ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ПЛАЗМИДЫ С ГЕНОМ ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ (NGF) СТИМУЛИРУЕТ АНГИОГЕНЕЗ И ВОССТАНОВЛЕНИЕ КРОВОСНАБЖЕНИЯ ИШЕМИЗИРОВАННОЙ ЗАДНЕЙ КОНЕЧНОСТИ МЫШИ

М.А. Болдырева [1], П.И. Макаревич [1], Л.М. Рафиева [2], И.Б. Белоглазова [1], К.В. Дергилев [1], С.В. Костров [2], Е.В. Парфёнова [1]

[1] Российский кардиологический научный и производственный комплекс, Москва, Россия
[2] Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

Delivery of nerve growth factor (NGF) gene via recombinant plasmid vector induces angiogenesis in murine ischemic hind limb

M.A. Boldyreva [1] , P.I. Makarevich [1], L.M.Rafieva [2], I.B. Beloglazova [1], K.V. Dergilev [1], S.V. Kostrov [2], S.V. Parfyonova 1
[1] Russian Cardiology Research and Production Complex, Moscow, Russia
[2] Institute of Molecular Genetics of RAS, Moscow, Russia.

Прогресс в области терапевтического ангиогенеза связывают с поиском эффективных комбинаций различных факторов, способных стимулировать весь комплекс репаративных процессов, которые невозможны без восстановления как кровоснабжения, так и иннервации. Хорошо известно, что процессы роста нервов и сосудов тесно взаимосвязаны. Например, фактор роста нервов (NGF) может действовать как непрямой активатор ангиогенеза благодаря его способности стимулировать экспрессию и секрецию важнейшего ангиогенного фактора – фактора роста эндотелия сосудов (VEGF).

Целью данного исследования являлась оценка возможности стимулировать ангиогенез в ишемизированных скелетных мышцах с помощью локального введения созданной нами плазмидной генетической конструкции, несущей ген *ngf* человека. Ее ангиогенная эффективность исследовалась in vivo на модели ишемии задней конечности мыши.

Увеличение плотности сосудов в ишемизированных скелетных мышцах, выявленное в группе животных, которым вводили плазмиду с геном *ngf*, сопровождалось значительным уменьшением числа ампутаций и размера некроза конечности, а также более быстрым восстановлением в них кровотока. Протяженность некроза стопы также была значительно меньше в экспериментальной группе по сравнению с контрольной: к 21 дню длина стопы составляла 17,0±0,41 мм в опытной группе и 9,0±1,84 мм в контрольной группе ($p < 0.005$). Уже к 14 дню было отмечено выраженное увеличение перфузии конечности (в экспериментальной группе 44,62±7,68% против 16,74±5,85% в контроле, $p = 0,005$), что свидетельствовало об образовании под действием NGF функционально активных сосудов: среднее количество сосудов в поле зрения в опытной группе примерно в 2 раза превышало количество сосудов в контроле ($p < 0,05$).

Полученные результаты свидетельствуют об ангиогенном эффекте экспериментальной генной терапии на основе плазмидной конструкции с геном фактора роста нервов.

Ключевые слова: генная терапия, ангиогенез, фактор роста нервов, ишемические заболевания.

The development of therapeutic angiogenesis that can stimulate the formation of mature vessels is a valuable prospect for treatment of ischemic disease, and the combination of well-known angiogenic factors with other growth factors is now beginning to show promise in therapy. In our efforts to identify possible targets for therapeutic intervention using combinations of growth factors, nerve growth factor (NGF) seems to be a possible candidate.

In this study we analyzed the possibility to stimulate angiogenesis via local delivery of a plasmid encoding human nerve growth factor (hNGF). We used a murine hind-limb ischemia model to assess plasmid angiogenic potential in vivo. Plasmid DNA was diluted in saline and injected into ischemic *m. tibialis anterior*. Blood flow restoration was analyzed by laser Doppler imaging every 7 days after surgery, and throughout the experiment we assessed total hind-limb necrosis. After animals were sacrificed, muscle samples were frozen for histological analysis. Tissue sections were stained with antibodies against endothelium marker CD31 to assess vascular density.

Blood perfusion by day 7 was higher in the NGF-treated group compared to control ($p = 0.01$), and by day 14 animals in the NGF-treated group had perfusion 2.8 fold higher than control animals (NGF 44.62±7.68; control 16.74±5.85; $p = 0.005$). Vascular density in tissue samples by day 14 in NGF-treated animals was about 2-fold higher than in the control group ($p < 0.05$).

Our data indicate that NGF gene therapy is an effective therapeutic tool to stimulate angiogenesis.

Keywords: gene therapy, angiogenesis, nerve growth factor, ischemic disease.

Введение

Ишемические заболевания, такие как ишемическая болезнь сердца (ИБС), ишемический инсульт и критическая ишемия нижних конечностей (КИНК), в течение нескольких десятилетий лидируют в списке причин инвалидизации и смертности населения развитых стран, несмотря на внедрение эффективных методов хирургической и эндоваскулярной реваскуляризации [1].

