

РАЗДЕЛ 2 – ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ PART 2 – RESEARCH ARTICLES

ЭФФЕКТЫ ПРЯМОЙ И ОПОСРЕДОВАННОЙ ДОСТАВКИ ГЕНА VEGF КЛЕТКАМИ ПУПОВИННОЙ КРОВИ В ОБЛАСТЬ ИШЕМИИ КОНЕЧНОСТИ У КРЫС

Саматошенков И.В., Андреев С.А., Бойчук Н.В.

Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия, e-mail: mr.samatoshenkov@mail.ru

EFFECTS OF DIRECT AND INDIRECT DELIVERY OF THE VEGF GENE BY CORD BLOOD CELLS IN LIMB ISCHEMIA AREA IN RATS

Samatoshenkov IV, Andreev SA, Boychuk NV

Kazan State Medical University, Kazan, Russia, e-mail: mr.samatoshenkov@mail.ru

Для цитирования:

Саматошенков И.В., Андреев С.А., Бойчук Н.В. Эффекты прямой и опосредованной доставки гена VEGF клетками пуповинной крови в область ишемии конечности у крыс// Морфологические ведомости.- 2017.- Том 25.- № 4.- С. 14-17. [https://doi.org/10.20340/mv-mn.17\(25\).04.14-17](https://doi.org/10.20340/mv-mn.17(25).04.14-17)

For the citation:

Samatoshenkov IV, Andreev SA, Boychuk NV. Effects of direct and indirect delivery of the vegf gene by cord blood cells in limb ischemia area in rats. *Morfologicheskie Vedomosti – Morphological Newsletter*. 2017 Dec 30;25(4):14-17.

Резюме: На модели ишемии задней конечности крысы изучены эффекты доставки рекомбинантного гена VEGF165 человека в условиях прямой и клеточно-опосредованной генной терапии. Тотчас после создания модели ишемии в дистальную часть икроножной мышцы инъецировали раствор с геном VEGF (группа Ad-VEGF) или трансдуцированные тем же геном мононуклеарные клетки крови пуповины (ККП) человека (группа ККП+Ad-VEGF). На 14-е сутки показано увеличение количества CD31- и CD34-иммунопозитивных клеток в ишемизированной икроножной мышце в обеих группах животных. Количество CD31- и CD34-иммунопозитивных клеток в группе Ad-VEGF увеличивалось соответственно на 23% и в 2 раза, а в группе ККП+Ad-VEGF соответственно в 4 и 5 раз. На этом сроке количество CD31-иммунопозитивных клеток в группе ККП+Ad-VEGF было больше в 3 раза, а CD34-иммунопозитивных клеток – в 2 раза по сравнению с группой Ad-VEGF. Существенно больший прирост количества эндотелиальных клеток при доставке в область ишемии гена VEGF при помощи ККП по сравнению с прямой инъекцией данного гена в ту же область указывает на значительно более высокую эффективность ангиогенеза в условиях проведения клеточно-опосредованной генной терапии.

Ключевые слова: икроножная мышца, ишемия, клетки крови пуповины, ангиогенез, VEGF

Summary: The effects of delivery of recombinant human VEGF165 gene under conditions of direct and cell-mediated gene therapy were studied in the model of posterior limb ischemia. Immediately after the creation of the ischemia model, a solution with the VEGF gene (Ad-VEGF group) or the mononuclear blood cells of the human umbilical cord (PCC) mononuclear cells (group CCP + Ad-VEGF) transduced by the same gene was injected into the distal part of the gastrocnemius muscle. At day 14, an increase in the number of CD31- and CD34-immunopositive cells in the ischemic gastrocnemius muscle was shown in both groups of animals. The number of CD31- and CD34-immunopositive cells in the Ad-VEGF group increased by 23% and by 2 times, respectively, and by 4 and 5 times, respectively, in the CCP + Ad-VEGF group. At this time, the number of CD31-immunopositive cells in the CCP + Ad-VEGF group was greater by a factor of 3, and the CD34-immunopositive cells by a factor of 2 compared with the Ad-VEGF group. A significantly larger increase in the number of endothelial cells, when delivered to the ischemia region of the VEGF gene by PPC compared to direct injection of the gene into the same region, indicates a significantly higher efficiency of angiogenesis under conditions of cell-mediated gene therapy.

