

Влияние димерного миметика фактора роста нервов ГК-2 на микроциркуляцию в скелетной мышце в условиях модели ишемии задней конечности у крыс

Цорин И. Б., Ефимова А. О., Пекельдина Е. С., Вититнова М. Б., Крыжановский С. А.

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Аннотация. Цель исследования. В опытах на модели ишемии задней конечности у крыс изучить влияние агониста TrkA-рецепторов димерного дипептидного миметика 4-ой петли NGF соединения ГК-2 на микроциркуляцию в ишемизированной скелетной мышце. Методы. Ишемию задней конечности вызывали у белых беспородных крыс самцов резекцией бедренной артерии. Соединение ГК-2 вводили в/б в дозе 1 мг/кг/сут в течение 14 дней. Показатели микроциркуляции регистрировали с помощью компьютерного лазерного анализатора «ЛАКК-ОП2». Регистрацию осуществляли одновременно в интактной и оперированной конечности до операции, через 1 и 14 суток после неё. Результаты. В условиях модели ишемии задней конечности показано, что соединение ГК-2 к 14-му дню после операции практически полностью восстанавливает показатель перфузии и коэффициент его вариации в ишемизированной мышце до уровня интактной контрлатеральной конечности. Заключение. Можно полагать, что противоишемическое действие соединения ГК-2 связано с восстановлением микроциркуляции в результате усиления процессов неоангиогенеза.

Ключевые слова: NGF; ГК-2; микроциркуляция; показатель перфузии; коэффициент вариации; ишемия задней конечности; неоангиогенез

Для цитирования:

Цорин И.Б., Ефимова А.О., Пекельдина Е.С., Вититнова М.Б., Крыжановский С.А. Влияние димерного миметика фактора роста нервов ГК-2 на микроциркуляцию в скелетной мышце в условиях модели ишемии задней конечности у крыс // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2020. – № 4. – С. 9–13. DOI: 10.37489/2587-7836-2020-4-9-13

Effect of nerve growth factor dimeric mimetic GK-2 on microcirculation in skeletal muscle on the hind limb ischemia model in rats

Tsorin IB, Efimova AO, Pekeldina ES, Vititnova MB, Kryzhanovskii SA
FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Abstract. The purpose of the study. In experiments on a hind limb ischemia model in rats, the effect of the TrkA-receptor agonist of the NGF 4th loop dimeric dipeptide mimetic compound GK-2 has been studied on microcirculation in ischemic skeletal muscle. Methods. the Hind limb ischemia was caused in white male mongrel rats by the femoral artery resection. The compound GK-2 was administered intravenously (1 mg/kg/day during 14 days). Microcirculation parameters were recorded using a computer laser analyzer "LAKK-OP2". Registration was carried out simultaneously in the intact and operated limb before the operation, 1 and 14 days after it. Results. In the conditions of the hind limb ischemia model, it was shown that the compound GK-2 almost completely restored the perfusion index and its variation coefficient in the ischemic muscle to the intact contralateral limb level by the 14th day after surgery. Conclusion. It can be assumed that the anti-ischemic effect of the compound GK-2 is associated with the restoration of microcirculation as a result of increased neoangiogenesis.

Keywords: NGF; GK-2; microcirculation; perfusion index; variation coefficient; hind limb ischemia; neoangiogenesis

For citations:

Tsorin IB, Efimova AO, Pekeldina ES, Vititnova MB, Kryzhanovskii SA. Effect of nerve growth factor dimeric mimetic GK-2 on microcirculation in skeletal muscle on the hind limb ischemia model in rats. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2020;(4):9–13. DOI: 10.37489/2587-7836-2020-4-9-13

Введение

Хронические ишемические состояния, в том числе хроническая ишемия нижних конечностей, занимают одно из лидирующих положений в структуре летальности в экономически развитых странах мира. Одним из возможных подходов к лечению такого рода больных является использование лекарственных средств, стимулирующих ангиогенез и, таким образом, восстанавливающих кровоснабжение ишемизированных тканей [1]. С этой целью могут быть использованы экзогенные аналоги эндогенных факторов роста или химические соединения, активирующие эти факторы [2]. Одним из таких эндогенных веществ является нейротрофин, получивший название фактор роста нервов (NGF). NGF стимулирует пролиферацию, миелинизацию нейронов, регулирует синаптическую пластичность. Помимо ЦНС и периферической нерв-