Альтернативным методом восстановления кровотока является терапевтический ангиогенез, направленный на стимуляцию роста сосудов в зоне ишемии с помощью локального введения факторов роста, их генов или стволовых и прогениторных клеток, что позволяет без хирургического вмешательства улучшить кровоснабжение ткани, замедлить дегенеративные процессы, и, в ряде случаев, восстановить функцию органа [2–5].

e-mail: pavel.makarevich@gmail.com

Однако контролируемые клинические исследования по терапевтическому ангиогенезу, основанному на использовании рекомбинатных белков или генной терапии, не показали достаточной эффективности этого подхода у больных ИБС, КИНК и с синдромом диабетической стопы [6–10].

Важным фактором, влияющим на эффективность терапии, может являться наличие у пациентов нарушений не только васкулярной, но и нервной трофики тканей. Например, у пациентов с сахарным диабетом, являющимся частым коморбидным состоянием в кардиологии, нарушение кровоснабжения может усугубляться наличием нейропатии, ассоциированной с метаболическими расстройствами [11]. Также известно, что при инфаркте миокарда (ИМ) процессы репарации зависят как от восстановления перфузии поврежденного миокарда, так и от восстановления его иннервации [12].

Прогресс в области терапевтического ангиогенеза связывают с поиском эффективных комбинаций различных факторов, способных стимулировать весь комплекс репаративных процессов, которые невозможны без восстановления как кровоснабжения, так и иннервации [13–15]. Хорошо известно, что процессы роста нервов и сосудов тесно взаимосвязаны, поскольку сосуды иннервируются, а нервы кровоснабжаются. Клетки эндотелия секретируют широкий спектр нейротрофических факторов, причем многие из них обладают способностью стимулировать рост как нервов, так и сосудов [16, 17]. В связи с этим для восстановления кровоснабжения представляется рациональным использование нейротрофических факторов наряду с ангиогенными, особенно в случае диабетических макроангиопатий. Последние сопровождаются нарушениями трофики мышц, причем в условиях гипергликемии процессы ангиогенеза идут значительно хуже, чем при нормальном уровне глюкозы [18]. По этой причине возможность внешней стимуляции ангиогенеза и нейральной трофики мышечной ткани может быть эффективной в отношении предотвращения развития инвалидизирующих осложнений сахарного диабета – диабетической стопы, гангрен и полинейропатии с потерей моторной функции.

Одним из важнейших нейротрофических факторов, регулирующих рост аксонов, является фактор роста нервов (NGF), белок семейства нейротрофинов, который был открыт в 1951 г. NGF обладает способностью регулировать рост, дифференцировку и выживание периферических нейронов во время развития эмбриона [19]. NGF представляет собой гликопротеин, состоящий из 118 аминокислот. Секретируемый клетками NGF действует как аутокринно, так и паракринно. Его биологические эффекты напрямую зависят от связывания со специфическим тирозинкиназным рецептором на клеточной поверхности TrkA и неспецифическим рецептором p75, общим для всего семейства нейротрофинов. Эти рецепторы обнаружены не только на клетках нервной системы, но также на клетках сосудистой стенки и кардиомиоцитах. Связываясь с рецепторами на эндотелиальных клетках, NGF стимулирует их пролиферацию и миграцию подобно ангиогенным факторам [20, 21]. NGF вызывает дозозависимый ангиогенный эффект в классических моделях ангиогенеза – васкуляризации хорио-аллантоидной мембраны куриного эмбриона и неоваскуляризации роговицы у грызунов [22]. NGF и его рецепторы присутствуют в больших количествах в моноцитах периферической крови, играющих ведущую роль в процессах артериогенеза – развитии коллатеральных сосудов [23]. Более того, NGF может действовать и как непрямой активатор ангиогенеза благодаря его способности стимулировать экспрессию и секрецию важнейшего ангиогенного фактора VEGF [24]. Проангиогенные свойства NGF были подтверждены в доклинических и клинических исследованиях, показавших его способность эффективно стимулировать заживление язвенных дефектов [25]. Учитывая ангиогенные свойства NGF, можно предположить, что он представляет интерес и для терапевтического ангиогенеза у больных с ишемическими заболеваниями.

Целью данного исследования являлась оценка возможности стимулировать ангиогенез и репаративные процессы в ишемизированных скелетных мышцах с помощью локального введения плазмидной генетической конструкции, несущей ген фактора роста нервов человека, NGF.

Материал и методы

Плазмидные векторы

В лаборатории белковой инженерии Института молекулярной генетики Российской академии наук (ИМГ РАН) ранее была получена плазмида pUC, несущая в своем составе ген *ngf* человека [26]. Используя ее в качестве матрицы, с помощью полимеразной цепной реакции была получена последовательность ДНК, включающая в себя ген *hngf*, фланкированный с 5'-конца сайтом рестрикции *Nhe*I и последовательностью из шести нуклеотидов, соответствующих последовательности Козак в данном гене, и с 3'-конца сайтом рестрикции *Kpn*I. В качестве прямого и обратного праймеров использовали олигонуклеотиды NGF-NhI (5'-ACTGAGGCTAGCAGCG TAATGTCCATGTTG-3') и NGF-Kpn (5'-CGTGTCGGTAC CTCAGGCTCTTCTCAC-3'), соответственно (Евроген, Россия). В результате была получена плазмида, названная pCINGF. Этим полученным вектором pCINGF трансформировали клетки *Escherichia coli* штамма TG-1 с целью амплификации пДНК. Дополнительно был проведен рестрикционный анализ и секвенирование для верификации последовательности кДНК гена *hngf*. Учитывая высокую (до 90%) гомологию как первичной аминокислотной последовательности, так и нуклеотидной последовательности кДНК NGF человека и мыши, оценка эффективности разрабатываемой генетической конструкции возможна на моделях ишемии тканей у мыши.

