

На правах рукописи

МАКАРЕВИЧ ПАВЕЛ ИГОРЕВИЧ

**РАЗРАБОТКА МЕТОДА КОМБИНИРОВАННОЙ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ
ИШЕМИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЛАЗМИДНЫХ
КОНСТРУКЦИЙ С ГЕНАМИ VEGF165 И HGF ЧЕЛОВЕКА**

14.01.05 – Кардиология

03.01.04 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Москва 2015

Работа выполнена на кафедре биохимии и молекулярной медицины Факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» и в лаборатории ангиогенеза Института экспериментальной кардиологии ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России

Научный руководитель:

д.м.н., профессор

Елена Викторовна Парфёнова

Официальные оппоненты:

руководитель лаборатории физиологии рецепторов и сигнальных систем
ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова»

Российской академии наук (г. Москва),
доктор биологических наук, профессор

Авдонин Павел Владимирович

заведующая кафедрой пропедевтики внутренних
болезней Медицинского факультета
ФГАОУ ВО «Российский университет
дружбы народов» (г. Москва),
доктор медицинских наук, профессор

Кобалава Жанна Давидовна

Ведущая организация: ФГБУН «Научно-исследовательский институт кардиологии» (г. Томск)

Защита диссертации состоится « ____ » _____ 2015г в ____ часов на заседании
Диссертационного совета Д 208.016.01 при ФГБУ «Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины» Минздрава России по адресу:
101990, г. Москва, Петроверигский пер., д.10, стр. 3.

С диссертацией можно ознакомиться в читальном зале ФГБУ «ГНИЦ профилактической
медицины» Минздрава России (101990, г. Москва, Петроверигский пер., д. 10, стр. 3) и
на сайте www.gnicpm.ru

Автореферат разослан « ____ » _____ 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук

Киселева Наталия Васильевна

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.

a/г – антитела	DAPI – 4,6-диамино-2-фенилиндол
АФР – ангиогенный фактор роста	DMEM – среда Игла в модификации
α-ГМА – альфа-гладкомышечный актин	Дальбекко
ГАФД - глицерилальдегид-3- фосфатдегидрогеназа	EGM-2 – ростовая среда для эндотелиальных клеток
ГМК – гладкомышечные клетки	EGM-2MV – ростовая среда для микрососудистых эндотелиальных клеток
ДИ – доверительный интервал	FITC – флуоресцеина изотиоцианат
ИБС – ишемическая болезнь сердца	GFP – зеленый флуоресцентный белок
ИМ – инфаркт миокарда	Hb – гемоглобин
ИМТ – индекс массы тела	HIF – фактор, индуцируемый гипоксией
ИФА – иммуноферментный анализ	HGF – фактор роста гепатоцитов
К- – отрицательный контроль	HRE – элемент, чувствительный к гипоксии
кДНК – комплементарная ДНК	HUVEC – клетки эндотелия пупочной вены человека
КИНК – критическая ишемия нижних конечностей	ICAM-1 – межклеточная молекула адгезии-1
ЛЖ – левый желудочек	IL-8 – интерлейкин-8
мРНК – матричная РНК	К- – отрицательный контроль
ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения	MAP-киназы – митоген-активируемые протеинкиназы
пДНК – плазмидная ДНК	MCP-1 – хемоаттрактант моноцитов-1
ПЗ – поле зрения (микроскопа)	MR-proANP – срединный участок предшественника предсердного натрийуретического пептида
ПНА – передняя нисходящая артерия	NFκB – ядерный фактор каппа-B
ПЦР – полимеразная цепная реакция	NT-proBNP – N-концевой фрагмент предшественника мозгового натрийуретического пептида
СД 2 типа – сахарный диабет 2 типа	NYHA – Нью-Йоркская ассоциация сердца
ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания	pC4W – оригинальный плазмидный вектор на базе промотора цитомегаловируса
ФБС – фетальная бычья сыворотка	pсDNA3 – коммерческий плазмидный вектор на базе промотора цитомегаловируса
ФВ – фракция выброса	PGL3 – коммерческий репортерный вектор с геном люциферазы светлячка
ФК – функциональный класс	TIME – Т-иммортиализованные клетки микрососудистого эндотелия человека
ФСБ – фосфатно-солевой буфер	vs. – по сравнению
ХСН – хроническая сердечная недостаточность	VCAM-1 – молекула адгезии эндотелия-1
ЧСА – человеческий сывороточный альбумин	VEGF – эндотелиальный фактор роста сосудов
ЭК – эндотелиальные клетки	VEGFR – тирозинкиназный рецептор VEGF
Эхо-КГ – эхокардиография	
EA.hy926 – линейные клетки эндотелия человека	
bFGF – основной фактор роста фибробластов	
c-met – тирозинкиназный рецептор HGF	
СРБ – С-реактивный белок	
CD31 – кластер дифференцировки 31	
CD68 – кластер дифференцировки 68	

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

Актуальность темы. Ишемические заболевания (ИБС, КИНК, ОНМК) являются ведущими в структуре заболеваемости и смертности в развитых странах (Roger V, et al. 2012). Несмотря на расширение спектра медикаментозных и хирургических методов лечения, в настоящее время отсутствуют эффективные способы стимуляции роста сосудов (ангиогенеза) в тканях (Gupta R, et al. 2009). Усиление ангиогенеза является наиболее патогенетически оправданным методом лечения ишемических заболеваний, в основе которых лежит нарушение кровоснабжения тканей (Shimamura M, et al. 2013). Дополнительную актуальность разработкам в этой области придает наличие большой когорты пациентов с критическими стенозами крупных артерий, которым уже были выполнены операции шунтирования или ангиопластики с последующим развитием рестенозов, т.е. возможности хирургического и эндоваскулярного лечения оказались практически исчерпанными (Мжаванадзе Н.Д. и др. 2012; Jolicoeur E, et al. 2012).

Методы, направленные на стимуляцию ангиогенеза и защитных механизмов в ишемизированных тканях, получили название *терапевтического ангиогенеза*. Среди них наиболее перспективной считается *генная терапия* с локальной экспрессией АФР в тканях (Deveza L, et al. 2012). С 1998 г. в этой области были проведены масштабные клинические исследования, в которых для терапевтического ангиогенеза использовали гены VEGF165, bFGF, HGF (Isner J, et al. 1998; Талицкий К.А. и др. 2011; Швальб П.Г. и др. 2011; Morishita R, et al. 2012). Показано, что генная терапия является безопасным и хорошо переносимым методом терапевтического ангиогенеза, однако ее эффективность при ИБС и КИНК по ряду ключевых конечных точек оказалась значительно ниже ожидаемого (De Naro J, et al. 2009; Miao Y, et al. 2014). Одним из способов ее увеличения может являться комбинирование генов АФР для аддитивной стимуляции ангиогенеза (Arsic N, et al. 2003; Lee J, et al. 2007). При такой постановке задачи встает вопрос о плеотропных эффектах АФР, которые планируется использовать. Влияние АФР на процессы, сопутствующие ангиогенезу и, в частности на воспаление, может быть одним из факторов, определяющих эффективность разрабатываемого метода (van Amerongen M, et al. 2007).

Среди белков, обладающих ангиогенным действием, особый интерес вызывает так называемый «динамический дуэт» VEGF165 и HGF (Gerritsen M. 2005). Оба белка принимают участие в локальной и системной защите тканей при ишемии (Ueda H, et al. 2001; Matsudiarra K, et al. 2012), а при комбинированном воздействии способны потенцировать свои митогенные эффекты на ЭК и ГМК (Xin X, et al. 2001). Это указывает на возможность повышения эффективности терапевтического ангиогенеза за счет совместной экспрессии VEGF165 и HGF в ишемизированных тканях. Однако, эти два АФР характеризуются выраженной плеотропией, которая может влиять на эффективность их комбинированного применения, что определяет необходимость исследования механизмов их сочетанного влияния на процессы, связанные с ростом сосудов.

Цель исследования. Разработать метод терапевтического ангиогенеза, основанный на использовании сочетания генов VEGF165 и HGF, встроенных в

оригинальные плазмидные конструкции; изучить механизм совместного влияния этих факторов на ангиогенез и репаративные процессы в ишемизированном миокарде и скелетных мышцах на моделях ИМ и ишемии конечностей у экспериментальных животных.

Задачи исследования

1. Исследовать уровни VEGF165 и HGF в периферической крови больных ИБС с постинфарктной ХСН и сопоставить их с клиническими характеристиками пациентов и маркерами ХСН.

2. Оценить эффективность комбинированного введения плазмид с генами VEGF165 и HGF в восстановлении кровотока и стимуляции васкуляризации скелетных мышц на модели ишемии задней конечности у мыши.

3. Исследовать ангиогенную и тканепротективную эффективность комбинированного использования плазмид с генами VEGF165 и HGF на модели ИМ у крысы.

4. На культуре ЭК человека изучить молекулярные механизмы сочетанного влияния VEGF165 и HGF на процессы васкуляризации, для чего оценить активацию сигнальных каскадов, продукцию клетками хемокинов и активацию факторов транскрипции при совместном воздействии VEGF165 и HGF.

