

УДК 612.17:612.064:612.084:612.086

ЭКСПРЕССИЯ KDR/Flk-1 (VEGFR2) В МИОКАРДЕ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ АНТРАЦИКЛИНОВОЙ КАРДИОМИОПАТИИ

Колдышева Е.В., Клиникова М.Г., Ивлева Е.К., Листвягова Н.А., Лушникова Е.Л.

ФГБНУ «Институт молекулярной патологии и патоморфологии», Новосибирск, e-mail: pathol@inbox.ru

С помощью иммуногистохимического анализа изучен характер и выраженность экспрессии KDR/Flk-1 (VEGFR2) в миокарде крыс при моделировании антрациклиновой кардиомиопатии (однократном внутрибрюшинном введении в дозе 7 мг/кг доxorубина гидрохлорида). Показано, что доxorубин-индуцированная кардиомиопатия развивается уже в течение 3 сут. после введения препарата и характеризуется преимущественно литическими повреждениями кардиомиоцитов, появлением контрактурно измененных мышечных сегментов. Выраженность повреждений нарастает по мере увеличения срока эксперимента (до 14-х суток). По данным иммуногистохимического исследования, развитие антрациклиновой кардиомиопатии сопровождается усилением экспрессии KDR/Flk-1 в кардиомиоцитах; индекс Flk-1-позитивных кардиомиоцитов возрастает в 7 раз по сравнению с контролем. Предполагается, что усиление экспрессии Flk-1 в кардиомиоцитах связано с активацией цитопротекторных реакций в ответ на повреждающее воздействие доxorубина.

Ключевые слова: кардиомиоциты, KDR/Flk-1, доxorубин, иммуногистохимия.

EXPRESSION OF KDR/Flk-1 (VEGFR2) IN RAT MYOCARDIUM DURING DEVELOPMENT OF ANTHRACYCLINE CARDIOMYOPATHY

Koldysheva E.V., Klinnikova M.G., Ivleva E.K., Listvyagova N.A., Lushnikova E.L.

Institute of Molecular Pathology and Pathomorphology, Novosibirsk, e-mail: pathol@inbox.ru

Using immunohistochemistry the occurrence and intensity of KDR/Flk-1 (VEGFR2) expression in rat myocardium were studied in modeling anthracycline cardiomyopathy (single intraperitoneal administration of a dose of 7 mg/kg of doxorubicin hydrochloride). It was shown that doxorubicin-induced cardiomyopathy has been developing for 3 days after the injection and was characterized predominantly by cardiomyocyte lytic lesions, and appearance of cardiomyocyte contracture lesions. Intensity of damage increased with the period of the experiment (up to 14 days). According to immunohistochemical studies, the development of anthracycline-induced cardiomyopathy is accompanied by increased expression of the KDR/Flk-1 in cardiomyocytes; index of the Flk-1 positive cardiomyocytes was increased by 7 times compared to the control value. It is assumed that the increase of Flk-1 expression in cardiomyocytes is associated with activation of cytoprotective reactions in response to the damaging effects of doxorubicin.

Keywords: cardiomyocytes, KDR/Flk-1, doxorubicin, immunohistochemistry.

Изучение структурных основ и молекулярных механизмов регенерации миокарда, в том числе его основной клеточной популяции – кардиомиоцитов, после повреждающих воздействий остается одной из важнейших задач современной регенераторной медицины. Значительные ограничения пролиферативной активности и, как следствие, клеточных форм регенерации кардиомиоцитов у взрослых млекопитающих обуславливают недостаточность тканеспецифической регенерации миокарда при массивных очаговых или диффузных повреждениях [3]. С учетом этих обстоятельств особо актуальным является установление сигнальных путей и каскадов внутриклеточных реакций, обеспечивающих выживание кардиомиоцитов, их физиологическую регенерацию и возможное вступление в клеточный цикл нетерминально дифференцированных клеток.

В последнее время появляются данные о том, что сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), являющийся сильным митогеном для эндотелиальных клеток, может выполнять функции фактора выживания для других клеток и тканей [7; 8]. Экспрессия Flk-1 наблюдается не только в эндотелиальных клетках, но и в кардиомиоцитах [6; 10; 15]. Более того, показано, что сами кардиомиоциты под действием внешних стрессирующих факторов, например гипоксии, способны вырабатывать VEGF и секретировать его во внешнюю среду [14]. Воздействие VEGF повышает жизнеспособность эндотелиальных клеток и кардиомиоцитов, подавляя активность проапоптотических белков [11].