Клеточные культуры

В работе использовали следующие культуры клеток: клетки линии HEK293 (ATCC, США) и клетки феохромоцитомы надпочечников крысы линии PC12 (ECACC, Великобритания).

Культивирование клеток линии HEK293 проводилось в среде DMEM/F12 (Hyclone, США) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) и 0,3 г/л L-глутамина. Клетки линии PC12 культивировали в среде DMEM/F12, содержащей 15% ФБС и 50 нг/мл гентамицина. Все культуры содержались в стандартных условиях – 37°C в атмосфере с 5% содержанием CO_2.

Анализ экспрессии гена ngf in vitro

Клетки линии HEK293 культивировали в 24-луночных планшетах до достижения 80–90% монослоя, далее трансфицировали плазмидами с геном NGF, после чего содержание рекомбинантного белка в среде анализировали в динамике методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческого набора NGF Emax ImmunoAssay System (Promega, США). Трансфекцию клеток проводили согласно протоколу производителя. В качестве отрицательного контроля клетки трансфицировали пустой плазмидой pCI.

In vitro анализ биологической активности нейротрофина NGF

Клетки линии PC12 культивировали в 24-луночных планшетах, предварительно покрытых поли-D-лизингидробромидом. Культуральную среду заменяли средой с исследуемым фактором (концентрация NGF в среде составляла 5–10 нг/мл), либо контрольной средой, после чего клетки инкубировали 48 ч. В качестве положительного контроля использовали коммерческий рекомбинантный NGF (PeproTech, Китай) в концентрации 10 нг/мл. Для оценки дифференцирующего действия клетки фотографировали на микроскопе Olympus CKX 41 (Olympus, Япония), после чего анализировали при помощи программы ImageJ 1.40 (NIH, США). При этом использовали следующие критерии: дифференцированной считали клетку, имеющую либо один отросток длиной в два раза больше тела клетки, либо имеющую более двух отростков длиной равной телу клетки.

Экспериментальные животные

Эксперименты проводились на самцах мышей линии C57/Bl весом 28–30 г (8–10 недель). Было сформировано две экспериментальные группы по 13 животных: животным опытной группы вводилась плазмида pCINGF, животным контрольной группы – физиологический раствор. Для данных животных характерно хорошее развитие коллатерального кровотока, предполагающее наличие большого количества ремоделирующихся мелких сосудов, по которым возможен приход циркулирующих клеток в зону ишемии. Протоколы эксперимента на животных были одобрены этическим комитетом и приведены в соответствие с внутренними требованиями Института экспериментальной кардиологии РКНПК.

Мышиная модель ишемии задней конечности

Классическая модель ишемии задней конечности мыши, которая описана S. Takeshita с соавт. (1998) [27] ранее была оптимизирована в лаборатории Ангиогенеза ИЭК [28]. Животных наркотизировали внутрибрюшинным введением 2,5% раствора авертина. Под бинокулярным микроскопом производился продольный разрез кожи левого бедра мыши от области паховой связки до коленной области (в области проекции *a. Femoralis*); бедренная артерия выделялась целиком от начала бифуркации (*a. Iliaca externa*) до ее разделения на *a. poplitae* и *a. saphenous* и её ветви, включая *a. epigastrica inferior, a. femoralis profunda, a. circumflexa lateralis*; на сосуд накладывались шелковые лигатуры нитью 6/0, участки сосуда между перевязками отсекались, после чего рана ушивалась атравматической иглой с шелковой нитью 5/0. Предыдущие исследования показали, что такой способ повреждения позволяет достичь снижения кровотока до уровня менее 10% от контрольного, вызывая нарушение кровоснабжения дистальной части конечности и тяжелую ишемию мышц голени [28].

Внутримышечное введение раствора плазмиды и электропорация

Растворенную в физиологическом растворе в концентрации 2 мг/мл плазмидную ДНК вводили инсулиновым шприцем в количестве 100 мкг в *m. tibialis anterior*, после чего мышца подвергалась низковольтовой электропорации чрескожным методом. В качестве источника тока использовали аппарат BTX Harvard Apparatus ECM 830 (BTX, США). На область инъекции накладывали ложки электродов, после чего подавали 3 импульса (20 мсек, 1 гЦ, 40 В), затем полярность меняли и электропорацию повторяли. Данная процедура по нашим данным и данным литературы способна увеличивать эффективность трансфекции (количество трансфицированных мышечных волокон) в среднем в 8-10 раз [29, 30]. Отрицательным контролем служило введение физиологического раствора 0,9% NaCl в том же объеме (50 мкл) и с проведением электропорации.