Научная новизна. Впервые показана корреляция уровня VEGF165 и натрийуретических пептидов в крови больных с постинфарктной ХСН, а также ассоциация увеличенного содержания HGF и развития ИБС. Впервые на клинически релевантных экспериментальных моделях ишемии конечности и ИМ показана возможность повышения эффективности терапевтического ангиогенеза за счет использования комбинации плазмид с генами VEGF165 и HGF. Изучена роль и механизм плеотропного влияния VEGF165 и HGF на активацию эндотелиальных клеток, моноцитарную инфильтрацию периинфарктной зоны и миокардиальный ангиогенез, индуцируемый комбинацией этих АФР.

Практическая значимость работы. Разработан новый метод терапевтического ангиогенеза, основанный на сочетанной экспрессии двух АФР – VEGF165 и HGF в ишемизированном миокарде и скелетных мышцах. Дана доклиническая оценка эффективности комбинации оригинальных плазмид, несущих эти АФР, на моделях ИМ и ишемии конечностей. Результаты работы могут быть положены в основу создания нового лекарственного средства для генной терапии ИБС и КИНК, представляющего собой плазмидную конструкцию с генами VEGF165 и HGF человека. Апробированные в работе оригинальные плазмидные конструкции, несущие оптимизированные последовательности генов VEGF165 и HGF человека, могут быть использованы для разработки на их основе препаратов для генной терапии других заболеваний, при которых повышенная продукция этих факторов роста в тканях-мишенях может оказывать терапевтический эффект.

Внедрение. Полученные результаты были использованы при выполнении государственных контрактов № 02.512.11.2203 «Разработка метода применения рекомбинантных генетических конструкций, экспрессирующих гены ангиогенных

факторов роста, для терапии заболеваний, обусловленных недостаточным кровоснабжением тканей и органов», №11.519.11.6042 «Идентификация новых молекулярно-генетических и клеточных биомаркеров отягощенного течения сердечной недостаточности при ее сочетании с метаболическими расстройствами» и №12411.1008799.13.179 «Доклинические исследования лекарственного средства на основе рекомбинантной плазмидной конструкции, несущей гены факторов роста, для лечения ишемических заболеваний». Результаты исследования были использованы при реализации международного проекта FP7/2007-2013 «Studies Investigating Comorbidities Aggravating in Heart Failure (SICA-HF)».

Апробация диссертации состоялась 7 сентября 2014 г. на совместном заседании кафедры биохимии и молекулярной медицины, лаборатории генных и клеточных технологий, лаборатории постгеномных технологий факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова и лаборатории ангиогенеза ФГБУ РКНПК Минздрава РФ.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 28 печатных работ (11 статей и 16 тезисов конференций) в отечественной и зарубежной печати, в т.ч. – 11 статей в журналах, включенных в перечень ВАК РФ, а также получен один патент на изобретение.

Основные положения, выносимые на защиту

– У больных ИБС и постинфарктной ХСН имеется повышение уровня VEGF165 и HGF в крови по сравнению со здоровыми добровольцами. При этом повышение содержания VEGF165 коррелирует с содержанием натрийуретических пептидов, а рост концентрации HGF ассоциирован с развитием ИБС. Данный факт может отражать напряжение компенсаторных механизмов, направленных на стимуляцию ангиогенных процессов и защиту ткани от ишемического стресса и повреждения.

– Комбинированная экспрессия VEGF165 и HGF в ишемизированной скелетной мышце мыши с помощью плазмидного вектора pC4W позволяет увеличить эффективность стимуляции как ангио- так и артериогенеза, улучшить восстановление кровотока в конечности и уменьшить ишемическое повреждение тканей конечности по сравнению с экспрессией только одного из этих факторов.

– Совместное введение в периинфарктную зону сердца крысы плазмид с генами VEGF165 и HGF позволяет более эффективно стимулировать ангиогенез, но не увеличивает эффективность влияния на артериогенез и уменьшение размера постинфарктного фиброза.

– Экспрессия VEGF165 и HGF разнонаправленно влияет на моноцитарную инфильтрацию периинфарктной зоны, играющую важную роль в миокардиальном артериогенезе, в результате чего при комбинированной экспрессии этих факторов HGF, вероятно, подавляет стимулирующее действие VEGF165 на таксис моноцитов, что может определять отсутствие усиления артериогенеза.

– VEGF165 и HGF обладают аддитивным действием на активацию в культивируемых эндотелиальных клетках внутриклеточных сигнальных каскадов - MAP-киназ ERK1/2 и p38, контролирующих их пролиферацию и миграцию, что может

быть одним из механизмов усиления ангиогенного эффекта при совместной экспрессии этих факторов в ишемизированных тканях.

– VEGF165 и HGF обладают разнонаправленным действием на активность NFκB и продукцию клетками эндотелия MCP-1, в результате чего при их комбинировании HGF подавляет VEGF165-индуцированный рост его секреции. Этот механизм может быть ответственен за уменьшение аккумуляции моноцитов в перинфарктной зоне и отсутствие аддитивного влияния на ангиогенез при сочетанной экспрессии VEGF165 и HGF.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа представлена на 171 странице компьютерной верстки и состоит из введения и четырех глав: обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения результатов, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературных источников, включающего 434 ссылки (9 отечественных и 325 иностранных). Работа проиллюстрирована 34 рисунками и 9 таблицами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

Группа больных ИБС и контрольная группа здоровых добровольцев

Критериями включения в группу больных ИБС являлись:

- Наличие установленного диагноза ИБС (ИМ в анамнезе) с развитием постинфарктной ХСН;
- Наличие хотя бы одного из следующих объективных критериев при скрининге:
 - ФВ ЛЖ $\leq 40\%$ по данным Эхо-КГ;
 - размер левого предсердия $>4,0$ см или $>2,5$ см/м роста;
 - уровень NT-proBNP >400 пг/мл;
- Возраст > 18 лет;
- Информированное согласие на участие в исследовании.

В исследование были включены 54 больных ИБС с постинфарктной ХСН. Среди включенных в исследование у 37/54 больных ранее была выполнена коронароангиография, подтвердившая диагноз ИБС.

В общей группе больных ИБС была выделена подгруппа из 25 пациентов, у которых имелся сопутствующий диагноз СД-2, отягощающий течение заболевания.

Критерии исключения: ИМ или ОНМК в течение 6 нед до включения в исследование; КИМК; беременность; потребность в гемодиализе или перитонеальном диализе; воспалительные заболевания сердца и перикарда, гипертрофическая или дилатационная кардиомиопатия; онкологическая патология в анамнезе; тяжелые сопутствующие заболевания; системные васкулиты; инфекционные заболевания; анемия (Hb <90 г/л).

Группу контроля составили 27 практически здоровых добровольцев, у которых по данным физикального обследования и нагрузочной пробы (тредмил-тест с ЭКГ) не было выявлено признаков нарушения кровоснабжения миокарда в виде значимой динамики

сегмента ST или ангинозных болей, а также не выявлено нарушения толерантности к глюкозе и других метаболических расстройств.

Все включенные в исследование предоставляли письменное согласие на обработку образцов крови и данных обследования.

Инструментальные и лабораторные методы исследования

Забор материала и получение образцов плазмы и сыворотки. Взятие крови в количестве 10-12 мл проводилось натощак методом венепункции с использованием системы Vacutainer, заполненной стабилизирующим агентом или разделительным гелем для получения плазмы или сыворотки соответственно. Для получения плазмы пробирка со центрифугировалась при 1000 g в течение 10 мин, после чего супернатант отбирался в аликвоты по 300 мкл и замораживался. Для получения сыворотки пробирки с собранной кровью инкубировались в течение 30 мин при комнатной температуре, после чего сгусток осаждался центрифугированием и сыворотка разделялась на аликвоты по 300 мкл. Хранение образцов осуществлялось при температуре -80°C.

Эхо-КГ и оценка ФК ХСН. Оценку структурно-функционального состояния сердца выполняли методом трансторакальной Эхо-КГ с использованием ультразвуковой системы iE 33 (Philips, Нидерланды). В ходе ультразвукового исследования определяли структурно-морфологические параметры сердца, а также рассчитывали ФВ ЛЖ (по Симпсону), которую использовали в качестве одного из критериев включения в исследование. Определение ФК ХСН выполняли с помощью теста с 6-минутной ходьбой с дальнейшей классификацией по NYHA.

Клинико-лабораторные методы исследования. Индекс массы тела для всех обследованных рассчитывали стандартным способом по формуле:

$$\text{ИМТ} = \text{Вес (кг)} / \text{Рост}^2 \text{ (м)}$$

Лабораторное исследование включало стандартный биохимический анализ крови (общий холестерин и его фракции, Hb, ферменты печени и др.).

Состояние углеводного обмена оценивали по уровню тощачковой глюкозы и гликированного гемоглобина (HbA1c), измеренного иммунотурбидиметрическим методом; уровень мочевой кислоты был определен колориметрическим методом; содержание СРБ – методом твердофазной ИФА.

Определение сывороточного уровня NT-proBNP и MR-proANP выполняли методом ИФА с помощью соответствующих наборов реактивов на приборе Roche Elecsys 2010 (Roche, Швейцария).

Молекулярные и биохимические методы

Определение факторов роста и хемокинов методом ИФА. Содержание VEGF165 и HGF в образцах среды, плазмы и сыворотки, а также в гомогенатах тканей определяли с использованием наборов Quantikyne (R&D Systems, США). Содержание MCP-1 и IL-8 в средах с ЭК измеряли с применением наборов OptEIA (BD, США).

