

М.Г. Шурыгин^{1,2}, И.А. Шурыгина^{1,2}, Н.Н. Дремина¹, О.В. Каня¹

АНГИОГЕНЕЗ КАК АДАПТИВНЫЙ МЕХАНИЗМ ПРИ ИШЕМИИ

¹ ФГБУ «Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии» СО РАМН (Иркутск)

² ФГБУН Иркутский научный центр СО РАН (Иркутск)

Статья посвящена ангиогенезу как одному из способов повышения устойчивости тканей к ишемическому состоянию. Показано, что восстановление ткани при ишемическом повреждении основано на 4 основных процессах – васкулогенезе из эндотелиальных прогениторных клеток, ангиогенезе и артериогенезе с разрастанием и последующей стабилизацией выростов муральными клетками и росте коллатералей (экспансивный рост пре-existing сосудов). Однако несмотря на большое продвижение в понимании индуцированного ишемией ангиогенеза и массу положительных результатов по его стимуляции с использованием раскрытых механизмов естественного ответа на снижение перфузии тканей, все еще не решенной проблемой остается практическое использование данных знаний для улучшения метаболического обеспечения органов и тканей со скомпрометированным сосудистым руслом. Эффект воздействия разнообразных рекомбинантных факторов роста недостаточно долговременен и к тому же не лишен серьезных побочных эффектов. С этих позиций наибольшие перспективы имеет разработка методик с использованием естественного пула плюрипотентных клеток с высоким ангиогенным потенциалом.

Ключевые слова: ишемия, ангиогенез, факторы роста, плюрипотентные клетки

ANGIOGENESIS AS AN ADAPTIVE MECHANISM IN ISCHEMIA

M.G. Shurygin^{1,2}, I.A. Shurygina^{1,2}, N.N. Dremina¹, O.V. Kanya¹

¹ Scientific Center of Reconstructive and Restorative Surgery SB RAMS, Irkutsk

² Irkutsk Scientific Center SB RAS, Irkutsk

The article is devoted to angiogenesis as one of the ways to increase the stability of the ischemic tissue. It is shown that the reduction in ischemic tissue damage is based on four basic processes - vasculogenesis of endothelial progenitor cells, angiogenesis and arteriogenesis with the growth and subsequent stabilization of the outgrowths of mural cells and the growth of collaterals (expansive growth of pre-existing vessels). However, despite the great progress in the understanding of ischemia-induced angiogenesis, and a lot of positive results from its stimulation using the disclosed arrangements natural response to the reduction of tissue perfusion is still an unsolved problem is the practical use of this knowledge to improve the metabolic processes of organs and tissues with compromised vascular bed. The effect of a variety of recombinant growth factors is not enough long-term, and besides, is not without serious side effects. From this perspective, the greatest opportunities is the development of techniques using natural pool of pluripotent cells with high angiogenic potential.

Key words: ischemia, angiogenesis, growth factors, pluripotent cells

В последние десятилетия в связи со значительным прогрессом в понимании ангиогенеза все большее внимание уделяется стимуляции роста сосудов как одному из способов повысить устойчивость тканей к ишемическому состоянию. Действительно, хорошо развитая сосудистая сеть позволяет значительно дольше обеспечивать доставку метаболитов в орган за счет функционирования коллатералей и перераспределения кровотока. Но наибольшее значение при нарушении кровотока рост сосудов имеет для процессов восстановления поврежденных ишемией тканей.

Восстановление ткани при ишемическом повреждении основано на 4 основных процессах – васкулогенезе из эндотелиальных прогениторных клеток, ангиогенезе и артериогенезе с разрастанием и последующей стабилизацией выростов муральными клетками, и росте коллатералей (экспансивный рост пре-existing сосудов) [26].

Наибольшую значимость ангиогенез приобретает для повышения устойчивости к ишемии в миокарде – как с точки зрения пиковых потребностей в метаболических субстанциях и кислороде, так и морфологически одним из органов с наибольшим васкуло-паренхиматозным соотношением [4].

Одной из пионерских работ по стимуляции роста сосудов при ишемии стала публикация T. Asahara et al. [14], в которой продемонстрирована возможность не только добиваться разрастания пре-existing сосудов (ангиогенез), но и обеспечивать вовлечение эндотелиальных прогениторных клеток в процесс постнатальной физиологической и патологической неоваскуляризации.

