиоциты, эндотелиоциты, клетки гладкой мускулатуры кровеносных сосудов. Полагают, что источником клеток-предшественников является костный мозг. Положительный эффект интракоронарной трансплантации моноклеарных клеток костного мозга (они содержат около 2% СК) в инфаркт-связанную коронарную артерию показан у пациентов с острым инфарктом миокарда [8, 13, 29, 52, 55]. В экспериментальной работе [42], представлены данные о том, что процесс естественной миграции клеток-предшественников из костного мозга в миокард можно усилить с помощью определенных цитокинов. Таким образом, третий подход к усилению регенерации сердца и неоваскулогенеза в постинфарктном периоде базируется на применении цитокинов, усиливающих поступление в кровоток из костного мозга стволовых клеток с последующей фиксацией этих клеток в инфарктированном миокарде. Рассмотрим три подхода более детально.

Усиление пролиферации кардиомиоцитов. К сожалению, сегодня мы мало что знаем о цитокинах, которые усиливают пролиферацию клеток сердца *in vivo*. Предполагают, что эндогенным стимулятором деления

кардиомиоцитов может быть инсулиноподобный фактор роста (IGF-1, Insulin-like growth factor-1) [11, 37, 38, 57]. В экспериментах на культуре неонатальных кардиомиоцитов показано, что блокада экспрессии рецепторов IGF-1 приводит к снижению скорости синтеза ДНК в 50 раз [27], в то время как блокада экспрессии этих же рецепторов в культуре кардиальных фибробластов ведет к снижению синтеза ДНК только в 3 раза [45]. Логично предположить, что *in vivo* IGF-1 будет в большей мере стимулировать деление кардиомиоцитов, чем пролиферацию фибробластов. Если подобный процесс будет отмечаться и в случае инфаркта, то в ответ на активацию рецепторов IGF-1 инфарктированный миокард будет лучше регенерировать, а процессы постинфарктного ремоделирования замедлятся. Данные [37, 38, 57] во многом подтверждают это предположение. Эти авторы выполняли эксперименты на трансгенных мышцах с избыточной экспрессией IGF-1. У этих подопытных животных вызывали коронароокклюзию [37] или сужение коронарной артерии [38]. Оказалось, что скорость некротической гибели кардиомиоцитов в зоне ишемии у трансгенных особей в 5 раз ниже по сравнению с обычной линией мышей [38]. Интенсивность заместительного фиброза, дилатации желудочков и гипертрофии сердца у мышей с гиперэкспрессией IGF-1 достоверно ниже, чем у мышей с низкой интенсивностью синтеза IGF-1 [37]. Гиперэкспрессия IGF-1 замедляет формирование экспериментальной дилатационной кардиомиопатии у мышей [57]. Казалось бы, эти данные говорят о целесообразности клинической апробации IGF-1. Однако такой вывод представляется поспешным по двум причинам: во-первых, в вышеперечисленных исследованиях не был использован экзогенный IGF-1, все опыты проводились на мышцах с избыточной продукцией эндогенного IGF-1; во-вторых, независимые исследования не проводились. Таким образом, о перспективах клинического применения этого цитокина можно будет говорить после получения данных о регенеративной активности экзогенного IGF-1 в независимых исследованиях.

IGF-1 является важнейшим цитокином, который стимулирует деление кардиомиоцитов, но есть и другие факторы роста, которые могут усилить пролиферацию клеток миокарда. В настоящее время показано, что деление эмбриональных клеток сердца можно усиливать *in vitro* с помощью добавления в среду инкубации тромбоцитарного фактора роста [50]. В 2003 г. японские исследователи попытались стимулировать регенерацию миокарда с помощью фактора роста гепатоцитов (HGF, hepatocyte growth factor) [39].

На третий день после экспериментального инфаркта мышцам внутримышечно вводили аденовирусный вектор, кодирующий HGF человека. Подобная "генотерапия" приводила к появлению в крови мышей HGF человека. Через месяц после инфаркта у животных оценивали процессы постинфарктного ремоделирова-

ния. Оказалось, что инъекция аденовирусного вектора приводила к уменьшению дилатации левого желудочка по сравнению с контрольной группой животных. Одновременно увеличивалась скорость сокращения левого желудочка и уменьшалось конечное диастолическое давление (КДД). Однако усиления пролиферации кардиомиоцитов под действием вектора, кодирующего HGF, обнаружить не удалось. Морфологические исследования, выполненные авторами, показали, что HGF стимулирует гипертрофию кардиомиоцитов, усиливает ангиогенез и замедляет рубцевание инфарктированного миокарда. По мнению авторов, за счет этих событий, а не усиления регенерации миокарда, происходит замедление постинфарктного ремоделирования сердца [39].