Оценка кровотока методом лазер–доплеровского сканирования

Для оценки кровотока использовался лазер-доплеровский сканер (Laser Doppler Imaging System, Moor, Великобритания). Измерения кровотока проводили сразу после операции, а также на 3, 7, 14, 21 день. Животное анестезировали в камере с помощью изофлюрана. Перед началом сканирования в течение 5 мин животное выдерживали на подогреваемом матрасе с температурой 37°C. Для каждого случая проводили не менее 5 повторных измерений. В обработку включались данные, полученные при условии, что разница в результатах двух последовательных измерений, проведенных с интервалом в 2–3 мин., не превышала 10%. Для снижения возможного разброса результатов измерений при переходе от одного животного к другому, а также для исключения влияния внешних факторов (свет, глубина наркоза, температура в лаборатории и т.д.) данные обрабатывались в виде отношения кровотока в ишемизированной конечности (левая лапа) к кровотоку в интактной правой лапе. Кроме того, в каждый день измерения проводили оценку внешнего состояния лапы (наличие отека, ампутаций, величины некроза) и измеряли длину стопы.

Оценка размера некроза конечности

На протяжении всего периода эксперимента, начиная со дня операции, а также на 3, 7, 14 и 21 день производили измерение длины стопы животного, оценивали внешнее состояние ишемизированной стопы, делали фотографии обеих конечностей с одновременной регистрацией кровотока с помощью лазер-доплеровского сканера. При каждом измерении в протоколе фиксировали длину стопы (мм), а также отмечали наличие или отсутствие развития некроза стопы.

Оценка плотности сосудов в скелетных мышцах животных

Визуализацию сосудов осуществляли методом иммуногистохимии. Замороженные срезы мышц окрашивали антителами против маркера эндотелия (CD31) и визуализировали сосуды с использованием светового микроскопа ZEISS AXIO Observer.A1 (Германия), оборудованного CCD камерой (AxioCam Carl Zeiss, Германия). Анализ полученных изображений проводили при помощи программы ClickCounter2.

На 14 день часть животных (по 3 из группы) умерщвляли передозировкой изофлюрана, после чего извлекали мышцы голени, которые погружали в среду Tissue-Tek (Sacura Finetechnical Co., Ltd., Япония) и замораживали в парах жидкого азота. Образцы хранили при температуре -70^{0}С. Из каждого замороженного фрагмента на криостате (MICROM HM 505E Cryostat, Германия) получали серийные срезы толщиной 7 мкм с шагом 500 мкм. Стекла со срезами хранили при температуре -20^{0}С. Срезы окрашивали первичными антителами против CD31 (BD Pharmingen, США), маркера эндотелиальных клеток. Процесс окрашивания проводили с использованием VECTASTAIN Elite ABC Kit (Rat IgG) в соответствии с протоколом фирмы-производителя (Vector Laboratories Ltd, США). Для подсчета сосудов анализировали по 5–6 срезов с каждого образца (при увеличении ×100), используя программу Click Counter2 (собственная разработка): сравнивали усредненное количество сосудов в поле зрения.

Статистическая обработка данных

Данные представлены в формате среднее значение ± стандартная ошибка среднего. Статистическую обработку результатов выполняли при помощи пакета Statsoft Statistica 6.0 с использованием t-критерия Стьюдента. Статистически значимыми считали отличия при $p<0,05$.

Результаты и обсуждение

Оценка выбранной нами системы доставки гена NGF в ткани требовала исследования биологической активности нарабатываемого клетками фактора роста. Анализ проводился по способности NGF оказывать специфическое дифференцирующее действие на клетки линии PC12. Для этого клетки линии HEK293 трансфицировали плазмидами, содержащими ген *ngf*, после чего анализировали биологическую активность полученного NGF. Через 48 ч. после добавления к клеткам линии PC12 среды, содержащей наработанный после трансфекции NGF, доля специфически дифференцированных клеток составляла: 45±2,1%; в положительном контроле (рекомбинантный человеческий NGF) доля клеток с признаками дифференцировки составила 42±5,4% (рис. 1). В отрицательном контроле признаков специфической дифференцировки PC12 обнаружено не было. Таким образом, на данном этапе нами была показана специфическая биологическая активность продуцируемого фактора роста NGF, кодируемого полученными нами плазмидами.

Следующим этапом стало испытание терапевтической эффективности введения гена NGF в ишемизированную скелетную мышцу на модели in vivo. Для этого нами была проведена комплексная оценка по ряду показателей.

У животных контрольной группы процесс заживления был сопряжен с выраженным воспалением и отеком конечности, практически у всех животных отмечалась ригидность сгибательных мышц – конечность была поджата к животу и характеризовалась выраженными признаками некроза (рис. 2Б-Г), в то время как у животных, которым вводили плазмиду с геном NGF, этого практически не наблюдалось (рис. 2А).

Протяженность некроза стопы была значительно меньше в опытной группе по сравнению с контрольной. Так, к 7 дню после операции регистрировались статистически значимые различия между группами по длине стопы (15,4±1,63 мм в опытной группе и 10,6±1,96 мм в контрольной группе, $p<0,05$), которые стали еще более выраженными к 21 дню среди животных, оставшихся в эксперименте (17,0±0,41 мм против 9,0±1,84 мм, $p<0,005$) (рис. 3). На 14 день в опытной группе внешнее состояние ишемизированной конечности практически не отличалось от интактной, сохраняясь таким и к 21 дню.

В контрольной группе число животных с ампутациями увеличивалось на протяжении всего эксперимента: к 7 дню после операции ампутации части конечности или некроз стопы наблюдались у 60% животных, а к 14 дню – у 80% (табл. 1), в результате чего измерение кровотока оказывалось невозможным у большинства животных контрольной группы на 14 и 21 день.

