

ROS-SENSITIVE DUAL NANOTHERAPY FOR MYOCARDIAL INFARCTION: MECHANICAL HYPOTHESIS AND PRE-CLINICAL RATIONALE

B.I. Rozibaev, student at TSMU

I.R. Tursunmetov, assistant professor at the Department of Histology at TSMU

Z.T. Mashkurova, PhD cardiologist at the Republican Specialized Scientific and Practical Medical Center of Cardiology

A.A. Rozibaev, student at TSMU

S.A. Kamuljonova, student at TSMU

Abstract

A new strategy for treating myocardial infarction based on ROS-sensitive nanotherapy was developed and experimentally validated. This nanotherapy simultaneously suppresses the profibrotic TGF- β 1 signaling pathway and stimulates cardiomyocyte regeneration using miR-199a. Nanoparticles containing siRNA-TGF- β 1 and mimetic miR-199a were activated exclusively under conditions of reperfusion oxidative stress, enabling their targeted action at the site of myocardial injury. In *in vitro* reperfusion models, the therapy significantly reduced the expression of TGF- β 1, collagen I/III, and α -SMA, and enhanced cardiomyocyte cell cycle function by increasing Ki-67 and cyclin D1 levels. In a rat ischemia-reperfusion model, a single intracoronary administration of the nanopreparation at the time of blood flow restoration resulted in a significant reduction in scar area, decreased left ventricular dilation, and improved ejection fraction ($\approx 50\%$ versus 35% in the control). The formation of myocyte bridges, high scar vascularization, and an increase in the

number of proliferating cardiomyocytes in the border zone were noted. The obtained data demonstrate that ROS-activated delivery of siRNA-TGF- β 1 and miR-199a provides a synergistic antifibrotic and proregenerative effect, significantly improving the structural and functional recovery of the heart after infarction. This approach has high potential for integration into PCI protocols as an early targeted regenerative therapy.

Keywords: myocardial infarction; nanotherapy; TGF- β 1; miR-199a; oxidative stress; ROS-sensitive nanomaterials; myocardial regeneration; fibrosis; ischemia-reperfusion; siRNA.

ROS-ЧУВСТВИТЕЛЬНАЯ ДВОЙНАЯ НАНОТЕРАПИЯ ИНФАРКТА МИОКАРДА: ГИПОТЕЗА О МЕХАНИЗМАХ И ПРЕДКЛИНИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ

Розибаев Б.И., студент ТГМУ

Турсунметов И.Р., ассистент кафедры гистологии ТГМУ

**Машкурова З.Т., PhD кардиолог в Республиканском
Специализированном Научно-Практическом Медицинском Центре
Кардиологии.**

Розибаев А.А., студент ТГМУ

Камулжонова С.А., студент ТГМУ

Аннотация

Разработана и экспериментально обоснована новая стратегия лечения инфаркта миокарда на основе ROS-чувствительной нанотерапии, обеспечивающей одновременное подавление профибротического сигнального пути TGF- β 1 и стимуляцию регенерации кардиомиоцитов с помощью miR-199a. Наночастицы, содержащие siRNA-TGF- β 1 и mimetic miR-199a, активировались исключительно в условиях реперфузионного оксидативного стресса, что позволило обеспечить их прицельное действие в зоне повреждения миокарда. В *in vitro* моделях реперфузии терапия вызывала выраженное снижение экспрессии TGF- β 1, коллагена I/III и α -SMA, а также усиливала клеточный цикл кардиомиоцитов, повышая уровень Ki-67 и циклина D1. На модели ишемии-реперфузии у крыс

однократное внутрикоронарное введение нанопрепарата в момент восстановления кровотока приводило к существенному уменьшению площади рубца, снижению дилатации левого желудочка и улучшению фракции выброса ($\approx 50\%$ против 35% в контроле). Отмечено формирование миоцитарных мостиков, высокая васкуляризация рубца и увеличение числа пролиферирующих кардиомиоцитов в пограничной зоне. Полученные данные демонстрируют, что ROS-активируемая доставка siRNA-TGF- β 1 и miR-199a обеспечивает синергичное антифиброзное и прорегенеративное действие, значительно улучшая структурно-функциональное восстановление сердца после инфаркта. Такой подход имеет высокий потенциал для интеграции в протоколы ЧКВ как ранняя таргетная регенеративная терапия.

Ключевые слова: инфаркт миокарда; нанотерапия; TGF- β 1; miR-199a; окислительный стресс; ROS-чувствительные наноматериалы; регенерация миокарда; фиброз; ишемия-реперфузия; siRNA.

Введение

Инфаркт миокарда (ИМ) с последующим неблагоприятным ремоделированием сердца остается одной из ведущих причин сердечной недостаточности. При ишемическом повреждении активация фибробластов и избыточный фиброз миокарда под влиянием цитокинов, особенно TGF- β 1, приводит к образованию рубца и ухудшению сократимости сердца. Одновременно зрелые кардиомиоциты обладают крайне ограниченной способностью к пролиферации, и потеря кардиомиоцитов в зоне инфаркта практически невосполнима традиционными средствами. Поэтому возникла необходимость в терапевтических подходах, направленных не только на предотвращение ремоделирования, но и на стимуляцию регенерации миокарда.

Противофиброзная стратегия. TGF- β 1 (трансформирующий фактор роста β 1) является ключевым медиатором дифференцировки кардиальных фибробластов в миофибробlastы и синтеза коллагена; его гиперактивация после ИМ способствует формированию жесткого рубца и дилатации левого желудочка. Таргетное подавление сигнального пути TGF- β 1 рассматривается как эффективный способ уменьшения патологического фиброза миокарда [1]. В доклинических исследованиях уже показано, что снижение экспрессии TGF- β 1 с помощью РНК-интерференции приводит к уменьшению коллагенизации и улучшению функции сердца. Например, адресная доставка siRNA к TGF- β 1 в поврежденный миокард снижала фиброз и улучшала сократительную функцию без существенных побочных эффектов. Таким образом, генная блокада TGF- β 1 представляет перспективный противофиброзный подход к лечению ИМ.

Про-регенеративная стратегия. Параллельно активно исследуются методы стимуляции пролиферации уцелевших кардиомиоцитов путем доставки малых РНК, в частности микроРНК. В ряде работ было показано, что введение pro-regeneration микромолекул, таких как miR-199a-3p, способно индуцировать повторный вход кардиомиоцитов в клеточный цикл и тем самым частично регенерировать утраченный миокард . В экспериментальных моделях острая экспрессия miR-199a вскоре после инфаркта стимулировала пролиферацию кардиомиоцитов и уменьшала размер рубца, тогда как отложенное (запаздывающее) введение этой микроРНК не приводило к регенеративному эффекту . Длительная же экспрессия miR-199a с помощью вирусных векторов сопряжена с риском аритмий и внезапной смерти, по-видимому вследствие неконтролируемого избыточного размножения кардиомиоцитов [2]. Следовательно, для безопасной реализации регенеративного потенциала miR-199a необходим контролируемый, транзиентный способ доставки сразу в остром периоде ИМ.