Таким образом, наиболее перспективным фактором роста для стимуляции регенерации миокарда и профилактики постинфарктного ремоделирования на сегодня является IGF-1. Однако для окончательного решения вопроса о целесообразности клинических испытаний этого фактора роста необходимо разработать технологию производства рекомбинантного IGF-1 человека, а также провести всесторонние и независимые исследования кардиотропной активности этого цитокина на модели инфаркта миокарда у лабораторных животных.

Стимуляция неоваскулогенеза. Васкулярный эндотелиальный фактор роста (VEGF, vascular endothelial growth factor) первоначально был идентифицирован как белок, который секретируется раковыми клетками, индуцирует повышение проницаемости кровеносных сосудов и вызывает асцит [49]. Затем было установлено, что повышение проницаемости сосудов является эффектом вторичным по отношению к усилению подвижности эндотелиальных клеток под действием VEGF [30]. Так, например, добавление в среду инкубации эндотелиоцитов VEGF приводит к усилению миграции этих клеток в 36 раз [12]. В 1989 г. четыре группы исследователей опубликовали данные о том, что VEGF усиливает митогическую активность эндотелиоцитов [23, 30, 35, 44]. Затем было установлено, что VEGF способен стимулировать неоваскулогенез *in vivo* [14, 36, 43, 53]. Так, названный фактор роста способен индуцировать новообразование сосудов как в зоне инфаркта миокарда [14, 43], так и в ишемизированных задних конечностях подопытных животных [53]. Первоначально исследователи полагали, что механизм ангиогенного действия VEGF связан только с митогенным действием цитокина в отношении дифференцированных эндотелиальных клеток [23, 30, 35, 44]. Однако исследование [12] говорит о том, что эта точка зрения справедлива только отчасти. В опытах на изолированных клетках-предшественниках эндотелиоцитов показано, что VEGF в концентрации 10 нг/мл увеличивает пролиферативную активность этих клеток на 29%, а их подвижность увеличивается в 36 раз [12]. Японские исследователи попытались выяснить, может

ли VEGF вызывать мобилизацию прекурсоров эндотелиоцитов из костного мозга [12]. Оказалось, внутрибрюшинное введение крысам VEGF приводит к трехкратному увеличению в крови животных количества клеток предшественников эндотелиоцитов, а исследования, выполненные на мышах, показали, что эти прекурсоры участвуют в новообразовании кровеносных сосудов в поврежденной роговице [12]. Мобилизация прекурсоров эндотелиоцитов под действием VEGF, по-видимому, имеет место и у человека. На подобную возможность указывают клинические наблюдения [28]. В этой работе было показано, что внутримышечная инъекция векторной ДНК, кодирующей VEGF человека, вызывает увеличение в крови добровольцев концентрации VEGF и количества прекурсоров эндотелиоцитов более чем в 2 раза [28]. В экспериментах, выполненных на мышах и собаках, показано, что ангиогенный эффект VEGF напрямую зависит от активации NO-синтазы эндотелиоцитов [24, 40]. Фармакологическая блокада NO-синтазы с помощью L-NAME (N^G -Nitro-L-arginine methyl ester) приводит к блокаде образования новых коллатералей в зоне ишемии миокарда у собак, несмотря на увеличение синтеза ишемизированными кардиомиоцитами VEGF [40]. Напрашивается вывод, что совместное назначение VEGF и доноров NO могло бы значительно усилить ангиогенный эффект указанного цитокина. Однако подобные исследования пока не проводились.

Таким образом, VEGF стимулирует миграцию и митоз не только зрелых эндотелиоцитов, но и прекурсоров. Более того, этот фактор роста вызывает мобилизацию клеток-предшественников из костного мозга и включение этих клеток в неангиогенез [12]. Очевидно, оба названных эффекта обеспечивают VEGF-индуцированную неоваскуляризацию органов и тканей.