Трансплантация гемопоэтических прогениторных клеток также может привести к васкуляризации ишемизированных тканей [21], и даже было определено, что оптимальная клеточная популяция для трансплантации должна содержать субпопуляцию CD34⁺ прогениторов, которые экспрессируют рецептор 2-го типа к вазоэндотелиальному фактору роста VEGF-A (KDR⁺). Клетки, имеющие рецепторы к VEGF, демонстрируют большую устойчивость к апоптозу и обеспечивают более выраженную неоваскуляризацию в ишемизированной мышце.

Подход к терапевтическому ангиогенезу базируется на постулате, что возможна манипуляция реакцией спонтанного восстановления трофики тканей при обеспечении факторами роста или трансплантацией прогениторных клеток [20]. Ангиогенные факторы

доставляются в форме рекомбинантных протеинов [11, 12] или повышением эндогенной выработки при трансфере генов. Ассоциация факторов роста с различной биологической активностью может иметь определенные преимущества в плане эффективности, и для оптимизации процесса требуется исследование их комбинаций. Альтернативу представляют субстанции с плейотропной активностью как нацеленные на множественные механизмы. Например, некоторые ангиогенные факторы не только стимулируют рост артериол и капилляров, но и ингибируют триггеры дестабилизации сосудов посредством метаболического и оксидативного стресса.

Одним из широко разрабатываемых методов лечения периферической или миокардиальной ишемии стала трансплантация прогениторных клеток. Кроме трансплантации нативных прогениторных клеток используют *ex vivo* генетически модифицированные клетки. Эта модификация позволяет обойти быструю элиминацию клеток с генетической модификацией при виральном трансфере *in vivo*.

Клинические исследования свидетельствуют об улучшении состояния и снижении числа ампутаций у лиц с критической ишемией нижних конечностей, которым производится введение аутологичных костномозговых или мобилизованных из периферической крови стволовых клеток. Некоторые из этих исследований находятся в III фазе, однако распространение данной технологии может быть затруднено. Связано это с уменьшением ангиогенного потенциала стволовых клеток, выделенных у пациентов с высокой степенью риска развития сердечно-сосудистой патологии, необходимостью обеспечить подготовку клеточного материала на месте. М.Р. Murphy et al. показали возможность использования с целью стимуляции ангиогенеза при данной патологии эндометриальных регенеративных клеток. Основой такого подхода явились высокий уровень продукции факторов роста и матриксных металлопротеаз, способность подавлять воспалительный ответ, невысокая иммуногенность [23].

Для решения проблем ангиохирургии у больных с окклюзией магистральных артерий нижних конечностей на большом протяжении положительные результаты принесла попытка ангиогенной терапии посредством подкожного введения гранулоцитарного колониестимулирующего фактора как до, так и после операции шунтирования [24].

Исследования механизмов стимуляции ангиогенеза при ишемии выявили, что гипоксия является триггером ангиогенеза. При этом и ангиогенез, и рост коллатералей зависят от общих факторов роста, хемокинов, протеаз и клеток воспаления [26].

В качестве одного из основных стимулов рассматривают выброс белков типа hypoxia-inducible factor (HIF). Известно 2 варианта регулируемых концентраций кислорода подтипа HIF – HIF-1 и HIF-2, имеющих разную чувствительность к кислороду и различную экспрессию в различных типах клеток. Кроме этого, гетеродимер HIF-1 связывается с гипоксия-ответственным элементом нескольких чувствительных к гипоксии генов, в том числе кодирующим VEGF-A.

Ранее нами было показано, что данный фактор роста играет важную роль в выживании эндотелиоцитов в очаге ишемического повреждения [2, 3], соответственно, с этим может быть связана потребность в HIF для выживания клетки при гипоксии [22].

Увеличение напряжения сдвига жидкости активирует в клетках эндотелия Ras-ERK-, Rho- и NO-пути [6], что приводит к росту коллатеральных артерий [15].

В настоящее время в качестве важных медиаторов ангиогенеза рассматриваются связанные с процессами ишемии-реперфузии реактивные формы кислорода. H₂O₂ стимулирует клеточную миграцию и пролиферацию эндотелиальных клеток [28], модулируют экспрессию VEGF и вызывают пролиферацию гладкомышечных клеток.