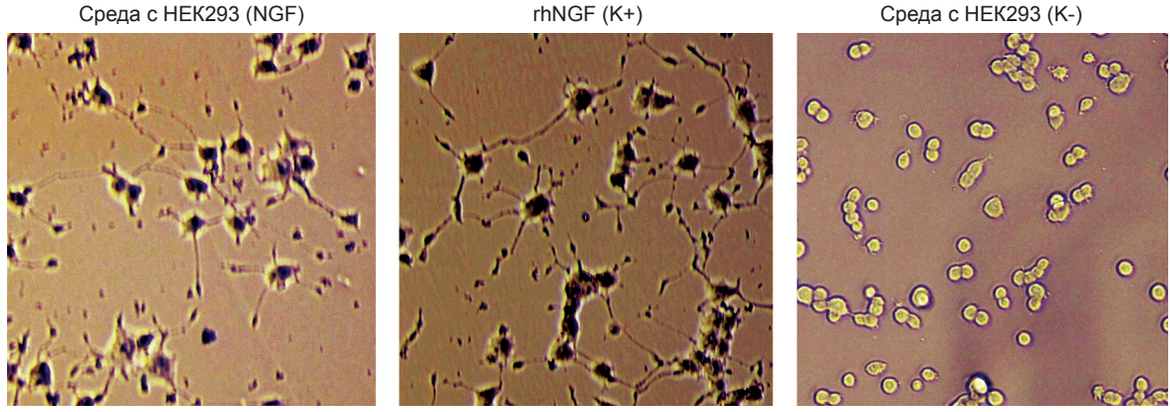

Рис. 1. Клетки линии PC12 под дифференцирующим действием человеческого NGF, секретируемого после трансфекции. Положительный контроль (К+) – коммерческий рекомбинантный NGF человека (rhNGF 10 нг/мл); отрицательный контроль (К-) – клетки, трансфицированные пустой плазмидой pCI. Ув. ×100

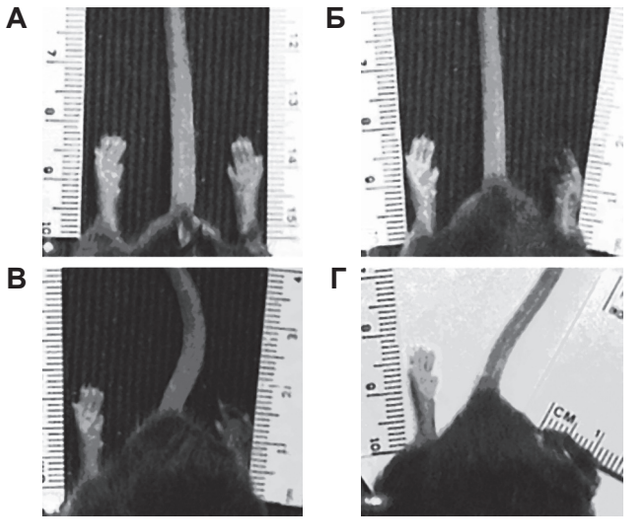

Рис. 2. Длина стопы мыши на разных сроках после индукции ишемии:
А – на 3 день после введения плазмиды с геном ngf;
Б – на 3 день после введения 0,9% NaCl;
В, Г – на 7 день после введения 0,9% NaCl

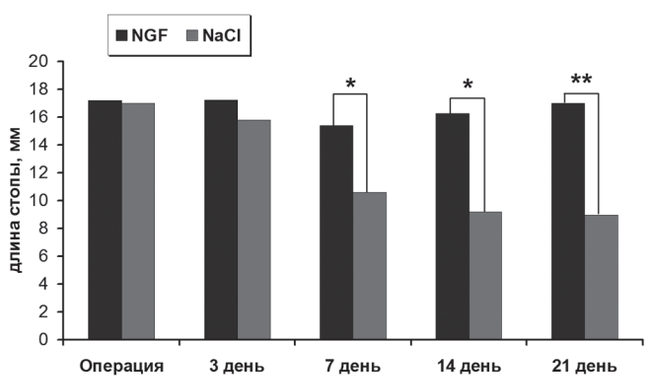

*Рис. 3. Изменение длины стопы ишемизированной конечности у мышей (мм) в контрольной (0,9% NaCl) и экспериментальной (плазмида с геном ngf) группах в течение 21 дня после операции (*p<0,05; **p <0,005)*

Таблица 1. **Доли животных с ампутациями в группах исследования на 3, 7, 14 и 21 дни после операции**

	День 3	День 7	День 14	День 21
phNGF	11%	11%	11%	11%
Контроль	20%	60%	80%	80%

В отличие от контроля в опытной группе на протяжении трех недель после операции наблюдалось стабильное восстановление кровотока в ишемизированной конечности (рис. 4). Значимые различия между группами по восстановлению кровотока регистрировались на 7 день (в опытной группе 27,33±3,11%; в контроле 14,09±3,54%, p = 0,01), и были еще более выраженным на 14 день (в опытной группе 44,62±7,68%, в контроле 16,74±5,85%, p = 0,005) (рис. 5). Данные представлены в виде отношения кровотока в ишемизированной конечности к кровотоку в интактной конечности.