Клинические наблюдения показывают, что VEGF участвует в новообразовании сосудов не только у животных, но и у человека. Так, впечатляющие результаты были получены в клинических наблюдениях, выполненных на пациентах с ИБС [26]. В исследование были отобраны 14 пациентов, которым была не показана коронарная ангиопластика, а обычные методы лечения не оказывали должного терапевтического эффекта. Во время выполнения ангиографического обследования этим больным с помощью катетера осуществлялась интракоронарная инфузия рекомбинантного VEGF человека в дозе 5000 ЕД за 10 мин. Через 2 месяца было проведено повторное обследование этих пациентов. У семи человек из 14 методом однофотонной эмиссионной компьютерной томографии было зафиксировано улучшение коронарной перфузии. Ангиографическое обследование позволило выявить у этих пациентов увеличение плотности коллатералей в миокарде, у них же было отмечено снижение функционального класса стенокардии с третьего до первого. Не ясно, почему VEGF оказал положительный терапевтический эффект только у половины об-

следованных добровольцев. Возможно, выбранная доза VEGF оказалась мала. Может быть, NO-синтаза в эндотелиоцитах этих индивидуумов оказалась нечувствительной к действию VEGF. Ответить на оба эти вопроса пока не представляется возможным, поскольку исследователи применяли только одну дозу VEGF и не оценивали продукцию оксида азота у своих больных. Отметим, что данное клиническое наблюдение было выполнено на практически “безнадежных” больных ИБС. Возможно, что в будущем VEGF займет достойное место в комплексной терапии коронарной болезни сердца.

Васкулярный эндотелиальный фактор роста не является единственным цитокином, который может усиливать неангиогенез в инфарктированном миокарде. Есть сведения, что подобный эффект может оказывать кислый и основной факторы роста фибробластов (FGF, fibroblast growth factor) [48, 56]. Наиболее интересными представляются данные [56]. Авторы выполняли эксперименты на свиньях с экспериментальным инфарктом миокарда. Через 5 недель после эмболии левой нисходящей коронарной артерии в интактный миокард и в перинфарктную зону животных производили инъекции рекомбинантного основного FGF-2 человека [56]. Применялся один FGF-2 или совместно с гепарином. Оказалось, что FGF-2 не влиял на плотность капилляров в миокарде, но увеличивал плотность артериол. Через 4 – 5 недель после инъекции одного основного FGF-2 плотность артериол в интактном участке сердца увеличилась на 85%, а после совместного использования FGF-2 и гепарина — в 3 раза. После комбинированной инъекции (FGF-2 + гепарин) количество артериол на единицу объема ткани в перинфарктной области сердца увеличилась в 7 раз. Близкие результаты были получены в экспериментах с аденовирусным вектором, кодирующим кислый FGF, который применялся с профилактической целью у кроликов [48]. За 15 дней до моделирования коронароокклюзии этим животным производили инъекцию векторной ДНК в предполагаемый регион ишемии. Оказалось, что подобная “генотерапия” уменьшает размер области риска (зона ишемии) в 2 раза по сравнению с контрольными животными. Гистологические исследования показали, что в месте инъекции векторной ДНК происходит двукратное увеличение плотности артериол, а плотность капиллярного русла увеличивается на 17%. Авторы обоих исследований не изучали вопрос о том, как скажется применение FGF-2 или FGF-вектора на процессах постинфарктного ремоделирования сердца. Между тем, подобное исследование представляется целесообразным, поскольку FGF является фактором роста фибробластов, поэтому его применение может индуцировать усиление образования фиброзной ткани.

Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) и гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ) — претенденты

на роль стимуляторов неоваскулогенеза. До недавнего времени ГМ-КСФ рассматривали исключительно как эндогенный регулятор пролиферации клеток-предшественников гранулоцитов, а лекарственная форма ГМ-КСФ (молграмостим) была рекомендована в нашей стране для лечения иммунодефицитных состояний, связанных с лимфопенией, а Г-КСФ (филгастим) применялся для терапии гранулоцитопении, осложняющей течение многих заболеваний [5]. Однако в начале 90-х годов прошлого столетия появились сведения о том, что Г-КСФ и ГМ-КСФ могут стимулировать пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток [15, 16, 17]. Рецепторы ГМ-КСФ были обнаружены в эндотелиальных клетках [22]. Вместе с тем публикаций, посвященных изучению роли ГМ-КСФ в регуляции неангиогенеза коронарных сосудов, в доступной литературе мы не встретили. Кроме того, существуют данные о том, что ГМ-КСФ может стимулировать пролиферацию не только эндотелиоцитов, но и клеток гладкой мускулатуры сосудов [47]. С избыточной пролиферативной активностью клеток гладкой мускулатуры связывают рестеноз коронарных артерий после коронарной ангиопластики [1, 29]. Таким образом, сказать а priori, как повлияет применение ГМ-КСФ и Г-КСФ на состоянии коронарной перфузии у пациентов, перенесших ИМ, без экспериментальных и клинических исследований пока не представляется возможным, поскольку эти цитокины, с одной стороны, могут стимулировать неангиогенез, а с другой — индуцировать рестеноз коронарных артерий за счет пролиферации клеток гладкой мускулатуры.

