

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

DOI: ??-????-????/????-????-????

ЭФФЕКТИВНОСТЬ СОЧЕТАННОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПЛАЗМИДНЫХ КОНСТРУКЦИЙ, СОДЕРЖАЩИХ ГЕНЫ HGF И АНГИОПОЭТИН-1, ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ КРОВОТОКА В ИШЕМИЗИРОВАННЫХ ТКАНЯХК.А. Рубина¹, Е.В. Семина^{1,2}, Д.Т. Дыйканов¹, М.А. Болдырева²,
П.И. Макаревич^{2,3}, Ж.А. Акопян^{1,3}, Е.В. Парфенова^{1,2}, В.А. Ткачук¹⁻³

e-mail: e-semina@yandex.ru

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия² Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии, Москва, Россия³ Институт регенеративной медицины медицинского научно-образовательного центра Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия**Efficacy of combined use of plasmid constructs containing HGF and angiopoietin-1 genes to restore blood flow in ischemic tissues**К.А. Rubina¹, E.V. Semina^{1,2}, D.T. Diykanov¹, M.A. Boldyreva², P.I. Makarevich^{2,3}, Y.V. Parfyonova^{1,2},
Zh.A. Akopyan^{1,3}, V.A. Tkachuk¹⁻³¹ M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia² Russian Cardiology Research and Production Complex, Moscow, Russia³ Institute of Regenerative Medicine, Medical Research and Education Centre, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

В мире активно ведутся исследования, направленные на разработку методов и подходов для лечения ишемических заболеваний, в основе которых лежит стимуляция роста и ремоделирования кровеносных сосудов. Эта стратегия была названа терапевтическим ангиогенезом.

Цель настоящей работы — на моделях *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* оценить специфическую биологическую активность и ангиогенный потенциал исследуемого вещества Васкопозтина, содержащего плазмиды для экспрессии HGF и ангиопоэтина-1.

В модельных экспериментах *in vitro* и *ex vivo* было показано, что Васкопозтин оказывает стимулирующее действие на миграцию, пролиферацию и формирование капилляроподобных структур сосудистыми клетками. *In vivo* на модели ишемии задней конечности у мышей введение Васкопозтина обеспечивало стабильный синтез белков HGF и ангиопоэтина-1, что приводило к активации ангиогенеза и стабилизации вновь сформированных сосудов в ишемизированной мышце. Кроме того, при введении Васкопозтина было обнаружено восстановление кровотока в ишемизированной конечности, уменьшение размеров некроза и снижение частоты ампутаций.

На основании полученных данных можно сделать вывод о наличии у Васкопозтина ангиогенной активности, что позволяет рассматривать его как перспективное средство для терапевтического ангиогенеза.

Ключевые слова: фактор роста гепатоцитов, ангиопоэтин-1, Васкопозтин, генная терапия, ангиогенез, лечение ишемии.

Введение

Заболевания, вызываемые ишемией миокарда, головного мозга и нижних конечностей относятся к наиболее значимым причинам инвалидизации и смертности населения России. Существующие хирургические методы лечения применимы не для всех больных, а консервативные методы неэффективны у тяжело больных. В этой связи, помимо медикаментозной терапии, методов эндоваскулярной и хирургической реваскуляризации активно ведутся разработки инновационных технологий для решения данной проблемы. В их основе лежит понимание фундаментальных механизмов индукции роста новых кровеносных сосудов и их стабилизации для обеспечения восстановления кровоснабжения в ишемизированных тканях. Терапевтический ангиогенез представляет собой одну из стратегий в лечении ишемических заболеваний,

New methods to stimulate blood supply of the ischemic organs and tissues are being intensively developed worldwide. These approaches are based on revascularization and remodeling of the newly formed blood vessels. This strategy was called therapeutic angiogenesis.

Using *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* models we investigated the specific biological activity and angiogenic potential of Vascopeptin, which contained the plasmids for HGF and angiopoietin-1 expression. Vascopeptin stimulated vascular cell migration, proliferation and the formation of capillary-like structures *in vitro* and *ex vivo*. Using *in vivo* model of posterior limb ischemia in mice we demonstrated that Vascopeptin administration mediated stable HGF and angiopoietin-1 production resulting in new blood vessel formation and their stabilization in the ischemic muscles. In addition, Vascopeptin injection led to the restoration of the blood flow, decrease in the size of necrosis in ischemic limb and the reduction in the amputation frequency.

The current data suggest Vascopeptin a promising drug for therapeutic angiogenesis.

Keywords: hepatocyte growth factor, angiopoietin-1, Vascopeptin, gene therapy, angiogenesis, ischemia treatment.

которая направлена на стимуляцию роста и ремоделирования кровеносных сосудов. Формирование новых функциональных сосудов достигается с помощью введения рекомбинантных ангиогенных факторов, их генов или прогениторных клеток, способных продуцировать ангиогенные факторы и факторы роста или дифференцироваться в клетки сосудов [1].

Среди наиболее изученных индукторов ангиогенеза — фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), основной фактор роста фибробластов (bFGF), фактор роста гепатоцитов (HGF) [2, 3]. Созревание сосудов и их стабилизация происходят за счёт взаимодействия эндотелиальных клеток растущего сосуда с перницидами или гладкомышечными клетками и за счёт продукции муральных клетками ангиопоэтина-1 (Ang-1), фактора роста тромбоцитов (PDGF-β) и трансформирующего фактора роста (TGF-β) [2, 3].

Было показано, что введение рекомбинантных белковых факторов в зону ишемии стимулирует процессы регенерации [1], однако, использование генетических конструкций оказывается более эффективно, поскольку обеспечивает продолжительную экспрессию трансгена в ткани-мишени [2, 4, 5].

Действующим началом исследуемого вещества, прошедшего доклинические токсикологические исследования (зарегистрированный товарный знак Васкопозтин, номер регистрации 2014743133) является смесь плазмид, несущих гены фактора роста гепатоцитов HGF и Ang-1. HGF — это гликопротеин, исходно идентифицированный как митоген для гепатоцитов, участвующий в регенерации печени. Известно, что HGF стимулирует пролиферацию и миграцию не только эпителиальных клеток (эпидермис, почки, легкие), но и клеток эндотелия. Кроме этого, HGF является антиапоптотическим фактором [6]. В органах и тканях HGF секретируется мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками (ММСК), клетками эндотелия и рядом клеток иммунной системы. Он действует как мультифункциональный цитокин, облегчая миграцию и стимулируя пролиферацию, что делает его одним из центральных факторов роста, регулирующих процессы ангиогенеза, роста нервов и регенерации тканей [7]. Эффекты HGF реализуются через его взаимодействие с рецептором с-Met, который синтезируется многими типами клеток и представляет собой тирозинкиназный рецептор, обеспечивающий активацию целого ряда сигнальных каскадов в клетке-мишени [8, 9]. Результаты клинических исследований эффективности и безопасности (I фаза) плазмид с геном HGF для терапии ишемии конечностей проводились R. Morishita и соавт. (2004), и полученные данные легли в основу II–III фаз клинических исследований [6]. Другой фактор — Ang-1 продуцируется перicyтами и гладкомышечными клетками, и также оказывает стимулирующее действие на ангиогенез, но механизм его действия заключается в стабилизации вновь образованных сосудов. Кроме того, Ang-1 уменьшает проницаемость сосудов и обладает противовоспалительной активностью. По данным литературы, присутствие ангиогенных факторов роста в течение двух недель оказывается достаточно для активации ангиогенеза и стабилизации вновь сформированных сосудов в ишемизированной мышце [9].

Целью настоящего исследования было проведение углубленного изучения специфической активности и ангиогенного потенциала Васкопозтина, содержащего плазмиды для экспрессии HGF и Ang-1, на моделях *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*.