VEGF оказывает свои клеточные эффекты, взаимодействуя с рецепторами с тирозинкиназной активностью, главным образом с VEGFR-1 (Flt-1; fms-like tyrosine kinase) и VEGFR-2 (Flk-1; fetal liver kinase). Установлено, что широкий спектр клеточных реакций на VEGF реализуется преимущественно через взаимодействие с Flk-1. В частности, начинается более интенсивное деление и миграция эндотелиальных клеток, повышается их проницаемость. Рецепторы Flt-1 не способны обеспечивать перечисленные биологические реакции эндотелиальной клетки, но они могут связывать избыток VEGF, циркулирующего в плазме крови, и контролировать его воздействие на сосуды. Реализация эффектов VEGF в кардиомиоцитах опосредуется через внутриклеточный сигнальный путь PI3K/Akt, играющий центральную роль в регуляции роста, дифференцировки и выживания клеток [4; 12].

Следует отметить, что, несмотря на значительное внимание исследователей к роли VEGF при ишемии сердца, прямое действие VEGF на кардиомиоциты в этих и других патологических условиях изучено мало. Имеющиеся данные получены, главным образом, на клеточных культурах неонатальных сердечных миоцитов [9]. В то же время является актуальным изучение и предотвращение негативных последствий химиотерапии [2], связанных с блокадой проведения сигнала через Flk-1 в сердце.

Цель работы – с помощью иммуногистохимического метода оценить экспрессию Flk-1 в миокарде экспериментальных животных при воспроизведении антрациклиновой кардиомиопатии.

Материал и методы исследования

Антрациклиновую кардиомиопатию воспроизводили у крыс-самцов Вистар (n=28), которым однократно внутрибрюшинно вводили доксорубицина гидрохлорид («Фармахеми Б.В.», Нидерланды) в дозе 7 мг/кг в растворе 0,9% NaCl. Контрольным животным (n=5) одновременно с опытными внутрибрюшинно однократно вводили физиологический раствор в объеме, соответствующем их массе тела. Всех животных содержали в стандартных условиях вивария на полноценном рационе, вода *ad libitum*. Эксперименты проведены с соблюдением всех правил и рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных

животных, используемых в экспериментальных работах.

Животных выводили из эксперимента декапитацией в первой половине дня через 3 и 14 сут. после введения доксорубина. После вскрытия и взвешивания сердца образцы миокарда фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина, обрабатывали по стандартной методике для заливки в парафин. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином с постановкой реакции Перлса, по методу ван Гизона с докраской эластических волокон резорцин-фуксином Вейгерта, ставили PAS-реакцию.

С помощью метода иммуногистохимии оценивали экспрессию рецептора вазоэндотелиального фактора роста-2 – KDR/Flk-1 (использовали кроличьи поликлональные антитела E3712 в разведении 1:50, Spring Bioscience, USA). В качестве хромогена использовали 3,3'-диаминобензидин (ДАБ), докрасивали гематоксилином.

Исследования срезов проводили в универсальном микроскопе «Leica DM 4000B». С помощью компьютерной программы «Leica QWin V3» проводили подсчет Flk-1-позитивных кардиомиоцитов при увеличении в 400 раз (тестовая площадь 61171,56 мкм²). Для каждого животного подсчет кардиомиоцитов проводили в 15 непересекающихся тестовых площадях. Затем вычисляли индекс Flk-1-позитивных кардиомиоцитов.