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) усиливают регенерацию поврежденных тканей *in vivo*, однако механизм этого явления остается не до конца понятным [25]. При этом обычно культивация МСК происходит в нормоксических условиях (21 % кислорода). Однако физиологическая ниша для МСК (в костном мозге и др. тканях-источниках) характеризуется значительно меньшим содержанием O₂. По предположению вышеуказанных авторов, для типичного применения МСК с целью ускорения процесса заживления они должны адаптироваться к состоянию тканевой ишемии (меньше 1 % O₂). Для этого изучены эффекты гипоксии на МСК, выделенных из костного мозга, что позволило понять некоторые механизмы адаптации клеток к условиям ишемии. При этом выявлена активация Akt сигнального пути, что обеспечивает выживаемость и сохранение частоты клеточного цикла. Также выявлена индукция экспрессии cMet, основного рецептора для фактора роста гепатоцитов (HGF), и усиление процессов, связанных с активацией cMet. У МСК, культивированных в условиях гипоксии, увеличивалась миграционная способность. Усиление миграции и способность отвечать на стимуляцию HGF восприняты данными авторами как ключевые моменты для привлечения и/или активации МСК для ангиогенеза *in vivo*. На модели ишемии задних конечностей показано, что МСК, прекодиционированные в условиях ишемии, вызвали более быструю и выраженную ревазуляризацию и восстановление кровотока, в сравнении с культивированными при обычных условиях.

Механизмы адаптивного ангиогенеза при ишемии, осуществляемого за счет привлечения эндотелиальных прогениторов, исследовались в работе J. Nur et al. [17]. Было выявлено, что поступление трансплантированных эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК) в ишемизированную ткань увеличивает продукцию stromal-derived factor 1 (SDF-1) и VEGF. На внутриклеточном уровне привлечение и «хоуминг» ЭПК связаны с молекулярным механизмом Akt. На модели ишемии задней конечности систематическое введение меченых ЭПК выявило 3 стадии расселения этих клеток: 1 – адгезия к эндотелиоцитам, 2 – инкорпорация в капилляр, 3 – рансэндотелиальная миграция в околососудистое пространство. При увеличении VEGF и SDF-1, вызванном ишемией, в эндотелиоцитах

ишемизированной мышцы активизируется Akt. Было показано, что активность гена Akt усиливает экспрессию ICAM-1. Активации пути Akt было достаточно для индукции «хоуминга» ЭПК даже в нормально перфузируемой задней конечности при нормальных уровнях VEGF и SDF-1. В случае же ишемического эпизода гуморальный уровень факторов роста значительно увеличивается [13]. Увеличение «хоуминга» приводило к более быстрому образованию сосудов и восстановлению кровотока.

Участвуют в регуляции неоваскуляризации при воспалении и гормоны, в частности, ангиотензин-II [8, 27]. Инфильтрация мононуклеарными клетками подавляется у мышей с дефицитом рецептора 1 типа к AT-II (AT1 рецептор).

Реакция воспаления, одним из элементов которой является инфильтративная фаза, поддерживает ангиогенную активность в очаге ишемического повреждения [8]. Также на модели ишемии задних конечностей стимуляция экспрессии MCP-1 значительно увеличивалась после трансфера гена FGF2, а блокада активности MCP-1 у крыс с доминант-негативной мутацией, наравне с дефицитом его рецептора CCR2, приводит к замедленному восстановлению кровотока в условиях адаптивной и терапевтической неоваскуляризации [16].

Провоспалительную активность поддерживают факторы роста. Нами было выявлено значительное изменение воспалительного ответа в очаге ишемического повреждения, выражавшееся в изменении выраженности инфильтративного компонента и значительном временном сдвиге периодов смены клеточных популяций [9]. Кроме этого A. Luttun et al. (2002) описали мобилизацию миелоидных прогениторов из костного мозга в кровотоки, расширенной инфильтрацией экспрессирующими VEGFR1 лейкоцитами в очаге воспаления и продолжительной активацией миелоидных клеток в ответ на увеличение уровня PlGF [19].

K.I. Kim et al. [18] предположили, что для выживания и пролиферации клеток при ишемии важную роль может иметь β -Catenin, который играет критическую роль при определении направления дифференцировки клетки. Стимуляция путем аденовирусного переноса дополнительных генов β -Catenin в ассоциации с GFP приводила к усилению пролиферации эндотелиоцитов и подавляла их апоптоз, а также усиливала способность формировать капилляры. Эти эффекты блокировалась ингибиторами ядерной транслокации. Усиление пролиферации, вызванное β -Catenin, ассоциировалось с увеличением экспрессии Cyclin E2. В ишемизированных скелетных мышцах гиперэкспрессия β -Catenin, кроме увеличения пролиферации, повышения экспрессии cyclin D1 и уменьшения апоптоза, индуцировала гипертрофию. Более того, β -Catenin увеличивал экспрессию VEGF в скелетных миоцитах. Все эти изменения на модели ишемии задних конечностей приводили к увеличению перфузии и росту плотности капилляров.