Плазмидные векторы и оптимизация кДНК. Полученные методом ПЦР кДНК человеческих VEGF165 и HGF были клонированы в оригинальную плазмиду pC4W с получением pC4W-VEGF165 и pC4W-HGF. Оптимизация заключалась в замене редких

кодонов на частые и удалении сигнала полиаденилирования мРНК с получением рС4W-VEGF165opt и рС4W-HGFopt.

Репортерные плазмиды с зависимой и конститутивной экспрессией люцифераз. Для определения активности НИФ использовали плазмиду PGL3 с геном люциферазы светлячка и шестью сайтами связывания НИФ (pHRE-LUC). Для определения активации промотора гена IL-8 он был клонирован в PGL3 с получением pro_IL8-LUC.

Выделение мРНК, реакция обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени. Для выделения мРНК из клеток использовали набор RNeasy Miniprep Kit (Qiagen, Германия). Выделенную мРНК использовали для синтеза кДНК (RevertAid Kit, Fermentas, Латвия). Для ПЦР в реальном времени использовали реагенты фирмы «Синтол» (Россия); накопление продукта определяли на приборе Applied Biosystems (США). С помощью специфических пар праймеров оценивали экспрессию VCAM-1 и ICAM-1 с нормализацией по β -актину и ГАФД.

Электрофорез белков в полиакриламидном геле и иммуноблоттинг. Белки, содержащиеся в лизатах клеток, разделяли при помощи электрофореза. После переноса и блокирования (1 ч, 5% обезжиренное молоко) мембрану окрашивали первичными (1 ч) и вторичными (40 мин) а/т. Детекцию осуществляли с помощью субстрата ECL (Amersham Biosciences, США), сигнал фиксировали на Kodak Digital Camera (Kodak, США) и обрабатывали денситометрическим способом.

Цитологические методы

Культура эукариотических клеток. В работе использованы первичные клетки эндотелия пупочной вены (HUVES), иммортализованные клетки микрососудистых ЭК (TIME) и линейные ЭК (EA.hy926) человека. Клетки культивировали при стандартных условиях ($T=37^{\circ}\text{C}$; 5% CO_2). Для EA.hy926 использовали среду DMEM/10% ФБС (Gibco, США). HUVES и TIME содержали в средах EGM-2 и EGM-2MV (Lonza, Швейцария) на чашках, покрытых желатином.

Трансфекция клеток с помощью Lipofectamine 2000. Для трансфекции EA.hy926 высаживали на 24-луночный планшет в DMEM/10% ФБС и трансфицировали с использованием Lipofectamine 2000 (Invitrogen, США) по протоколу производителя с соотношением пДНК/Lipofectamine 2:1. Через 24 ч после нанесения липосомальных комплексов среду заменяли на свежую.

Определение активности люцифераз с использованием специфических субстратов. Для определения активности люцифераз в ЭК, трансфицированных репортерными конструкциями, использовали набор Dual Luciferase Reporter Detection (Promega, США) по протоколу производителя. Сигнал считывали на люминометре Victor X3 со временем экспозиции 2-5 сек.

Стимуляция клеток эндотелия человека рекомбинантными VEGF165 и HGF. По достижении HUVES или TIME 80% конfluence на 6-луночном планшете их депривировали 4 ч и в соответствующие лунки вносили стерильный ЧСА, VEGF165, HGF (по 25 нг/мл) или VEGF165+HGF (по 12,5 нг/мл). Через 4, 6 или 12 ч среду собирали для ИФА, клетки отмывали и лизировали нагретым до 95°C буфером Лэммли (150 мкл) или буфером из состава набора для выделения мРНК.

Испытания терапевтической эффективности на животных моделях ишемических заболеваний

Экспериментальные животные. Для модели ишемии задней конечности использовали самцов мыши C57/B6 (8–10 нед). Для модели ИМ использовали самцов крысы Wistar (250 г). Все манипуляции выполняли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» ФГБУ РКНПК.

Модель ишемии задней конечности, инъекция плазмид в скелетные мышцы и низковольтовая электропорация. В работе была использована модель ишемии задней конечности у мыши (Couffignal T, et al. 1998). Операцию выполняли под наркозом (авертин интраперитонеально, 300 мкл 2,5% р-ра): в левой бедренной области производили разрез по линии проекции *a. femoralis*. Бедренную артерию и ее ветви выделяли в дистальной части и перевязывали нитью 6–0 проксимальнее подколенной бифуркации, после чего иссекали. Рану ушивали шелком 4–0 непрерывным швом. Стерильные р-ры пДНК в 100 мкл 0,9% NaCl вводили в *m. tibialis anterior* однократно с помощью инсулинового шприца. Были сформированы 4 группы эксперимента (n=9–10/группе): отрицательного котроля (пустая pC4W, 100 мкг) «VEGF» (pC4W-VEGFopt, 100 мкг), «HGF» (pC4W-HGFopt, 100 мкг) и «VEGF+HGF» (комбинация двух плазмид в соотношении 1:1). Для повышения эффективности трансфекции был использован метод низковольтовой электропорации.

Лазерная доплерография. Для оценки кровотока на подошвенной поверхности задних конечностей мышей использовали лазер–доплеровский сканер (LDI, Moor, Великобритания). Измерения выполняли после операции и затем 1 раз в 7 сут до 21 сут включительно.

Модель ИМ у крысы и внутримиекардиальное введение растворов плазмид. Операцию выполняли под наркозом (золетил 30 мг/кг интраперитеально) с вентилляторной поддержкой. Через продольный разрез по передней срединной линии обнажали наружную поверхность межреберных мышц. Далее производили разрез по ходу IV межреберья и сердце выводили в рану. Перевязку ПНА производили шелковой лигатурой (шелк 3-0). Зона развивающегося ИМ отличалась по цвету и имела бледный или темно-бордовый цвет. По периферии развивающегося ИМ с помощью инсулинового шприца 4-мя равными инъекциями вводили р-ры pC4W-VEGFopt, pC4W-HGFopt (250 мкг в 250 мкл) или их комбинацию в соотношении 1:1 (250+250 мкг в 250 мкл) формированием групп по аналогии с опытом на модели ишемии задней конечности (n=4-5/группе). Сердце возвращали в грудную полость, разрез ушивали, и после возобновления самостоятельного дыхания животных помещали в клетки.

Гистологическая оценка эффектов пДНК и микроскопические методы

Гомогенизация тканей и детекция АФР человека с помощью ИФА. Образцы *m. tibialis anterior* мышцы и перинфарктной зоны ЛЖ крысы выделяли на 3 сут после введения пДНК, помещали в ступку на жидком N₂ и добавляли экстракционный буфер. Ткань размалывали пестиком, собирали и нагревали до 37°C. Гомогенат центрифугировали, а супернатант использовали для определения VEGF165 и HGF человека методом ИФА.

Подготовка тканей и замороженных срезов. Образцы мышц и миокарда замораживали в среде Tissue-Tek (Sakura, Япония) в парах жидкого азота; гистологический анализ проводили на замороженных срезах толщиной 7 мкм.

Иммунофлуоресцентное окрашивание и подсчет сосудов. Срезы фиксировали 4% формальдегидом, отмывали ФСБ и после блокировки окрашивали 1 ч FITC-мечеными а/т vs. α -ГМА мыши или крысы (1:50), немечеными а/т кролика vs. CD31 мыши или крысы (1:100) или а/т мыши vs. CD68 крысы (1:100). После отмывки ФСБ срезы на 1 ч помещали в р-р вторичных а/т (1:800). После докраски DAPI препараты заключали под покровные стекла. Для каждого среза получали по 5 ПЗ, на которых вручную подсчитывали CD31+ и α -ГМА+ структуры.

Анализ размеров постинфарктного кардиосклероза на срезах миокарда, окрашенных по Мэллори. После фиксации в ледяном ацетоне (20 мин) стекла высушивали и на 2 мин погружали в р-р кислого фуксина, споласкивали дистиллятом и переносили на 2 мин в 1% фосфорномолибденовую кислоту. После этого стекла споласкивали дистиллятом и на 15 мин погружали в краситель Мэллори. По истечении времени инкубации срезы отмывали, обезвоживали и заключали под покровные стекла. Препараты ЛЖ фотографировали с полным охватом срезов и затем в программном пакете Metamorph (UIC, США) оценивали площади рубца и жизнеспособной ткани ЛЖ. Для анализа использовали не менее 6 срезов с каждого препарата.

Окраска гематоксилином–эозином и морфометрический анализ площади некроза. Срезы фиксировали 4% формальдегидом, промывали в ФСБ, ополаскивали дистиллятом и инкубировали в гематоксилине 1 мин. Для дифференцировки срезы промывали водопроводной водой, затем погружали в эозин В на 3 мин. Далее срезы проводили по спиртам и заключали под покровными стеклами. После получения микрофотографий в программном пакете Metamorph оценивали площадь некроза, которую выражали в % от площади среза. Критериями некроза являлись разрушение волокон, кариолизис и резко выраженная инфильтрация клетками воспаления.