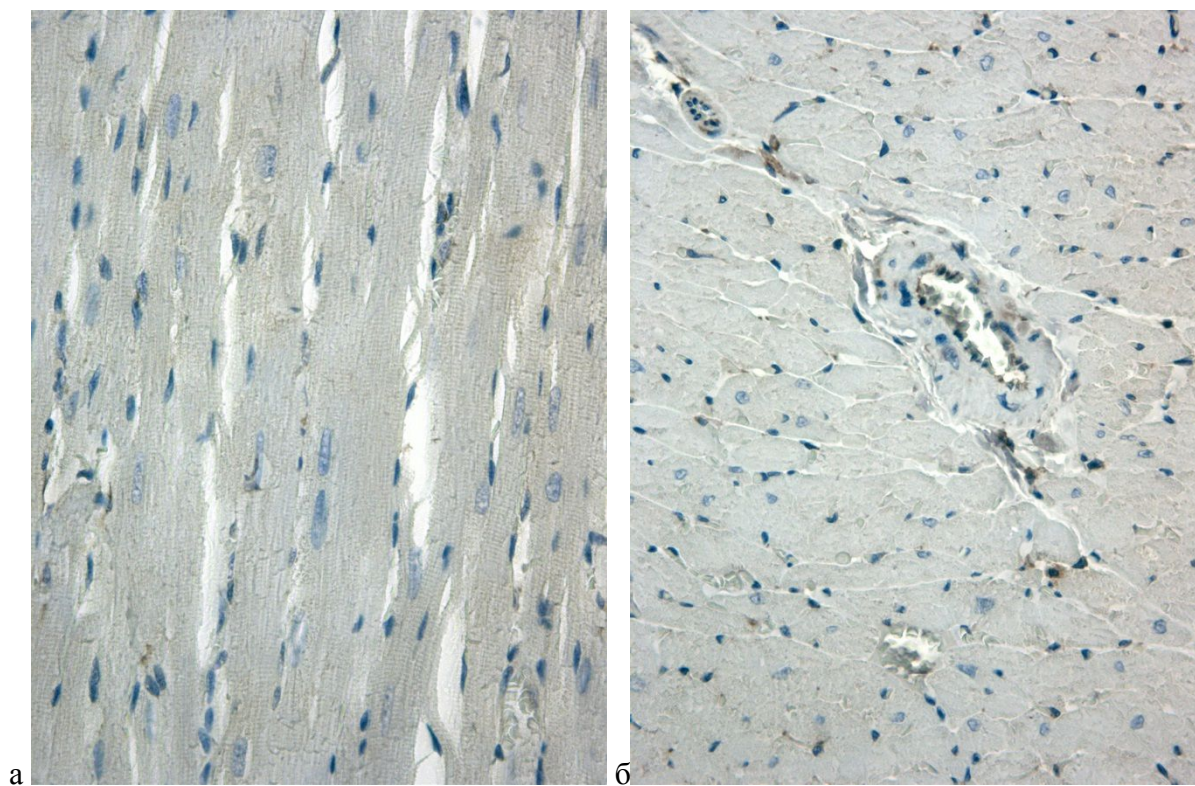
Статистическую обработку проводили с использованием критерия Стьюдента, различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

В миокарде контрольных животных экспрессия Flk-1 выявлялась в отдельных кардиомиоцитах, при этом интенсивность окраски была умеренной (рис. 1а). Индекс Flk-1-позитивных кардиомиоцитов в миокарде контрольных животных составил $13,58 \pm 1,45\%$. В кардиомиоцитах экспрессия Flk-1 регистрировалась в основном в миофибриллярных пучках. Кроме мышечных клеток сердца Flk-1 выявлялась в эндотелиоцитах и гладкомышечных клетках интрамуральных артерий и вен, а также в эндотелиоцитах капилляров (рис. 1б). В гладкомышечных клетках следует отметить неравномерный характер распределения продукта реакции по цитоплазме.

Однократное введение доксорубина крысам Вистар обуславливало появление во всех слоях миокарда через 3 сут. эксперимента литически измененных кардиомиоцитов, которые мы считаем морфологическим эквивалентом развивающейся регенераторно-пластической недостаточности миокарда. Кардиомиоциты с контрактурными повреждениями миофибрилл (преимущественно I – II степеней) были единичными. Следует отметить умеренную липидную инфильтрацию кардиомиоцитов, которая, вероятно, отражала изменения метаболизма липидов в кардиомиоцитах в результате дислипидемического эффекта доксорубина, который был описан нами ранее [1].

Нарушения гемодинамики при антрациклиновой кардиомиопатии проявлялись в выраженном венозном и капиллярном полнокровии, развивающемся лимфостазе, умеренном периваскулярном и интерстициальном отеке.