Эритропоэтин известен, как гормон, который секретируется почками и стимулирует гемопоэз [34]. В клинике его (эпоэтин альфа) применяют для лечения анемий [41, 51]. Обнаружено, что эритропоэтин оказывает митогенное действие на эндотелиоциты [9], в эндотелиальных клетках человека идентифицирована мРНК рецепторов эритропоэтина [10]. Показано, что эритропоэтин стимулирует неоваскулогенез *in vivo* [20, 46]. Остается неизвестным, может ли этот цитокин активировать неангиогенез в ишемизированном сердце.

Мобилизация клеток-предшественников является методом терапии инфаркта миокарда, который находится в стадии клинической апробации. В отечественной литературе этот метод лечения ИМ называют “регенеративной терапией” [2]. Наиболее перспективными препаратами для мобилизации из костного мозга клеток-предшественников кардиомиоцитов и эндотелиоцитов наряду с VEGF являются Г-КСФ [2, 42] и эритропоэтин [25]. Установлено, что Г-КСФ стимулирует миграцию примитивных клеток костного мозга в ткань сердца и трансдифференцировку этих клеток в кардиомиоциты [54]. После того, как было показано [42], что Г-КСФ может предупреждать постинфарктное ремоделирование сердца при экспериментальном ИМ у мышей, его стали применять для регенератив-

ной терапии инфаркта миокарда [2, 29]. Работа [42] была выполнена на мышах линии C57BL, у которых с помощью коронароокклюзии вызывали инфаркт. Через 3 дня после инфаркта подопытным животным начинали подкожно вводить фактор стволовых клеток (stem cell factor, 200 мкг/кг/день) и Г-КСФ (50 мкг/кг/день). Комплексная терапия продолжалась в течение 5 дней и вызывала увеличение в крови мышей количества примитивных клеток костного мозга (предположительно СК) в 250 раз. Через 27 дней после коронароокклюзии у подопытных животных оценивали показатели насосной функции сердца и проводили морфологические исследования. Оказалось, что курсовое введение цитокинов приводит к снижению летальности среди мышей. У животных, получавших цитокины, наблюдалось увеличение фракции выброса, снижение КДД, увеличивалась скорость сокращения и расслабления левого желудочка, на 26% уменьшалась дилатация левого желудочка по сравнению с аналогичными показателями у контрольных животных с коронароокклюзией. Морфологические исследования показали, что применение цитокинов ведет к уменьшению размеров зоны инфаркта на 40%, усилению пролиферации кардиомиоцитов и стимуляции неангиогенеза. Эти факты послужили основанием для клинических испытаний Г-КСФ в качестве средства для лечения ИМ. Четырем больным с постинфарктным кардиосклерозом и хронической сердечной недостаточностью (ХСН) назначали курсовое введение нейпогена (Г-КСФ 5 мкг/кг/день, подкожно, в течение 7 дней) [2]. У двух больных было зафиксировано улучшение течения ХСН, у одного пациента – усугубление ХСН, а у четвертого не было отмечено положительной или отрицательной динамики сердечной недостаточности. У всех четырех пациентов признаков регенерации сердца не удалось обнаружить. Столь низкая эффективность Г-КСФ может иметь, по меньшей мере, две причины. Во-первых, выбранная доза Г-КСФ (5 мкг/кг/день) оказалась мала, для сравнения — в эксперименте использовали в 10 раз большую дозировку Г-КСФ [42], а в клинике для терапии лейкозов Г-КСФ применяли в дозе от 12 до 50 мкг/кг/день [32, 33]. Во-вторых, в эксперименте Г-КСФ [42] вводили на четвертые сутки после ИМ, когда начинается рубцевание очага некроза, а в клинике нейпоген назначали тогда, когда этот рубец уже сформировался, что и могло быть причиной неудачи клинических испытаний. Аналогичным было исследование [29]. Трех пациентам, перенесшим инфаркт миокарда, в течение четырех дней перед стентированием коронарных артерий подкожно вводили Г-КСФ в дозе 10 мкг/кг/день. Через 6 месяцев после терапии у всех было зафиксировано снижение конечного систолического объема левого желудочка и увеличение фракции выброса, но аналогичные изменения наблюдались и у некоторых пациентов контрольной группы (инфаркт миокарда + стентирование). В силу малой выборки положительный