Key words: gastrocnemius muscle, ischemia, umbilical cord blood mononuclear cells, angiogenesis, VEGF

Введение. В последние годы ишемия нижних конечностей у человека – часто встречающаяся патология, частота заболеваемости которой достигает 10%. Количество пациентов с заболеваниями периферических артерий за последние годы возросло более чем на 23% [1]. Хирургическое лечение ишемии нижних конечностей несостоятельно, так как около 30% пациентов имеют ограничения для прямой реваскуляризации конечности, прежде всего по причине поражения дистального русла. Исследование и поиск способов стимулирования ангиогенеза при помощи ангиогенных факторов или их кодирующих генетических конструкций является актуальной задачей [2]. Основу лечебной тактики, предложенной М. Höckel в 1993 г., составляет стимулирование ангиогенеза в ишемизированных тканях ангиогенными факторами, например сосудистым эндотелиальным фактором роста (VEGF). Терапевтический ген можно вводить с помощью аденовируса (Ad-VEGF) путем инъекции в ишемизированную мышцу (прямая генная терапия). Показано значительное улучшение структуры мышцы при введении гена VEGF и FGF в варианте прямой генной терапии при критической ишемии конечности [3,4]. Перспективным направлением является доставка терапевтических генов в область повреждения при помощи клеток (генно-клеточная терапия). В проведенных исследованиях использовали гемопоэтические стволовые клетки, эффект от их использования заключался в улучшении функции конечности, увеличении количества эндотелиальных клеток и усилении васкуляризации конечности по данным доплеровского исследования [5, 6].

Цель исследования - сравнение эффективности ангиогенеза под воздействием гена VEGF при его доставке методами прямой генной и клеточно-опосредованной терапии ишемизированной икроножной мышцы крысы.

Материалы и методы исследования. Исследование проведено на 30 крысах-самцах линии Wistar массой 220–280 г. Все вмешательства соответствовали правилам, утвержденным локальным этическим комитетом Казанского

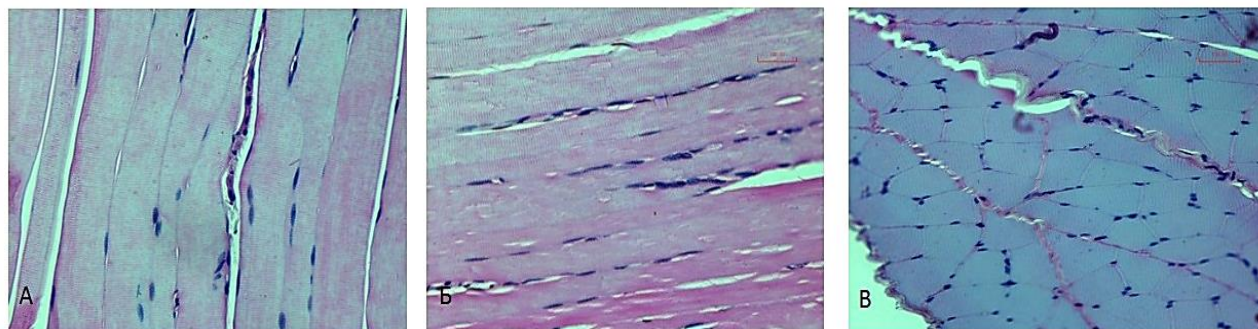
медицинского университета. Крыс наркотизировали путем внутривенной инъекции хлоралгидрата (80 мг/мл, 0,4 мл на 100 г, Sigma). Ишемию задней конечности создавали путем наложения на бедренную артерию, непосредственно у места отхождения от подвздошной артерии, двух лигатур. Участок между лигатурами пересекали. Ишемию регистрировали аппаратом для измерения микроциркуляторного русла EasyLDI (England), производя замеры уровня кровотока в конечности до операции, на следующий день и на 5 сутки после операции. После операции животные получали инъекцию 1 мл разведенного в физиологическом растворе гентамицина в мышцу бедра на контралатеральной конечности. Сразу после лигирования артерии крыс разделили на 3 группы.