Использованное оборудование и программные пакеты. Препараты анализировали на микроскопе Axiovert 200M (Zeiss, Германия). Документирование и обработку снимков производили с помощью камеры AxioCam HRC (Zeiss, Германия) в программе Axiovision 3.1 (Zeiss, Германия)

Статистический анализ результатов

Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение или стандартная ошибка среднего. Обработку результатов выполняли в Statsoft Statistica 6.0. Распределение параметров оценивали с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Для оценки значимости использовали t–критерий Стьюдента или U–критерий Манна–Уитни для выборок с Гауссовым или непараметрическим распределением. При сравнении нескольких групп или подгрупп использовали дисперсионный анализ или метод Крускала-Уоллиса. Для многофакторного анализа использовали логистическую регрессию с бинарным откликом. Значимыми считали отличия с $p < 0,05$ (при необходимости вводили поправку Бонферрони).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Характеристика групп исследования и анализ содержания АФР в крови больных ИБС. При клинико-демографическом анализе больные ИБС оказались значимо старше по сравнению со здоровыми добровольцами, включенными в исследование. У больных ИБС были значимо выше показатели ИМТ, уровень тощачевой глюкозы, Hb A1c и СРБ – маркера воспаления, сопровождающего атеротромбоз и метаболические расстройства, был значимо выше в группе ИБС. У пациентов с ИБС было выявлено сниженное по сравнению со здоровыми добровольцами содержание холестерина, что может быть обусловлено гиполипидемической терапией (таблица 1).

Таблица 1

Клинико-демографическая характеристика и основные данные биохимического профиля в группах исследования

Показатель	Здоровые добровольцы (n=27)	ИБС (n=54)	Значение p (χ^2 или t-тест)
Возраст, лет	52,5±9,0	59,9±8,3	0,001
Соотношение М/Ж	20:7 (2,85:1)	45:9 (5:1)	0,32
ИМТ, кг/м ²	27,8±4,1	30,8±4,7	0,02
Глюкоза, ммоль/л	5,2±0,47	7,7±3,7	0,001
Общий холестерин, ммоль/л	5,0±0,93	4,7±1,3	0,01
СРБ, мг/л	0,12±0,09	0,36±0,28	0,03
Мочевая к-та, мкмоль/л	337,3±62,6	354,9±86,6	0,49
Hb A1c, %	5,5±0,26	6,8±1,5	0,001
ФВ, %	61,9±5,65	35,2±4,3	0,001
ФК ХСН (по NYHA)	-	I (n=3); 5,6% II (n=34); 62,9% III (n=17); 31,5%	-

При анализе содержания VEGF165 и HGF в крови больных ИБС было выявлено значимое увеличение их уровня по сравнению со здоровыми добровольцами (таблица 2).

Таблица 2

Показатели содержания VEGF165 и HGF в крови больных ИБС и здоровых добровольцев

Показатель	Контроль (n=27)	ИБС (n=54)	p (t-тест)
VEGF165, пг/мл	167,3±103,4	272,1±185,2	0,02
HGF, пг/мл	386,18±121,8	631,3±196,8	0,00002

Корреляционный анализ выявил средней силы положительную связь между содержанием VEGF165 и уровнем натрийуретических пептидов. Коэффициенты r^2 для пар VEGF165–MR-proANP и VEGF165–NT-proBNP равнялись 0,37 и 0,36 соответственно ($p < 0,05$).

Из основной группы больных ИБС дополнительно была выделена подгруппа с наличием СД-2, отягощающего течение заболевания. В этой подгруппе было значимо больше пациентов с III ФК ХСН и значимо меньше с I ФК ХСН по сравнению с больными ИБС без СД-2, что отражало более тяжелое течение заболевания при наличии коморбидной патологии.

В подгруппе ИБС и СД-2 также были значимо выше показатели ИМТ, содержания мочевого к-ты, уровня Hb A1c и тощачковой глюкозы (таблица 3).

Таблица 3

Сравнительная характеристика подгрупп больных с ИБС и ИБС+СД-2

Показатель	ИБС (n=30)	ИБС+СД-2 (n=24)	Значение p (χ^2 или t-тест)
Возраст, лет	58,9±8,6	59,9±8,2	0,99
Соотношение М/Ж	26:4 (6,5:1)	19:5 (3,8:1)	0,46
ИМТ, кг/м ²	29,1±4,3	32,9±4,4	0,003
Глюкоза, ммоль/л	5,5±0,74	10,7±4,11	0,00001
Общий холестерин, ммоль/л	4,5±1,3	4,8±1,3	0,50
СРБ, мг/л	0,36±0,19	0,37±0,21	0,94
Мочевая к-та, мкмоль/л	334,8±73,0	385,0±98,3	0,05
Hb A1c, %	6,02±0,43	8,0±1,7	0,00001
ФВ, %	35,5±3,5	35,2±4,3	0,65
ФК ХСН (по NYHA)	I (n=3); 10,0% II (n=20); 66,6% III (n=7); 23,4%	I (n=0); 0% II (n=11); 45,8% III (n=13); 54,2%	0,017 0,12 0,02

При анализе подгруппы больных ИБС+СД-2 была выявлена тенденция к повышению уровня VEGF165 по сравнению с больными без СД-2 (304,6±184,0 пг/мл vs. 252,9±174,4 пг/мл соответственно), которая не достигала значимости (p=0,08). Уровень HGF у пациентов с сочетанием ИБС+СД-2 был значимо выше, чем у больных ИБС без диабета и составил 733,3±205,5 пг/мл vs. 562,14±158,3 пг/мл соответственно (p=0,002).

Регрессионный анализ показал, что среди включенных в модель факторов значимые показатели статистики Вальда были получены для возраста, ИМТ и уровня HGF в крови (таблица 4). Для VEGF165 статистическая значимость не была достигнута (p=0,24) несмотря на повышение его содержания у больных ИБС.

Таблица 4

Данные регрессионного анализа факторов, ассоциированных с ИБС

Показатель	Wald χ^2	Отношение шансов (95% ДИ)	Значение p
Возраст, лет	6,8	1,0953 (1,021-1,174)	0,01
Пол	1,51	0,464 (0,139-1,542)	0,21
ИМТ, кг/м ²	6,0	1,1779 (1,031-1,345)	0,01
HGF, пг/мл	25,9	1,0122 (1,005-1,019)	0,0016
VEGF165, пг/мл	6,18	1,0031 (0,9979-1,008)	0,24

Если связь возраста и ИМТ с формированием ИБС хорошо известна, то ассоциация уровня HGF с развитием ССЗ была показана впервые. Невысокое отношение шансов для HGF связано с тем, что оно является экспоненциальной функцией коэффициента регрессии и отражает увеличение вероятности в ответ на прирост уровня HGF на 1,0 пг/мл. Следует отметить, что полученные данные должны быть подтверждены в исследованиях с проспективным дизайном.

При анализе с использованием “дерева классификации” были выделены подгруппы с превалированием больных ИБС или здоровых добровольцев и определены дискриминирующие уровни HGF, характерные для этих подгрупп, которые на рисунке 1 обозначены 2.1-2.3.

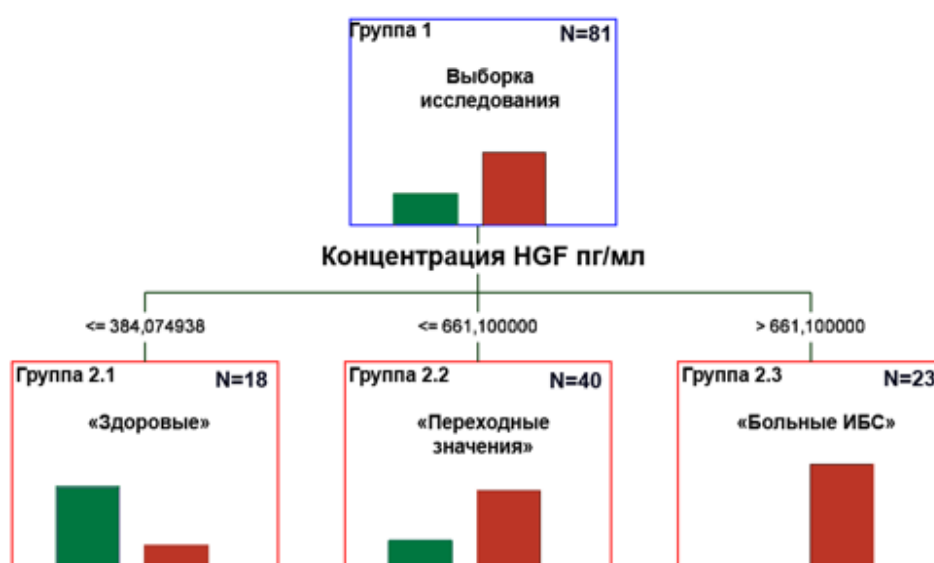


Рис. 1 – Дерево классификации подгрупп в зависимости от содержания HGF в крови и соотношения «здоровые/больные ИБС».

Примечание: Столбцы отражают количество больных ИБС (красные) и здоровых лиц (зеленые).

В подгруппе 2.1 с низким содержанием HGF ($\leq 384,1$ пг/мл) превалировали здоровые лица ($n=14$), а больные ИБС ($n=4$) были в меньшинстве. В подгруппе 2.2 с промежуточными значениями содержания HGF ($348,1-661,1$ пг/мл) отмечалась тенденция к превалированию больных ИБС ($n=30$) по сравнению со здоровыми лицами ($n=10$). Наконец, подгруппа 2.3 полностью состояла из больных ИБС ($n=23$) и отличалась высоким уровнем HGF ($>661,1$ пг/мл). По результатам анализа предложено дискриминирующее значение уровня HGF в периферической крови ($>661,1$ пг/мл), которое было характерно для больных ИБС. Необходимо подчеркнуть, что анализ выявил статистическую ассоциацию факторов с развитием ССЗ, которая требует верификации в проспективных исследованиях.