Материал и методы

Получение исследуемого вещества

Исследуемое вещество (далее Васкопозтин) представляет собой смесь в равных весовых пропорциях двух плазмидных ДНК рН-CMV1, содержащих гены HGF (рН-CMV1-HGF) и Ang-1 (рН-CMV1-Ang-1), с суммарной концентрацией 1 мг/мл в стерильном изотоническом растворе хлорида натрия. Нарботка и очистка плазмид осуществлялась в стерильных условиях с помощью набора «EndoFree Plasmid Giga Kit» (Qiagen).

Дизайн исследования

Работы по изучению биологической активности и ангиогенного потенциала Васкопозтина проводили на трёх уровнях: *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*. В экспериментах *in vitro* была проведена оценка продукции белков HGF и Ang-1 в кондиционированной среде, полученной после культивирования клеток HEK293, трансфицированных

Васкопозтином, влияние этой среды на пролиферацию эндотелиальных клеток пуповины человека (HUVEC), миграцию клеток HUVEC и ММСК человека, а также на формирование клетками HUVEC капиллярноподобных структур. В экспериментах *ex vivo* была проведена оценка влияния кондиционированной среды, полученной после культивирования клеток HEK293, трансфицированных Васкопозтином, на миграцию сосудистых клеток из экпланта аорты мыши. В экспериментах *in vivo* была проанализирована длительность экспрессии белков HGF и Ang-1 в мышце у мышей после введения Васкопозтина, а также динамика восстановления кровотока в ишемизированной конечности с использованием методов доплерографии и гистологического анализа. Оценивали частоту ампутаций и размер некроза.

Экспериментальные животные

В экспериментах использовали мышей-самцов линии C57/B6 (n=75) и линии BALB/c (n=12) в возрасте 8–10 недель (питомник ФИБХ, Пущино, Россия). Манипуляции с животными были одобрены этическим комитетом в соответствии с внутренними требованиями Института экспериментальной кардиологии ФГБУ «НМИЦК» Минздрава РФ (Номер протокола 385.06.2009 от 06.2009 г.). Перед операцией мышей наркотизировали интраперитонеальной инъекцией авертина (300 мкл 2,5% раствора). Эвтаназию мышей осуществляли дислокацией шейных позвонков предварительно наркотизированных мышей.

Определение концентрации HGF и Ang-1 в кондиционированной среде от трансфицированных клеток HEK293 методом иммуноферментного анализа

Клетки HEK293 (клеточная линия, полученная из эмбриональных почек человека, ATCC® CRL-1573™, США) культивировали при стандартных условиях в среде DMEM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС, реактивы фирмы HyClone, США). Затем клетки трансфицировали Васкопозтином или контрольной плазмидой рН-CMV1 с помощью реагента Lipofectamine2000™ (Invitrogen, США). Через 48–72 ч. после трансфекции в кондиционированных средах определяли концентрацию HGF и Ang-1 методом ИФА с использованием соответствующих коммерческих наборов серии Quantikine (R&D Systems, США) в соответствии с рекомендациями производителя; при необходимости образцы среды разводили для соблюдения диапазона линейности, предусмотренного набором для иммуноферментного анализа (ИФА).

Культивирование ММСК и эндотелиальных клеток пуповины человека

ММСК, выделенные из подкожной жировой клетчатки человека и эндотелиальные клетки пуповины человека (HUVEC) были получены из национального банка-депозитария живых систем, созданного в рамках научной программы «Научные основы создания национального банка-депозитария живых систем» (соглашение РНФ №14-50-00029). ММСК культивировали в чашках Петри в среде, поддерживающей рост недифференцированных ММСК AdvanceSTEM с добавлением 10% Advance Stem Cell Growth Supplement (Thermo Scientific, США), эндотелиальные клетки HUVEC культивировали в чашках Петри, покрытых желатином, в среде EGM-2 с 10% ФБС (Lonza, Швейцария).

Оценка пролиферации клеток HUVEC

Для оценки пролиферации клеток HUVEC использовался МТТ-тест в соответствии со стандартным протоколом. На 2 пассаже клетки HUVEC высаживали в пять 96-луночных планшетов (в количестве 8×10^3 клеток

на лунку) и культивировали в течение 24 ч. до формирования клетками 50% монослоя. Планшет №1 использовали для построения калибровочного графика. Через 24 ч. среду культивирования EGM-2 с 10% ФБС заменяли на другие среды: в планшете №2 (отрицательный контроль) на среду EGM-2 с 5,5% ФБС; в планшете №3 на кондиционированную среду от трансфицированных клеток HEK293 контрольной плазмидой pH-CMV1; в планшете №4 на кондиционированную среду от трансфицированных клеток HEK293 Васкопозитином (конечная концентрация HGF при этом составляла 50 нг/мл); в планшете №5 на среду EGM-2 с 10% ФБС (положительный контроль). Проллиферацию оценивали по изменению оптической плотности раствора, коррелирующей с количеством клеток, с помощью калибровочного графика; среднее время удвоения популяции T_d рассчитывали по формуле $T_d = (\log 22) * t / [\log 2(Nt/NO)]$, где t — время прироста популяции, Nt — количество клеток через время t , NO — исходное количество клеток [10].

Оценка миграции клеток HUVEC и MMCK

Перед началом эксперимента MMCK и HUVEC депривировали в бессывороточной среде в течение 18 ч. В день эксперимента в камеры 24-луночной системы Transwell® вносили раствор коллагена I типа (ИМТЕК, Россия) в концентрации 100 мкг/мл (в верхние камеры — по 200 мкл, в нижние — по 700 мкл) и инкубировали при +37 °C 60 мин. Депривированные клетки снимали с чашек Петри раствором Версена и осаждали центрифугированием при 200 g в течение 10 мин. Полученный осадок ресуспендировали в бессывороточной среде DMEM, содержащей 0,25% БСА. Концентрацию клеток доводили до 6×10^5 /мл. В верхние камеры Трансвелл® вносили по 200 мкл клеточной суспензии, в нижние — 700 мкл среды для культивирования клеток MMCK или HUVEC, в которую добавляли разные варианты сред: кондиционированную среду от клеток HEK293, трансфицированных Васкопозитином; кондиционированную среду от клеток HEK293, трансфицированных контрольной плазмидой pH-CMV1; среду DMEM с 10% ФБС (положительный контроль). Образцы (20 лунок для каждой точки) помещали в CO₂-инкубатор на 17 ч. Мигрировавшие клетки окрашивали красителем Diff-Quick согласно инструкции производителя. Миграцию клеток анализировали с помощью световой микроскопии Axiovert 200M (Zeiss, Германия) в 6 случайно выбранных полях зрения для каждого образца.

Оценка формирования клетками HUVEC капилляроподобных структур на Матригеле

В качестве модели ангиогенеза *in vitro* использовали стандартную методику формирования трубочек на Матригеле, известную как «tube assay». На покрытый Матригелем 48-луночный планшет высаживали суспензию клеток HUVEC 2 пассажа, ресуспендированных в разных средах, в конечной концентрации 2×10^5 кл./мл: в кондиционированной среде от клеток HEK293, трансфицированных контрольной плазмидой pH-CMV1; в кондиционированной среде от клеток HEK293, трансфицированных Васкопозитином (конечная концентрация HGF 50 нг/мл); в среде EGM-2, содержащей 5% ФБС. На каждую экспериментальную точку анализировали 12 лунок; эксперимент повторяли 3 раза с использованием трёх культур клеток HUVEC, полученных от разных доноров. Фотографирование образовавшихся капилляроподобных структур в 6 случайно выбранных полях зрения в каждой лунке осуществляли через 3 и 6 ч. после нанесения клеток на Матригель.