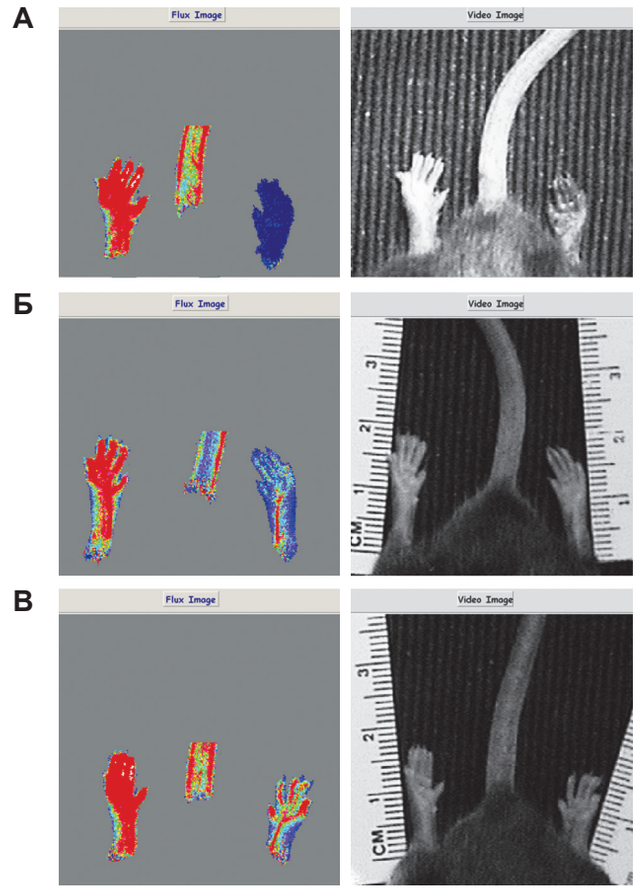

Рис. 4. Результаты лазерного доплеровского сканирования – восстановление кровотока в ишемизированной конечности мыши на 3 день после операции:
А – животное контрольной группы (проводилась инъекция 0,9% NaCl);
Б, В – животные экспериментальной группы (проводилась инъекция плазмиды с геном ngf)

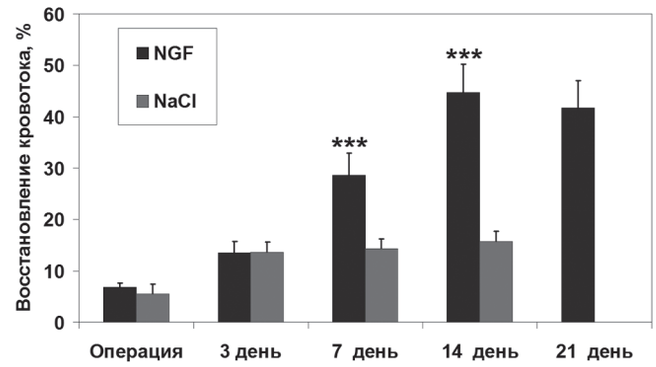

Рис. 5. Изменение кровотока в ишемизированной конечности мыши в течение 21 дня после операции в контрольной (проводилась инъекция 0,9% NaCl, =n = 11) и экспериментальной (проводилась инъекция плазмиды с геном NGF, n = 13) группах. Данные представлены в виде отношения кровотока в ишемизированной конечности к кровотоку в интактной конечности.
****различия между группами статистически значимы, p<0,05*

Оценка количества сосудов на срезах мышц показала, что на 14 день после операции среднее количество сосудов в поле зрения в опытной группе составило 909,0±106,3, что в 2 раза превышало количество сосудов в контроле (449,0±76,1, $p<0,05$) (рис. 6; табл. 2).

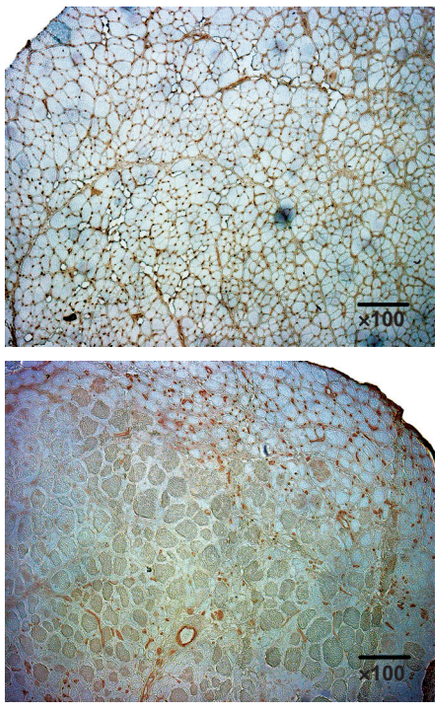

Рис. 6. Ишемизированные скелетные мышцы животных экспериментальной (проводилась инъекция плазмиды pCINGF) и контрольной (проводилась инъекция 0,9% NaCl) групп. Иммуногистохимическая оценка плотности капилляров, реакция с антителами к CD31. Масштабный отрезок – 100 мкм

Таблица 2. **Плотность капилляров (CD31⁺ сосудов) в поле зрения на срезах скелетных мышц животных в группах исследования на 7 и 14 дни после операции (на 14 день, p<0,05)**