*Рис. 1. Иммуногистохимическое выявление Flk-1 в миокарде контрольных животных.
Ув. 400*

а – отсутствие экспрессии Flk-1 в кардиомиоцитах; б – умеренная экспрессия Flk-1 в эндотелиоцитах интрамуральной артерии

В этот срок эксперимента значительно усиливалась интенсивность окрашивания кардиомиоцитов при постановке иммуногистохимической реакции с антителами в Flk-1. Практически все кардиомиоциты экспрессировали Flk-1, индекс окрашенных клеток составлял в этот срок $94,32 \pm 0,76\%$ ($p < 0,001$ при сравнении с контролем). В миокарде присутствовали как равномерно, так и неравномерно окрашенные участки (рис. 2). Особо следует отметить отсутствие окрашивания так называемых малых кардиомиоцитов (рис. 2б), которые располагались небольшими кластерами в среднем слое миокарда, чаще вблизи верхушки сердца. Кроме кардиомиоцитов, экспрессия Flk-1 выявлялась также в эндотелиоцитах и гладкомышечных клетках кровеносных сосудов. В этот срок эксперимента периваскулярно и в интерстиции появлялись интенсивно окрашенные соединительнотканнные клетки (макрофаги и фибробласты).

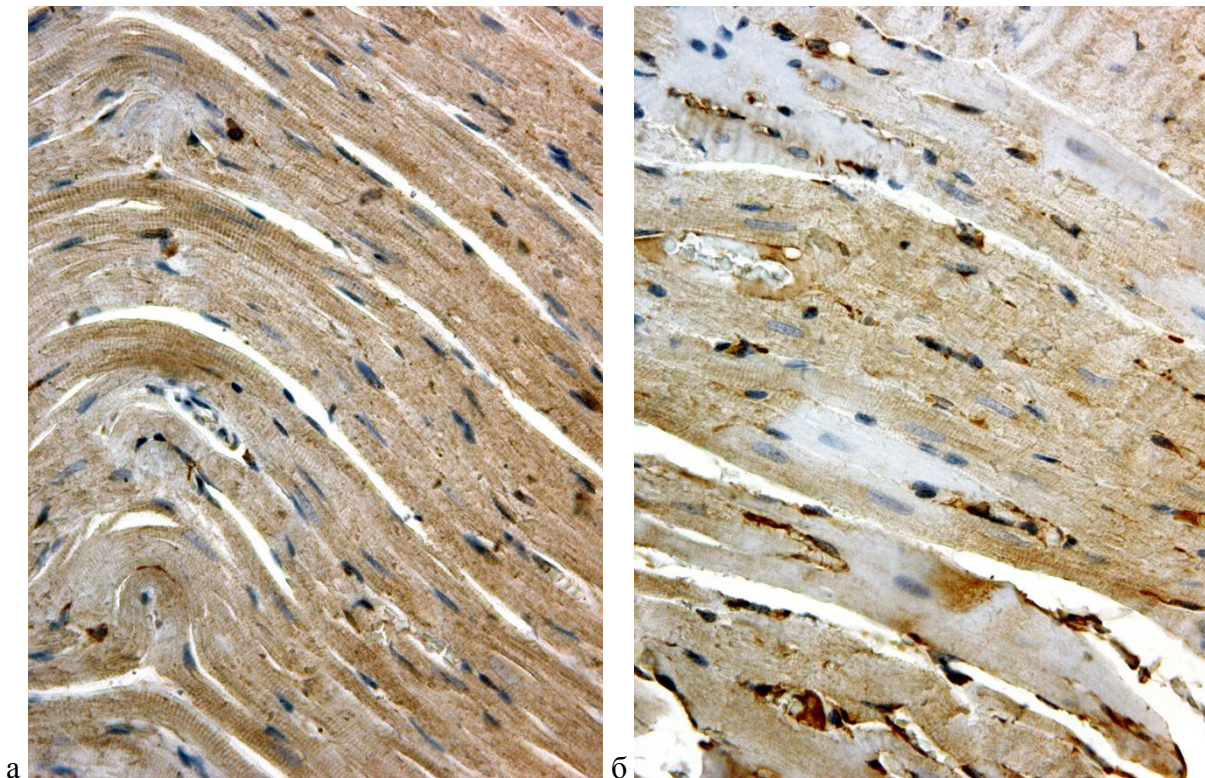


Рис. 2. Иммуногистохимическое выявление Flk-1 в миокарде крыс через 3 сут. после однократного введения доксорубицина. Ув. 400