ной системы акцептором эффектов NGF является сердечно-сосудистая система. В значительном количестве исследований показано, что этот нейротрофин синтезируется и экскретируется эндотелиальными и гладкомышечными клетками сосудов, а на их клеточной мембране представлены специфичные для NGF TrkA рецепторы, посредством взаимодействия с которыми NGF активирует PI3K-Akt, Ras-MAPK и PLCγ1-IP3 внутриклеточные сигнальные пути, запускающие неоангиогенез [3, 4]. В частности, на изолированных эндотелиальных клетках микрососудов человека было показано, что NGF стимулирует пролиферацию клеток [5]. В опытах на мышах NGF стимулировал ангиогенез в зоне ишемии, вызванной окклюзией бедренной артерии [6]. Однако применение NGF в качестве лекарственного средства проблематично ввиду его высокой себестоимости. В результате многолетних фундаментальных исследований в

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» был синтезирован димерный дипептидный миметик 4-ой петли NGF, обладающий свойствами агониста TgkA рецепторов – соединение ГК-2 [7]. Согласно данным фармакологических исследований, соединение ГК-2 обладает выраженной нейропротективной активностью *in vitro* и *in vivo* [8], которая связана с его способностью активировать TgkA-сопряжённый PI3K-Akt внутриклеточный сигнальный путь [9].

Ранее в опытах *in vitro* на культуре изолированных клеток эндотелия человека HUVEC нами было показано, что соединение ГК-2 стимулирует тубулогенез, который является начальной стадией ангиогенеза, препятствует развитию апоптоза и по своей ангиогенной активности не уступает эталонному нейтрофину NGF. В опытах на модели ишемии задней конечности у крыс было показано, что соединение инициирует пролиферацию кровеносных сосудов в ишемизированной мышце и уменьшает интенсивность ишемического повреждения [10, 11]. Можно было предложить, что увеличение васкуляризации ишемизированной мышцы под влиянием ГК-2 улучшает кровоснабжение ткани и именно с этим связано его противоишемическое действие.

Цель исследования

В опытах на модели ишемии задней конечности у крыс изучить влияние агониста TgkA-рецепторов димерного дипептидного миметика 4-ой петли NGF соединения ГК-2 на микроциркуляцию в ишемизированной скелетной мышце.

Материалы и методы

Животные. Эксперименты выполнены на беспородных белых крысах-самцах массой 200–220 г, полученных из Филиала «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства». Животные имели ветеринарный сертификат и прошли карантин в виварии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Животных содержали в соответствии с приказом Минздрава России № 199 от 01 апреля 2016 года «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и СП 2.2.1.3218–14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» от 29 августа 2014 г. № 51. Все эксперименты с животными проводили в соответствии с международными правилами (European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC)), а также в соответствии с «Правилами работы с животными», утверждёнными биоэтической комиссией ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Животные были рандомизированы на 2 группы: 1-я — контроль с ишемией задней конечности ($n = 8$); 2-я —

животные с ишемией задней конечности, получавшие ГК-2 ($n = 8$).

Модель ишемии задней конечности. Ишемию задних конечностей у анестезированных крыс (тиопентал натрия, 50 мг/кг, в/б) вызывали путём одномоментной резекции участка бедренной артерии, после чего рану послойно ушивали. Соединение ГК-2 (1 мг/кг) вводили внутривентриально в течение 14 дней от момента резекции бедренной артерии. Первую инъекцию осуществляли через 1 час после окончания операции. Контрольным животным по аналогичной схеме внутривентриально вводили 0,3 мл изотонического 0,9 % раствора натрия хлорида.

Метод измерения микроциркуляции. Оценку микроциркуляции в тканях организма проводили методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) с помощью компьютеризированного лазерного анализатора «ЛАКК-ОП2» (производство НПП «Лазма», Россия) с использованием программы LDF 3.0.2.395. В ходе эксперимента осуществлялась одновременная регистрация диагностических показателей микроциркуляции крови в интактной и оперированной задней конечностях наркотизированной крысы (хлорал гидрат 350 мг/кг в/б). Световодный зонд фиксировали на средней трети двухглавой мышцы бедра, измерения проводили до резекции бедренной артерии, через 1 и 14 суток после неё в трёх точках на каждой конечности. Длительность записи показателей микроциркуляции в каждой точке составляла 8 минут. При оценке микрокровотока рассчитывались: показатель перфузии (М) в перфузионных единицах (п.ед.), его среднее квадратическое отклонение (σ) и коэффициент вариации (Kv).

