

© Коллектив авторов., 2009  
УДК 577.112.34:615.22:616.137.83-005.4-092.9

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА АНГИОГЕННОГО ЭФФЕКТА L-АРГИНИНА И СОСУДИСТОГО ЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА (VEGF) ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ КОНЕЧНОСТИ

*Е. Б. Артюшкова, Д. В. Пашков, З. И. Цоколаева, М. В. Покровский,  
Т. Г. Покровская, Е. В. Артюшкова*

Курский государственный медицинский университет  
Российский кардиологический научно-производственный комплекс

**Экспериментальная работа проведена на 24 крысах самцах линии Wistar. Кровообращение в конечностях оценивалось методами лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) и иммуногистохимической визуализации сосудов в срезах мышц голени. Моделирование ишемии задней конечности осуществляли путем иссечения бедренной артерии. Лечение проводили при помощи внутримышечных инъекций раствора плазмиды с геном VEGF и внутрибрюшинного введения L-аргинина в дозе 200 мг/кг. В контрольной группе вводили 0,9% раствор хлорид натрия. Результаты оценивали на 14 сутки. В группах, получавших L-аргинин и VEGF, отмечено увеличение числа сосудов по сравнению с группой плацебо, а уровень перфузии был достоверно выше только у животных, получавших L-аргинин.**

**Ключевые слова:** ангиогенез, эндотелиальный фактор роста, экспериментальная ишемия

Распространенность хронических облитерирующих заболеваний артерий нижних конечностей составляет более 20% от всех видов сердечно-сосудистой патологии, что соответствует 2-3% от всей численности населения и 35-50% от численности лиц старше 60 лет. По данным Г.Р. Галстян (2006), распространенность данной патологии составляет 9-10% среди лиц старше 50 лет [2]. Несмотря на внедрение эффективных методов медикаментозного лечения, хирургической и эндоваскулярной реваскуляризации, в ряде случаев результаты лечения остаются неудовлетворительными.

В последнее время отмечается распространение нового метода лечения ишемических состояний – терапевтического ангиогенеза, который основан на применении различных факторов роста сосудов в ишемизированных тканях [9]. Основным фактором, используемым сегодня, остается VEGF [10, 11]. Механизм ангиогенного эффекта VEGF обусловлен его способностью селективно стимулировать миграцию и пролиферацию эндотелиальных клеток, экспрессию в них активаторов плазминогена, увеличивать сосудистую проницаемость, вызывать вазодилатацию, привлекать моноциты и стимулировать мобилизацию прогениторных клеток из костного мозга [11]. Основным регулятором экспрессии VEGF является гипоксия [7]. Оксид азота, аденозин и простагландины также могут влиять на его экспрессию различными клетками [5]. Увеличение образования оксида азота в ишемизированных тканях также приводит к стимуляции ангиогенеза

[1]. В наших последних работах описана возможность коррекции хронической ишемии конечности у крыс при помощи донатора NO – L-аргинина [1].

Целью настоящего исследования явилась оценка ангиогенного эффекта L-аргинина и сравнение его с эффектом VEGF в виде плазмидной генетической конструкции при экспериментальной ишемии конечности у крыс.

#### Материалы и методы

Экспериментальная работа выполнена на 24 крысах самцах линии Wistar средней массой тела 230-250 г. Животные были разделены на 4 группы по 6 крыс в каждой. Характеристика группы представлена в таблице 1.

Таблица 1.

#### Характеристика групп животных

Группы	n	Характеристика	Методы исследования
Интактная	6	Здоровые животные	Морфологический
Плацебо	6	Моделирование ишемии + 0,9% раствор NaCl в/м на 5 сут.	Морфологический
VEGF	6	Моделирование ишемии + VEGF на 5 сут. в/м	Морфологический
L-аргинин	6	Моделирование ишемии + L-аргинина 200 мг/кг на 2 сут.	Морфологический

Моделирование ишемии задней конечности крыс проводили в асептических условиях под наркозом (этаминал натрия 35 мг/кг внутривенно), путем удаления бедренной артерии на всем ее протяжении от паховой связи до бифуркации на а. poplitea и а. saphenus.