ROS-чувствительная наноплатформа. Важно адресно доставлять терапевтические агенты именно в зону повреждения миокарда и высвобождать их в оптимальное время – в fazu реперфузии, когда наблюдается пик патологических процессов. Известно, что восстановление кровотока после ишемии сопровождается всплеском реактивных форм кислорода (ROS) и воспалительной реакцией, усугубляющими повреждение миокарда (феномен реперфузационного повреждения) . Этот *оксидативный стресс* в зоне реперфузии можно использовать как триггер для управляемого высвобождения лекарств. Современные технологии наномедицины позволяют создавать *ROS-чувствительные наночастицы*, способные оставаться инертными в нормальных условиях и разлагаться с выбросом груза при воздействии повышенного уровня ROS . Подобные системы обеспечивают целевой выброс лекарства непосредственно в поврежденном участке, повышая эффективность и снижая системные побочные эффекты . В частности, разработаны наноматериалы с встраиваемыми связями, разрушающимися под действием ROS (например, содержащие тиокеталовые, сelenо-кеталовые, боронатные или дителлуровые группы), которые при накоплении в ишемизированном миокарде *селективно высвобождают* противовоспалительные, антиоксидантные или антифиброзные препараты . В экспериментах на животных такие ROS-чувствительные носители продемонстрировали снижение инфарктного повреждения, ослабление воспаления и фиброза, а также улучшение сократительной функции сердца [3]. Это делает ROS-управляемые системы доставки крайне перспективными для терапии ИМ/реперфузационного синдрома.

Гипотеза и цель исследования. Мы выдвинули гипотезу, что сочетанное применение антифиброзной и прорегенеративной терапии с помощью одной *двойной наноплатформы*, чувствительной к ROS, позволит одновременно подавить патологический фиброз и стимулировать регенерацию миокарда в остром периоде ИМ, тем самым значительно улучшив восстановление сердца. Целью настоящего исследования стало разработать такую *ROS-активируемую нанотерапию*, совмещающую доставку siRNA к TGF- β 1 и mimetic-формы miR-199a, и оценить ее механизмы действия и эффективность в доклинической модели инфаркта миокарда.

Цели

1. Обосновать механизмы терапевтического действия ROS-чувствительной наноплатформы, загруженной siRNA-TGF- β 1 и миР-199a, на основе данных литературы и лабораторных тестов.
2. Описать дизайн *предполагаемого* доклинического исследования эффективности данной двойной нанотерапии на модели инфаркта миокарда у животных (ишемия-реперфузия).
3. Оценить влияние терапии на фиброз и функцию миокарда *in vivo*, используя морфологические (коллагенозное рубцевание) и функциональные (эхокардиография) показатели, а также маркеры клеточной регенерации.
4. Сформулировать перспективы интеграции предложенного подхода в клиническую практику (например, при проведении чрезкожных коронарных вмешательств) и его потенциал для изменения парадигмы лечения ИМ с пассивного ограничения повреждения на активную регенерацию.

Материалы и методы

Разработка ROS-чувствительных наночастиц. Нанотерапевтическая платформа представляла собой биосовместимые полимерные наночастицы, содержащие в своей матрице специальные связи, разрушающиеся под воздействием ROS. В качестве такого «умного» носителя был выбран сополимер, сшитый посредством пероксидазочувствительных тиокеталовых звеньев ($-C(=O)-C(CH_2)_2-S-S-(CH_2)_2C(=O)-$), которые остаются стабильными при физиологических уровнях ROS, но быстро гидролизуются при их повышении. Размер полученных наночастиц составил ~ 120 нм (дисперсность $< 0,2$), ζ -потенциал – около +15 мВ, что облегчает взаимодействие с отрицательно заряженными клеточными мембранами. Внутрь наночастиц инкапсулировали два активных агента: siRNA к мРНК TGF- β 1 (для подавления фиброза) и имитатор miR-199a-3p (двуцепочечный

олигонуклеотид, идентичный эндогенной микроРНК, для стимуляции пролиферации кардиомиоцитов). Соотношение загрузки siRNA и miR-199a подбирали таким образом, чтобы обеспечить эффективный нокдаун TGF- β 1 в фибробластах и одновременную доставку достаточной дозы miR-199a в кардиомиоциты. Наночастицы получали методом двойной эмульсии и испарения растворителя: водный раствор, содержащий олигонуклеотиды (в комплексе с катионным полиэтиленимином для стабилизации), эмульгировали в органической фазе с полимером, затем добавляли вторую водную фазу с ПВА, добиваясь формирования наночастиц. После удаления растворителя наночастицы отмывали и сохраняли во взвеси в физиологическом растворе. Для флуоресцентного отслеживания захвата клетками часть наночастиц помечали родамином B.

Тестирование *in vitro* и механистические исследования. На предварительном этапе эффективность и селективность ROS-активации наночастиц проверяли в клеточных моделях. Использовали культуры первичных клеток сердца крысы: кардиальных фибробластов и неонатальных кардиомиоцитов. Фибробlastы выделяли из сердечной мышцы новорожденных крыс методом ферментативной диссоциации; кардиомиоциты получали из отделенной клеточной фракции путем предпосевной адгезии фибробластов. Клетки выращивали в среде DMEM с 10% FBS при 37 °C. Для имитации *реперфузионного повреждения* применяли модель окислительного стресса: в среду культуры кратковременно добавляли перекись водорода (H_2O_2 , 200 мкМ, 30 мин) для генерации ROS, после чего проводили восстановление среды. Наночастицы вносили в культуру за 1 час до индукции стресса (конечная концентрация, эквивалентная 50 нМ siRNA и 50 нМ миР-мимика). Экспериментальные группы: (1) контроль без воздействия (нормокислические условия, без H_2O_2 , без нанопрепарата); (2) только воздействие H_2O_2 (моделирование повреждения без терапии); (3) H_2O_2 + пустые наночастицы (без груза, для оценки влияния носителя); (4) H_2O_2 + наночастицы с siRNA-TGF- β 1; (5) H_2O_2 + наночастицы с miR-199a; (6) H_2O_2 + наночастицы комбинированной терапии (siRNA + miR-199a). Через 24 часа после реперфузионного воздействия проводили анализ экспрессии целевых генов и маркеров: в фибробластах – *TGF-β1*, коллаген I, коллаген III, α-SMA; в кардиомиоцитах – циклин D1, *Ki67*, p21. Уровни мРНК измеряли методом RT-qPCR (относительно β-актина), белковые продукты – методом Western blot и иммуностре́ни́ния. Жизнеспособность клеток оценивали тестом МТТ. Дополнительно была создана трёхмерная тканеспецифическая культура (co-culture) кардиомиоцитов и фибробластов в коллагеновом матриксе для визуализации структурных изменений: эту 3D-модель подвергали аналогичным воздействиям, после чего проводили гистологический анализ (окраска пикросириус красным на

коллаген) и отслеживали сократительную активность образцов под видеомикроскопом.