В экспериментах использовали аденовирусный вектор (далее - Ad) с встроенной экспрессионной конструкцией, несущей ген сосудистого эндотелиального фактора роста 165 (далее - VEGF), а также мононуклеарные клетки крови пуповины (далее - ККП), трансдуцированные Ad-VEGF (далее - ККП+AdV-VEGF) [8].

Животным первой группы (n=10) вводили 60 мкл Ad-VEGF в 4 точки дистальной части икроножной мышцы, по 15 мкл в каждую точку, с общим количеством вирусных частиц 2×10^{10} . Животным второй группы (n=10) вводили ККП+Ad-VEGF в том же объеме и в те же точки (2×10^6 клеток). Животным третьей, контрольной, группы (n=10) инъектировали физиологический раствор в том же объеме и в те же точки. Через 14 суток животных наркотизировали и транскардиально перфузировали 4% раствором параформальдегида (4°C). Икроножную мышцу забирали и обрабатывали по стандартной методике для последующего иммуногистохимического анализа. На продольных срезах мышцы проводили иммуногистохимическую реакцию с антителами против CD31 и CD34. При помощи микроскопа JEM-1200 при увеличении $\times 100$ производили оцифровку изображений. Подсчет количества иммунопозитивных клеток осуществляли в фиксированной зоне морфометрии в области ишемии размером 700 мкм при помощи программы ImageJ. Результаты подсчета обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования и обсуждение. В исследуемой задней конечности крысы после операции было зарегистрировано стойкое снижение кровотока на 45% по сравнению с уровнем до операции. Кровоток в прооперированной конечности уменьшился с $123 \pm 0,8$ до $56 \pm 0,5$. В последующем значения кровотока сохранялись в пределах $62 \pm 1,3$ до конца исследования.

Забранные на 14 суток образцы мышечной ткани животных трех групп исследовали с помощью стандартной гистологической методики и окраски срезов гематоксилином и эозином (рис. 1).



Контрольная
группа

advVEGF

МККП+advVEGF

Рис. 1. Морфологическая картина мышечной ткани икроножной мышцы крысы на 14 сутки после инъекции в мышцу физраствора (А), advVEGF (Б) и МККП+advVEGF (В). Окраска гематоксилином и эозином. Ув.: $\times 100$.

Структура мышечных волокон крыс контрольной группы (введение физраствора) представляется в целом ненарушенной (рис.1-А). Поперечная исчерченность просматривается, но в отдельных волокнах размыта или деформирована. Отмечается расслоение мышечных волокон. Удлиненные ядра расположены непосредственно под сарколеммой, структура ядер не нарушена. Структура мышечных волокон у крыс второй группы (введение Ad-VEGF) в целом не нарушена. Заметна поперечная исчерченность, что говорит о сохранной организации миофибрилл (рис. 1-Б). Отмечена некоторая расслаиваемость волокон. Вытянутые ядра расположены вблизи сарколеммы. Отдельные ядра округлены и деформированы, некоторые из них смещены вглубь мышечного волокна. У крыс третьей группы (введение ККП+AdV-VEGF) целостность мышечных волокон не нарушена, характерны отчетливая поперечная исчерченность мышечных волокон и упорядоченность миофибрилл. На поперечных срезах полигональной формы видны хорошо контурированные ядра, расположенные непосредственно под сарколеммой (рис. 1-В). Структура мышечной ткани представляется наиболее соответствующей интактной мышце, что позволяет предположить наличие протективного для миофибрилл эффекта у клеточно-опосредованного способа введения гена.

В группе ККП+Ad-VEGF наблюдается значительно большее количество CD31- и CD34-иммунопозитивных клеток по сравнению с группой Ad-VEGF (рис. 2). В группе Ad-VEGF выявлено значительно меньшее количество эндотелиальных клеток (рис. 2-Б, 2-Д) по сравнению с группой с использованием трансдуцированных ККП+Ad-VEGF. На 14-е сутки эксперимента в группе ККП+Ad-VEGF количество CD31-иммунопозитивных клеток было в три раза больше, а CD34-иммунопозитивных клеток – в 2 раза по сравнению с группой Ad-VEGF, т.е. в группе ККП+Ad-VEGF (рис. 2-В, 2-Е) отмечено наибольшее количество эндотелиальных клеток. В группе Ad-VEGF количество CD31- и CD34-иммунопозитивных клеток увеличивалось по сравнению с контрольной группой соответственно на 23% и в 2 раза. В контрольной группе (рис. 2-А, 2-Г)

зарегистрировали наименьшее количество эндотелиальных клеток. Полученные данные позволяют предположить проявление гиперплазии эндотелиальных клеток у животных группы с ККП+Ad-VEGF, что можно трактовать как усиление ангиогенеза.