Оценка миграции сосудистых клеток из экплантов аорты мыши в Матригеле *ex vivo*

Выделение брюшной аорты мышей линии C57/Black проводили по методу, описанному ранее [11]. Выделенную брюшную аорту мыши помещали в лунки 8 луночных планшетов (Nunc™ Lab-Tek™ Chambered Coverglass, Thermo Scientific, США) и наносили 60 мкл Матригеля, в который предварительно в зависимости от условий эксперимента добавляли одну из субстанций: кондиционированную среду от клеток HEK293, трансфицированных Васкопозитином, или контрольной плазмидой pH-CMV1, или рекомбинантный VEGF (20 нг/мл, положительный контроль). После полимеризации Матригеля в лунки вносили среду EGM-2 с 10% ФБС. Миграцию сосудистых клеток из экпланта оценивали на 7 и 14 сут. с использованием световой темнопольной микроскопии при увеличении в 50 раз. На каждую экспериментальную точку брали 3 образца аорты от трёх мышей; эксперимент повторяли три раза.

Определение концентрации факторов HGF и Ang-1 в эксплантах скелетных мышц методом ИФА

Здоровым животным в *m. tibialis anterior* вводили 100 мкг Васкопозитина в 100 мкл 0,9% NaCl (n=15). В группе отрицательного контроля в *m. tibialis anterior* вводили контрольную плазмиду pH-CMV1 в количестве 100 мкг в 100 мкл 0,9% NaCl (n=15). Для повышения эффективности трансфекции использовали метод низковольтовой электропорации по ранее отработанному протоколу [12]. Образцы мышц *m. tibialis anterior* выделяли на 3 и 14 и 21 сут. после введения плазмид. После эвтаназии животного мышцу выделяли и отмывали в буфере Хэнкса, далее образец помещали в ступку, предварительно охлажденную в жидком азоте, дальнейшее выделение белка и очистку гомогената проводили по ранее разработанному методу [12]. Полученный белковый экстракт использовали для количественного определения концентрации HGF и Ang-1 методом ИФА с помощью наборов серии Quantikine (R&D Systems, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Полученные данные по содержанию HGF и Ang-1 нормировали на концентрацию общего белка в гомогенате, измеренную методом Брэдфорда.

Оценка восстановления кровотока на модели ишемии задней конечности *in vivo* методом лазерной доплерографии

В работе использовали модель ишемии задней конечности у мышей линии C57, описанную ранее [13]. Сразу после индукции ишемии животным вводили 100 мкг Васкопозитина в 100 мкл 0,9% NaCl в *m. tibialis anterior* (группа Васкопозитин, n=25). В группе отрицательного контроля мышам (контрольная группа, n=25) вводили 100 мкг контрольной плазмиды pH-CMV1 в 100 мкл 0,9% NaCl. Для повышения эффективности трансфекции использовали метод низковольтовой электропорации по ранее отработанному протоколу [12].

Для оценки восстановления подкожного кровотока на подошвенной поверхности задних лап применяли лазерный доплеровский сканер (Laser Doppler Imaging System, Moor, Англия) по методу, описанному ранее [14].

Иммунофлуоресцентная визуализация сосудов на препаратах скелетных мышц

Из образцов мышц *m. tibialis anterior* 5 животных из каждой группы, делали криосрезы толщиной 7 мкм, фиксировали в ацетоне 15 мин., и для визуализации CD31 и α -гладкомышечного актина (α -ГМА) использовали иммунофлуоресцентный метод, описанный ранее [14].

Для каждого среза получали серию изображений с 4 случайных полей зрения, на которых проводили подсчёт количества CD31⁺ и α -ГМА⁺ структур с последующей статистической обработкой данных.

Гистологическая оценка размера некроза ткани

Криосрезы мышц, полученные от 5 животных из каждой группы, фиксировали в течение 15 мин. в 4% растворе формальдегида, промывали и затем окрашивали гематоксилином и эозином стандартным способом. Окрашенные срезы заключали в среду Cytoseal-60 (Richard-Allen Scientific, США). Анализ образцов осуществляли при помощи инвертированного микроскопа Axiovert 200M с цифровой видеокамерой AxioCam HRC и программой Axiovision 3.1 (Zeiss, Германия). С каждого среза получали изображения в 4 случайных полях зрения. С помощью программы MetaMorph 7.1.0.0 (Universal Imaging Corporation, США) для каждого изображения оценивали площадь некроза, которую нормировали на площадь поля зрения. Признаками некроза считали нарушение нормальной морфологии волокон, кариолизис, инфильтрацию клетками воспаления или замещение мышц рубцовой тканью.

Оценка частоты некрозов

Для оценки частоты некрозов и ампутаций ишемизированной конечности нами были проведены предварительные эксперименты для выбора линии мышей, наиболее пригодных для этих экспериментов. Было обнаружено, что у мышей линии C57/Black, несмотря на развитие некрозов мышц, достаточно хорошо развита система коллатеральных сосудов, и практически не наблюдаются высокие ампутации конечностей. Поэтому использование таких мышей в данных экспериментах было нецелесообразно. Нами были использованы мышамцы линии BALB-c (n=12) основным отличием которых от мышей C57/Black является незначительное развитие коллатерального кровотока и крайне тяжелая степень ишемии, возникающая после использованной операции. При проведении операции *a. femoralis* лигировали и пересекали на границе средней и нижней трети бедра с сохранением *n. ischiadicus*. После этого животным в *m. biceps femoris* однократно вводили 100 мкл раствора 0,9% NaCl, содержащего 100 мкг Васкопозтина (группа Васкопозтин, n=6) или 100 мкг контрольной плазмиды pH-CMV1 (контрольная группа, n=6). На 7 сут. проводили оценку протяженности некроза конечности (в сантиметрах) и оценивали общее состояние конечности. Встречаемость патологических изменений приводили в виде частоты/процентов.

Статистическая обработка данных

Данные представлены в виде значений среднего \pm стандартное отклонение (СО). Нормальность распределений проверялась с помощью критериев Шапиро-Уилка и Колмогорова-Смирнова. Статистическая оценка различий показателей перфузии проводилась по U-критерию Манна-Уитни. Сравнение количества капилляров проводили с помощью t-критерия Стьюдента, плотности ГМА-положительных структур — с помощью U-критерия Манна-Уитни. Для статистической оценки различий частоты встречаемости некрозов использовали критерий χ^2 . Значимыми принимались отличия при $p < 0,05$.

Результаты

Содержание факторов HGF и Ang-1 в среде клеток HEK293, трансфицированных Васкопозтином

Содержание факторов в кондиционированной среде от клеток HEK293 после трансфекции контрольной плазмидой pH-CMV1 было ниже порогового уровня определения, а при трансфекции Васкопозтином концентрации HGF и Ang-1 в среде возрастали: до 0,207 мкг/мл для HGF и 0,9 мкг/мл для Ang-1. Эти данные свидетельствуют о том, что плазмиды pH-CMV1-HGF и pH-CMV1-Ang-1, входящие в состав Васкопозтина, функционально активны и при трансфекции клеток человека *in vitro* обеспечивают эффективную продукцию соответствующих факторов роста. Во всех последующих экспериментах использовали кондиционированную среду от клеток HEK293 после трансфекции Васкопозтином или контрольной плазмидой pH-CMV1.