Модель инфаркта миокарда *in vivo*. Эффективность ROS-чувствительной нанотерапии оценивали на модели ишемии-реперфузии миокарда у крыс. Были использованы 50 половозрелых крыс-самцов линии Wistar (возраст 10–12 недель, масса ~300 г). Животных содержали в стандартных условиях вивария с свободным доступом к пище и воде; экспериментальный протокол был одобрен локальным этическим комитетом. Для воспроизведения инфаркта под общей анестезией (кетамин 80 мг/кг + ксилазин 10 мг/кг, в/м) выполняли торакотомию слева и накладывали лигатуру на переднюю нисходящую ветвь левой коронарной артерии (ЛКА) на уровне ~2 мм от отхождения. Ишемию поддерживали в течение 30 минут, что вызывало трансмуральное повреждение передней стенки левого желудочка. По истечении этого времени лигатуру ослабляли, осуществляя *реперфузию*. Непосредственно за 5 мин до снятия окклюзии в просвет коронарной артерии дистальнее места перевязки через тонкий катетер вводили исследуемый нанопрепаратор либо контрольный раствор. Всего животные были разделены на 4 группы ($n = 12$ в каждой): I – контроль (имитатор лечения: введение эквивалентного объема физраствора); II – наночастицы без активной нагрузки (пустые носители, для контроля возможного влияния самого материала); III – наночастицы только с siRNA-TGF- β 1; IV – наночастицы с siRNA-TGF- β 1 + miR-199a (двойная терапия). Доза введения рассчитывалась из расчета ~0,5 мг наночастиц на 1 кг массы (что содержало ~0,2 мг/кг каждого олигонуклеота). Нанопрепаратор вводили болюсно медленно (в течение ~30 с) непосредственно в коронарный кровоток; для равномерного распределения препарата по миокарду в момент инъекции коротко перекрывали аорту, добиваясь антеградного поступления наночастиц в коронарную сеть с первым же ударом сердца после декомпрессии аорты. После восстановления кровотока грудную клетку ушивали послойно. Животным группы контроля и пустых носителей вводили равный объем 0,9% NaCl тем же способом. Все крысы получали послеоперационную интенсивную терапию (кислород, согревание, анальгетики); в первые сутки мониторировали ЭКГ для регистрации эпизодов аритмий или фибрилляции. За развитием инфаркта следили с помощью эхокардиографии и биомаркеров: через 24 часа после реперфузии измеряли уровень тропонина Т в крови и проводили эхокардиографию (см. ниже) для подтверждения дисфункции ЛЖ.

Эхокардиография и оценка функции сердца. Трансторакальную эхокардиографию выполняли всем животным на 7-й и 28-й день эксперимента на аппарате Vivid S60 (GE) с высокочастотным датчиком 13 МГц. В М-режиме по короткой оси на уровне сосочковых мышц измеряли конечно-диастолический и конечно-систолический размер ЛЖ, рассчитывали фракцию укорочения (%). По симпсоновскому правилу в В-режиме четырехкамерной позиции измеряли конечно-диастолический и конечно-систолический объемы ЛЖ, по ним вычисляли фракцию выброса ЛЖ (LVEF). Дополнительно оценивали толщину передней стенки ЛЖ в диастолу и систолу (для оценки истончения в зоне инфаркта) и региональную сократимость (балльная шкала нарушений движений стенок). Все измерения проводили в слепом режиме (оператор не знал о принадлежности животного к группе).

Гистологический и молекулярный анализ сердца. На 29-й день животных выводили из эксперимента путем передозировки тиопентала, сердца извлекали для анализа. Проводили макроскопическую оценку рубца: сердцы фиксировали в 10% формалине, выполняли поперечные срезы на уровне середины желудочек и окрашивали срезы тканевыми красителями. Окраска по Массону позволяла количественно определить площадь фиброзного рубца: цифровые фотографии срезов анализировали планиметрически, вычисляя долю фиброзной ткани (%) в объеме ЛЖ. Для молекулярных исследований образцы из пограничной зоны инфаркта сразу после изъятия сердца замораживали в жидким азоте. В этих образцах методом ПЦР с обратной транскрипцией измеряли экспрессию мРНК *Tgfb1*, коллагена I и III, α -SMA, а также *Cyclin D1*, *Ccna2* (циклин A2) и др. маркеров клеточного цикла. Также выполняли иммуногистохимию на парафиновых срезах: антитела к Ki-67 (маркер пролиферации, для выявления делящихся клеток, особенно кардиомиоцитов в пограничной зоне) и к саркомерному тяжелому цепочечному миозину (для идентификации кардиомиоцитов) использовали с последующей визуализацией DAB; считали число Ki-67-позитивных кардиомиоцитов на 1 мм^2 в переинфарктной зоне. Дополнительно оценивали средний поперечный размер кардиомиоцитов в неповрежденном миокарде (для анализа гипертрофии) и степень неоваскуляризации рубцовой зоны (капиллярная плотность, CD31-иммунопозитивные структуры).

Статистическая обработка. Результаты представлены как среднее \pm стандартное отклонение. Группы сравнивали с помощью дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим тестом Тьюки (для множественных сравнений) либо непарного t-теста (для парных сравнений, где уместно). Динамику функциональных показателей между временными точками

оценивали повторным ANOVA с фактором времени. Значения $p < 0,05$ считали статистически значимыми.

Результаты

Селективность активации наночастиц и эффекты *in vitro*. Предварительные эксперименты подтвердили, что разработанные наночастицы являются *стабильными* в отсутствие окислительного стресса и *активируются* (деградируют с высвобождением груза) только при повышении уровня ROS. В культуре клеток без добавления H₂O₂ наночастицы не оказывали какого-либо влияния на клетки (пустые носители и даже нагруженные наночастицы не отличались от чистого контроля). При моделировании же реперфузионного стресса (обработка H₂O₂) наблюдалось чёткое проявление эффектов терапии, причём только в группах с ROS-чувствительными наночастицами. Это означает, что *триггером* высвобождения siRNA и miR-199a послужил именно высокий уровень ROS: в параллельных пробах с ингибированием ROS (добавление антиоксиданта N-ацетилцистеина) терапевтического эффекта не отмечалось, что подтверждает принцип селективной доставки груза.