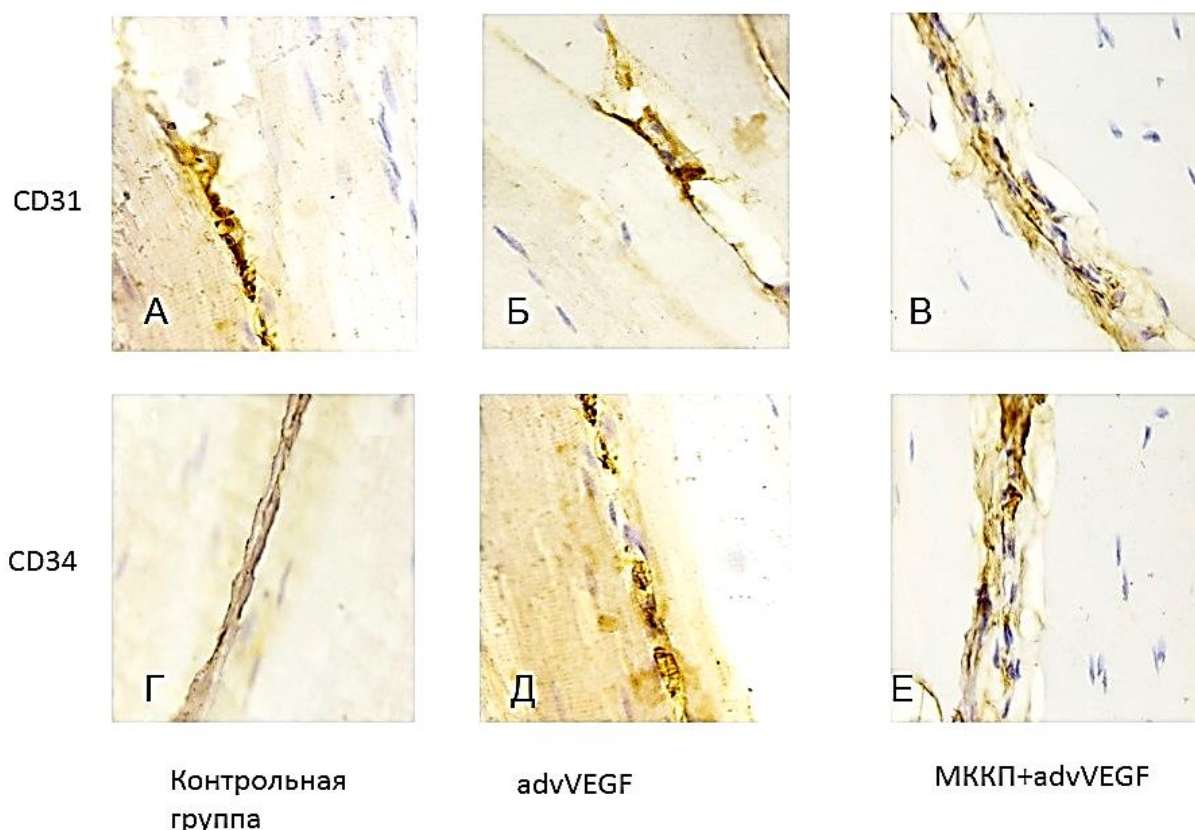


Рис. 2. Икроножная мышца крысы. Иммуногистохимическая реакция с антителами против CD31 (А–В) и CD34 (Г–Е) на 14 сутки после инъекции в мышцу физраствора (А, Г), advVEGF (Б, Д) и МККП+advVEGF (В, Е). Ув.: x100.

