



**Макеев
Олег Германович**

Заведующий лабораторией клеточной и генной терапии
ГБУЗСО Институт медицинских клеточных технологий,
г. Екатеринбург, д.м.н., профессор

Ремоделирование сосудистой сети ишемизированных тканей посредством образования сосудов de novo за счет эктопической экспрессии факторов ангиогенеза

Макеев О.Г., Шуман Е.А., Коротков А.В.

ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет»

Минздрава России, Екатеринбург

ГБУЗСО Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург

Сосудистые заболевания и, прежде всего, ишемическая болезнь сердца, являются одной из главных причин смертности взрослого населения промышленно развитых стран. Несмотря на достигнутые успехи в лечении данных заболеваний, значительная часть пациентов имеет абсолютные противопоказания для реваскуляризации с применением эндоваскулярной баллонной ангиопластики, стентирования или шунтирования.

Перспективным направлением представляется разработка технологий генотерапии, предусматривающих прямое введение встроенных в векторную систему генов факторов роста сосудов в миокард, скелетные мышцы или непосредственно в сосудистую стенку.

Однако введение отдельных генов, как было показано целым рядом плацебо-контролируемых исследований, не сопровождается подтвержденным клиническим эффектом. Так, использование VEGF, FGF или E2F на фоне ИБС продемонстрировало только «тенденцию к улучшению», при этом отличия толерантности пациентов к физической нагрузке и величина зоны ишемического дефекта были статистически недостоверны.

Неэффективность монофакторной терапии обусловлена тем, что в образовании полноценной сосудистой сети принимают участие продукты, кодируемые более чем тридцатью генами.

Возраст-зависимый дефицит этих факторов обуславливает то, что толь-

ко у каждого четвертого пациента с сосудистой недостаточностью развиваются полноценные коллатеральные сосуды.

Главными генами, ответственными за образование и рост сосудистой сети как в период роста организма, так и у взрослых, являются гены фактора транскрипции HIF.

В результате дефицита факторов HIF, ответственных за инициацию транскрипции широкого спектра ангиопоэтинов (более 30), в ишемизированной ткани в ответ на гипоксию развиваются некробиотические процессы с последующим замещением дефекта соединительной тканью и, соответственно, снижается функциональная активность органа наряду с возростанием риска повторных сосудистых катастроф.

Следующим по значимости в отношении ангиогенеза являются продукты гена VEGF. В результате альтернативного сплайсинга продукта экспрессии гена образуется 6 факторов: VEGF-A (VEGF-1), VEGF-B (VEGF-3), VEGF-C (VEGF-2), VEGF-D, VEGF-E и PlGF, которые являются секретируемыми белками и обеспечивают мобилизацию эндотелиоцитов, их миграцию в зону ишемии, пролиферацию и формирование сосудов.

Однако с момента рождения экспрессия VEGF в различных тканях выражена в разной степени и с возрастом прогрессивно снижается (наименьшая экспрессия наблюдается в высокоспециализированных тканях, в том числе в сердце, ЦНС), а у 9–18% населения в гене VEGF встречаются мутации, снижающие активность образующихся белков.

В свою очередь, экспрессия HIF у большинства людей среднего и старшего возраста в этих тканях отсутствует.

Важно отметить, что индуцированная экспрессия VEGF не только не сопровождается образованием полноценных сосудов, но и резко повышает проницаемость существующих, в то время как экспрессия VEGF в комплексе с прочими факторами (HIF) стимулирует рост и развитие новой сосудистой сети.

Более того, недостаточная экспрессия прочих ангиогенных факторов роста сопровождается развитием дефицита мышечных элементов сосудистой стенки вследствие недостаточной миграции в зону ишемии и пролиферации гладкомышечных клеток сосудов (hVSMCs). Последнее в полной мере относится и к циркулирующим сосудообразующим клеткам, под которыми понимают стволовые клетки (CAC), дающие начала тканям сосуда.

Важнейшей и до сих пор нерешенной проблемой генотерапии является низкая эффективность трансфекции в условиях *in vivo*, как правило, не превышающая 10%, что негативно сказывается на результативности терапии. Кроме того, существенным моментом является неконтролируемое распределение генетического вектора в тканях организма при его системном введении.