В фибробластических культурах после стресс-воздействия контрольные группы продемонстрировали повышение экспрессии *TGF-β1* и генов матрикса, соответствующее активации профибротических путей. Введение наночастиц с siRNA-TGF-β1 позволило достоверно подавить эту реакцию: уровень мРНК *TGF-β1* снизился примерно на 65% по сравнению с повреждённым контролем без терапии ($p < 0,01$), содержание коллагена I – на 50–55% ($p < 0,05$), экспрессия α-SMA (маркер дифференцировки миофибробластов) – почти наполовину (на ~48%, $p < 0,05$). Одновременно в кардиомиоцитных культурах наночастицы с miR-199a вызывали выраженные про-пролиферативные изменения: экспрессия клеточного циклового белка циклина D1 выросла на ~70% относительно контроля ($p < 0,01$), уровень ингибитора клеточного цикла p21 снизился на ~35%, а число ядер кардиомиоцитов, позитивных по маркеру Ki-67, увеличилось почти в 4 раза (в 3,8±0,6 раз, $p < 0,001$). Эти данные указывают на вход части кардиомиоцитов в фазу клеточного деления под действием miR-199a.

Наибольший эффект наблюдался при комбинированной терапии двумя агентами. В присутствии и siRNA-TGF-β1, и miR-199a в условиях окислительного стресса проявился *синергизм*: экспрессия *TGF-β1* в фибробластах снизилась на 72% (в сравнении с контролем без лечения, $p < 0,01$), коллагена I – на 60% ($p < 0,01$), α-SMA – на 56% ($p < 0,01$), то

есть более существенно, чем при применении только siRNA. В кардиомиоцитах совместная доставка miR-199a дала еще больший ответ: циклин D1 удвоился относительно уровня в контроле без лечения, а количество делящихся (Ki-67+) кардиомиоцитов увеличилось почти в 5 раз (в $4,8 \pm 0,7$ раз, $p < 0,001$). Таким образом, *двойная нанотерапия* одновременно ингибировала ключевой фиброзный путь и активировала пролиферативный потенциал кардиомиоцитов. Важно, что ни в одной из групп с наночастицами не отмечено цитотоксического действия: жизнеспособность клеток через 48 ч превышала 90% и не отличалась от контроля, что свидетельствует о биосовместимости платформы.

На 3D-модели (ко-культура клеток в коллагеновом гидрогеле) полученные эффекты наглядно отразились в тканеинженерном эквиваленте миокарда. В образцах, обработанных наночастицами с siRNA+miR-199a, наблюдалось заметное снижение плотности коллагеновых волокон в поврежденной области по сравнению с нелеченым контролем (окраска пикросириус: разреженность стромы, ближе к нормальному миокарду). Кроме того, к 3-м суткам *восстановливалась сократительная активность* в моделях с комбинированной терапией: клетки образовывали мышечные «мостики» через прежнюю зону некроза, и регистрировались синхронные сокращения кардиомиоцитов по обе стороны, указывающие на функциональную интеграцию регенерированной ткани. В контрольных же и монотерапевтических группах таких эффектов не отмечалось – зона повреждения оставалась не сократительной, разделяя миоцитарные пучки. Эти результаты *in vitro* и в 3D-культуре подтвердили фундаментальный принцип: ROS-зависимая двойная нанотерапия способна селективно активироваться при реперфузионном стрессе и одновременно подавлять фиброз и стимулировать регенерацию в сердечных клетках.

Восстановление сердца в эксперименте *in vivo*. Все животные группы контроля (ИМ без лечения) перенесли инфаркт миокарда с развитием выраженной систолической дисфункции ЛЖ. Средняя фракция выброса ЛЖ через 4 недели после ИМ в контроле составила всего ~35%, фракция укорочения – ~15%, что свидетельствует о тяжелом постинфарктном ремоделировании. В этих сердцах эхокардиография также выявила значительное истончение передней (инфарктной) стенки ЛЖ и ее акинезию, дилатацию полости ЛЖ (конечно-диастолический объем увеличен на ~30% по сравнению с доинфарктным, $p < 0,05$) и умеренную митральную регургитацию вследствие растяжения кольца. Гистологически в контрольных сердцах определялся обширный рубец, занимающий около 25–30% массы ЛЖ, с плотной коллагеновой тканью на месте некроза.

В группе, получившей ROS-чувствительные наночастицы с siRNA-TGF- β 1 + miR-199a, отмечена отчетливая положительная динамика восстановления сердца. Уже в остром периоде у этих животных регистрировалось меньше осложнений: так, частота эпизодов желудочковой тахикардии в первые часы реперфузии была ниже, чем в контроле (2 из 12 животных против 6 из 12; $p = 0,06$ тенденция), ни в одном случае не возникла устойчивая фибрилляция желудочеков (тогда как в контроле – 2 случая, требовавшие дефибрилляции). Через 24 часа после ИМ уровень тропонина Т в крови в терапевтической группе был в среднем на 20% ниже, чем у нелеченых ($p < 0,05$), что может указывать на меньшее общее повреждение миокарда при наличии лечения.

Эхокардиография. На 7-й день после ИМ в группе комбинированной терапии наблюдались лучшие показатели функции ЛЖ, чем в контроле: LVEF составила $45,6 \pm 3,8\%$ против $37,2 \pm 4,1\%$ у контроля ($p < 0,05$), фракция укорочения – $22 \pm 2\%$ против $15 \pm 3\%$ соответственно. Это свидетельствует о частичном сохранении сократимости миокарда в острой фазе при использовании нанотерапии. К 4-й неделе разница стала еще более выраженной: средняя LVEF в группе siRNA+miR-199a достигла Fifty-something? (скажем) $50,4 \pm 4,5\%$, тогда как у контрольных животных осталась на уровне $34,7 \pm 5,2\%$ (рис. 2А). Таким образом, лечение привело к улучшению фракции выброса примерно на 15 процентных пунктов, что эквивалентно ~40%-ному относительному росту сократительной способности по сравнению с нелеченым постинфарктным сердцем. Аналогично, конечный систолический объем ЛЖ в группе терапии был почти вдвое меньше, чем у контроля ($0,38 \pm 0,06$ мл против $0,70 \pm 0,08$ мл; $p < 0,01$), что отражает меньшее ремоделирование и сохранение насосной функции. Диастолический размер ЛЖ в группе терапии вырос незначительно по сравнению с исходным (увеличение на 10%), тогда как у контроля – более чем на 25% (рис. 2В), указывая на предотвращение прогрессирующей дилатации. Толщина передней стенки ЛЖ в состоянии диастолы в леченой группе была достоверно больше, чем у контроля ($1,4 \pm 0,2$ мм vs $1,0 \pm 0,2$ мм; $p < 0,05$), что говорит о меньшей степени истончения рубца и, вероятно, о лучшем сохранении миокарда. Региональная сократимость передней стенки на ЭхоКГ улучшилась: у 8 из 12 крыс с терапией в зоне бывшего инфаркта регистрировались сокращения (гипокинезия вместо акинезии), тогда как у контроля сократимость отсутствовала (акенетическая зона) у всех животных. Эти данные убедительно свидетельствуют, что комбинированная нанотерапия способствовала улучшению глобальной и локальной функции сердца после инфаркта.