Таблица 1
Количество CD31- и CD34-иммунопозитивных клеток в области ишемии икроножной мышцы крысы

	Контрольная группа	Ad-VEGF	ККП + AdVEGF
CD31	4,4±1,32	5,4±2,05*	17,2±2,23**
CD34	2,8±1,23	5,6±0,9*	13,2±2,19**

p<0,05 при сравнении * – с контрольной группой, ** – с группой Ad-VEGF

Данные по количеству эндотелиальных клеток всех трех групп представлены в таблице 1. В данном исследовании по критериям количества эндотелиальных клеток показано, что введение Ad-VEGF в варианте клеточно-опосредованной терапии при помощи ККП оказывается более эффективным способом стимулирования ангиогенеза в

ишемизированной ткани, чем введение Ad-VEGF в виде прямой генной терапии. Существует предположение, что клеточная доставка обеспечивает протекторный эффект для ангиогенных факторов, вводимых в организм, и поэтому большая их часть реализует свой эффект в ишемизированной ткани. В настоящее время активно разрабатывается технология доставки терапевтических генов в область повреждения при помощи клеток (генно-клеточная, или клеточно-опосредованная генная терапия) [6, 7]. Это связано с необходимостью использования более эффективных подходов для усиления ангиогенного потенциала эндотелиальных клеток, чем метод прямой генной терапии. Согласно данным литературы, прямая генная терапия имеет ряд недостатков. К их числу относятся крайне низкая эффективность трансфекции, отсутствие способов прекращения избыточного синтеза ангиогенного фактора трансфицированными клетками реципиента и высокий риск образования опухолей вследствие неконтролируемого поступления ангиогенных факторов в системный кровоток. Кроме того, не исключен и иммунный ответ организма на белок, синтезируемый в организме с помощью вирусного вектора. По сравнению с прямой генной терапией, предполагающей непосредственную инъекцию ДНК-содержащих векторов в организм, клеточно-опосредованная доставка терапевтических генов имеет очевидные преимущества. Предполагается, что такой способ доставки генов является более продуктивным [8, 9] и позволит повысить эффективность восстановления кровоснабжения в ишемизированных тканях [10]. Одно из основных преимуществ, основанное на феномене адресной миграции клеток (хоуминг), состоит в потенциальной возможности обеспечить доставку генов к множественным очагам ишемии, наличие которых характерно для проявления большинства ишемических заболеваний. Другое преимущество генно-клеточной терапии связано с возможностью длительной продукции в области повреждения молекул-стимуляторов регенерации в оптимальных дозах. Наконец, сами трансплантируемые клетки служат источником молекул-стимуляторов регенерации и молекул внеклеточного матрикса, поддерживающих рост новых сосудов. Для трансплантаций в мышечную ткань, в том числе и как носителей терапевтических генов, применяют стволовые и прогениторные клетки многих типов. Из них наиболее перспективными представляются мононуклеарные клетки крови пуповины. Выбор этих клеток обусловлен

низкой иммуногенностью ККП (что позволяет их использовать для алло- и аутотрансплантации, доступность, простота получения и хранения), а также отсутствием законодательных, этических и религиозных запретов. Кроме того, ККП экспрессируют многочисленные ростовые и трофические факторы, способны дифференцироваться в специализированные клетки разных типов и стимулировать ангиогенез [11].

Заключение. Таким образом, весьма перспективным может быть доставка нескольких ангиогенных генов на клеточных носителях для усиления ангиогенеза. Существует предположение, что ввиду наличия хронического характера заболевания требуется многократное введение препарата в ишемизированную ткань. Важно отметить, что исследования в этой области касаются не только фундаментальной науки, но и клинической медицины. Врачи уже сегодня связывают будущий прогресс в лечении инкурабельных пациентов с генной терапией. Так, у значимой доли больных с ишемией нижних конечностей на фоне использования генных препаратов станет выполнимой ранее бесперспективная, вследствие неразвитости периферического русла, хирургическая реконструкция кровотока, в ряде случаев может быть отсрочено хирургическое лечение или сняты показания к ампутации. Для этих категорий больных сочетание хирургического и генно-инженерного подхода является весьма многообещающим и перспективным [12].