Обнаруженное увеличение содержания VEGF165 связывают с его участием в защите от тканевой гипоксии, сопровождающей ИБС, ИМ и последующее снижение ФВ. Продукция VEGF165 кардиомиоцитами, ЭК и ГМК является механизмом поддержания гомеостаза, как и увеличение содержания натрийуретических пептидов,

что объясняет выявленную корреляцию этих показателей. Рост содержания HGF связывают с его участием в ответе на повреждение миокарда, причем не только у больных с признаками ИБС или ХСН, но и на ранних этапах атеросклероза коронарных сосудов. В пользу этого говорят данные о способности HGF подавлять апоптоз кардиомиоцитов и мобилизовать резидентные стволовые клетки сердца при ишемии. Более высокое содержание HGF у больных ИБС с коморбидным СД 2 типа также относят к компенсаторным реакциям, так как показано участие HGF в нормализации чувствительности тканей к инсулину и его противовоспалительные свойства.

Участие исследованных АФР в защите тканей при ишемии позволяет предположить, что доставка VEGF165 и HGF позволит компенсировать “локальный дефицит” этих АФР, а их комбинирование способно дополнительно активизировать ангиогенез и защитить ткани от повреждения.

Анализ продукции человеческих VEGF165 и HGF при их введении в ткани животных. Ключевым при разработке методики комбинированной доставки является обнаружение белка в тканях *in situ*. Для этого концентрация человеческих АФР была измерена в гомогенатах скелетных мышц и миокарда, взятых на 3 сут после введения животным пДНК с генами VEGF165 и HGF или их смеси в соотношении 1:1. Оказалось, что при комбинированной доставке генов АФР концентрация белков сопоставима с введением одиночных плазмид, что позволило использовать данный метод при дальнейших испытаниях на животных моделях (рисунок 2).

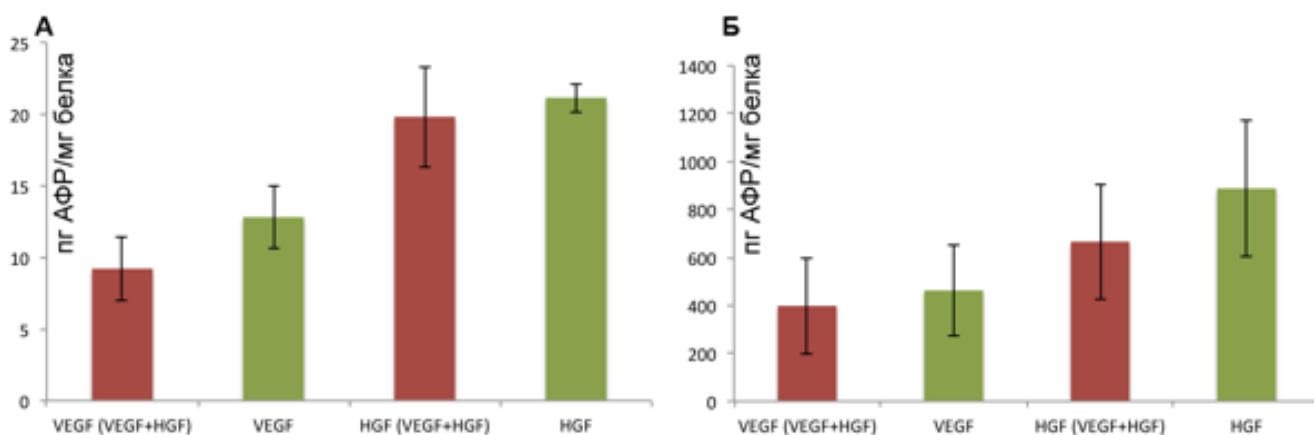


Рис. 2 – Концентрация VEGF165 и HGF человека в гомогенатах миокарда ЛЖ крысы (А) и скелетной мышцы (Б).

Примечание: красным выделены образцы с комбинированным введением пДНК

Исследование терапевтической эффективности комбинации VEGF165 и HGF на животных моделях ишемии задней конечности и ИМ. В опыте на модели ишемии задней конечности было установлено, что введение одиночных плазмид с генами VEGF165 или HGF имело сопоставимую эффективность в плане восстановления кровотока, которое достигало 50-55% (группы «VEGF» и «HGF»), что было значительно выше, чем средний показатель у животных, которым вводили пустую pC4W. При введении смеси плазмид (группа «VEGF+HGF») восстановление кровотока к 21 сут

достигало 70%, что было значимо выше, чем после введения одиночных конструкций (рисунок 3).

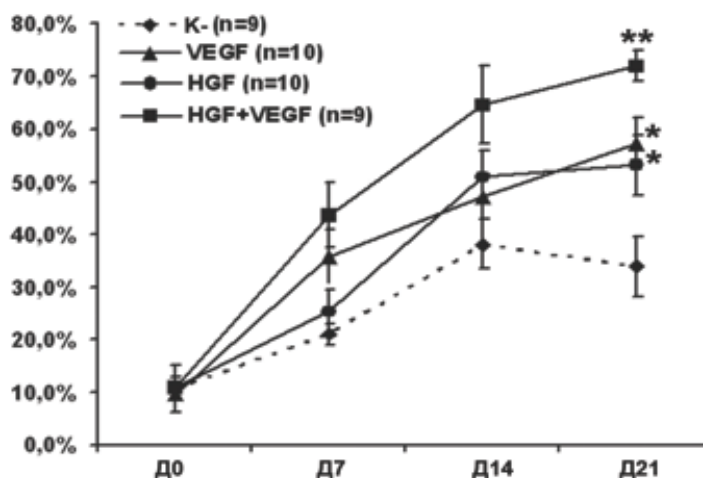


Рис. 3 – Кривые восстановления кровотока в ишемизированной задней конечности мыши после введения плазмид pC4W-VEGFopt, pC4W-HGFopt или их комбинации.

Примечание: * $p < 0,05$ vs. «К-» (пустая pC4W); ** $p < 0,025$ vs. «VEGF» или «HGF» (критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони);

Уменьшение некроза является важным показателем эффективности генной терапии. При анализе образцов скелетной мышцы было обнаружено, что экспрессия в ней как VEGF165, так и HGF приводила к уменьшению распространенности некроза, вызванного ишемией. Минимальная площадь некроза на срезах тканей была отмечена в группе комбинации VEGF165 и HGF (рисунок 4).

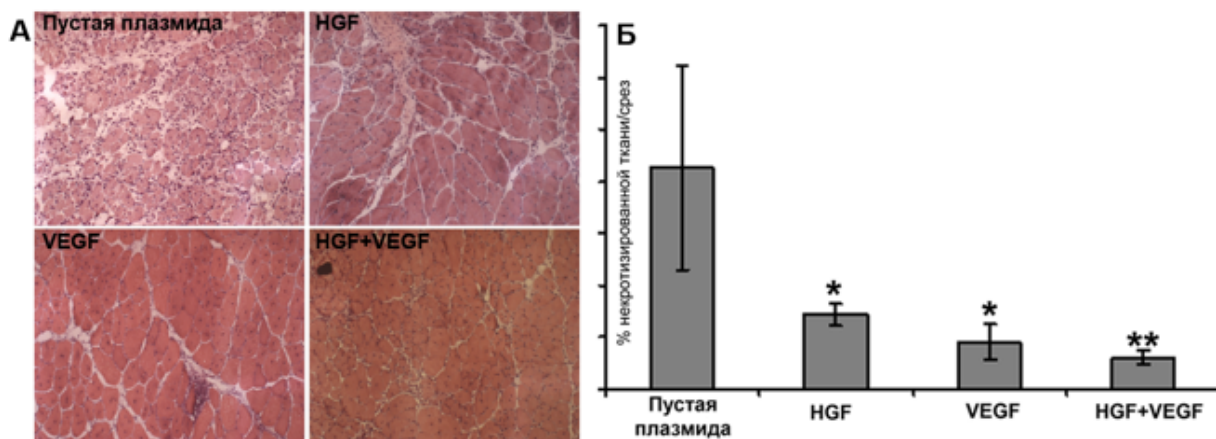


Рис. 4 – Влияние комбинированной генной терапии на размер некроза ишемизированных скелетных мышц.

Примечание: (А) микрофотографии скелетных мышц; увеличение $\times 100$ и (Б) показатели площади некроза на срезе (%); * $p < 0,05$ vs. "Пустая плазмида" ** $p < 0,025$ vs. «VEGF» или «HGF» (критерий Манна-Уитни).

Гистологический анализ скелетных мышц выявил усиление ангио- и артериогенеза в группах «VEGF» и «HGF»; наиболее высокие показатели плотности капилляров и артериол были отмечены в группе «VEGF+HGF». Введение одиночных плазмид с генами VEGF165 и HGF также обладало значимым ангиогенным эффектом по сравнению с пустым вектором pC4W, однако максимальная плотность как капилляров, так и артериол наблюдалась после сочетанной экспрессии АФР (таблица 5).

Таблица 5

Данные анализа плотности сосудов на срезах скелетных мышц

Группа	α -ГМА+ (n/ПЗ)	p vs. pC4W	CD31+ (n/ПЗ)	p vs. pC4W
К-	1,31±0,15	-	322,4±44,9	-
«VEGF»	1,86±0,19	0,03	364,2±53,0	0,0001
«HGF»	1,78±0,21	0,001	354,6±25,0	0,002
«VEGF+HGF»	2,61±0,18	0,001	477,2±75,6	0,0001

При оценке площади постинфарктного фиброза миокарда было выявлено ее статистически значимое уменьшение у животных из групп «VEGF» или «HGF». В группе «VEGF+HGF» площадь фиброза ЛЖ также была ниже, причем в К-, но не отличалась от групп с введением одиночных плазмид (рисунок 5).