Влияние кондиционированной среды клеток HEK293, трансфицированных Васкопозтином, на пролиферацию клеток HUVEC

Наиболее распространенной моделью для изучения ангиогенной активности тестируемых препаратов *in vitro* является анализ их влияния на пролиферацию эндотелиальных клеток. Было обнаружено, что кондиционированная среда от клеток HEK293, после трансфекции их Васкопозтином, в 1,5 раза уменьшает время удвоения популяции HUVEC, даже по сравнению с положительным контролем. В группе отрицательного контроля пролиферация клеток HUVEC в течение 24 ч. отсутствовала, что может объясняться либо низким содержанием факторов роста, регулирующих пролиферацию клеток, либо тем, что выбранный интервал (24 ч.) недостаточен для **увеличения** клеток HUVEC при таком сниженном содержании сыворотки (табл. 1).

Таблица 1. Оценка пролиферации клеток HUVEC с помощью МТТ-теста

Состав среды	Время удвоения, ч.
Среда EGM-2 с 5,5% ФБС (отрицательный контроль)	0
Среда EGM-2 с 10% ФБС (положительный контроль)	71 \pm 11
Кондиционированная среда от клеток HEK293, трансфицированных контрольной плазмидой pH-CMV1	77 \pm 6
Кондиционированная среда от клеток HEK293, трансфицированных Васкопозтином	50 \pm 14

Влияние кондиционированной среды от клеток HEK293, трансфицированных Васкопозтином, на миграцию клеток HUVEC и ММСК

На рис. 1 представлены результаты миграции клеток ММСК на вставку Трансвелл, полученные при изучении влияния кондиционированной среды от клеток HEK293, трансфицированных Васкопозтином или

контрольной плазмидой pH-CMV1 (контрольная среда). Анализ данных о миграции клеток свидетельствует о том, что кондиционированная среда, содержащая высокие концентрации ангиогенных факторов HGF и Ang-1 значительно стимулирует миграцию ММСК (в 10,3 раза) и HUVEC (в 5,38 раз) по сравнению с контрольной средой. Однако наибольший эффект стимуляции направленной

миграции клеток был обнаружен в группе положительного контроля — среда DMEM с 10% ФБС (табл. 2). Это может объясняться тем, что использованная в положительном контроле сыворотка животного происхождения

содержит стероидные гормоны, жирорастворимые витамины, липопротеиды, а также целый спектр биологически активных веществ, которые, как известно, стимулируют миграцию и пролиферацию клеток.

Таблица 2. Оценка миграции клеток ММСК и HUVEC с помощью системы Transwell®

Состав среды	Число мигрировавших ММСК	Число мигрировавших HUVEC
Кондиционированная среда от клеток HEK293, трансфицированных контрольной плазмидой рН-CMV1	6,8±2,2	9,75±4
Кондиционированная среда от клеток HEK293, трансфицированных Васкопоэтином	70,65±11,6*	52,45±14,2*
Среда DMEM с 10% ФБС (положительный контроль)	98,9±22,3*	124,3±38,6*

Примечание: *р < 0,005, данные сравнивали с группой контрольная плазмида рН-CMV1.

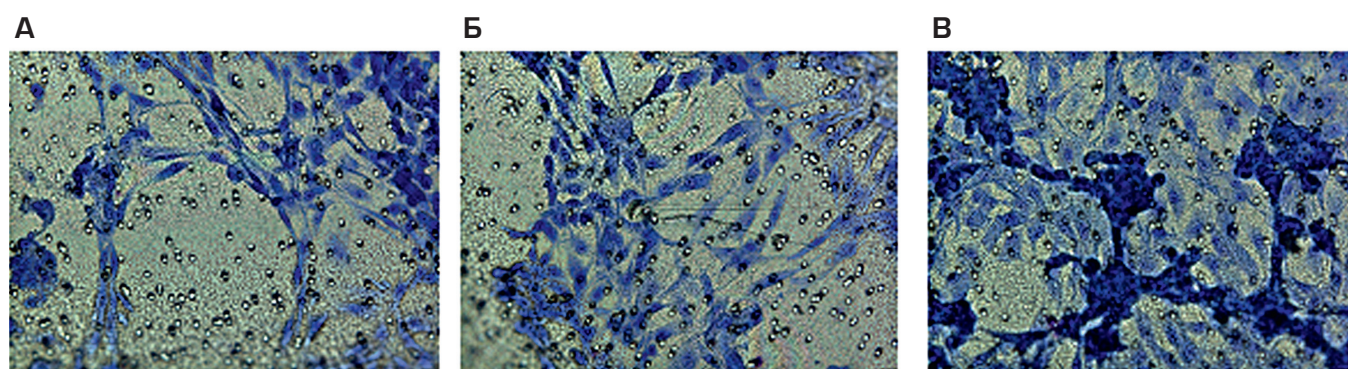


Рис. 1. ММСК в условиях стимуляции миграции ангиогенными факторами HGF и Ang-1. Миграция клеток по градиенту концентрации HGF и Ang-1, содержащихся в кондиционированной среде клеток HEK293, трансфицированных контрольной плазмидой рН-CMV1 (А) или Васкопоэтином (Б). В — среда DMEM с 10% ФБС.

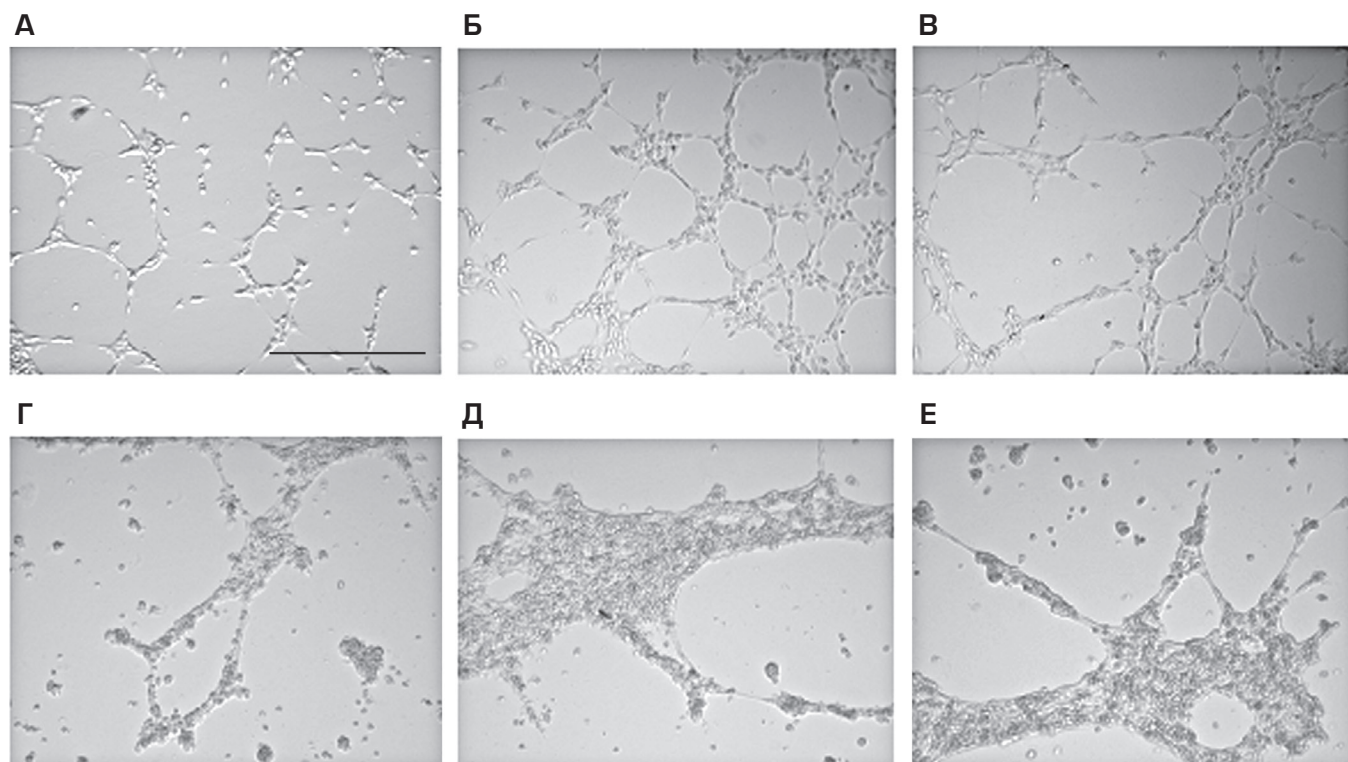


Рис. 2. Капилляроподобные структуры, формирующиеся клетками HUVEC под действием ангиогенных факторов HGF и Ang-1. Результаты через 3 (А-В, верхняя панель) и 6 ч. после начала эксперимента (Г-Е, нижняя панель) в присутствии факторов HGF и Ang-1, содержащихся в кондиционированной среде от клеток HEK293, трансфицированных контрольной плазмидой рН-CMV1 (А и Г) и Васкопоэтином (Б и Д); среда EGM-2 с 5% ФБС (В и Е).