эффект Г-КСФ был не достоверен. Таким образом, оба исследования [2, 29] были выполнены на малой выборке больных и в поздние сроки после ИМ [2], что не позволяет сделать окончательный вывод о целесообразности применения Г-КСФ в остром периоде инфаркта миокарда.

Мобилизация мононуклеарных клеток из костного мозга — не единственный эффект, который может оказывать Г-КСФ. Полагают, что этот фактор роста, наряду с фактором стволовых клеток, может увеличивать выживаемость СК, способствуя тем самым включению этих клеток в процесс регенерации миокарда после инфаркта [42]. Логично предположить, что Г-КСФ будет усиливать регенеративный эффект интракардиальной трансплантации аутологичных СК костного мозга. Подобный метод лечения ИМ в настоящее время проходит апробацию в некоторых клиниках России и за рубежом, но его эффективность пока недостаточно высока [8, 13, 29, 52, 55]. Возможно, что совместное применение клеточной терапии и Г-КСФ позволит добиться больших успехов. Подобную надежду могут вселять недавние исследования [31], которые обнаружили, что Г-КСФ в два раза увеличивает интервал времени от момента трансплантации сердца до его отторжения у крыс. Возможно, что названный цитокин сможет существенно усилить терапевтический эффект трансплантации СК у пациентов с ИМ.

Клинические испытания Г-КСФ показали, что этот цитокин может оказывать и побочные эффекты. Так, через 6 месяцев после чрескожной коронарной ангиопластики и курсового (10 мкг/кг ежедневно в течение 4–х дней) введения Г-КСФ у пациентов с ИМ увеличивалась частота рестенозов имплантированных стентов по сравнению с контрольной группой пациентов, у которых выполнялось стентирование без назначения Г-КСФ [29]. По этой причине исследование было досрочно прекращено. Авторы объясняют негативный эффект Г-КСФ тем, что Г-КСФ вызывает мобилизацию из костного мозга не только стволовых клеток, но и лейкоцитов, которые могут усиливать воспалительную реакцию в месте имплантации стента и, тем самым, провоцировать возникновение рестеноза. Кроме того, полагают [29], что стволовые клетки, поступающие из костного мозга в кровотоки под действием Г-КСФ, могут накапливаться в поврежденной при баллонировании коронарной артерии и трансдифференцироваться в клетки гладких мышц, вызывая тем самым рестеноз. Выходом из создавшейся ситуации, по мнению авторов работы, является имплантация стентов с лекарственным покрытием, что позволило бы избежать нежелательных эффектов применения Г-КСФ.

ГМ-КСФ тоже может стимулировать миграцию клеток-предшественников эндотелиоцитов из костного мозга в кровотоки [21]. Обнаружено, что курсовое введение кроликам ГМ-КСФ (20 мкг/кг/день, подкожно, в течение 7 дней) приводит к увеличению в крови жи-

вотных эндотелиальных клеток-предшественников [21]. Авторы не изучали влияние ГМ-КСФ на процессы неоваскулогенеза в ишемизированном сердце, однако, выполняя эксперименты на кроликах с гиперхолестеринемией, они обнаружили, что ГМ-КСФ может усиливать неэндотелизацию артерий с поврежденной интимой. Этот факт можно рассматривать, как косвенный признак того, что ГМ-КСФ может вовлекаться в образование новых кровеносных сосудов. Если это предположение подтвердится, то этот колониестимулирующий фактор может найти применение в терапии ИБС.