Оценку кровообращения в конечности осуществляли методом лазерной доплеровской флоуметрии на 14 сутки после операции моделирования ишемии. ЛДФ проводили при помощи аппарата Biopac System (USA) и датчика (точечного) TSD-144. Под наркозом на латеральной поверхности голени иссекали участок кожи, обнажали наружную группу мышц. Запись уровня микроциркуляции осуществляли в пяти точках, соответствующих середине длине m. tibialis anterior, точках отстоящих от первой на 3-5 мм выше, ниже, латеральнее и медиальнее. Обработка данных осуществлялась программой Acq 38. Величины уровня микроциркуляции в различных группах оценивали в качестве абсолютных показателей, а также рассчитывали относительную величину уровня микроциркуляции в оперированной конечности путем соотношения с результатами ЛДФ на противоположной стороне.

Плазмиды гена VEGF вводили на 5 сутки после операции. Процедуру осуществляли под наркозом. Инъекцию раствора плазмиды в стерильном фосфатно-солевом буфере вводили путем транскутанной внутримышечной инъекции в m. tibialis anterior. Раствор объемом 250 мкл с содержанием плазмидной ДНК 250 мкг вводили в пять точек (по 50 мкл в каждую точку). Точками для введения служили середина длины мышцы, точки, отстоящие от первой на 3-5 мм (в зависимости от величины животного) выше, ниже, латеральнее и медиальнее от первой. Введение физиологического раствора в группе плацебо-контроля осуществляли аналогично (пять инъекций по 50 мкл под наркозом) на 5 сутки после операции моделирования ишемии конечности.

L-аргинин (“Ajinomoto Co. INC.”, Japan) вводили внутривенно в виде водного раствора в дозе 200 мг/кг на 2 сутки после операции моделирования ишемии конечности.

Иммуногистохимическая визуализация сосудов осуществлялась на срезах мышц голени крысы моноклональными антителами к CD 31 (BD). Подсчет сосудов на окрашенных гистологических срезах мышц крысы осуществляли на микроскопе Zeiss Axiovert 200M при увеличении  $\times 20$ . На 5 срезах, сделанных на разных уровнях мышцы, обсчитывали по 5 полей зрения. Данные для каждого животного усредняли.

Результаты флоуметрического и иммуногистохимического исследований статистически обработаны при помощи программного пакета Microsoft Office XP.

### Результаты и их обсуждение

Кровоток в мышцах голени здоровых крыс составляла  $373,12 \pm 11,46$  п.е., а среднее количество сосудов в мышцах составляло  $862,17 \pm 67,93$  в поле зрения (п/з). В группе с моделированием ишемии конечностей, получавшей 0,9% раствор хлорида натрия (плацебо-контроль) перфузия мышц кровью достоверно снижалась в среднем до  $242,42 \pm 10,51$  п. е. ( $p < 0,001$ ) по сравнению с ее уровнем в конечностях у интактных животных (рис. 1), а число сосудов уменьшалось почти вдвое, составляя  $493,50 \pm 49,7$  в п/з ( $p < 0,01$ ) (рис. 2).

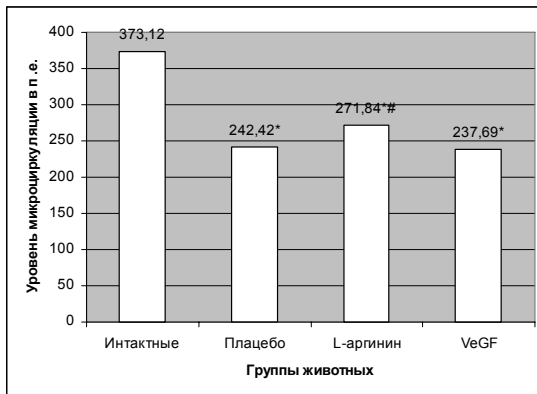


Рисунок 1. Результаты флоуметрии на 14 сутки. \* - статистически значимые различие по сравнению с группой интактных животных; # - статистически значимые различия по сравнению с группой плацебо.