Влияние кондиционированной среды клеток НЕК293, трансфицированных Васкопозтином, на формирование капиллярноподобных структур *in vitro*

Одной из распространенных моделей для изучения ангиогенной активности веществ является анализ формирования эндотелиальными клетками капиллярноподобных структур на Матригеле в присутствии тестируемых агентов. На рис. 2 представлены данные, демонстрирующие увеличение количества капиллярноподобных структур, сформированных клетками HUVEC под влиянием кондиционированной среды от клеток НЕК293, трансфицированных Васкопозтином, в зависимости от времени экспозиции: через 3 ч. после начала эксперимента (рис. 2Б), и через 6 ч. (рис. 2Д) по сравнению с контролем (кондиционированная среда от клеток НЕК293, трансфицированных контрольной плазмидой рН-CMV1, рис. 2Г).

Таким образом, ангиогенные факторы HGF и Ang-1, содержащиеся в среде клеток НЕК293, трансфицированных Васкопозтином, стимулируют формирование и стабилизацию капиллярноподобных структур эндотелиальными клетками по сравнению с контролем.

Влияние кондиционированной среды от клеток НЕК293, трансфицированных Васкопозтином, на миграцию сосудистых клеток из эксплантов аорты мыши в Матригеле *ex vivo*

Культивирование брюшной аорты мыши в трёхмерном матриксе *ex vivo* является широко используемой моделью ангиогенеза [11]. Введение в Матригель различных биологически активных веществ позволяет анализировать их влияние на процесс ангиогенеза в динамике. На рис. 3 представлены микрофотографии эксплантов аорты, сделанные с помощью темнопольной микроскопии на 7 сут. (рис. 3А-В) и 14 сут. (рис. 3 Г-Е)

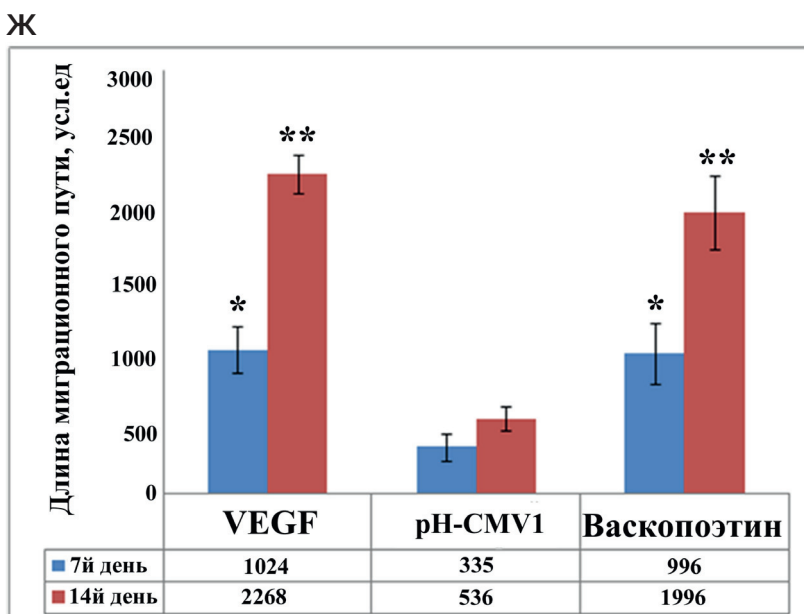
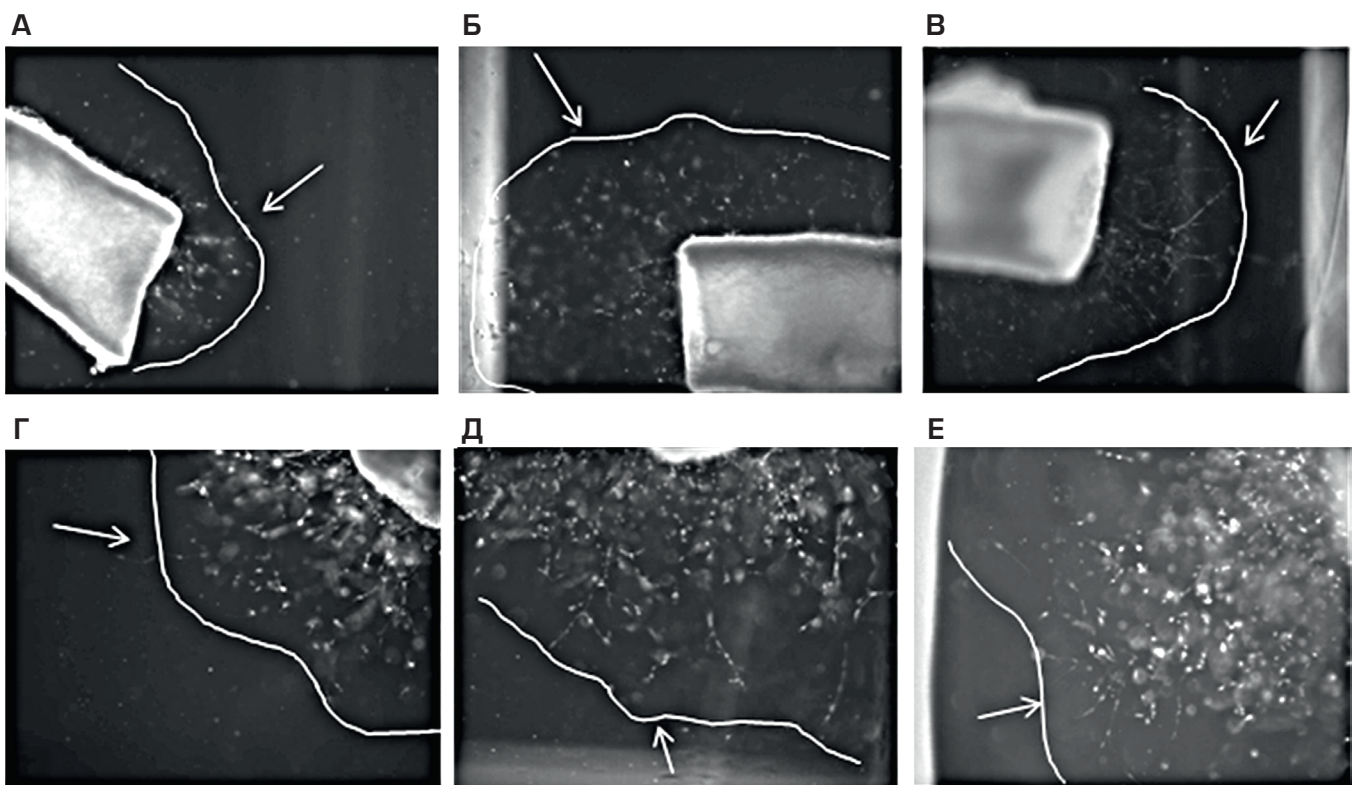