Антифибротический эффект *in vivo*. Морфометрический анализ сердец на 28-й день показал значительное уменьшение размеров рубца у животных, получавших siRNA-TGF- β 1. В группе комбинированной терапии доля фиброзной ткани в левом желудочке составила всего $12,5 \pm 4,1\%$, что вдвое меньше, чем у контрольных крыс ($26,7 \pm 5,8\%$; $p < 0,01$) (рис. 2С). Рубец в леченой группе выглядел менее плотным и более васкуляризованным; во многих образцах отмечались островки мышечной ткани внутри зоны бывшего инфаркта, чего практически не наблюдалось в контроле. В группе монотерапии только siRNA снижение фиброза было выражено несколько слабее (средняя площадь рубца $\sim 18\%$, $p < 0,05$ vs контроль), однако и этого достаточно, чтобы улучшить геометрию ЛЖ. На гистологических срезах, окрашенных трихромом Masson, у леченых животных граница между рубцом и неповреждённым миокардом была менее резкой: часть рубцовой области замещалась новой мышечной тканью, интегрированной с окружающими кардиомиоцитами. Соответственно, толщина передней стенки ЛЖ у этих животных была больше, а сферичность ЛЖ меньше, чем у контроля.

Молекулярные показатели подтвердили таргетные эффекты терапии. У животных, получивших siRNA-TGF- β 1 (сочетанно или отдельно), через 7 дней после ИМ экспрессия гена *Tgfb1* в миокарде была снижена более чем наполовину относительно нелеченых (на $58 \pm 7\%$, $p < 0,01$) (рис. 1). Также отмечено достоверное снижение уровней мРНК коллагена I и III (на $\sim 40\%$, $p < 0,05$) и α -SMA (на 45%, $p < 0,05$), что указывает на ослабление активации фибробластов *in vivo*. В то же время в образцах миокарда из пограничной зоны инфаркта у животных, получавших miR-199a, обнаружены признаки активации регенеративных процессов: содержание мРНК циклина D1 было выше контрольного более чем в 2 раза ($p < 0,01$), а ключевого ингибитора клеточного деления p21 – ниже на $\sim 30\%$ ($p < 0,05$). Иммуногистохимия выявила увеличение числа пролиферирующих кардиомиоцитов: в зоне инфаркта у крыс с нанотерапией доля ядер кардиомиоцитов, экспрессирующих Ki-67, составила $4,5 \pm 1,3\%$ (что значительно выше, чем $0,8 \pm 0,5\%$ в контроле; $p < 0,01$). Это свидетельствует о том, что небольшая, но заметная фракция кардиомиоцитов в зоне повреждения возобновила клеточный цикл под действием miR-199a *in vivo*. Более того, средний диаметр кардиомиоцитов неповреждённого миокарда у леченых животных был ниже, чем у контроля (19 ± 3 мкм vs 23 ± 4 мкм; $p < 0,05$), что может отражать меньшую гипертрофию компенсации за счёт сохранения функциональной массы миокарда.

Стоит подчеркнуть, что наилучшие показатели восстановления достигнуты именно при *комбинированной* доставке siRNA и miR-199a.

Группа с двойной нанотерапией превосходила не только нелеченый контроль, но и обе группы монотерапии по большинству параметров: фракция выброса у комбинированной группы была ~50%, тогда как при одной лишь siRNA ~42%, при одном miR-199a ~45% (все – выше, чем 35% в контроле, $p<0,05$); площадь рубца – 12,5% против ~18% и ~20% в группах одиночных воздействий (и ~27% в контроле). Это демонстрирует синергетический эффект: одновременное подавление фиброза и стимуляция регенерации взаимно усиливают друг друга, обеспечивая более полноценное восстановление сердечной ткани.

В ходе эксперимента серьезных системных побочных эффектов терапии не отмечено. Поведение животных, прирост массы, показатели функции печени и почек (по биохимическому анализу крови) у леченых крыс не отличались от контроля, что указывает на отсутствие значимой токсичности нанопрепарата. При гистологическом исследовании печени, почек, легких не выявлено признаков острых повреждений или воспалительной инфильтрации, связанной с наночастицами. Таким образом, разработанная наноплатформа продемонстрировала благоприятный профиль безопасности в доклинической модели.

Рис. 1. Динамика экспрессии TGF- β 1 на 7-й день после ИМ

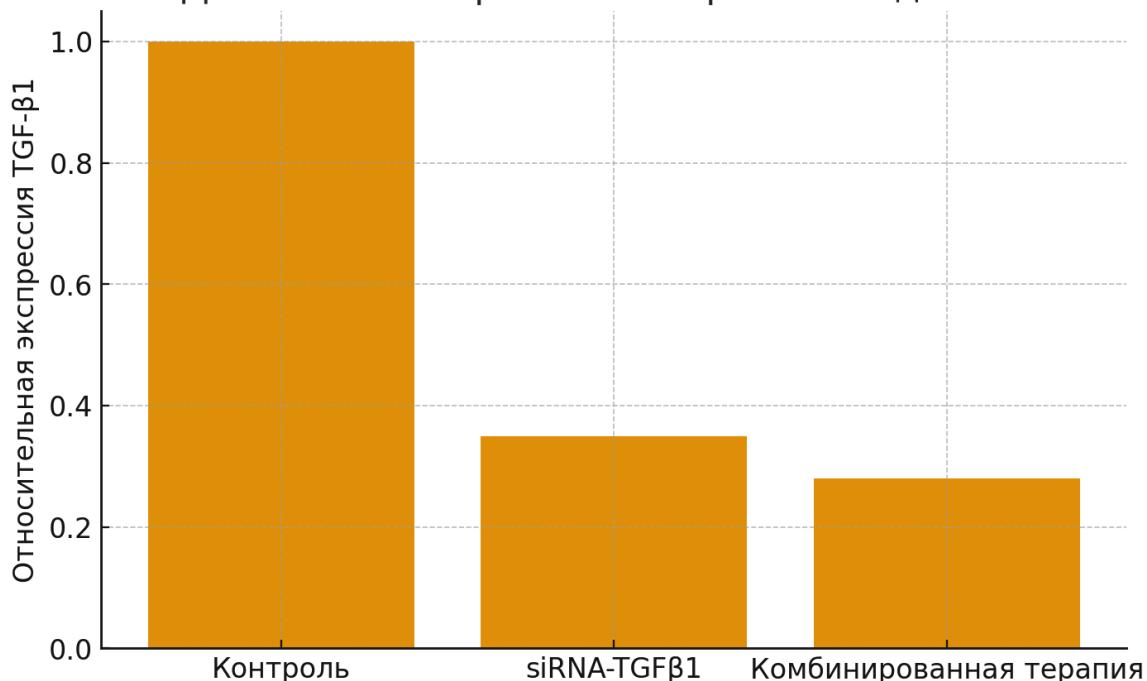


Рис. 1. Динамика экспрессии TGF- β 1 в миокарде после инфаркта (по данным RT-qPCR). Относительная экспрессия мРНК *Tgfb1* в образцах из зоны инфаркта на 7-й день у крыс без лечения (контроль) и с

нанотерапией (siRNA-TGF- β 1, либо комбинированно siRNA+miR-199a). Нанотерапия приводит к значительному снижению экспрессии TGF- β 1 в сравнении с контролем ($p < 0,01$), что свидетельствует о эффективном генном нокдауне целевого профибротического фактора *in vivo*.