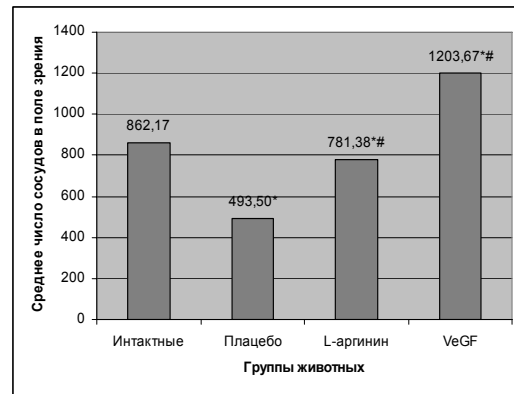


Рисунок 2. Результаты подсчета количества сосудов в поле зрения на 14 сутки. \* - статистически значимые различия по сравнению с группой интактных животных; # - статистически значимые различия по сравнению с группой плацебо.

В группе, получавшей инъекции плазмиды с геном VEGF, уровень перфузии составил  $237,69 \pm 7,77$  п. е., что не отличается от значений в контрольной группе (рис. 1). Относительные величины уровня перфузии (процент от уровня в интактной контралатеральной конечности) в этих группах также не различались (63,24% и 62,55% соответственно,  $p > 0,5$ ). Иная картина наблюдалась при анализе плотности сосудов. В группе, получавшей генную терапию VEGF среднее

количество сосудов в поле зрения было увеличено более чем в два раза по сравнению с контролем и составило  $1203,67 \pm 193,28$  сосудов в п/з ( $p < 0,01$ ) (рис. 2).

В группе, получавшей L-аргинин, уровень микроциркуляции на 14 сутки составил  $271,84,13 \pm 10,94$  п. е. или 69,76% по отношению к здоровой конечности (рис. 1), а плотность сосудов -  $830,14 \pm 110,99$  в п/з (рис. 2), что достоверно превышало эти показатели в группе плацебо ( $p < 0,05$ ).

Морфологическая картина в мышцах животных опытных и контрольных групп после иммуногистохимического окрашивания представлена на рис. 3.