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Fowkes GR, Rudan D, Rudan I, Aboyans V. Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *The Lancet* 2013;382:1329-1340. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61249-0.
2. Gupta R, Tongers J, Losordo DW. Human studies of angiogenic gene therapy. *Circ. res.* 2009;105:724-736. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.200386.
3. Jazwa A, Tomczyk M, Taha HM, Hytonen E, Stoszek M, Zentilin L, Giacca M, Yla-Herttuala S, Emanueli C, Jozkowicz A, Dulak J. Arteriogenic therapy based on simultaneous delivery of VEGF-A and FGF4 genes improves the recovery from acute limb ischemia. *Vascular Cell* 2013;5:13. doi: 10.1186/2045-824X-5-13.
4. Sanada F, Taniyama Y, Azuma J, Yuka I, Kanbara Y, Iwabayashi M, Rakugi H, Morishita R. Therapeutic Angiogenesis by Gene Therapy for Critical Limb Ischemia: Choice of Biological Agent. *Immunol Endocr Metab Agents Med Chem.* 2014;14(1):32-39.
5. Armstrong L, Lako M, Buckley N, Lappin TR, Murphy MJ, Nolte JA, Pittenger M, Stojkovic M. Our top 10 developments in stem cell biology over the last 30 years. *Stem Cells* 2012;30(1):2-9. doi: 10.1002/stem.1007.
6. Lawall H, Bramlage P, Amann B. Stem cell and progenitor cell therapy in peripheral artery disease. *Thromb.Haemost.* 2010;103:696-709. doi: 10.1160/TH09-10-0688.
7. Islamov RR, Rizvanov AA, Mukhamedyarov MA, Salafutdinov II, Garanina EE, Fedotova VY, Solovyeva VV, Mukhamedshina YO, Safiullov ZZ, Izmailov AA, Guseva DS, Zefirov AL, Kiyasov AP, Palotas A. Symptomatic improvement, increased life-span and sustained cell homing in amyotrophic lateral sclerosis after transplantation of human umbilical cord blood cells genetically modified with adeno-viral vectors expressing a neuro-protective factor and a neural cell adhesion molecule. *Curr Gene Ther.* 2015;15(3):266-276.
8. Xie N, Li Z, Adesanya TM, Guo W, Liu Y, Fu M, Kilic A, Tan T, Zhu H, Xie X. Transplantation of placenta-derived mesenchymal stem cells enhances angiogenesis after ischemic limb injury in mice. *J cellmol med.* 2016 Jan;20(1):29-37. doi: 10.1111/jcmm.12489.
9. Zhe L, Guo LZ, Kim T, Han S, Kim S. Angio-vasculogenic properties of endothelial-induced mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. *Circulation Journal* 2016;80:998-1007. doi: 10.1253/circj.CJ-15-1169.
10. Shevchenko EK, Talickij KA, Parfenova EV. Perspektivy povyshenijaj effektivnosti gennoj i kletочноj terapii serdechno-sosudistyh zabolevanij: geneticheski modifitsirovannye kletki. *Kletochная transplantologija i tkanevaja inzhenerija.* 2010;5:215-218.
11. Islamov RR, Rizvanov AA, Mukhamedyarov MA, Salafutdinov II, Garanina EE, Fedotova VY, Solovyeva VV, Mukhamedshina YO, Safiullov ZZ, Izmailov AA, Guseva DS, Zefirov AL, Kiyasov AP, Palotas A. Symptomatic improvement, increased life-span and sustained cell homing in amyotrophic lateral sclerosis after transplantation of human umbilical cord blood cells genetically modified with adeno-viral vectors expressing a neuro-protective factor and a neural cell adhesion molecule. *Curr Gene Ther.* 2015;15(3):266-276.
12. Voronov DA. Ispolzovanie gennyh induktorov neoangiogeneza v kompleksnom lechenii pacientov s hronicheskoj ishemiej nizhnih konechnostej: fundamental'nye aspekty i klinicheskie rezul'taty. *Kardiologija i serdechno-sosudistaja hirurgija.* 2009;5:44-48.

Авторская справка

Саматошенков Игорь Валерьевич, врач-ординатор кафедры хирургических болезней № 2, Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия; e-mail: mr.samatoshenkov@mail.ru

Андреев Сергей Александрович, студент 4 курса, Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия; e-mail: sergeymedeo@icloud.com

Бойчук Наталья Валентиновна, кандидат биологических наук, доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии, Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия; e-mail: nboychuck@yandex.ru