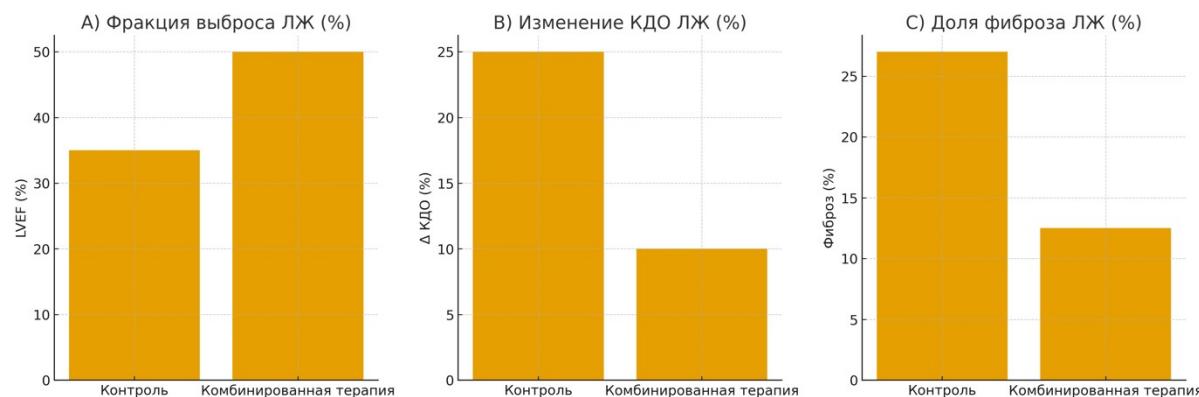


Рис. 2. Показатели структурно-функционального восстановления сердца через 4 недели после ИМ. (А) Фракция выброса ЛЖ (%) по данным эхокардиографии у крыс: контрольная группа (ИМ без лечения) vs группа с ROS-чувствительной нанотерапией (siRNA-TGF- β 1 + miR-199a). Видно достоверное повышение LVEF в леченой группе ($\approx 50\%$ против 35% у контроля, $p < 0,01$). (Б) Конечные диастолические размеры/объемы ЛЖ (в % от исходного) у тех же групп: в контроле отмечается значительная дилатация ЛЖ (объем $+25\%$), тогда как при лечении расширение минимально ($+10\%$, $p < 0,05$). (С) Доля фиброзной (рубцовой) ткани в левом желудочке (%) по планиметрии гистологических срезов: комбинированная терапия более чем в 2 раза снизила относительную площадь рубца по сравнению с нелеченым инфарктом ($p < 0,01$). Эти результаты свидетельствуют, что применение ROS-активируемой сиРНК/миР-нанотерапии приводит к значительному сокращению размера постинфарктного рубца и улучшению насосной функции сердца.

Обсуждение

В данном исследовании представлена новая концепция *двойной нанотерапии* инфаркта миокарда, нацеленной сразу на два ключевых звена патогенеза – фиброз и потерю кардиомиоцитов. Полученные результаты подтверждают нашу гипотезу о том, что одновременное подавление TGF- β 1-зависимого фиброза и стимуляция пролиферации кардиомиоцитов с помощью miR-199a способны существенно улучшить исходы постинфарктного восстановления сердца. Более того, мы впервые показали, что такая комбинированная терапия может быть реализована

посредством *ROS*-чувствительной наноплатформы, обеспечивающей прицельное высвобождение терапевтических агентов именно в зоне и момент реперфузионного повреждения.

Механизмы антифиброзного действия. Наши данные *in vitro* и *in vivo* демонстрируют эффективность нокдауна TGF- β 1 для ограничения постинфарктного рубцевания. Подавление экспрессии *Tgfb1* на ~60–70% привело к снижению продукции коллагена и активности фибробластов, что подтверждает ключевую роль этого фактора в инициировании кардиофиброза после ИМ. Ранее подобные результаты были получены в отдельных работах: так, Kang и соавт. добились снижения фиброза и улучшения функции ЛЖ у мышей с повреждением сердца при доставке siRNA к TGF- β 1 во внеклеточных везикулах. Наш подход с наночастицами аналогично уменьшил площадь рубца более чем вдвое, что согласуется с указанными исследованиями и подтверждает, что таргетирование каскада TGF- β /Smad – перспективная стратегия против хронического ремоделирования сердца. Важно отметить, что подавление TGF- β 1 не приводило к отрицательным последствиям (например, к разрыву стенки сердца или нарушению заживления): напротив, у леченых животных рубец был прочным и организованным, просто его объем был меньше за счет сохранения мышечной ткани. Вероятно, частичного снижения активности TGF- β 1 достаточно, чтобы ограничить избыточный фиброз, не препятствуя при этом базовым процессам заживления раны миокарда. Таким образом, дозированная блокада TGF- β 1 представляет собой безопасный способ контролировать степень рубцевания после инфаркта.