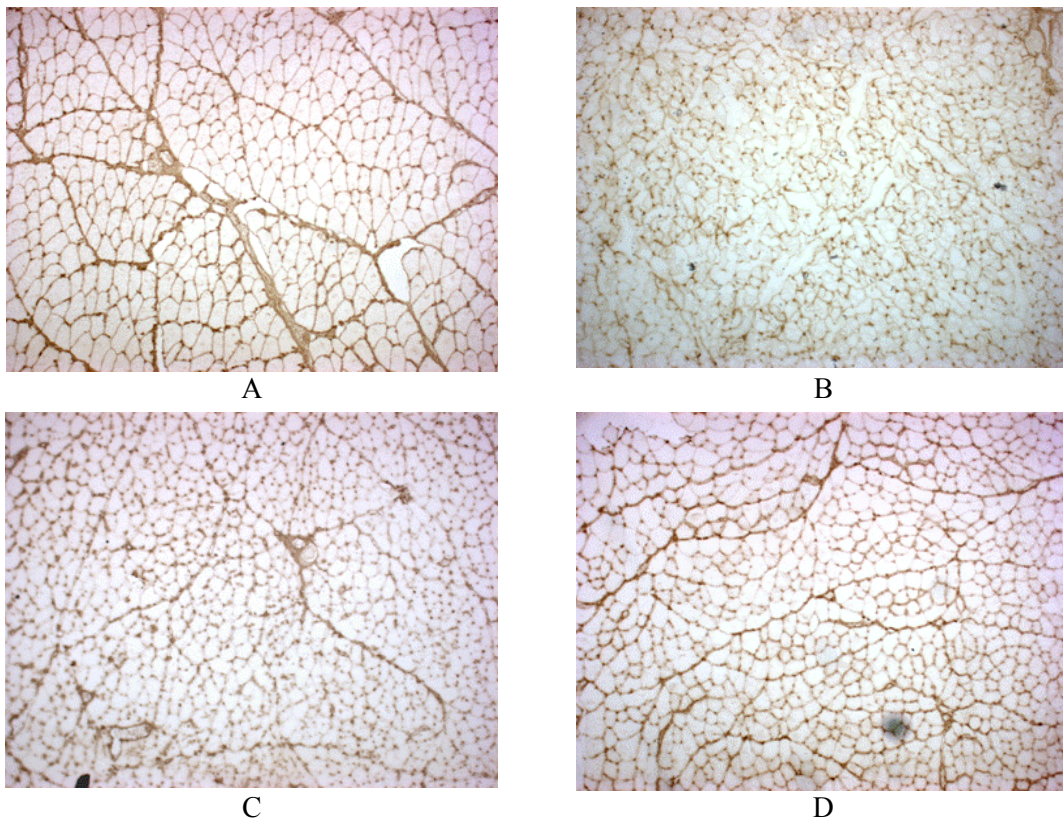


Рисунок 3. Срезы мышц с позитивным окрашиванием к CD31 на 14 сутки эксперимента. А – группа интактных животных; В – группа плацебо; С – группа животных, получавших VEGF; D – группа животных, получавших L-аргинин (x20; окраска диаминобензидином).

Результаты флоуметрического и иммуногистохимического исследований однозначно свидетельствуют о том, что выбранная модель экспериментальной ишемии позволяет адекватно воспроизвести экспериментальную ишемию у крыс. Отмечается достоверное снижение перфузии и плотности сосудов в ишемизированных мышцах голени крысы. После операции моделирования ишемии конечности у животных наблюдались акральные некрозы, артериальные трофические язвы, гангрена, ишемический отек конечности и болевой синдром.

Достоверные различия по уровню перфузии между группой плацебо и группой, получавшей L-аргинин, совпадают с литературными данными о стимулирующем влиянии L-аргинина на активность кровообращения в микроциркуляторном русле

[6]. При проведении ЛДФ в группе, получавшей L-аргинин, на 30 сутки величина уровня микроциркуляции составляет  $394,00 \pm 24,22$  п. е. или 91,67% по отношению к контралатеральной конечности. То есть можно говорить о почти полном восстановлении микроциркуляции под влиянием лечения, в то время как в контрольной группе данный показатель составляет 62,5%. Эти результаты совпадают с теми, которые мы наблюдали в предыдущих опытах, когда L-аргинин способствовал восстановлению кровообращения в конечности [1]. Подобный фармакологический эффект L-аргинина объясняется наличием у него свойств донора оксида азота - под влиянием эндотелиальной NO-синтазы из него образуется монооксид азота, который оказывает вазодилатирующее и эндотелиопротективное действие, что создает оптимальные условия для неангиогенеза [8]. Стимуляция неангиогенеза наблюдалась как при введении плазмиды с VEGF, так и при введении L-аргинина. Однако увеличение перфузии конечности было незначительным в группе с введением L-аргинина и вообще отсутствовало на 14 сутки в группе с введением VEGF. Возможно, эти противоречия могут быть обусловлены тем, что большинство новообразованных сосудов временно не являются функционирующими. Ранее мы наблюдали значимый эффект L-аргинина, который регистрируется лишь к 28 суткам наблюдения [3].

Полученные данные позволяют объективно говорить о том, что L-аргинин при системном введении способен активировать неангиогенез и улучшать перфузию ишемизированных мышц. Отсутствие у L-аргинина побочных эффектов и значимое антиишемическое действие делают целесообразным применение препарата у пациентов с хронической ишемией конечностей и диктуют необходимость дальнейших экспериментальных и клинических испытаний.