а – интенсивная равномерная окраска кардиомиоцитов; б – мозаичность окрашивания, отсутствие экспрессии Flk-1 в «малых» кардиомиоцитах

Через 14 сут. после введения доксорубицина в кардиомиоцитах нарастали литические изменения, что отражало усиление регенераторно-пластической сердечной недостаточности. Одновременно регистрировались участки миокарда со значительными контрактурными повреждениями кардиомиоцитов, преимущественно сегментными. При этом в отдельных кардиомиоцитах различались субсегментарные контрактуры. Сохранялись нарушения гемодинамики, отмечалась умеренная диффузная мононуклеарная инфильтрация стромы. Индекс Flk-1-позитивных кардиомиоцитов существенно не менялся по сравнению с предыдущим сроком и составлял $91,14 \pm 1,56\%$ ($p < 0,001$ при сравнении с контролем). Следует отметить выраженную неравномерность экспрессии Flk-1 в кардиомиоцитах (рис. 3): в одних кардиомиоцитах окрашивание было интенсивным, в других – умеренным, в отдельных клетках (с выраженными контрактурными изменениями и в «малых» кардиомиоцитах) оно отсутствовало (рис. 3б). Кроме кардиомиоцитов, Flk-1 экспрессировалась в соединительнотканых клетках, при этом интенсивность их окрашивания была высокой.