Статистическая обработка. Статистическую обработку результатов проводили следующим образом. Нормальность распределения данных проверяли по критерию Шапиро–Уилка, гомогенность дисперсий — по Левену. Так как результаты измерений микроциркуляции крови были распределены по нормальному закону и дисперсии выборок были гомогенны, то для определения значимости различий использовали дисперсионный анализ повторных измерений с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Ньюмену–Кейлсу. Полученные результаты представляли в виде средних арифметических и их стандартных ошибок. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Ранее мы показали, что соединение ГК-2 улучшает васкуляризацию мышцы в условиях ишемии [10, 11]. Оказалось, что у животных, получавших соединение ГК-2, суммарная длина капиллярного русла в повреждённой мышце статистически значимо больше ($p = 0,003$), чем у контрольных животных — 19 531 (16 085–24 511) и 14 456 (10 901–17 404) мкм/мм², соот-

ветственно. Количество сосудов в 1 мм² ишемизированной ткани у животных, получавших соединение ГК-2, также было статистически значимо больше ($p < 0,001$), чем в контроле: 70 (70÷78) и 53 (50÷57), соответственно (табл. 1). Математический анализ полученных результатов свидетельствует о том, что

Таблица 1

Влияние димерного дипептидного миметика 4-ой петли NGF соединения ГК-2 (1 мг/кг/сут в течение 14 дн. в/б) на васкуляризацию ишемизированной икроножной мышцы крысы

Показатель	Контроль, $n = 13$	Соединение ГК-2, $n = 10$
Суммарная длина капиллярного русла, мкм/мм ²	14 456 10 901÷17 404	19 531* 16 085÷24 511
Количество сосудов/мм ²	53 50÷57	70* 70÷78
Индекс васкуляризации	14 725 9 030÷19 630	27 794* 25 218÷35 941

Примечания: Показаны медианы, нижний и верхний квартили; * – $p \leq 0,05$ по отношению к контролю по критерию Манна–Уитни.

интенсивность васкуляризации ишемизированной ткани у животных, получавших соединение ГК-2, практически в 2 раза выше, чем в контроле – индекс васкуляризации составляет 27 794 (25 218÷35 941) и 14 725 (9 030÷19 630), соответственно ($p < 0,001$). Полученные данные позволяют говорить о выраженной ангиогенной активности изучаемого соединения, что подтверждается результатами световой микроскопии. Если у контрольных животных в повреждённой мышце сосуды полнокровны, околососудистый отёк хорошо выражен, капилляры извитые, мелкие, тонкие, плохо различимы, то у крыс, получавших ГК-2, эндотелий сосудов чётко выражен, капиллярная сеть хорошо различима, капилляры идут прямо и располагаются вдоль мышечных волокон [10, 11].

Анализ результатов, полученных при измерении микроциркуляции, показал, что в контрольной и основной группах животных, до резекции бедренной артерии различия между конечностями в интенсивности микроциркуляции отсутствовали (табл. 2). Через сутки после резекции бедренной артерии в обеих группах в ишемизированной конечности наблюдалось резкое снижение перфузии, однако у крыс, получавших ГК-2, оно было статистически значимо меньше. Так, если в контрольной группе падение показателя перфузии по отношению к интактной конечности составляло $-8,37 \pm 0,34$ п.ед., то у крыс, получавших ГК-2, снижение этого показателя составляло $-6,49 \pm 0,34$ п.ед. ($p \leq 0,05$). К 14-м суткам после операции в обеих группах наблюдалось уменьшение различий показателя перфузии между интактной и оперированной конечностями. Однако в контрольной группе это восстановление было частичным, тогда как у крыс, получавших ГК-2, различия между интактной

и ишемизированной конечностями практически исчезали (см. табл. 2). Так, если у животных, получавших соединение ГК-2, различие показателя перфузии в конечностях составляло $0,15 \pm 0,19$ п.ед. ($p > 0,05$), то в контрольной группе $3,78 \pm 0,19$ п.ед. ($p \leq 0,05$).

Можно полагать, что восстановление показателя перфузии под влиянием соединения ГК-2 связано с тем, что оно, активируя TrkA-рецепторы, запускает сопряжённый с ними PI3K-Акт внутриклеточный сигнальный путь и, таким образом усиливает ангиогенез в ишемизированной мышечной ткани [7, 9].