Эритропоэтин также претендует на роль эндогенного фактора, вызывающего мобилизацию из костного мозга прекурсоров эндотелиоцитов. Установлено, что подкожное введение мышам эритропоэтина (1000 IU/kg, ежедневно в течение 3 дней) ведет к усилению пролиферативной активности СК и увеличению количества клеток-предшественников эндотелиоцитов в костном мозге [25]. Одновременно в крови животных в 2 раза увеличивается количество прекурсоров эндотелиоцитов, а через две недели после последней инъекции эритропоэтина отмечается неоваскуляризация специальных поливиниловых губок, имплантированных подкожно [25]. Через две недели после применения эритропоэтина у животных с перевязанной бедренной артерией отмечается почти полное восстановление кровотока в ишемизированной задней конечности, видимо, за счет гипертрофии *a. profunda femoralis* и образования коллатералей. Авторы попытались выяснить, участвует ли эндогенный эритропоэтин в регуляции уровня циркулирующих в крови клеток-предшественников эндотелиоцитов. С этой целью они сопоставили уровень циркулирующих в крови людей прекурсоров эндотелиоцитов и концентрацию эритропоэтина. Оказалось, что между этими двумя величинами существует тесная корреляция ($r = 0,61$; $p < 0,001$) [25]. Эти факты позволили предположить, что эритропоэтин является физиологическим стимулятором мобилизации прекурсоров эндотелиоцитов и участвует в неоваскулогенезе. Авторы не изучали эффект эритропоэтина на течение инфаркта миокарда.

Внутрибрюшинное введение крысам эритропоэтина (5000 ЕД/кг) за 24 ч до изоляции сердца значительно повышает устойчивость изолированного перфузируемого сердца к патогенному действию ишемии и реперфузии [18]. В реперфузионном периоде сила сокращений изолированного сердца крыс, получавших эритропоэтин, была в 2,5 раза выше, чем в контрольных препаратах. Морфологические исследования показали, что эритропоэтин полностью подавляет апоптоз, возникающий в ответ на ишемию-реперфузию изолированного сердца. Одновременно снижается активность каспазы-3, фермента, обеспечивающего апоптоз. Сходные данные представлены в работе [19]. Выполняя эксперименты на изолированных кардиоми-

оцитах, которые инкубировались в течение 24 ч в условиях гипоксии, авторы обнаружили, что добавление в среду инкубации этих клеток эритропоэтина (100 нг/мл) полностью ингибирует апоптоз, но не влияет на гибель клеток сердца в результате некроза. В опытах *in vivo*, выполненных на крысах, эритропоэтин вводили внутрибрюшинно (5000 ЕД/кг) ежедневно в течение 7–8 дней. По первой схеме (8 дней) препарат начинали вводить за 24 ч до коронароокклюзии (30 мин) и реперфузии. По второй схеме (7 дней) эритропоэтин начинали вводить сразу же после удаления лигатуры с коронарной артерии. Оказалось, что в обоих случаях названный цитокин предупреждал увеличение КДД на 7–е сутки эксперимента, что они рассматривают, как доказательство профилактического эффекта эритропоэтина в отношении постинфарктного ремоделирования сердца. В литературе отсутствуют сведения о том, может ли эритропоэтин стимулировать регенерацию и неоваскулогенез ишемизированного сердца. Однако подобный эффект представляется вероятным, поскольку эритропоэтин вызывает увеличение в крови клеток-предшественников эндотелиоцитов [25].

Таким образом, анализ литературных данных свидетельствует, что наиболее перспективными средствами для стимуляции неоваскулогенеза и профилактики постинфарктного ремоделирования сердца у пациентов, перенесших инфаркт миокарда, являются VEGF, Г-КСФ и эритропоэтин.