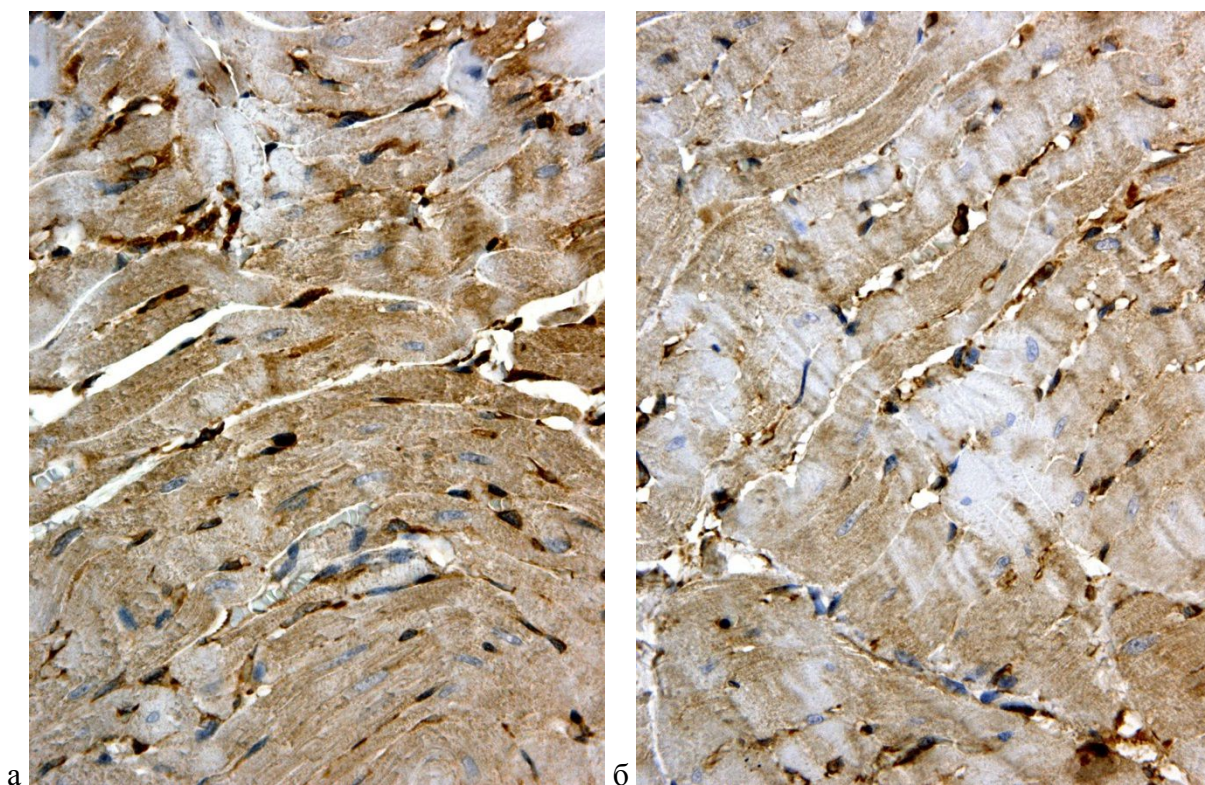


Рис. 3. Иммуногистохимическое выявление Flk-1 в миокарде крыс через 14 сут. после однократного введения доксорубицина. Ув. 400

а – интенсивная неравномерная окраска кардиомиоцитов; б – мозаичность окрашивания, отсутствие экспрессии Flk-1 в полосах сокращения

Значительное увеличение экспрессии Flk-1 в кардиомиоцитах после однократного введения доксорубицина может отражать стимуляцию цитопротекторных реакций через усиление экспрессии генов, ответственных за дифференцировку. Известно, что добавление VEGF к культивируемым мышечным эмбриональным стволовым клеткам активирует дифференцировку кардиомиоцитов через активацию рецепторов Flk-1 и Flt-1, которые, в свою очередь, способствуют усилению экспрессии кардиоспецифических – белков α -MHC, сTn-I, коннексина-43 и транскрипционного фактора Nkx2.5 [5]. Установлено также, что экспрессия Flk-1 и Flt-1 значительно усиливается в дифференцирующихся эмбриональных стволовых клетках по сравнению с недифференцирующимися.

При использовании ингибиторов Flk-1 (например, бевацизумаба, ранибизумаба), подавляющих ангиогенез в опухолях и эффективных при лечении некоторых видов рака (например, почечно-клеточного рака, саркомы мягких тканей и гепатоклеточной карциномы), выявлена блокада распространения сигналов через Flk-1 в разных тканях, что впоследствии может быть причиной развития застойной сердечной недостаточности, гипертонической болезни и других патологий [13].

Показано, что VEGF значительно усиливает фосфорилирование ERK, но не JNK [5]. Применение специфического для ERK ингибитора PD-098059, в отличие от специфического

для JNK ингибитора SP-600125, приводит к подавлению VEGF-индуцированной дифференцировки кардиомиоцитов из эмбриональных стволовых клеток, т.е. VEGF влияет на дифференцировку кардиомиоцитов через ERK-сигнальные пути.

Развитие антрациклиновой кардиомиопатии (в частности, доксорубицин-индуцированной кардиомиопатии) в значительной степени опосредовано усилением генерации активных форм кислорода и, как следствие, связано с повреждением структурных белков и мембран кардиомиоцитов. Показано, что добавление VEGF (100 нг/мл) в культуру неонатальных кардиомиоцитов заметно снижает их H₂O₂-индуцированную гибель [9]. В этом же исследовании показано, что фосфорилирование Akt осуществляется в дозозависимой манере и не связано с изменением общего содержания Akt. Выявленное в нашем исследовании увеличение индекса Flk-1-позитивных кардиомиоцитов при воспроизведении антрациклиновой кардиомиопатии может свидетельствовать о стимулировании цитопротекторных реакций в кардиомиоцитах путем усиления экспрессии Flk-1.

Таким образом, по данным иммуногистохимического исследования, развитие антрациклиновой кардиомиопатии сопровождается усилением экспрессии KDR/Flk-1 в кардиомиоцитах (индекс Flk-1-позитивных кардиомиоцитов возрастает в 7 раз по сравнению с контролем). Выявленное усиление экспрессии Flk-1 в кардиомиоцитах может быть активацией цитопротекторных реакций в ответ на повреждающее действие доксорубицина.