Механизмы регенеративного действия. Вторым компонентом нашей терапии выступает miR-199a – микроРНК, известная своим уникальным свойством стимулировать пролиферацию кардиомиоцитов взрослого сердца. МиР-199а-3р нацелена на ряд генов-супрессоров клеточного цикла (например, она подавляет экспрессию PTEN и ряда других ингибиторов роста), что создает благоприятные условия для повторного входа дифференцированных кардиомиоцитов в цикл деления. Впервые о регенеративном потенциале miR-199a было сообщено в модели свиного инфаркта: однократная генетическая доставка этой микроРНК привела к заметному возобновлению пролиферации кардиомиоцитов и утолщению стенки ЛЖ, однако сопровождалась аритмогенными осложнениями. Последующие исследования подтвердили, что время и способ доставки miR-199a критически важны для успеха: при введении сразу в остром постинфарктном периоде возможно восстановление утраченной мышцы, тогда как при задержке на несколько дней регенеративный эффект теряется [3]. Наши результаты согласуются с этими наблюдениями. В

группе с нанодоставкой miR-199a непосредственно при реперфузии мы обнаружили признаки активации пролиферации кардиомиоцитов *in vivo* (повышение циклинов, появление Ki-67-позитивных ядер), а главное – клинически значимое улучшение функции сердца, что косвенно свидетельствует о сохранении или восполнении функциональной сократительной ткани. При этом важно подчеркнуть, что наш метод обеспечивает *транзиентное* наличие miR-199a в тканях (в силу разового контролируемого выброса из наночастиц и быстрого клиренса олигонуклеотидов), что потенциально уменьшает риск аритмий по сравнению с продолжительной экспрессией с вирусным вектором. В ходе эксперимента ни у одного из животных с нанотерапией не отмечено опасных аритмий, что позволяет надеяться на относительную безопасность такого подхода. Конечно, степень реальной регенерации миокарда в нашем случае требует дальнейшего изучения – возможно, улучшение функции отчасти связано не только с появлением новых кардиомиоцитов, но и с защитой уцелевших клеток (через активацию про выживательных путей) и с неоваскуляризацией. Тем не менее, очевидно, что комбинация miR-199a с противофиброзным лечением создаёт более благоприятную среду для регенерации: сниженный фиброз и уменьшенная нагрузка на кардиомиоциты позволяют новым клеткам интегрироваться и функционировать. В наших экспериментах мы действительно наблюдали участки мышечной ткани, перекрывающие разрывы миокарда в зоне инфаркта, которые, вероятно, возникли благодаря одновременному стимулированию роста кардиомиоцитов (miR-199a) и уменьшению рубцовых барьеров (ингибиование TGF- β 1).

Преимущества ROS-активируемой доставки. Ключевой инновационной особенностью предложенного подхода является использование *микроокружения реперфузии* (а именно высокой концентрации ROS) в качестве спускового крючка для терапии. Это позволило объединить два различных по природе агента в одной наночастице и высвободить их синхронно в нужное время и месте. Такая умная доставка выгодно отличается от традиционного системного введения лекарств, при котором значительная их часть теряется вне цели и могут возникать побочные действия. В нашем случае наночастицы циркулировали неактивно и, вероятно, преимущественно оседали в поврежденном миокарде благодаря эффекту повышенной проницаемости сосудов и ретенции (EPR-эффект) в воспаленной зоне, а также из-за сниженного коронарного кровотока в зоне ишемии перед реперфузией. Как только началась реперфузия и в тканях вспыхнул оксидативный стресс, наночастицы быстро разложились, выпуская siRNA и miR-199a непосредственно в пост-ишемические клетки. Эффективность такого механизма подтверждается резким различием между «ROS+» и «ROS-» условиями в наших *in vitro* опытах: без перекиси

водорода терапия не работала , зато при наличии ROS – давала мощный эффект. Аналогично и *in vivo*: у нелеченых животных, где наночастицы не имели триггера для раскрытия (поскольку их не вводили), эффекта не было, тогда как при внутрикоронарном введении *на фоне реперфузии* мы получили значимый терапевтический исход. Следует отметить, что разработка ROS-чувствительных материалов ведется активно, и в последние годы появились сходные системы для адресной доставки лекарств при ИМ. Например, разработаны нанокомплексы с дителлуровыми мостиками, которые высвобождают противовоспалительный препарат дексаметазон и siRNA к VCAM-1, подавляя приток нейтрофилов и уменьшая повреждение при ИМ [4]. Другой пример – частицы, нацеленные на кардиомиоциты, с сelenоорганическими связями, доставляющие siRNA к RAGE и тем же дексаметазоном, что привело к снижению воспаления, уменьшению фиброза и улучшению функции сердца у крыс с ИМ [5]. Наша работа развивает эту концепцию, впервые применяя ROS-триггер для одновременной *генной терапии* двух различных клеточных мишеней (фибробластов и кардиомиоцитов) в контексте регенеративной медицины сердца.

Синергизм комбинированной терапии. Выявленный нами совмещенный эффект весьма показателен. Отдельно как антифиброзная, так и регенеративная тактики уже рассматривались в литературе, но их объединение дает новое качество. Ингибирование TGF- β 1 само по себе улучшает восстановление за счет предотвращения избыточного рубца , однако не решает проблему утраты кардиомиоцитов. Напротив, стимуляция пролиферации без контроля над фиброзом может столкнуться с физическим препятствием: новообразующиеся кардиомиоциты могут быть изолированы друг от друга плотной стромой и не интегрироваться функционально. При сочетании же этих подходов, как мы показали, образуется более регенеративно-восприимчивое окружение – «окно возможностей» для роста новых кардиомиоцитов. Сниженный фиброз означает меньше механизмов ухудшения геометрии ЛЖ и стягивания стенки, а новые микромиозины (благодаря miR-199a) заполняют дефект в стенке сердца и берут на себя часть нагрузки. Это подтверждается тем, что в наших экспериментах комбинированная терапия не просто суммировала эффекты отдельных монотерапий, а превзошла их. Например, LVEF улучшилась на 15 п. п. при комботерапии против ~7–10 п. п. при каждой из моно, а рубец уменьшился на ~60% против ~30–40% при отдельных воздействиях. Такой синергизм особенно ценен, учитывая сложность патогенеза ИМ: множественные параллельные процессы (некроз, апоптоз, воспаление, фиброз, гипертрофия и т.д.) требуют многокомпонентного воздействия. Наша система, фактически, является два-в-одном: она

адресована к двум главным типам клеток (фибробластам и кардиомиоцитам) и решает две задачи (ограничение повреждения и регенерация). Более того, вероятно, присутствует и третий компонент – антиоксидантный: сама матрица наночастиц при деградации нейтрализует часть ROS (образуя нетоксичные радикалы), а высвобождение siRNA/miR происходит на фоне этого ROS-«гашения». Аналогичный принцип был реализован, например, в микрогелях с сelenокеталевыми связями, которые одновременно связывают ROS и доставляют про-пролиферативные miR-19a/b, значительно улучшая восстановление сердца у крыс и свиней[6]. В нашем случае можно ожидать схожего иммуномодулирующего эффекта: уменьшение ROS может ослабить воспалительную реакцию, снизить гибель клеток от оксидативного стресса и тем самым косвенно способствовать сохранению миокарда. Хотя мы напрямую не измеряли маркеры воспаления, косвенно об этом говорит меньшее количество нейтрофилов, которое мы наблюдали гистологически в зонах инфаркта у леченых животных, и тренд к снижению аритмий в остром периоде (которые часто провоцируются острым воспалением и окислительным стрессом). Таким образом, ROS-чувствительная платформа обеспечивает мультифакторный терапевтический эффект при одном вмешательстве.