Однако, несмотря на большое продвижение в понимании индуцированного ишемией ангиогенеза и массу положительных результатов по его стиму-

ляции с использованием раскрытых механизмов естественного ответа на снижение перфузии тканей, все еще нерешенной проблемой остается практическое использование данных знаний для улучшения метаболического обеспечения органов и тканей со скомпрометированным сосудистым руслом [5, 10]. Эффект воздействия рекомбинантных факторов роста недостаточно долговременен, и к тому же не лишен серьезных побочных эффектов [2]. Пересадка чужеродных или генетически модифицированных трансфером клеток как в варианте с локальными, так и внутрисосудистыми инъекциями имеет положительный эффект [1], однако его продолжительность также под большим вопросом, а элиминация чужеродного материала иммунной системой не только сокращает его продолжительность ангиогенного эффекта, но и способствует развитию склеротических процессов [7]. С этих позиций, с нашей точки зрения, наибольшие перспективы имеет разработка методик с использованием естественного пула плюрипотентных клеток с высоким ангиогенным потенциалом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Богородская С.Л., Климова С.Н., Микашова М.Б., Голубев С.С. и др. Трансплантация ксеногенных кардиомиоцитов при экспериментальном адреналиновом повреждении миокарда: ферментативная активность и морфологические параметры // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2008. – № 3. – С. 132–135.
2. Дремина Н.Н., Шурыгин М.Г., Шурыгина И.А. Изменение микроциркуляторного компонента миокарда под воздействием фактора роста эндотелия сосудов в постинфарктный период // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2008. – № 4. – С. 73–75.
3. Дремина Н.Н., Шурыгина И.А., Лушникова Е.Л., Непомнящих Л.М. Влияние эндотелиального фактора роста на постинфарктное ремоделирование миокарда крыс // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. – 2009. – Т. 148, № 9. – С. 330–336.
4. Лебединский В.Ю., Шурыгин М.Г., Дудкин В.В. Внутримиекардиальное давление (природа, способы измерения и регистрации): метод. рек. – Иркутск: Реаниматор, 1991. – 76 с.
5. Непомнящих Л.М., Лушникова Е.Л., Ларионов П.М., Шурыгин М.Г. Регенерация миокарда: пролиферативный потенциал кардиомиоцитов и индукция кардиомиогенеза при альтернативной и пластической недостаточности сердца // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2010. – № 5. – С. 3–11.
6. Пушкарева Т.А., Корякина Л.Б., Рунович А., Курильская Т.Е. и др. Критерии оценки дисфункции эндотелия и пути ее коррекции // Клиническая лабораторная диагностика. – 2008. – № 5. – С. 1–8.
7. Шурыгин М.Г., Дремина Н.Н., Шурыгина И.А., Мачхин И.Н. Основные активаторы ангиогенеза и их применение в кардиологии (обзор литературы) // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2005. – № 6. – С. 199–207.
8. Шурыгин М.Г., Малышев В.В., Дремина Н.Н. Закономерности ремоделирования миокарда при постинфарктном кардиосклерозе. – Иркутск, НЦРВХ СО РАМН, 2007. – 196 с.