	День 7	День 14
phNGF	310±53,8	909,0±106,3
Контроль	181±13,5	449,0±76,1

Полученные результаты свидетельствуют об ангиогенном эффекте экспериментальной генной терапии на основе плазмидной конструкции с геном фактора роста нервов. Увеличение плотности сосудов в ишемизированных скелетных мышцах, выявленное у животных, которым вводили плазмиду с геном NGF (плазмида pCINGF), сопровождается значительным уменьшением ампутаций и некроза конечности, а также более быстрым восстановлением кровотока. Уже к 14 дню было отмечено выраженное увеличение перфузии конечности, что свидетельствовало об образовании под действием NGF функционально активных сосудов. К сожалению, в данном исследовании не удалось проследить динамику восстановления кровотока в течение более длительного времени из-за большого числа ампутаций в контрольной группе, которые развивались к 14 дню поле операции. Возможно, для исследования более длительной динамики восстановления кровотока на фоне генной терапии необходима модификация модели с созданием менее тяжелой ишемии конечности.

NGF – нейротрофический фактор с множественными функциями, включающими регуляцию процессов ранозаживления, контракцию раны, модулирование функций нейропептидов, регуляцию роста нервов и сосудов [31–33]. На моделях ишемии миокарда, скелетных мышц и мозга было показано возрастание экспрессии NGF и его рецептора TrkA в сосудах ишемизированных тканей [34, 35]. NGF регулирует ветвление сосудов [36] и капилляризацию нервов после механического повреждения [37]. Как следует из результатов предыдущих работ, механизм ангиогенного эффекта NGF, вероятно, опосредован его влиянием на экспрессию гена VEGF. Ранее было показано, что локальная инъекция рекомбинантного NGF способна увеличивать капилляризацию скелетных мышц мыши даже в отсутствии ишемии и этот эффект блокировался введением нейтрализующих антител к VEGF [38]. Введение NGF сопровождалось увеличением фосфорилирования Akt – сигнальной протеинкиназы [39], активируемой VEGF и задействованной в индукции NO-синтазы и увеличении выживаемости клеток. Кроме того, активация Akt приводит к увеличению миграционного потенциала клеток, что также может играть существенную роль в ангиогенезе [40].

В данном исследовании показана возможность использования генной терапии на основе гена NGF для стимуляции ангиогенеза и восстановления кровоснабжения в ишемизированных скелетных мышцах. В дальнейших исследованиях мы планируем оценить возможность повышения эффективности терапевтического ангиогенеза при сочетании генной терапии ангиогенными и нейротрофическими факторами. Одновременная стимуляция роста сосудов и нервов может быть необходима для достижения терапевтического эффекта при лечении диабетических макроангиопатий и нейропатий с трофическими язвами, для лечения бокового амиотрофического склероза, повреждений периферических нервов, ишемических инсультов, в эстетической медицине, а также для ускорения заживления ран.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 13-04-01009_а, 13-04-40172-Н, 12-04-01438_а, 12-04-92005-ННС_а; программ Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» и «Молекулярная и клеточная биология».

ЛИТЕРАТУРА:

1. Roger V.L., Go A.S., Lloyd-Jones D.M. et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. Circulation 2012; 125(1): 188-97.

2. Gupta R., Tongers J., Losordo D.W. Human studies of angiogenic gene therapy. Circ. Res. 2009; 105(8): 724-36.

3. Парфенова Е.В., Ткачук В.А. Перспективы генной терапии сердечно-сосудистых заболеваний. Вопросы медицинской химии 2000; 46(3): 293-310.

4. Парфенова Е.В., Ткачук В.А. Терапевтический ангиогенез: достижения, проблемы, перспективы. Кардиологический вестник 2007; 2(2): 4-12.

5. Шевченко Е.К., Талицкий К.А., Парфенова Е.В. Перспективы повышения эффективности генной и клеточной терапии сердечно-сосудистых заболеваний: генетически модифицированные клетки. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2010; V(2): 19-28.

6. Korpisalo P., Ylä-Herttuala S. Stimulation of functional vessel growth by gene therapy. Integr. Biol. (Camb.). 2010; 2(2-3): 102-12.

7. Robich M.P., Chu L.M., Oyamada S. et al. Myocardial therapeutic angiogenesis: a review of the state of development and future obstacles. Expert. Rev. Cardiovasc. Ther. 2011; 9(11): 1469-79.

8. Giacca M., Zacchigna S. VEGF gene therapy: therapeutic angiogenesis in the clinic and beyond. Gene Therapy 2012; 19: 622-9.

9. Mughal N.A., Russell D.A., Ponnambalam S. et al. Gene therapy in the treatment of peripheral arterial disease. Br. J Surg. 2012; 99(1): 6-15.

10. Madonna R., Rokosh G. Insights into gene therapy for critical limb ischemia: the devil is in the details. Vascul. Pharmacol. 2012; 57(1): 10-4.

11. Forsythe R.O., Hinchliffe R.J. Management of peripheral arterial disease and the diabetic foot. J. Cardiovasc. Surg. (Torino). 2014; 55(2 Suppl 1): 195-206.

12. El-Helou V., Proulx C., Gosselin H. et al. Dexamethasone treatment of post-MI rats attenuates sympathetic innervation of the infarct region. J. Appl. Physiol. (1985) 2008; 104(1):150-6.

13. Gupta S.C., Kim J.H., Prasad S. et al. Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. Cancer Metastasis Rev. 2010; 29(3): 405-34.