Значительный интерес представляют изменения коэффициента вариации показателя микроциркуляции. Через сутки после резекции бедренной артерии Кв увеличивается в ишемизированной конечности в обеих группах в одинаковой степени, что указывает на усиление напряжённости регуляторных процессов в сосудистом русле [12]. Через 14 суток после операции у крыс, получавших изучаемое соединение, Кв в обеих конечностях был одинаков, тогда как в контрольной группе различие между конечностями уменьшалось по сравнению с 1-и сутками, однако оставалось значительным (табл. 2). Так, если у контрольных животных увеличение Кв в ишемизированной конечности через 1 и 14 суток составляло $+11,8 \pm 1,1$ и $+6,1 \pm 1,0$ %, соответственно, то у крыс, получавших соединение ГК-2, эти показатели составляли $+12,1 \pm 1,1$ и $0,0 \pm 1,0$ % ($p \leq 0,05$), соответственно.

Таблица 2

Влияние соединения ГК-2 (1 мг/кг/сут в течение 14 дн., в/б) на различие показателей микроциркуляции между интактной и ишемизированной задними конечностями крыс

Соединение	Показатель	До операции	Через 1 сут после операции	Через 14 сут после операции
Контроль, $n = 8$	Показатель перфузии, п.ед.	$-0,25 \pm 0,20$	$-8,37 \pm 0,34\#$	$-3,78 \pm 0,19\#\$$
	Кв, %	$-0,1 \pm 0,5$	$+11,8 \pm 1,2\#$	$+6,1 \pm 1,0\#\$$
ГК-2, $n = 8$	Показатель перфузии, п.ед.	$-0,13 \pm 0,20$	$-6,49 \pm 0,34*\#$	$-0,15 \pm 0,19*\$$
	Кв, %	$+0,7 \pm 0,5$	$+12,2 \pm 1,1\#$	$0,0 \pm 1,0*\$$

Примечания: Показаны медианы, нижний и верхний квартили; * – $p \leq 0,05$ по отношению к контролю; # – $p \leq 0,05$ по отношению к уровню до операции; \$ – $p \leq 0,05$ по отношению к уровню через 1 сут после операции.

Таким образом, в условиях модели ишемии задней конечности у крыс соединение ГК-2 стимулирует васкуляризацию поражённой мышцы, ускоряет восстановление микроциркуляции, нормализует регуляторные процессы в микрососудистом русле ишемизированной конечности. Противоишемическое действие изучаемого соединения, по-видимому, связано с восстановлением микроциркуляции в результате усиления процессов неоангиогенеза.

Выводы

1. Димерный дипептидный миметик 4-й петли NGF соединение ГК-2 (1 мг/кг/сут в течение 14 дн., в/б) стимулирует восстановление кровоснабжения ишемизированной задней конечности.

2. Одним из возможных механизмов противо-ишемического действия соединения ГК-2 является восстановление микроциркуляции, связанное с усилением процессов неоангиогенеза.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ**Цорин Иосиф Борисович**

ORCID ID: 0000-0002-3988-7724

SPIN-код: 4015-3025

д. б. н., в. н. с. лаборатории фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Tsorin Iosif B.

ORCID ID: 0000-0002-3988-7724

SPIN code: 4015-3025

D. Sci. in Biology, Leading researcher of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Ефимова Алёна Олеговна

ORCID ID: 0000-0002-0548-8231

SPIN-код: 6877-0056

к. м. н., н. с. лаборатории фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Efimova Alena O.

ORCID ID: 0000-0002-0548-8231

SPIN code: 6877-0056

PhD in Medicine, Research Officer of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Пекельдина Евгения Сергеевна

SPIN-код: 3225-9216

н. с. лаборатории фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Pekeldina Eugenia S.

SPIN code: 3225-9216

Researcher Scientist of Laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Вититнова Марина Борисовна

ORCID ID: 0000-0002-7407-7516

SPIN-код: 1901-8919

к. б. н., с. н. с. лаборатории фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Vititnova Marina B.

ORCID ID: 0000-0002-7407-7516

SPIN code: 1901-8919

PhD in Biology, Senior Research Officer of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Крыжановский Сергей Александрович

Автор, ответственный за переписку

e-mail: SAK-538@yandex.ru

ORCID ID: 0000-0003-2832-4739

SPIN-код: 6596-4865

д. м. н., зав. лабораторией фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Kryzhanovskii Sergey B.