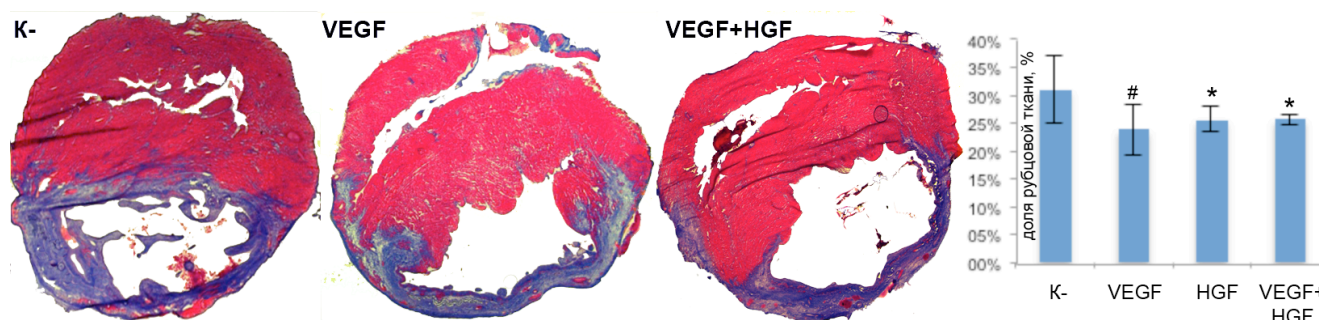


Рис. 5 – Микрофотографии срезов миокарда крысы, окрашенных по Мэллори и оценка размер фиброза ЛЖ.

Примечание: зона фиброза имеет голубоватый оттенок, ткань миокарда окрашена в красный цвет; увеличение x200; (n=4 в группе; U-критерий Манна-Уитни); # p<0,01; *p<0,05 vs. К-

Ангиогенный эффект введения плазмид в периинфарктную зону оценивали путем подсчета плотности капилляров. На 14 сут в группах «VEGF» и «HGF» отмечалась их более высокая плотность по сравнению с К-, а в группе комбинированной экспрессии АФР плотность капилляров была значимо выше по сравнению с одиночными плазмидами. Подсчет артериол показал, что их плотность значимо превышала показатель контрольных животных только в группах «VEGF» или «VEGF+HGF». При этом в группе «HGF» плотность артериол от К- значимо не отличалась (рисунок 6).

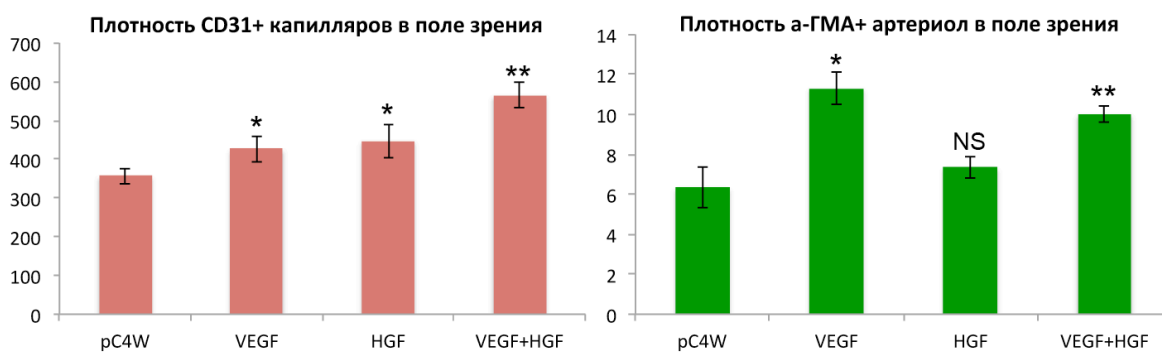


Рис. 6 – Результаты оценки плотности сосудов в периинфарктной зоне миокарда крысы.

Примечание: представлены средние ± стандартная ошибка среднего (n=4 в группе); t-критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони: *p<0,05 vs. «pC4W»; **p<0,025 vs. «VEGF» или «HGF»; NS – незначимое отличие (p=0,27).

Анализ моноцитарной инфильтрации периинфарктной зоны показал, что на 3 сут в группе «VEGF» наблюдалось значимое увеличение количества CD68+ клеток по сравнению с К-. В группе «HGF» плотность моноцитов была ниже, чем в К-, т.е. было выявлено разнонаправленное действие АФР на аккумуляцию CD68+ клеток в периинфарктной зоне. Введение смеси плазмид вызывало снижение моноцитарной инфильтрации по сравнению с группой «VEGF» за счет подавляющего эффекта HGF (рисунок 7).

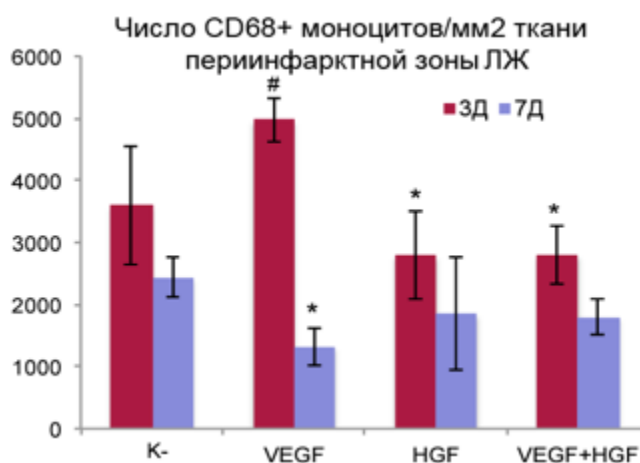


Рис. 7 – Результаты оценки инфильтрации периинфарктной зоны моноцитами.

Примечание: приведены данные на 3 и 7 сут (n=4 в группе), t-критерий Стьюдента; # p<0,05 (значение выше К-); * p<0,05 (значение ниже К-).

Выявленные изменения количества моноцитов коррелировали с данными оценки ангиогенного эффекта АФР и их комбинации, что соотносится с ключевой ролью этого типа клеток в миокардиальном ангиогенезе.

Изучение молекулярных механизмов реализации эффектов комбинации VEGF165 и HGF на ЭК человека. Исследование активации MAP-киназ, задействованных в передаче сигналов от VEGFR2 и c-met, показало, что стимуляция HUVEC комбинацией VEGF165 и HGF вызывает усиление фосфорилирования ERK1/2 и p38 (рисунок 8).

Последние регулируют пролиферацию и миграцию ЭК, а усиление их активации под действием комбинации АФР коррелировало с аддитивным действием на ангиогенез, наблюдавшимся на животных моделях.

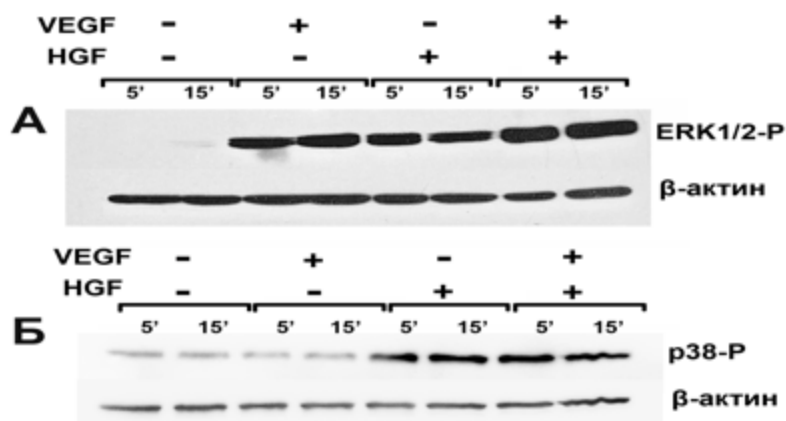


Рис. 8 – Ауторадиограммы мембран, окрашенных антителами к фосфорилированным формам ERK1/2 (А) и p38 (Б).

Анализ образцов сред, собранных с ЭК, стимулированных VEGF165, HGF или их комбинацией показал, что АФР модулируют продукцию двух ключевых хемокинов – MCP-1 и IL-8. В отношении MCP-1 факторы обладали разнонаправленным действием, а их комбинирование вызывало подавление VEGF-индуцированной продукции MCP-1 за счет влияния HGF. При этом для IL-8 оба белка обладали стимулирующим действием с аддитивным эффектом при комбинировании (рисунок 9).