#### **Выводы**

1. Используемая модель позволяет воспроизвести хроническую ишемию в эксперименте, наличие которой регистрируется при помощи флоуметрического и морфологического методов.
2. VeGF при внутримышечном введении в зону ишемии способствует росту кровеносных сосудов, что регистрируется на 14 сутки.
3. L-аргинин при системном введении в дозе 200 мг/кг при хронической ишемии способствует активации кровообращения и росту кровеносных сосудов, что регистрируется на 14 сутки.
4. Механизмом действия L-аргинина является неангиогенный эффект. Значимую роль в лечебном эффекте L-аргинина играет эндогенный метаболит – оксид азота (I).

#### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Артюшкова Е.Б., Пашков Д.В., Суковатых Б.С. и др. Возможности фармакологической коррекции хронической ишемии конечности в эксперименте //Кубанский научно-медицинский вестник. – 2007.- №1-2. – С. 19-22.
2. Галстян, Г. Е. Алгоритм диагностики и лечения заболеваний артерий В.нижних конечностей / Г. Е. Галстян // Consilium-Medicum. – 2006. – Т. №8., №12. – С. 34-38.
3. Суковатых Б. С. Экспериментальное и клиническое обоснование применения реваскуляризирующей остеомиопластики для лечения критической ишемии нижних конечностей / Б. С. Суковатых, Л. Н. Беликов, А. Н. Щербаков, К. С.

- Магомедалиева, Д. В. Пашков, В. В. Князев // Вестн. хир. им. Грекова, №4, - 2006. – С. 24-26.
4. Brevetti L.S et al. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase increases skeletal muscle blood flow and oxygenation in severe rat hind limb ischemia / Brevetti L.S., Chang D.S., Tang G.L. et al. // J Vasc. Surg. – 2003. – Vol. 38. – P. 820-26.
  5. [Ferrara N.](#) Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress / N. Ferrara // [Endocr. Rev.](#) – 2004. – Vol. 25(4). – P. 581-611.
  6. Huk I. et al. L-Arginine Treatment Alters the Kinetics of Nitric Oxide and Superoxide Release and Reduces Ischemia/Reperfusion Injury in Skeletal Muscle / Circulation. – 1997. – Vol. 96. – P. 667-675.
  7. [Liu L., Simon M. C.](#) Regulation of transcription and translation by hypoxia / L. Liu, M. C. Simon // Cancer Biol. Ther. – 2004. – Vol. 3(6). – P. 492-497.
  8. [Mendoza M. G.](#) et al. Nitric oxide-dependent neovascularization role in the lower extremity disease / M. G. [Mendoza, H. V. Robles, E. Romo et al.](#) // Curr Pharm Des. – 2007. – Vol. 13(35). – P. 3591-3596.
  9. Rissanen T. T. Current status of cardiovascular gene therapy / T. T. Rissanen, S. Yla-Herttuala // Mol. Ther. – 2007. – Vol. 15. – P. 1233-1247.
  10. Tirziu D. Angiogenesis in the human heart: Gene and cell therapy. / D. Tirziu, M. Simons // Angiogenesis. – 2005. – Vol. 8. – P. 241-251.
  11. Yla-Herttuala S. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical application in cardiovascular medicine / S. Yla-Herttuala, T. T. Rissanen, I. Vajanto // JMCC. – 2007. – Vol. 49. – P. 1015-1026.

**THE CONTRASTIVE VALUATION OF ANGIOGENIC  
EFFICACY OF THE L-ARGININE AND VASCULAR  
ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR FOR TENTATIVE  
LIMB ISCHEMIA**

*E. B. Artyushkova, D. V. Pashkov, Z. I. Tsokolayeva, M. V. Pokrovskiy,  
T. G. Pokrovskaya, E. V. Artyushkova*

The tentative research was made in 24 rats, Wistar line. The microcirculation level was evaluated in Laser-Doppler flowmetry method and by immunohistochemical visualization of the vessels in the muscles. The chronic ischemia was modeling by cutting out of the femoral artery. The intramuscular introduction of VeGF and intraperitoneal introduction of L-arginine 200 mg/kg were used for treatment. The isotonic solution of NaCl was used in control group. The results were valued in 14-th day. The vessels number increased in groups treated by VeGF and L-arginine. It was statistical difference in microcirculation level between control group and group that was treated by L-arginine.