Обзор подготовлен при поддержке гранта РФФИ и гранта Министерства образования РФ. Авторы выражают признательность А. А. Чурину и Н. А. Данильченко за информационную и техническую помощь при подготовке обзора.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ю. Н. Беленков, Р. С. Акчурин, А. П. Савченко и др., *Кардиология*, № 5, 42 – 47 (2002).
2. Ю. Н. Беленков, Ф. Т. Агеев, В. Ю. Мареев, В. Г. Савченко, *Кардиология*, № 3, 7 – 12 (2003).
3. Л. Н. Маслов, В. В. Рябов, С. И. Сазонова, *Вест. трансплант. иск. органов*, № 4, 78 – 86 (2003).
4. Л. Н. Маслов, В. В. Рябов, С. И. Сазонов, *Успехи физиол. наук*, 35(3), 50 – 60 (2004).
5. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства. Пособие для врачей*, ООО “Новая волна”, Т. 2, Москва (2002).
6. А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл, *Иммунология*, Мир, Москва (2000).
7. Дж. Теппермен, Х. Теппермен, *Физиология обмена веществ и эндокринной системы*, Мир, Москва (1989).
8. В. И. Шумаков, Э. Н. Казаков, Н. А. Онищенко и др., *Рос. кардиол. ж.*, № 5, 42 – 50 (2003).
9. A. Anagnostou, E. S. Lee, N. Kessimian, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 5978 – 5982 (1990).
10. A. Anagnostou, Z. Liu, M. Steiner, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 3974 – 3978 (1994).
11. P. Anversa, J. Kajstura, W. Cheng, et al., *Cardiovasc. Res.*, 32, 219 – 225 (1996).
12. T. Asahara T. Takahashi, H. Masuda, et al., *EMBO J.*, 18(14), 3964 – 2972 (1999).

13. B. Assmus, V. Schachinger, C. Teupe, et al., *Circulation*, **106**(24), 3009 – 3017 (2002).
14. S. Banai, M. T. Jacklitsch, M. Shou, et al., *Circulation*, **89**, 2183 – 2189 (1994).
15. Bocchietto, A. Guglielmetti, F. Silvagno, et al., *J. Cell. Physiol.*, **155**, 89 – 95 (1993).
16. Bussolino, J. M. Wang, P. Defilippi, et al., *Nature*, **337**, 471 – 473 (1989).
17. F. Bussolino, M. Ziche, J. M. Wang, et al., *J. Clin. Invest.*, **87**, 986 – 995 (1991).
18. Z. Cai, D. J. Manalo, G. Wei, et al., *Circulation*, **108**(1), 79 – 85 (2003).
19. L. Calvillo, R. Latini, J. Kajstura, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**(8), 4802 – 4806 (2003).
20. R. G. Carlini, A. A. Reyes, and M. Rothstein, *Kidney Int.*, **47**, 740 – 745 (1995).
21. H. J. Cho, H. S. Kim, M. M. Lee, et al., *Circulation*, **108**(23), 2918 – 2925 (2003).
22. F. Colotta, F. Bussolino, N. Polentarrutti, et al., *Exp. Cell. Res.*, **206**, 311 – 317 (1993).
23. N. Ferrara, and W. J. Henzel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **161**, 851 – 855 (1989).
24. D. Fukumura, T. Gohongi, A. Kadambi, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**(5), 2604 – 2609 (2001).
25. C. Heeschen, A. Aicher, R. Lehmann, et al., *Blood*, **102**(4), 1340 – 1346 (2003).
26. T. D. Henry, K. Rocha-Singh, J. M. Isner, et al., *Am. Heart J.*, **142**(5), 872 – 880 (2001).
27. J. Kajstura, W. Cheng, K. Reiss, and P. Anversa, *Exp. Cell. Res.*, **215**(2), 273 – 283 (1994).
28. C. Kalka, H. Masuda, T. Takahashi, et al., *Circ. Res.*, **86**(12), 1198 – 1202 (2000).
29. H. J. Kang, H. S. Kim, S. Y. Zhang, et al., *Lancet*, **363**(9411), 751 – 756 (2004).
30. P. J. Keck, S. D. Hauser, G. Krivi, et al., *Science*, **246**, 1309 – 1312 (1989).
31. T. Kitayama, K. Hayamizu, H. Egi, et al., *Transplantation*, **75**(4), 553 – 556 (2003).
32. G. Kobbe, D. Sohngen, U. Bauser, et al., *Ann. Hematol.*, **78**(10), 456 – 462 (1999).
33. G. Kobbe, U. Germing, D. Soehngen, et al., *Oncol. Rep.*, **6**(5), 1151 – 1152 (1999).
34. S. B. Krantz, *Blood*, **77**, 419 – 434 (1991).
35. D. W. Leung, G. Cachianes, W. J. Kuang, et al., *Science*, **246**, 1306 – 1309 (1989).
36. J. Li, L. F. Brown, M. G. Hibberd, et al., *Am. J. Physiol.*, **270**, H1803-H1811 (1996).
37. Q. Li, B. Li, X. Wang, et al., *J. Clin. Invest.*, **100**, 1991 – 1999 (1997).
38. B. Li, M. Setoguchi, X. Wang, et al., *Circ. Res.*, **84**(9), 1007 – 1019 (1999).
39. Y. Li, G. Takemura, K.-I. Kosai, et al., *Circulation*, **107**, 2499 – 2506 (2003).
40. T. Matsunaga, D. C. Warltier, D. W. Weihrauch, et al., *Circulation*, **102**(25), 3098 – 3103 (2000).
41. M. Mittelman, A. Zeidman, Z. Fradin, et al., *Acta Haematol.*, **98**, 204 – 210 (1997).
42. D. Orlic, J. Kajstura, S. Chimenti, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**(18), 10344 – 10349 (2001).
43. J. D. Perlman, M. G. Hibberd, M. L. Chuang, et al., *Nature Med.*, **1**, 1085 – 1089 (1995).
44. J. Plouet, J. Schilling, and D. Gospodarowicz, *EMBO J.*, **8**, 3801 – 3806 (1989).
45. K. Reiss, W. Cheng, J. Kajstura, et al., *Am. J. Physiol.*, **269**(3 Pt 2), H943-H951 (1995).
46. D. Ribatti, M. Presta, A. Vacca, et al., *Blood*, **93**, 2627 – 2636 (1999).
47. L. Rubbia-Brandt, A. P. Sappino, and G. Gabbiani, *Virchow's Arch. B Cell. Pathol. Incl. Mol. Pathol.*, **60**, 73 – 82 (1991).
48. J. Safi, A. F. DiPaula, T. Riccioni, et al., *Microvasc. Res.*, **58**(3), 238 – 249 (1999).
49. D. R. Senger, S. J. Galli, A. M. Dvorak, et al., *Science*, **219**, 983 – 985 (1983).
50. T. Shimizu, K. Kinugawa, A. Yao, et al., *Cardiovasc. Res.*, **41**(3), 641 – 653 (1999).
51. D. S. Silveberg, D. Wexler, D. Sheps, et al., *J. Am. Coll. Cardiol.*, **37**, 1775 – 1780 (2001).
52. B. E. Strauer, M. Brehm, T. Zeus, et al., *Circulation*, **106**, 1913 – 1918 (2002).
53. S. Takeshita, L. P. Zheng, E. Brogi, et al., *J. Clin. Invest.*, **93**, 662 – 670 (1994).
54. S. Tomita, M. Ishida, T. Nakatani, et al., *J. Heart Lung Transplant.*, **23**(5), 577 – 584 (2004).
55. H. F. Tse, Y. L. Kwong, J. K. F. Chan, et al., *Lancet*, **361**, 47 – 49 (2003).
56. E. Watanabe, D. M. Smith, J. Sun, et al., *Basic Res. Cardiol.*, **93**(1), 30 – 37 (1998).
57. S. Welch, D. Plank, S. Witt, et al., *Circ. Res.*, **90**(6), 641 – 648 (2002).