Список литературы

1. Клиникова М.Г., Лушникова Е.Л., Колдышева Е.В., Толстикова Т.Г., Сорокина И.В., Южик Е.И., Мжельская М.М. Кардиотоксический и дислипидемический эффекты доксорубицина и амида бетулоновой кислоты // Бюл. exper. биол. – 2016. – Т. 162, № 8. – С. 247-252.
2. Лушникова Е.Л., Толстикова Т.Г., Непомнящих Л.М., Клиникова М.Г., Молодых О.П., Свиридов Е.А., Сорокина И.В., Жукова Н.А. Численность кардиомиоцитов в миокарде крыс при воздействии на организм агентов с противоопухолевой активностью – циклофосфана и тритерпеноидов // Бюл. exper. биол. – 2007. – Т. 144, № 9. – С. 331-337.
3. Непомнящих Л.М., Лушникова Е.Л., Гольдштейн Д.В. Способны ли современные клеточные технологии устранить биологические ограничения тканеспецифической регенерации миокарда? // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2005. – № 2. – С. 63-74.
4. Brazil D.P., Park J., Hemmings B.A. PKB binding proteins: getting in on the Akt // Cell. – 2002. – Vol. 111. – P. 293-303.

5. Chen Yu., Amende I., Hampton T.G., Yang Y., Ke Q., Min J., Morgan J.P. Vascular endothelial growth factor promotes cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2006. – Vol. 291. – P. H1653–H1658.
6. Chiusa M., Hool S.L., Truetsch P., Djafarzadeh S., Jakob S.M., Seifriz F., Scherer S.J., Suter T.M., Zuppinger C., Zbinden S. Cancer therapy modulates VEGF signaling and viability in adult rat cardiac microvascular endothelial cells and cardiomyocytes // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2012. – Vol. 52 (5). - P. 1164-1175.
7. Compennolle V., Brusselmans K., Acker T., Hoet P., Tjwa M., Beck H., Plaisance S., Dor Y., Keshet E., Lupu F., Nemery B., Dewerchin M., Van Veldhoven P., Plate K., Moons L., Collen D., Carmeliet P. Loss of HIF-2 alpha and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice // *Nat. Med.* – 2002. – Vol. 8. – P. 702-710.
8. Feng Y., Rhodes P.G., Bhatt A.J. Dexamethasone pre-treatment protects brain against hypoxic-ischemic injury partially through up-regulation of vascular endothelial growth factor A in neonatal rats // *Neuroscience.* – 2011. – Vol. 179. – P. 223-232.
9. Guo W., Zhang D., Li W., Zhao Z., Liu B., Wang H., Li F. Akt-centered amplification loop plays a critical role in vascular endothelial growth factor/stromal cell-derived factor 1- α cross-talk and cardioprotection // *Chin. Med. J.* – 2011. – Vol. 124 (22). – P. 3800-3805.
10. Li F., Zhao H., Liao Y., Takashima S., Asano Y., Shintani Y., Hori M., Kitakaze M. Higher mortality in heterozygous neuropilin-1 mice after cardiac pressure overload // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2008. – Vol. 370. – P. 317-321.
11. Ruixing Y., Dezhai Y., Hai W., Kai H., Xianghong W., Yuming C. Intramyocardial injection of vascular endothelial growth factor gene improves cardiac performance and inhibits cardiomyocyte apoptosis // *Eur. J. Heart Fail.* – 2007. – Vol. 9 (4). – P. 343-351.
12. Shiojima I., Walsh K. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis // *Circ. Res.* – 2002. – Vol. 90. – P. 1243–1250.
13. Sundararajan S., Kumar A., Poongkunran M., Kannan A., Vogelzang N.J. Cardiovascular adverse effects of targeted antiangiogenic drugs: mechanisms and management // *Future Oncol.* – 2016. – Vol. 12 (8). – P. 1067-1080.
14. Westenbrink B.D., Ruifrok W.P., Voors A.A., Tilton R.G., van Veldhuisen D.J., Schoemaker R.G., van Gilst W.H., de Boer R.A. Vascular endothelial growth factor is crucial for erythropoietin-induced improvement of cardiac function in heart failure // *Cardiovasc. Res.* – 2010. – Vol. 7 (1). – P. – 30-39.
15. Zentilin L., Puligadda U., Lionetti V., Zacchigna S., Collesi C., Pattarini L., Ruozi G., Camporesi S., Sinagra G., Pepe M., Recchia F.A., Giacca M. Cardiomyocyte VEGFR-1 activation

by VEGF-B induces compensatory hypertrophy and preserves cardiac function after myocardial infarction // FASEB J. – 2010. – Vol. 24 (5). – P. 1467-1478.