14. Ouma G.O., Zafrir B., Mohler E.R. 3rd et al. Therapeutic Angiogenesis in Critical Limb Ischemia. Angiology 2013; 64(6): 466-80.

15. Powell R.J. Update on clinical trials evaluating the effect of biologic therapy in patients with critical limb ischemia. J. Vasc. Surg. 2012; 56(1): 264-6.

16. Zachary I. Neuroprotective role of vascular endothelial growth factor: signalling mechanisms, biological function, and therapeutic potential. Neurosignals 2005; 14(5): 207-21.

17. Kundi S., Bicknell R., Ahmed Z. The role of angiogenic and wound-healing factors after spinal cord injury in mammals. Neurosci. Res. 2013; 76(1-2): 1-9.

18. Efimenko A. Yu., Kochegura T. N., Akopyan Zh. A. et al. Autologous stem cell therapy: how aging andcChronic diseases affect stem and progenitor cells. 2015. BioResearch Open Access Vol. 4.1. DOI: 10.1089/biores.2014.0042.

19. Levi-Montalcini R., Hamburger V. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. J. Exp. Zool. 1951; 116(2): 321-61.

20. Moser K.V., Reindl M., Blasig I. et al. Brain capillary endothelial cells proliferate in response to NGF, express NGF receptors and secrete NGF after inflammation. Brain Res. 2004; 1017: 53-60.

21. Rahbek U.L., Dissing S., Thomassen C. et al. Nerve growth factor activates aorta endothelial cells causing PI3K/Akt- and ERK-dependent migration. Pflugers Arch. 2005; 450: 355-61.

22. Ribatti D., Nico B., Vacca A. et al. The gelatin sponge-chorioallantoic membrane assay. Nat. Protoc. 2006; 1(1): 85-91.

23. Caroleo M.C., Costa N., Bracci-Laudiero L. et al. Human monocyte/macrophages activate by exposure to LPS overexpress NGF and NGF receptors. J. Neuroimmunol. 2001; 113(2): 193-201.

24. Calza L., Giardino L., Giuliani A. et al. Nerve growth factor control of neuronal expression of angiogenetic and vasoactive factors. PNAS USA 2001; 98: 4160-5.

25. Tuveri M., Generini S., Matucci-Cerinic M. et al. NGF, a useful tool in the treatment of chronic vasculitic ulcers in rheumatoid arthritis. Lancet 2000; 356(9243): 1739-40.

26. Сафина Д. Р., Рафиева Л. М., Коваль А. В. и соавт. Олигомерная организация рекомбинантных нейротрофинов человека, экспрессированных в клетках Escherichia coli. Биоорг. Химия 2008; 34(3): 327-32.

27. Takeshita S., Isshiki T., Ochiai M. et al. Endothelium-dependent relaxation of collateral microvessels after intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor in a rat model of hindlimb ischemia. Circulation 1998; 98(13): 1261-3.

28. Traktuev D.O., Tsokolaeva Z.I., Shevelev A.A. et al. Urokinase gene transfer augments angiogenesis in ischemic skeletal and myocardial muscle. Mol. Ther. 2007; 15(11): 1939-46.

29. Макаревич П.И., Шевелев А.Я., Рыбалкин И.Н. и соавт. Новые плазмидные конструкции, предназначенные для терапевтического ангиогенеза и несущие гены ангиогенных факторов роста – VEGF, HGF и ангиопоэтина-1. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2010; V(1): 47-52.

30. 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.

31. Boyce V.S., Mendell L.M. Neurotrophins and spinal circuit function. Front. Neural Circuits 2014; 8: 59.

32. Bothwell M. NGF, BDNF, NT3, and NT4. Handb. Exp. Pharmacol. 2014; 220: 3-15.

33. Allen S.J., Watson J.J., Shoemark D.K. et al. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. Pharmacol. Ther. 2013; 138(2): 155-75.

34. Ieda M., Kimura K., Kanazawa H. et al. Regulation of cardiac nerves: a new paradigm in the management of sudden cardiac death? Curr. Med. Chem. 2008; 15(17): 1731-6.

35. Tonchev A.B. Brain ischemia, neurogenesis, and neurotrophic receptor expression in primates. Arch. Ital. Biol. 2011; 149(2): 225-31.

36. Lazarovici P., Gazit A., Staniszewska I. et al. Nerve growth factor (NGF) promotes angiogenesis in the quail chorioallantoic membrane. Endothelium 2006; 13(1): 51-9.

37. Varon S., Conner J.M. Nerve growth factor in CNS repair. J. Neurotrauma 1994; 11(5): 473-86.

38. Emanueli C., Salis M.B., Pinna A. et al. Nerve growth factor promotes angiogenesis and arteriogenesis in ischemic hindlimbs. Circulation 2002; 106(17): 2257-62.

39. Orike N., Middleton G., Borthwick E. et al. Role of PI 3-kinase, Akt and Bcl-2-related proteins in sustaining the survival of neurotrophic factor-independent adult sympathetic neurons. J. Cell Biol. 2001; 154(5): 995-1005.

40. Zubkova E., Semenkova L., Dudich E. et al. Alpha-fetoprotein contributes to THP-1 cell invasion and chemotaxis via protein kinase and Gi-protein-dependent pathways. Mol. Cell. Biochem. 2013; 379(1-2): 283-93.

Поступила:10.11.14