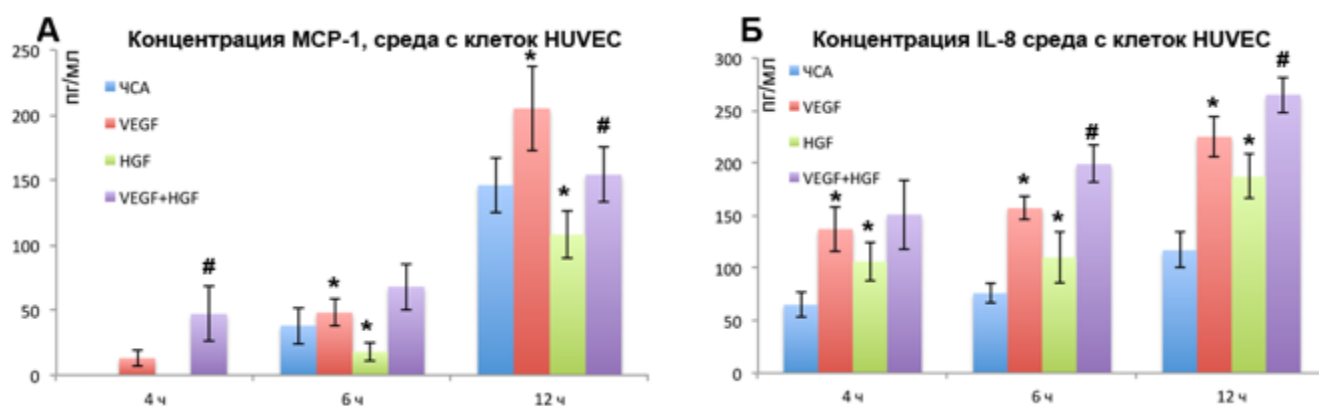


Рис. 9 – Изменения содержания MCP-1 (А) и IL-8 (Б) в среде культивирования при стимуляции ЭК рекомбинантными VEGF165, HGF или их комбинацией.

Примечание: для MCP-1: * $p < 0,05$ vs. ЧСА; # $p < 0,05$ vs. VEGF165; Для IL-8: * $p < 0,05$ vs. ЧСА; # $p < 0,05$ vs. VEGF165 и HGF; t-критерий Стьюдента

ПЦР анализ стимулированных ЭК показал схожие изменения экспрессии молекул адгезии ICAM-1 и VCAM-1. Под влиянием VEGF165 экспрессия ICAM-1 и VCAM-1 росла, а при добавлении к ЭК человеческого HGF происходило подавление экспрессии обеих молекул адгезии. Комбинирование факторов приводило к умеренному росту содержания экспрессии ICAM-1 и VCAM-1 из-за разнонаправленного действия АФР.

Таким образом, плеотропное влияние АФР на активацию ЭК и инвазию моноцитов в перинфарктную зону оказалось фактором, влияющим на эффективность миокардиального ангиогенеза под действием комбинации VEGF165 и HGF.

Анализ активности NFκB – фактора транскрипции, контролирующего экспрессию генов хемокинов и молекул адгезии, также показал, что VEGF165 и HGF обладают разнонаправленным действием на его активность. При инкубации HUVEC с VEGF165 происходило повышение активности NFκB, а под влиянием HGF – снижение. Под воздействием двух факторов в ЭК отмечалось уменьшение активирующего действия VEGF165 на NFκB. Выявленные изменения согласовывались с данными литературы о наличии у VEGF165 провоспалительного, а у HGF – противовоспалительно действия и их способности разнонаправленно модулировать адгезию лейкоцитов к ЭК.

Модуляция активности NFκB при этом не объясняет аддитивный характер действия сочетания VEGF165 и HGF на продукцию IL-8. Среди возможных факторов транскрипции, опосредующих влияние комбинации АФР, внимание привлекли HIF, участвующие в ангиогенезе и контролирующие экспрессию IL-8. Репортерный анализ в культуре EA.hy926 показал, что стимуляция VEGF165 и HGF обладает аддитивным действием на активность как HIF, так и промотора гена IL-8 (рисунок 10).

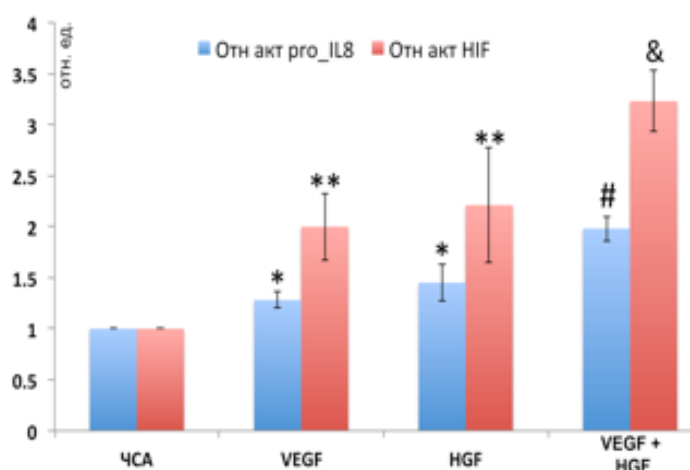


Рис. 10 – Оценка активности HIF и промотора гена IL-8 в ЭК после стимуляции VEGF165, HGF или их комбинацией.

Примечание: U-критерий Манна-Уитни; * $p < 0,05$ vs. ЧСА; ** $p < 0,01$ vs. ЧСА; # $p < 0,025$ vs. VEGF или HGF; & $p < 0,025$ vs. VEGF или HGF

Влияние АФР на HIF может быть реализовано за счет активности MAP-киназ и, в том числе, ERK1/2 и p38, аддитивная стимуляция которых была показана под действием сочетания VEGF165 и HGF. Таким образом, стимулирующее действие исследованных АФР и их комбинации на продукцию IL-8 клетками эндотелия может быть опосредовано факторами транскрипции из семейства HIF. Наблюдавшееся усиление ангиогенного действия VEGF165 и HGF при их комбинировании может быть связано с тем, что этот хемокин обладает собственным ангиогенным действием на ЭК и активирует таксис лейкоцитов, задействованных в регуляции ангиогенеза.

ВЫВОДЫ.

1. Содержание VEGF165 и HGF повышено в крови больных ишемической болезнью сердца с постинфарктным кардиосклерозом и хронической сердечной недостаточностью в сравнении со здоровыми людьми; содержание VEGF165 положительно коррелирует с концентрацией маркеров тяжести хронической сердечной недостаточности (pro-BNP и MR-ANP), а повышение HGF ассоциировано с сопутствующим сахарным диабетом 2 типа. При многофакторном регрессионном анализе выявлена ассоциация повышения HGF с наличием ишемической болезни сердца.

2. Сочетанная экспрессия VEGF165 и HGF в ишемизированных мышцах задней конечности мыши более эффективно восстанавливает кровоток, стимулирует ангио- и ангиогенез и уменьшает некроз по сравнению с введением каждого из этих факторов по отдельности, что указывает на возможность повышения эффективности генной терапии ишемии конечностей с помощью комбинированного введения плазмид с этими факторами роста.

3. Сочетанная экспрессия VEGF165 и HGF в перинфарктной зоне миокарда крысы более эффективно стимулирует ангиогенез, но не обладает аддитивным действием на ангиогенез и уменьшение размера инфаркта.

4. Экспрессия VEGF165 и HGF разнонаправленно влияет на аккумуляцию моноцитов в перинфарктной зоне: VEGF165 ее стимулирует, а HGF – подавляет, при этом сочетанная экспрессия нивелирует стимулирующий эффект VEGF165. Характер изменения моноцитарной инфильтрации под влиянием VEGF165, HGF и их комбинации соотносится с характером их влияния на ангиогенез в перинфарктной зоне миокарда.

5. Стимуляция эндотелиальных клеток рекомбинантными VEGF165 и HGF приводит к увеличению фосфорилирования ERK-1/2 и кратковременному росту фосфорилирования p38, регулирующих пролиферативную и миграционную активность клеток эндотелия, а также к увеличению экспрессии и продукции эндотелиальными клетками проангиогенного хемокина IL-8. Это может быть частью механизма усиления ангиогенного эффекта при сочетанной экспрессии этих ангиогенных факторов роста.

6. VEGF165 и HGF обладают разнонаправленным действием на активность NFκB в клетках эндотелия, экспрессию хемокина MCP-1 и молекул адгезии ICAM-1/VCAM-1; эти показатели уменьшаются под действием HGF и увеличиваются под влиянием VEGF165, что коррелирует с эффектом экспрессии VEGF165 и HGF на аккумуляцию моноцитов в перинфарктной зоне. Вероятным механизмом этого эффекта является разнонаправленное влияние VEGF165 и HGF на активность NFκB в клетках эндотелия.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

Статьи в журналах:

1. Шевченко Е.К., Макаревич П.И., Цоколаева З.И., Ратнер Е.И., Парфёнова Е.В. Эффективная трансдукция стромальных клеток жировой ткани человека с помощью рекомбинантного аденоассоциированного вируса. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2010. Т. V. №1. С. 60-64.
2. Макаревич П.И., Шевелев А.Я., Рыбалкин И.Н., Каширина Н.М., Липатова Л.Н., Цоколаева З.И., Шевченко Е.К., Белоглазова И.Б., Болдырева М.А., Рубина К.А., Власик Т.Н., Парфёнова Е.В. Новые плазмидные конструкции, предназначенные для терапевтического ангиогенеза и несущие гены ангиогенных факторов роста – VEGF, HGF и ангиопоэтина-1. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2010. Т. V. №1. С. 47-52.
3. Джояшвили Н.А., Калинина Н.И., Белоглазова И.Б., Цоколаева З.И., Макаревич П.И., Перов Ю.Л., Парфёнова Е.В., Ткачук В.А. Генная терапия фактором роста гепатоцитов приводит к регрессии экспериментального фиброза печени. РЖГТК. 2010. Т. 20. №4. С. 22-28.
4. Шевченко Е.К., Макаревич П.И., Цоколаева З.И., Сысоева В.Ю., Шевелев А.Я., Каширина Н.М., Власик Т.Н., Парфёнова Е.В. Восстановление кровотока в ишемизированной конечности мыши с помощью плазмидных конструкций и генетически модифицированных стромальных клеток жировой ткани. Молекулярная медицина. 2011. №4. С. 23 – 28.
5. Талицкий К.А., Булкина О.С., Арефьева Т.И., Воробьева О.Н., Левицкий И.В., Федорович А.А., Макаревич П.И., Парфёнова Е.В., Карпов Ю.А. Эффективность терапевтического ангиогенеза у больных с хронической ишемией нижних конечностей. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2011. Т. VI. №3. С. 88-98.
6. Шевченко Е.К., Макаревич П.И., Парфёнова Е.В. Генетическая модификация прогениторных клеток как способ повышения эффективности генной и клеточной терапии ишемических заболеваний. Кардиологический вестник. 2011. Т. VI. №1. С. 55-62.
7. Makarevich P.I., Tsokolaeva Z.I., Shevelyov A.Ya., Rybalkin I.N., Shevchenko E.K., Beloglazova I.B., Vlasik T.N., Tkachuk V.A., Parfyonova Ye.V. Combined transfer of human VEGF165 and HGF genes renders potent angiogenic effect in ischemic skeletal muscle. PloS One. 2012. Т. 7. №6. С. e38776.
8. Zubkova E.S., Semenkova L.N., Dudich I.V., Dudich E.N., Khromykh L.M., Makarevich P.I., Parfyonova Ye.V., Menshikov M.Yu. Recombinant human alpha-fetoprotein as a regulator of adipose tissue stromal cell activity. Russian journal of bioorganic chemistry. 2012. Т. 38. №5. С. 459-468.
9. Shevchenko E.K., Makarevich P.I., Tsokolaeva Z.I., Boldyreva M.A., Sysoeva V.Yu., Tkachuk V.A., Parfyonova Ye.V. Transplantation of modified human adipose derived stromal cells expressing VEGF165 results in more efficient angiogenic response in ischemic skeletal muscle. Journal of Translational Medicine. 2013. Т. 11. С. 138-151.
10. Кочегура Т.Н., Макаревич П.И., Овчинников А.Г., Жигунова Л.В., Лахова

Е.Л., Масенко В.П., Парфёнова Е.В., Агеев Ф.Т. Циркулирующие факторы, ассоциированные с метаболическими нарушениями у пациентов с постинфарктной сердечной недостаточностью. Сердечная недостаточность. 2013. Т. 14. №4. С. 191-199.

11. Кочегура Т.Н., Макаревич П.И., Овчинников А.Г., Жигунова Л.В., Лахова Е.Л., Шестакова М.В., Агеев Ф.Т., Парфёнова Е.В. Циркулирующий фактор роста гепатоцитов (HGF) у больных с хронической сердечной недостаточностью, сочетающейся с сахарным диабетом 2 типа и нарушением жирового обмена. Сахарный диабет. 2013. №2. С. 17-25.

Тезисы конференций:

1. Makarevich P.I., Shevelyov A.Ya., Rybalkin I.N., Tsokolaeva Z.I., Shevchenko E.K., Beloglazova I.B., Vlasik T.N., Parfyonova Ye.V., Tkachuk V.A. Amplification of the angiogenic effect in murine ischemic skeletal muscle after co-transfer of human HGF and VEGF in novel pC4W plasmid. Regenerative Medicine. 2009. Т. 4. №6. С. S320.

2. Makarevich P.I., Shevelyov A.Ya., Rybalkin I.N., Tsokolaeva Z.I., Shevchenko E.K., Beloglazova I.B., Vlasik T.N., Parfyonova Ye.V., Tkachuk V.A. Amplification of murine ischemic limb reperfusion via co-transfer of human HGF and VEGF pDNA using novel PC4W plasmid. Human Gene Therapy. 2009. Т. 20. №11. С. 1455.

3. Makarevich P.I., Tsokolaeva Z.I., Shevelyov A.Ya., Rybalkin I.N., Beloglazova I.B., Vlasik T.N., Parfyonova Ye.V., Tkachuk V.A. Gene transfer of VEGF165, HGF, urokinase and their combinations using novel PC4W plasmid for induction of vasculogenesis in mice hind limb ischemia model. Molecular Therapy. 2010. Т. 18. №S1. С. S168-S169.

4. Makarevich P.I., Tsokolaeva Z.I., Shevelyov A.Ya., Parfyonova Ye.V., Tkachuk V.A. Peripheral artery disease; combined approach in therapeutic angiogenesis. Human Gene Therapy. 2010. Т. 21. №10. С. 1470

5. Макаревич П.И., Цоколаева З.И., Шевченко Е.К., Шевелев А.Я., Парфёнова Е.В. Использование комбинаций плазмидных векторов для терапевтического ангиогенеза: исследование на мышинной модели ишемии. Материалы Всероссийской научной школы-конференции «Стволовые клетки и регенеративная медицина». 2010. С. 48.

6. Makarevich P.I., Shevchenko E.K., Tsokolaeva Z.I., Sysoeva V.Yu., Shevelyov A.Ya., Vlasik T.N., Parfyonova Ye.V. Therapeutic angiogenesis in ischemic muscle: gene and cell therapy for gene delivery. Human Gene Therapy. 2011. Т. 22. №10. С. A127

7. Makarevich P.I., Shevchenko E.K., Tsokolaeva Z.I., Sysoeva V.Yu., Shevelyov A.Yu., Vlasik T.N., Parfyonova Ye.V. Therapeutic angiogenesis in skeletal muscle: combining gene and cell therapy for gene delivery. Angiogenesis. 2011. Т. 14. №69. С. 103.

8. Макаревич П.И., Болдырева М.А., Цоколаева З.И., Зубкова Е.С., Меньшиков М.Ю., Парфёнова Е.В. Влияние провоспалительного цитокина ФНО-альфа на способность мезенхимальных клеток к хоумингу в поврежденную ткань. Материалы IV Всероссийской научной конференции «Стволовые клетки и регенеративная медицина». 2011. С. 18.

9. Шевченко Е.К., Макаревич П.И., Цоколаева З.И., Сысоева В.Ю., Шевелев А.Я., Власик Т.Н., Парфёнова Е.В. Терапевтический ангиогенез в ишемизированной мышце: повышение эффективности с помощью использования комбинированной генной и клеточной терапии. Материалы IV Всероссийской научной конференции «Стволовые клетки и регенеративная медицина». 2011. С. 51.

10. Makarevich P.I., Shevchenko E.K., Tsokolaeva Z.I., Sysoeva V.Yu., Shevelyov A.Ya., Gavrilov A., Vlasik T.N., Parfyonova Ye.V. Novel angiogenic therapies: gene-modified adipose-derived stromal cells and combined gene delivery. Материалы конференции «World Stem Cell Summit 2012». 2012. С. 88-89

11. Kochegura T.N., Ovchinnikov A.G., Makarevich P.I., Gigunova L.V., Lakhova Ye.L., Parfyonova Ye.V., Ageev F.T. Circulating level of endothelin-1 in patients with chronic systolic heart failure correlates with the degree of diastolic dysfunction and type 2 diabetes comorbidity. European Heart Journal. 2013. Т. 34. №44. С. 461.

12. Makarevich P.I., Dergilev K.V., Tsokolaeva Z.I., Gluhanyuk E.V., Parfyonova Ye.V. Combined gene delivery of VEGF and HGF induces angiogenesis and proliferation in ischemic rat myocardium. European Journal of Heart Failure. 2013. Т. 12. №S1. С. S44.

13. Kochegura T.N., Makarevich P.I., Ovchinnikov A.G., Gigunova L.V., Lakhova Ye.L., Ageev F.T., Parfyonova Ye.V. Circulating level of hepatocyte growth factor in patients with a comorbidity of heart failure and diabetes mellitus type 2. European Journal of Heart Failure. 2013. Т. 12. №S1. С. S108.

14. Makarevich P.I., Tsokolaeva Z.I., Dergilev K.V., Gluhanuk E.V., Gallinger J.O., Kochegura T.N., Tkachuk V.A., Parfyonova Ye.V. Seeking for novel growth factor combinations for therapeutic angiogenesis in myocardium: role for VEGF and HGF in angiogenesis and inflammation control. Angiogenesis. 2014. Т. 17. №3. С. 736.

15. Makarevich P.I., Dergilev K.V., Gluhanuk E.V., Gallinger J.O., Tsokolaeva Z.I., Kochegura T.N., Tkachuk V.A., Parfyonova Ye.V. Gene therapy by VEGF and HGF: stimulation of angiogenesis and inflammation control. Molecular Therapy. 2014. Т. 22. №S1. С. S232.

16. Макаревич П.И., Шевченко Е.К., Парфёнова Е.В. Возможности комбинированной генной и генно-клеточной терапии для стимуляции ангиогенеза и регенеративных процессов при ишемии. Материалы «Российского национального конгресса кардиологов-2014». 2014. С. 155.

Патент:

1. Патент на изобретение №2522778 «Средство для лечения ишемических поражений тканей и способ его применения». Авторы: Парфёнова Е.В., Шевченко Е.К., Макаревич П.И., Власик Т.Н., Рубина К.А., Шевелев А.Я., Ткачук В.А. Заявка №2012142542/10, дата подачи заявки 08.10.2012, опубликовано 20.07.2014.