Corresponding author

e-mail: SAK-538@yandex.ru

ORCID ID: 0000-0003-2832-4739

SPIN code: 6596-4865

D. Sci. in Medicine, Head of laboratory of pharmacological screening screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Литература / References

1. Ko SH, Bandyk DF. Therapeutic angiogenesis for critical limb ischemia. *Semin Vasc Surg.* 2014; 27(1): 23–31. DOI: 10.1053/j.semvasc.2014.10.001.
2. Парфенова Е.В., Ткачук В.А. Терапевтический ангиогенез: достижения, проблемы перспективы // *Кардиологический вестник.* 2007;2(2(14)):5–14. [Parfenova EV, Tkachuk VA. Therapeutic angiogenesis: advances, problems, prospects. *Cardiological bulletin.* 2007;2(2(14)): 5–15. (In Russ).].
3. Blais M, Lévesque P, Bellenfant S et al. Nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3 and glial-derived neurotrophic factor enhance angiogenesis in a tissue-engineered in vitro model. *Tissue Eng Part A.* 2013;19(15-16):1655–1664. DOI: 10.1089/ten.tea.2012.0745.
4. Крыжановский С.А., Вититнова М.Б. Сердечно-сосудистые эффекты фактора роста нервов // *Физиология человека.* 2011;37(3):109–128. [Kryzhanovskii SA, Vititnova MB. Cardiovascular effects of nerve growth factor. *Human Physiology.* 2011;37(3):109–128. (In Russ).].
5. Raychaudhuri SK, Raychaudhuri SP, Weltman H, Farber EM. Effect of nerve growth factor on endothelial cell biology: proliferation and adherence molecule expression on human dermal microvascular endothelial cells. *Arch Dermatol Res.* 2001;293(6): 291–295. DOI: 10.1007/s004030100224.
6. Emanuelli C, Salis MB, Pinna A et al. Nerve growth factor promotes angiogenesis and arteriogenesis in ischemic hindlimbs. *Circulation.* 2002;106(17):2257–2262. DOI: 10.1161/01.cir.0000033971.56802.c5.
7. Гудашева Т.А., Антипова Т.А., Середенин С.Б. Новые низкомолекулярные миметики фактора роста нервов // *Доклады Академии наук.* 2010;434(4):549–552. [Gudasheva TA, Antipova TA, Seredenin SB. Novel low-molecular-weight mimetics of the nerve growth factor. *Doklady Biochemistry and Biophysics.* 2010;434(1):262–265. (In Russ).].
8. Gudasheva TA, Povarnina PYu, Antipova TA, Seredenin SB. A novel dimeric dipeptide mimetic of the nerve growth factor exhibits pharmacological effects upon systemic administration and has no side effects accompanying the neurotrophin treatment. *Neuroscience & Medicine.* 2014;5(02):101–108. DOI: 10.4236/nm.2014.52013.
9. Гудашева Т.А., Антипова Т.А., Константинопольский М.А. и др. Оригинальный дипептидный миметик фактора роста нервов ГК-2 избирательно активирует пострецепторные пути TrkA, не вызывая побочных действий полноразмерного нейротрофина // *Доклады Академии наук.* 2014;456(2):231–235. [Gudasheva TA, Antipova TA, Konstantinopolsky MA et al. Nerve growth factor novel dipeptide mimetic GK-2 selectively activates TrkA postreceptor signaling pathways and does not cause adverse effects of native neurotrophin. *Doklady Biochemistry and Biophysics.* 2014;456(1):88–91. (In Russ).]. DOI: 10.7868/S0869565214140254.
10. Крыжановский С.А., Антипова Т.А., Цорин И.Б. и др. Ангиогенные эффекты димерного дипептидного миметика четвертой петли фактора роста нервов // *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* 2016;161(4):503–507. [Kryzhanovskii SA, Antipova TA, Tsorin IB. et al. Angiogenic effects of dimeric dipeptide mimetic of loop 4 of nerve growth factor. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2016;161(4):503–507. (In Russ).].
11. Пекльдина Е.С., Ионова Е.О., Мирошкина И.А. и др. Противоишемические свойства агониста TrkA-рецепторов миметика 4-ой петли фактора роста нервов // *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2018;(2):16–21. [Pekeldina ES, Ionova EO, Mirochkina IA et al. Antiischemic properties of the TrkA-receptor agonist, the nerve growth factor 4th loop mimetic. *Farmakokinetika i farmakodinamika.* 2018;(2):16–21. (In Russ).].
12. Крупаткин А.И., Сидоров В.В. Функциональная диагностика состояния диагностики состояния микроциркуляторно-тканевых систем. Колебания, информация, нелинейность. Руководство для врачей. — М.: Книжный дом «Либроком»; 2014. — 488 с. [Krupatkin AI, Sidorov VV. Funkcional'naya diagnostika sostoyaniya diagnostiki sostoyaniya mikrocirkulyarno-tkanevyh sistem. Kolebaniya, informaciya, nelinejnost'. Rukovodstvo dlya vrachej. Moscow: Knizhnyj dom «Librokom»; 2014. 488 (In Russ).].