Поступила 18.03.05

USING CYTOKINES TO STIMULATE NEOANGIOGENESIS AND CARDIAC REGENERATION

L. N. Maslov and S. I. Sazonova

Institute of Cardiology, Tomsk Scientific Center, Siberian Division of the Russian Academy of Sciences, ul. Kievskaya 111, Tomsk, 634050 Tomsk;

Tomsk State Pedagogical University, Tomsk, Russia

Data published on the use of cytokines for the stimulation of neoangiogenesis and cardiac regeneration have been systematized. There is evidence that insulin-like growth factor (IGF1) can stimulate proliferation of cardiomyocytes; hepatocyte growth factor (HGF) does not influence the mitosis of cardiac cells, but prevents post-infarction remodeling of heart; vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates proliferation of endothelial cells *in vitro* and neovasculogenesis in the ischemic heart *in vivo* for both animals and humans; fibroblast growth factor (FGF) can also induce neovasculogenesis in the ischemic heart; granulocyte-colony-stimulating factor (G-CSF) can mobilize stem cells and endothelial progenitor cells in bone marrow, which are involved in neoangiogenesis and cardiac regeneration; erythropoietin can mobilize endothelial progenitor cells from bone marrow and induce neovascularization of ischemic tissue *in vivo*. It is suggested that VEGF, G-CSF and erythropoietin are the most promising compounds for the stimulation of neoangiogenesis and cardiac regeneration in patients with myocardial infarction.