Решение проблемы таргетной доставки вектора и эффективности трансфекции при использовании предварительной трансфекции мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) VEGF и их системном введении была нами показана ранее.

Вместе с тем, в доступной литературе отсутствуют сведения о выраженности процессов неоангиогенеза в результате сочетанной эктопической экспрессии генов нескольких факторов ангиогенеза и возможности доставки кодирующих их векторов в зону ишемии посредством ММСК.

Целью исследования являлось изучение эффекта системного введения ММСК, предварительно трансфицированных генами факторов ангиогенеза (HIF1a, HIF1b, VEGF165, VEGF225), на моделируемой ишемии миокарда кроликов.

Материалы и методы

ММСК выделяли из жировой ткани кролика по методике, описанной ранее.

В качестве культуральной среды использовали среду DMEM с добавлением 10% FBS, 10 нг/мл bFGF, 100 ед/мл пенициллина и 100 ед/мл стрептомицина (Sigma). Полученные клетки трансфицировали геном VEGF165 (Whitehead Institute for Biomedical Research) — группа №1, или комплексом — генами HIF1a, HIF1b, (Dana Farber Cancer Institute), VEGF165 Whitehead Institute for (Biomedical Research), VEGF225 (The President and Fellows of Harvard College) — группа 2. Эффективность трансфекции оценивали трансфицируя ММСК плазмидой, несущей ген флуоресцирующего протеина EGFP (Addgene plasmid 13031), с использованием Lipofectamine 2000 (Invitrogen) по оптимизированному протоколу.

Эксперименты проведены на кроликах-самцах породы Шиншилла массой 2,8–3,2 кг и возрастом 1–1,2 года. Животным после премедикации атропином 0,04 мг/кг, для предотвращения отека слизистой трахеи, под тиопенталовым наркозом (внутрибрюшинно, 40 мг/кг) в условиях искусственной вентиляции легких проводили левую стернотомию. С целью обеспечения неполной окклюзии передней нисходящей артерии сердца выполняли перевязку ее проксимального сегмента на мандрине, сужающую просвет сосуда на 80%. Опытным группам животных №1 и 2 (n=5) сразу после наложения лигатуры интрамиокардиально однократно вводили ММСК, трансфицированные геном VEGF165 (Whitehead Institute for Biomedical Research) — группа №1 — в количестве 10^6 клеток или ММСК, трансфицированные генами HIF1a, HIF1b, (Dana Farber Cancer Institute), VEGF165 Whitehead Institute for (Biomedical Research), VEGF225 (The President and Fellows of Harvard College) в количестве 10^6 клеток.

Уровень ангиогенеза оценивали на 30-е сутки после операции. Кровеносные сосуды и их взаимоотношения с сердечными мышечными волокнами выявляли с помощью метода внутрисосудистой инъекции контрастными взвесями с последующей гистологической обработкой [1] и на микроскопических срезах миокарда, окрашенных гематоксилин-эозином, на основании определения числа капилляров, среднего диаметра капилляров (d), измеряемого с помощью окуляр-микрометра, расчета плотности (n) (кап/мм²), обменной поверхности капилляров (ОПК) и емкости капиллярного русла (ЕКП) на 1 мм³ миокардиальной ткани. Изучение рО₂ в зоне повреждения на открытом сердце проводили полярографическим методом с использованием генерирующей пары медная

амальгама-кадмий.

Статистическая обработка проводилась с использованием пакета прикладных программ Statistica 3.04. Результаты считали достоверными при $p \leq 0,05$

Результаты и обсуждение

Данные исследования приведены в таблице 1.

Таблица 1

Показатели состояния сосудистого русла ишемизированной зоны миокарда контрольной группы животных, группы с введением в кровотоки ММСК, трансфицированных геном VEGF165, и группы животных с введением в кровотоки ММСК, трансфицированных генами HIF1a, HIF1b, VEGF165, VEGF225

Параметры сосудистого русла миокарда	Контрольная группа	Опытная группа №1 ММСК + rhVEGF165 50мкг/см ²	Опытная группа №2 ММСК + HIF1a, HIF1b, VEGF165, VEGF225
n (кап/мм ²)	3,66±0,09	4,02±0,05*	6,13±0,12*#
d (мкм)	6,5±0,3	7,0±1,2	6,92±0,99
L (мм)	2120,0±80,0	3120,0±78,2*	4506,0±72,3*#
ОПК (мм ³)	46,52±1,2	66,3±5,6*	80,3±3,2*#
pO ₂ мм рт ст	8,0±1,8	31,1±2,2*	52,2±2,1*#

* — отличия опытных групп от контрольной ($p < 0,05$).