Рис. 3. Стимуляция миграции клеток сосудов из эксплантов аорты в Матригеле ангиогенными факторами HGF и Ang-1. Микрофотографии эксплантов на 7 (А-В) и 14 сут. (Г-Е). Белой линией и стрелкой обозначен фронт миграции клеток из экспланта. А, Г — добавление в Матригель кондиционированной среды от клеток НЕК293, трансфицированных контрольной плазмидой рН-CMV1; Б, Д — положительный контроль (рекомбинантный белок VEGF, 20 нг/мл); В, Е — добавление в Матригель кондиционированной среды от клеток НЕК293, трансфицированных Васкопозтином. Ж — результаты статистического анализа миграции, где представлены данные, полученные в трёх независимых экспериментах на 7 и 14 сут. после начала эксперимента (* $p < 0,05$, сравнение проводили между группами VEGF и Васкопозтин с контролем рН-CMV1 на 7 сут.; ** $p < 0,05$ сравнение проводили между группами VEGF и Васкопозтин с контролем рН-CMV1 на 14 сут.).

после начала эксперимента. На рис. 3Ж представлены результаты, полученные при подсчёте и статистическом анализе длины миграционного пути клеток из эксплантов аорты в Матригель на 7 сут. Данные свидетельствуют о статистически значимом стимулирующем миграцию эффекте Васкопозтина по сравнению с группой контроля pH-CMV1 ($p < 0,05$). Следует отметить, что Васкопозтин, как и VEGF, ангиогенные свойства которого хорошо изучены [15], значительно увеличивали скорость миграции сосудистых клеток из эксплантов аорты в Матригель и скорость миграции клеток в группе Васкопозтин была сопоставима со скоростью миграции клеток в группе VEGF, что говорит о высокой способности Васкопозтина стимулировать миграцию клеток сосудов.

Наработка факторов роста HGF и Ang-1 в скелетных мышцах

В полученных гомогенатах мышц животных, которым вводили контрольную плазмиду, содержание факторов HGF и Ang-1 оказалось ниже уровня детекции. Однако в мышцах, трансфицированных Васкопозтином, содержание белка HGF и Ang-1 детектировалось уже на 3 сут. после введения плазмид (290 пг/мкг белка и 70 пг/мкг белка, соответственно), достигало максимума на 7 сут. (375 пг/мкг белка и 410 пг/мкг белка, соответственно), и сохранялось на высоком уровне, как минимум, в течение 14 сут. (180 пг/мкг белка и 270 пг/мкг белка, соответственно).

Влияние Васкопозтина на восстановление кровотока после введения Васкопозтина в ишемизированную конечность

После проведения операции по индукции ишемии у большинства животных показатели перфузии падали до уровня 5–7% (по сравнению с неоперированной конечностью) (рис. 4А). В группе контроля (плаزمиды pH-CMV1) отмечалась чёткая тенденция к слабой перфузии тканей кровью и выходу ее на плато на уровне 40% от нормы через 15–20 сут. При введении Васкопозтина отмечалась более динамичная реперфузия конечности уже к 15 сут.: кровоток в этой точке был достоверно выше, чем в контроле, однако, максимальных значений этот эффект достигал к 20 сут. и перфузия тканей к 20 сут. превышала 60% от уровня перфузии в здоровой конечности.

Влияние Васкопозтина на формирование сосудов в ишемизированной конечности, частоту ампутаций и размер некроза

Для оценки специфической ангиогенной эффективности Васкопозтина по восстановлению кровотока мы исследовали его влияние на формирование сосудов в ишемизированной конечности мыши. При анализе окрашенных криосрезов образцов ткани мышц *m. tibialis anterior* и подсчёте капилляров и артериол оказалось, что к 15 сут. плотность капилляров (CD31⁺-структур) была достоверно выше на срезах, полученных от животных, которым вводили Васкопозтин, по сравнению с животными, которым вводили контрольную плазмиду (рис. 4Б, В и Г). Что касается плотности артериол (α -ГМА⁺-структур), была отмечена лишь тенденция ($p > 0,05$) к её увеличению в группе Васкопозтин по сравнению с контролем (рис. 4Б, В и Д).

Полученные данные подтверждают наличие специфической ангиогенной активности у Васкопозтина. Отсутствие статистической значимости в различиях по плотности α -ГМА⁺ артериол может объясняться также крайне высокой вариабельностью количества артериол, плотность которых существенно отличалась даже между разными срезами внутри одной группы животных.

При оценке площади некроза на криосрезам ишемизированных мышц было обнаружено, что площадь некроза в образцах мышц, которым вводили Васкопозтин, была в 2 раза меньше по сравнению с площадью некроза в контроле (рис. 5). Полученные нами данные свидетельствуют о тканепротективном действии Васкопозтина, которое может быть обусловлено как ангиогенными эффектами HGF и Ang-1, так и антиапоптотическим эффектом HGF. Нельзя также исключить и роль противовоспалительного действия HGF [16].

При оценке частоты ампутаций (стопа и выше) и некротизации тканей (дистальные некрозы фаланг или пальцев) некроз наблюдался практически у всех животных ввиду слабого развития коллатерального кровотока. Тем не менее, было обнаружено, что при введении контрольной плазмиды (pH-CMV1) частота ампутаций составила 66,7%, а в группе мышей, которым вводили Васкопозтин, частота ампутаций была снижена практически на 50% и составила 33,3% (табл. 3).

Таблица 3. Оценка размера и тяжести некроза после введения в ишемизированную конечность Васкопозтина

Группа	Дистальные некрозы	Средние некрозы	Высокие некрозы	Всего
Васкопозтин (n=6)	1	1	0*	2/6 (33,3%)
Контрольная плаزمиды pH-CMV1 (n=6)	0	2	2	4/6 (66,7%)

Примечание: * $p = 0,045$, 7 сут.

Обсуждение

Несмотря на то, что с момента проведения первых экспериментальных работ по терапевтическому ангиогенезу прошло более 15 лет, значительных успехов в клинике достигнуто не было [4, 17]. Единственным препаратом отечественного рынка является Неоваскулген, представляющий собой плазмидный препарат с геном VEGF, который может быть назначен в качестве одного из элементов комплексного лечения пациентов с хронической ишемией нижних конечностей [18].

В этой связи в нашей стране и во всем мире активно продолжают исследования, направленные на усовершенствование методов и повышения эффективности

генной терапии, как в плане использования различных генетических конструкций, так и способов доставки и режима введения [12, 13]. Вирусные конструкции (аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, ретровирусы, лентивирусы) с генами факторов роста активно применяются в работах по терапевтическому ангиогенезу [13, 19]. На модели ишемии задней конечности у мышей было показано, что сочетанное введение аденовирусных конструкций для экспрессии VEGF164 и PDGF-BB, эффективно восстанавливает кровоснабжение [20]. В некоторых работах были использованы генно-модифицированные клетки. Так, в нашей лаборатории ранее было установлено, что использование ММСК,

синтезирующих белок VEGF, для трансплантации цельных клеточных пластов или инъекции клеток в суспензии, вызывают выраженную реперфузию ишемизированной конечности мыши [13, 14].

Использование невирусных методов доставки генетического материала считается более актуальным: транскрипционная экспрессия генов и большое количество исследований, показавших эффективность и безопасность, делают плазмидные векторы оптимальным инструментом для генной терапии сегодня [13, 19].