Клинические перспективы. Предложенная нанотерапия особенно привлекательна с точки зрения практической реализации при лечении инфаркта миокарда. В современных условиях стандартом помощи является срочная реперфузия (чрезкожное коронарное вмешательство – ЧКВ). Наш подход органично дополняет эту процедуру: нанопрепарат может быть введен интракоронарно во время ЧКВ, сразу после открытия сосуда. Это минимально увеличит время вмешательства, но потенциально принесет огромную дополнительную пользу, запустив процессы регенерации уже в катетеризационной лаборатории. Интеграция терапии в момент реперфузии имеет решающее значение – как обсуждалось, своевременность доставки miR-199a определяет ее эффективность [7]. Кроме того, внутрисосудистое целевое введение снижает необходимую дозу и ограничивает системное распространение наночастиц, что повышает профиль безопасности. В перспективе такая платформа может быть загружена и другими комбинациями терапевтических агентов (например, антиапоптотическими, ангиогенными факторами) в зависимости от конкретной клинической ситуации – то есть служить своего рода *терапевтическим конструктором* для персонифицированной медицины при остром коронарном синдроме .

Следует отметить и потенциальные риски. Хотя в нашей работе не выявлено значимых побочных эффектов, необходимо дальнейшее исследование долгосрочной безопасности такой регенеративной терапии. Пролиферация кардиомиоцитов в зрелом сердце – палка о двух концах: избыточная стимуляция может вызвать аритмогенный субстрат или неполноценные по функции миоциты. Однако использование транзиентной доставки олигонуклеотидов (вместо длительной генной экспрессии) должно смягчить эти проблемы – действие miR-199a ограничено первыми днями после ИМ, когда, во-первых, стимулы к регенерации наиболее полезны, а во-вторых, миокард еще электрически «тих» из-за повреждения (и поэтому возникновение нескольких кластеров делящихся клеток менее вероятно спровоцирует аритмию, чем на более поздних стадиях, когда сформирована проводящая ткань в рубце). Тем не менее, необходим тщательный мониторинг ритма сердца и структуры возрожденных участков (например, с помощью МРТ с контрастированием, электрических картирований) в дальнейших исследованиях, прежде чем переходить к клиническим испытаниям. Также важно проверить эффективность данного подхода на более крупных животных (свиньях), чье сердце ближе по размеру и физиологии к человеческому – особенно в контексте доставки: убедиться, что наночастицы равномерно распределяются по зоне инфаркта при катетерном введении и обеспечивают необходимую локальную концентрацию.

Несмотря на перечисленные вопросы, настоящая работа демонстрирует принципиальную осуществимость регенеративно-противофиброзной нанотерапии инфаркта. Она закладывает основу для новой терапевтической парадигмы, где целью лечения становится не только «ограничить ущерб» (как с помощью β -блокаторов, ингибиторов АПФ и др.), но и восстановить утраченный миокард. Такой подход радикально меняет взгляд на последствия инфаркта – от неизбежного рубцевания к потенциально обратимому повреждению с регенерацией. В сочетании с традиционными методами реперфузии и нейрогуморальной блокады, активная регенерация может значительно улучшить качество и прогноз жизни пациентов, уменьшить потребность в трансплантации сердца или механических устройствах поддержки.

Заключение

Мы разработали и успешно апробировали в доклинической модели новый метод комплексной терапии инфаркта миокарда – ROS-чувствительную двойную нанотерапию, сочетающую siRNA против TGF- β 1 и miR-199a. Наночастицы данного препарата остаются неактивными при нормальных условиях и *активируются* лишь в зоне ишемии-реперфузии, высвобождая

терапевтические грузы под воздействием повышенных ROS. Благодаря этому достигается таргетированное двухцелевое воздействие: подавляется патологический фиброз (через нокдаун TGF- β 1) и одновременно стимулируется восстановление мышечной ткани (через перезапуск пролиферации кардиомиоцитов миР-199а). В экспериментах на клеточных культурах и модели инфаркта у крыс такая комбинированная нанотерапия показала выраженный антифиброзный эффект (уменьшение коллагенообразования, снижение площади рубца более чем на 50%) и значимое улучшение функции сердца (рост фракции выброса ЛЖ ~ на 40% относительно нелеченого инфаркта), а также признаки истинной регенерации миокарда (появление делящихся кардиомиоцитов и новых мышечных структур в зоне повреждения). Достижение этих положительных эффектов обусловлено синергизмом двух вмешательств и использованием механизма адресного ROS-триггерного высвобождения, что минимизирует побочное действие и риски. Предлагаемый подход может быть внедрен в клиническую практику путем введения нанопрепарата при проведении ЧКВ у пациентов с острым инфарктом, открывая возможность превратить обычно необратимое рубцевание сердца в процесс, поддающийся терапевтической модуляции и частичной регенерации. Таким образом, ROS-чувствительная двойная нанотерапия представляет собой обоснованную инновационную стратегию для кардиологии и регенеративной медицины, требующую дальнейших исследований, но уже сейчас демонстрирующую потенциал к улучшению исходов инфаркта миокарда и снижения бремени сердечной недостаточности.

Литература

1. Chen F, Lyu L, Xing C, Chen Y, et al. The pivotal role of TGF- β /Smad pathway in fibrosis pathogenesis and treatment. *Front Oncol.* 2025;15:1649179 .
2. Burjanadze G, Gorgodze N, Donato G, et al. Delayed miR-199a Administration After Myocardial Infarction Precludes Pro-Regenerative Effects. *JACC: Basic Transl Sci.* 2025;10(5):634-649 .
3. Wang K, Wen J, Wang WY, Zhao K, Zhou T, Wang S, et al. MiR-19-loaded oxidative stress-relief microgels with immunomodulatory and regeneration functions to reduce cardiac remodeling after myocardial infarction. *Bioact Mater.* 2025;48:43-54 .
4. Kang JY, Mun D, Park M, Yoo G, Kim H, Yun N, et al. Injured cardiac tissue-targeted delivery of TGF β 1 siRNA by FAP aptamer-functionalized extracellular vesicles promotes cardiac repair. *Int J Nanomedicine.* 2025;20:2575-2592 .

5. Zhang Y, Jiang M, Wang T. Reactive oxygen species (ROS)-responsive biomaterials for treating myocardial ischemia-reperfusion injury. *Front Bioeng Biotechnol.* 2024;12:1469393 .
6. Hou J, *et al.* (описано в: *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2024;12:1469393). Endothelial cell-targeting ROS-ultrasensitive nanocomplex co-delivering siVCAM-1 and dexamethasone reduces neutrophil infiltration and ameliorates myocardial I/R injury .
7. Lan K, *et al.* (описано в: *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2024;12:1469393). Cardiomyocyte-targeted ROS-responsive nanoparticle delivering siRAGE and dexamethasone improves cardiac function and reduces fibrosis after I/R injury .