— отличие группы №2 от группы №1.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что однократное введение ММСК, трансфицированных VEGF165, в условиях моделируемой ишемии вызывает усиление неоангиогенеза в виде формирования новых капилляров, что свидетельствует об успешной трансфекции клеток миокарда плазмидной ДНК гена фактора роста эндотелиоцитов и продукции VEGF миокардиальными клетками в достаточном количестве для проявления его эффекта. Трансфекция клеток набором факторов роста сосудов оказывает более выраженный эффект. При этом наряду с формированием капиллярной сети при трансфекции набором факторов роста сосудов сопровождается образованием артериол (рис. 1).

Введение ММСК, трансфицированных HIF1a, HIF1b, VEGF135, VEGF225, сопровождается образованием истинных сосудов (рис. 2, 3).

Введение ММСК, трансфицированных HIF1a, HIF1b, VEGF135, VEGF225, вызывает, наряду с формированием капилляров, образование полноценных сосудов (рис. 3), имеющих анастомозы с сосудистой сетью неповрежденного миокарда.

В результате ремоделирования сосудистой сети, помимо нормализации pO₂, у животных, трансфицированных набором факторов роста сосудов, на-

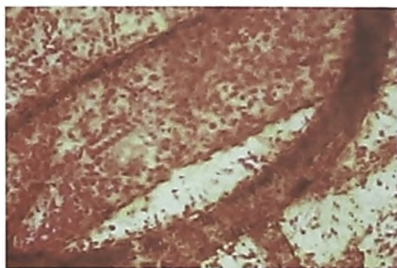


Рисунок 1. Формирование артериол в зоне ишемии после введения ММСК, трансфицированных генами HIF1a, HIF1b, VEGF165 и VEGF225.

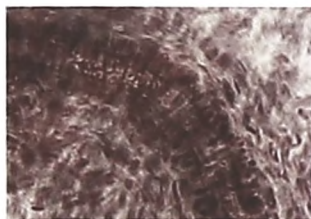


Рисунок 2. Сформировавшиеся в зоне ишемии сосуды в результате введения ММСК, трансфицированных HIF1a, HIF1b, VEGF165, VEGF225.

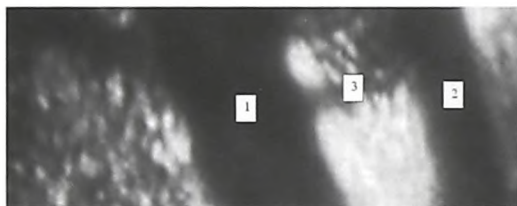


Рисунок 3. Сформировавшиеся в зоне ишемии сосуды в результате введения ММСК, трансфицированных HIF1a, HIF1b, VEGF135, VEGF225. 1 — артериола в зоне прилегающей к ишемии, 2 — вновь сформированная артериола, 3 — анастомоз.

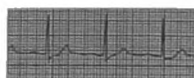
блюдается нормализация обменных процессов в зоне повреждения миокарда, о чем свидетельствует динамика изменения ЭКГ в ходе выполнения нагрузочной пробы (рис 4).

Таким образом, введение ММСК, трансфицированных четырьмя генами индукторов ангиогенеза, в отличие от трансфекции только геном VEGF165, сопровождается новообразованием полноценной сосудистой сети, имеющей анастомозы с сосудами неповрежденной ткани, нормализацией pO_2 и функций миокарда.



Опытная группа №1. Ведение MMCK, трансфицированных VEGF 165

Через 5 мин нагрузки появилась горизонтальная депрессия сегмента ST (V4) на 0,3 мВ (3 мм). Это признак ишемии миокарда.



Опытная группа №2. Ведение MMCK, трансфицированных HIF1a, HIF1b, VEGF165, VEGF225

Отрицательная ЭКГ-проба – депрессии сегмента ST в ответ на нагрузку не наблюдается.

Рисунок 4.