В поисках более эффективных методов генной терапии ряд исследователей использовали комбинацию векторов, кодирующих несколько факторов роста. Этот подход основан на понимании того, что ангиогенез является комплексным процессом, в котором участвуют несколько типов клеток (эндотелиальные и гладкомышечные, ММСК, моноциты, клетка-предшественники); процессы дегенерации и стабилизации матрикса, пролиферация, миграция и апоптоз клеток четко

регулируются различными факторами роста и цитокинами. Координированное действие разных факторов обеспечивает формирование нового функционально зрелого сосуда, ангиогенез и ремоделирование сосудов [2]. Эффективность восстановления кровотока в тканях и увеличение плотности сосудов на экспериментальных моделях были продемонстрированы в ряде исследований при использовании следующих комбинаций генов: VEGF и HGF [21] VEGF и bFGF [22], VEGF и PDGF-BB [23], VEGF и Ang-1 [24], VEGF и SDF-1 α [25].

В настоящей работе выбор комбинации HGF и Ang-1 для создания Васкопозтина основан на понимании механизмов ангиогенного и антиапоптотического действия этих факторов. При ишемических повреждениях органов и тканей происходит массовая гибель клеток из-за отсутствия нормального кровоснабжения, в этой связи первоочередной задачей для обеспечения полноценной регенерации является защита от апоптоза, индукция формирования кровеносных сосудов

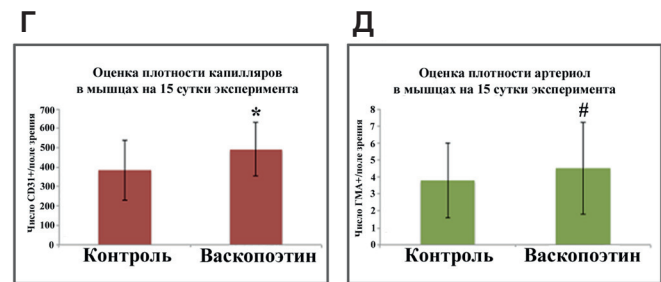
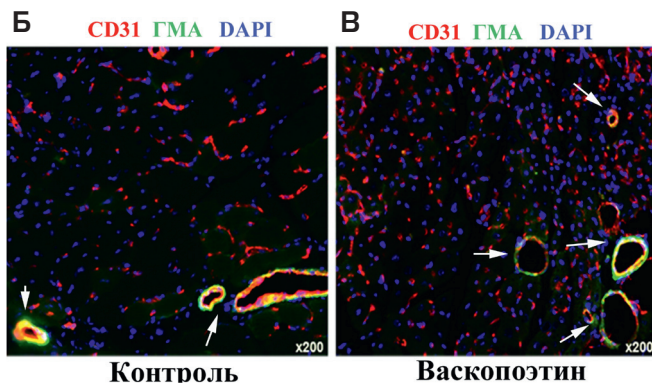
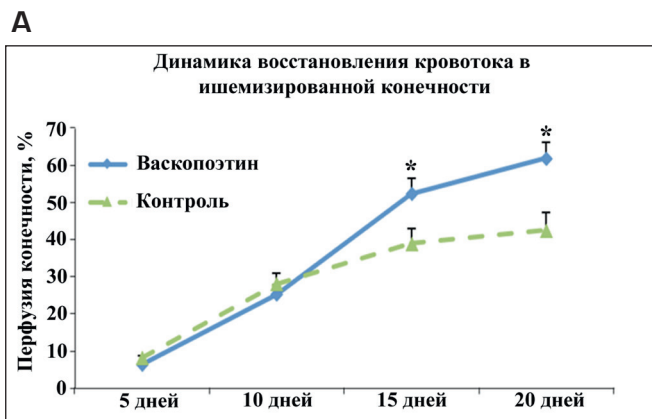


Рис. 4. Восстановление кровотока в ишемизированной конечности мыши после введения Васкопозтина. А — график восстановления кровотока в конечности, оценка по величине перфузии тканей подошвы кровью. Различия в группах Васкопозтин и контрольная плазмида (pH-CMV1) статистически значимы на 15 и 20 сут. ($n=25$ в каждой группе, $*p<0,05$). (Б-Д) — оценка влияния Васкопозтина на плотность капилляров и артериол в ишемизированной мышце конечности мыши. Б, В — окрашивание срезов мышц на маркеры капилляров (CD31) (красная флуоресценция) и артериол (ГМА+) (зеленая флуоресценция). Белыми стрелками обозначены сосуды, экспрессирующие CD31 и α -ГМА* (зеленая флуоресценция). Белыми стрелками обозначены сосуды, экспрессирующие CD31 и α -ГМА (двойное иммунофлуоресцентное окрашивание). Г, Д — результаты расчета плотности сосудов на срезах мышц, представленные как среднее количество сосудов в одном поле зрения (по 4 поля зрения для каждого образца, 5 образцов в каждой группе, $*p<0,05$, $\#p>0,05$).

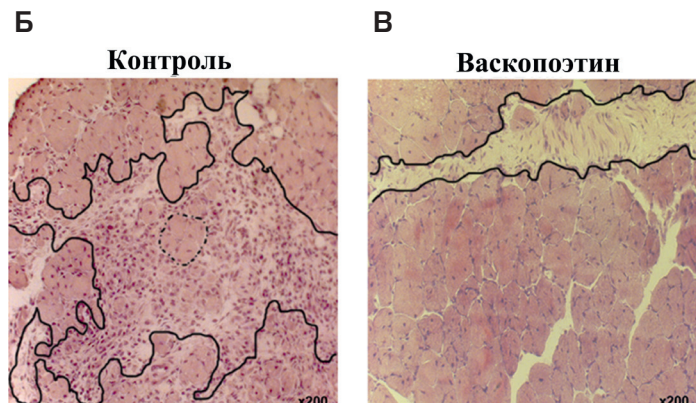
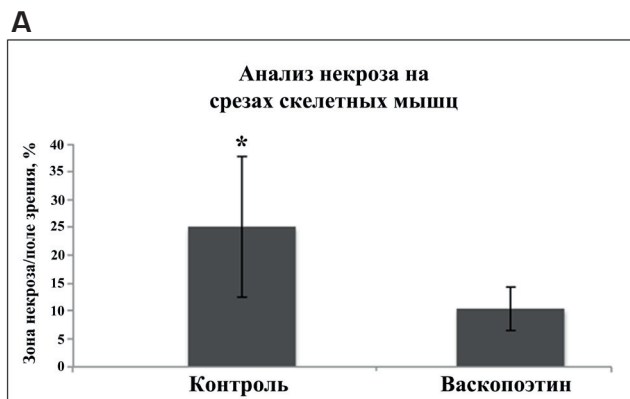


Рис. 5. Площадь некроза в ишемизированной мышце после введения Васкопозтина: А — средние значения площади некроза на срезах мышц (по 4 поля зрения для каждого образца, 5 образцов в каждой группе, $*p<0,05$), Б — ишемизированные мышцы, окраска: гематоксилин и эозин. Черной линией обведены зоны некроза.

и их стабилизация. Выбор клеток в экспериментах *in vitro* был обусловлен тем, что эндотелиальные клетки представляют собой главную клеточную мишень для ангиогенных факторов и экспрессируют рецепторы к HGF и Ang-1. Взаимодействие эндотелиальных клеток с ГМК и перicyтами необходимо для формирования стабильных, функционально зрелых сосудов [26]. Гетерогенная популяция ММСК содержит субпопуляцию перicyтов и ГМК, которые также экспрессируют на мембране рецепторы к HGF и Ang-1. При изучении биологической активности Васкопозтина было обнаружено, что присутствие факторов HGF и Ang-1 в среде культивирования активирует пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток, миграцию ММСК, увеличивает способность эндотелиальных клеток формировать капиллярноподобные структуры на Матригеле *in vitro* (рис. 2). Следует отметить, что в случае использования Васкопозтина эндотелиальные клетки не только достоверно лучше формировали капиллярноподобные структуры, но и сами структуры характеризовались большей протяжённостью и толщиной. Мы предполагаем, что присутствие HGF и Ang-1 в среде культивирования эндотелиальных клеток не только стимулирует сборку капиллярноподобных структур, но и способствует их стабилизации. Кроме того, использование комплексной трёхмерной модели эксплантной культуры аорты мыши *ex vivo* показало, что присутствие HGF и Ang-1 значительно увеличивает миграцию сосудистых клеток из экспланта и формирование капиллярноподобных структур в Матригеле (рис. 2, 3).