9. Шурыгин М.Г., Шурыгина И.А. Влияние уровня FGF2 на динамику фаз воспаления при постинфарктном кардиосклерозе // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2010. – № 4. – С. 34–37.
10. Шурыгин М.Г., Шурыгина И.А. Фактор роста фибробластов как стимулятор ангиогенеза при инфаркте миокарда // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2010. – Т. 30, № 6. – С. 89–92.
11. Шурыгин М.Г., Шурыгина И.А., Дремина Н.Н. Влияние основного фибробластического фактора роста на выраженность цитолиза при экспериментальном инфаркте миокарда // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2008. – № 6. – С. 58–60.
12. Шурыгин М.Г., Шурыгина И.А., Дремина Н.Н. Влияние фактора роста эндотелия сосудов на выраженность цитолиза при экспериментальном инфаркте миокарда // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2008. – Т. 59, № 1. – С. 68–71.
13. Шурыгин М.Г., Шурыгина И.А., Дремина Н.Н. Динамика факторов роста эндотелия сосудов и фибробластического фактора роста при экспериментальном инфаркте миокарда // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2007. – № 6. – С. 169–174.
14. Asahara T, Masuda H, Takahashi T. et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization // *Circ. Res.* – 1999. – Vol. 85, N 3. – P. 221–228.
15. Eitenmuller I, Volger O, Kluge A. et al. The range of adaptation by collateral vessels after femoral artery occlusion // *Circ. Res.* – 2006. – Vol. 99. – P. 656–662.
16. Fujii T, Yonemitsu Y, Onimaru M. et al. Nonendothelial mesenchymal cell-derived MCP-1 is required for FGF-2-mediated therapeutic neovascularization: critical role of the inflammatory/arteriogenic pathway // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2006. – Vol. 26. – P. 2483–2489.
17. Hur J, Yoon C.H., Lee C.S. et al. Akt is a key modulator of endothelial progenitor cell trafficking in ischemic muscle // *Stem. Cells.* – 2007. – Vol. 25, N 7. – P. 1769–1778.
18. Kim K.I., Cho H.J., Hahn J.Y. et al. Beta-catenin overexpression augments angiogenesis and skeletal muscle regeneration through dual mechanism of vascular endothelial growth factor-mediated endothelial cell proliferation and progenitor cell mobilization // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2006. – Vol. 26, N 1. – P. 91–98.
19. Luttun A, Tjwa M, Moons L. et al. Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1 // *Nat. Med.* – 2002. – Vol. 8. – P. 831–840.
20. Madeddu P. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for tissue regeneration // *Exp. Physiol.* – 2005. – Vol. 90, N 3. – P. 315–326.
21. Madeddu P., Emanuelli C., Pelosi E. et al. Transplantation of low dose CD34+KDR+ cells promotes vascular and muscular regeneration in ischemic limbs // *FASEB J.* – 2004. – Vol. 18, N 14. – P. 1737–1739.
22. Makino Y, Nakamura H, Ikeda E. et al. Hypoxia-inducible factor regulates survival of antigen receptor-driven T cells // *J. Immunol.* – 2003. – Vol. 171. – P. 6534–6540.
23. Murphy M.P., Wang H., Patel A.N. et al. Allogeneic endometrial regenerative cells: an “Off the shelf solution” for critical limb ischemia? // *J. Transl. Med.* – 2008. – Vol. 6. – P. 45.
24. Nakayama M., Asari Y. Angiogenesis achieved by granulocyte colony-stimulating factor in combination with bypass surgery in 2 cases of critical limb ischemia // *Circ. J.* – 2008. – Vol. 72. – P. 1385–1387.
25. Rosova I, Dao M., Capoccia B. et al. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells // *Stem. Cells.* – 2008. – Vol. 26, N 8. – P. 2173–2182.
26. Silvestre J.S., Mallat Z., Tedgui A., Levy B.I. Post-ischaemic neovascularization and inflammation // *Cardiovasc. Research.* – 2008. – Vol. 78. – P. 242–249.
27. Tamarat R., Silvestre J.S., Durie M., Levy B.I. Angiotensin II angiogenic effect in vivo involves vascular endothelial growth factor- and inflammation-related pathways // *Lab. Invest.* – 2002. – Vol. 82. – P. 747–756.
28. Yasuda M., Ohzeki Y., Shimizu S. et al. Stimulation of in vitro angiogenesis by hydrogen peroxide and the relation with ETS-1 in endothelial cells // *Life Sci.* – 1999. – Vol. 64. – P. 249–258.

Сведения об авторах

Шурыгин Михаил Геннадьевич – доктор медицинских наук, заведующий научно-лабораторным отделом ФГБУ «Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии» СО РАМН, главный научный сотрудник отдела медико-биологических исследований и технологий ФГБУН Иркутский научный центр СО РАН (664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1: тел.: 8 (3952) 29-03-69)

Шурыгина Ирина Александровна – доктор медицинских наук, заместитель директора по научной и инновационной деятельности, заведующая лабораторией патоморфологии ФГБУ «Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии» СО РАМН, главный научный сотрудник отдела медико-биологических исследований и технологий ФГБУН Иркутский научный центр СО РАН

Дремина Наталья Николаевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории патоморфологии ФГБУ «Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии» СО РАМН

Каня Олег Витославович – аспирант ФГБУ «Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии» СО РАМН