Стимулирующие эффекты Васкопозтина были далее подтверждены на моделях *in vivo*. Введение Васкопозтина в мышцы с последующей электропорацией приводило

к их эффективной трансфекции и продукции трансгена в высокой концентрации, о чем свидетельствуют данные по содержанию HGF и Ang-1 в гомогенатах мышц *m. tibialis anterior*. На модели ишемии задней конечности было обнаружено, что Васкопозтин вызывает васкуляризацию мышц, восстанавливает кровоток, значительно уменьшает некроз тканей и способствует сохранению конечности (рис. 4, 5).

Таким образом, в настоящем исследовании на моделях *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* продемонстрировано стимулирующее действие Васкопозтина на процессы ангиогенеза. Мы предполагаем, что в основе ангиогенных эффектов Васкопозтина лежит активация процессов миграции и пролиферации сосудистых клеток и их способности формировать капиллярноподобные структуры. Создание препарата, обладающего выраженными ангиогенными свойствами, способного не только стимулировать рост новых сосудов, но и обеспечивать их стабилизацию, защищать клетки от апоптоза в зоне повреждения и восстанавливать кровоснабжение в ишемизированных тканях, является перспективным подходом к решению проблемы улучшения кровоснабжения и восстановления функции органов и тканей после повреждения.

Благодарности

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект №14-24-00086) с использованием биоматериала, собранного и сохраняемого в рамках научной программы Научные основы создания национального банка-депозитария живых систем (соглашение РНФ №14-50-00029), и оборудования, приобретенного за счёт средств Программы развития МГУ им. М.В. Ломоносова.

ЛИТЕРАТУРА

1. Devesa L., Choi J., Yang F. Therapeutic Angiogenesis for Treating Cardiovascular Diseases. *Theranostics* 2012; 2(8): 801–14.
2. Carmeliet P., Jain K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011; 473(7347): 298–307.
3. Xu K., Cleaver O. Tubulogenesis during blood vessel formation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2011; 22(9): 993–1004.
4. Gupta R., Tongers J., Losordo D.W. Human Studies of Angiogenic Gene Therapy. *Circ. Res.* 2009; 105: 724–36.
5. Carmeliet P. VEGF gene therapy: stimulating angiogenesis or angioma-genesis. *Nat. Med.* 2000; 6: 1102–13.
6. Morishita R., Aoki M., Hashiya N. et al. Therapeutic angiogenesis using hepatocyte growth factor (HGF). *Curr. Gene Ther.* 2004; 4: 199–206.
7. Shimamura M., Nakagami H., Taniyama Y. et al. Gene therapy for peripheral arterial disease. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2014; 14(8): 1175–84.
8. Ono K., Matsumori A., Shioi T. et al. Enhanced expression of hepatocyte growth factor/c-Met by myocardial ischemia and reperfusion in a rat model. *Circulation* 1997; 95(11): 2552–8.
9. Rincon M.Y., Vanden Driessche T. et al. Gene therapy for cardiovascular disease: advances in vector development, targeting, and delivery for clinical translation. *Cardiovasc. Res.* 2015; 108(1): 4–20.
10. Pospelova T.V., Bykova T.V., Zubova S.G. et al. Rapamycin induces pluripotent genes associated with avoidance of replicative senescence. *Cell Cycle* 2013; 12(24): 3841–51.
11. Semina E.V., Rubina K.A., Sysoeva V.Yu. et al. Three-Dimensional Model of Biomatrix as a Method of Studying Blood Vessels and Nerve Growth in Tissue Engineering Structures. *Moscow University Chemistry Bulletin* 2016; 71(3): 172–7.
12. Makarevich P., Tsokolaeva Z., Shevelev A. et al. Combined transfer of human VEGF165 and HGF genes renders potent angiogenic effect in ischemic skeletal muscle. *PLoS One* 2012; 7(6): e38776.
13. Макаревич П.И., Болдырева М.А., Дергилёв К.В. и соавт. Трансплантация клеточных пластов из мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани эффективно индуцирует ангиогенез в ишемизированных скелетных мышцах. *Гены и Клетки* 2015; 10(3): 68–77.
14. Shevchenko E., Makarevich P., Tsokolaeva Z. et al. Transplantation of modified human adipose derived stromal cells expressing VEGF165 results in more efficient angiogenic response in ischemic skeletal muscle. *J. Transl. Med.* 2013; 11: 138.
15. Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* 2005; 69: 4–10.
16. Min J.K., Lee Y.M., Kim J.H. et al. Hepatocyte Growth Factor Suppresses Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Expression of Endothelial ICAM-1 and VCAM-1 by Inhibiting the Nuclear Factor- κ B Pathway. *Circ. Res.* 2005; 96: 300–7.
17. De Haro J., Acin F., Lopez-Quintana A. et al. Meta-analysis of randomized, controlled clinical trials in angiogenesis: gene and cell therapy in peripheral arterial disease. *Heart Vessels* 2009; 24: 321–8.
18. Deev R., Plaksa I., Bozo I. et al. Results of an International Postmarketing Surveillance Study of pl-VEGF165 Safety and Efficacy in 210 Patients with Peripheral Arterial Disease. *Am. J. Cardiovasc. Drugs* 2017; 17(3): 235–42.
19. Kim J., Miranda A.C., Popel A.S. et al. Gene delivery nanoparticles to modulate angiogenesis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* In press 2016.
20. Banfi G., von Degenfeld R., Gianni-Barrera S. et al. Therapeutic angiogenesis due to balanced single-vector delivery of VEGF and PDGF-BB. *FASEB J.* 2012; 26: 2486–97.
21. Makarevich P., Tsokolaeva Z., Shevelev A. et al. Combined transfer of human VEGF165 and HGF genes renders potent angiogenic effect in ischemic skeletal muscle. *PLoS One* 2012; 7(6): e38776.
22. Spanholtz T.A., Theodorou P., Holzbach T. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF165) plus basic fibroblast growth factor (bFGF) producing cells induce a mature and stable vascular network — a future therapy for ischemically challenged tissue. *J. Surg. Res.* 2011; 171: 329–38.
23. Kupatt C., Hinkel R., Pfosser A. et al. Cotransfection of vascular endothelial growth factor — A and platelet-derived growth factor-B via recombinant adeno-associated virus resolves chronic ischemic malperfusion role of vessel maturation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2010; 56: 414–22.
24. Su H., Takagawa J., Huang Y. et al. Additive effect of AAV-mediated angiopoietin-1 and VEGF expression on the therapy of infarcted heart. *Int. J. Cardiol.* 2009; 133: 191–7.
25. Yu J.X., Huang X.F., Lv W.M. et al. Combination of stromal-derived factor-1alpha and vascular endothelial growth factor genemodified endothelial progenitor cells is more effective for ischemic neovascularization. *J. Vasc. Surg.* 2009; 50: 608–16.
26. Макаревич П.И., Рубина К.А., Дьяканов Д.Т. и соавт. Терапевтический ангиогенез с применением факторов роста: современное состояние и перспективы развития. *Кардиология* 2015; 9: 59–71.

Поступила: 17.04.2017