

# Изучение влияния блокады VEGF рецепторов на антиишемическую активность соединения GK-2 на модели ишемии задней конечности крыс

Пекельдина Е. С., Мирошкина И. А., Сорокина А. В., Сазонова Н. М.,  
Вититнова М. Б., Крыжановский С. А.

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

**Аннотация.** Ранее в экспериментах *in vitro* и *in vivo* было показано, что агонист TrkA-рецепторов соединения GK-2, являющееся низкомолекулярным миметиком NGF, обладает выраженной ангиогенной и антиишемической активностью. Однако оставалось не ясным, связана ли эта активность с активацией VEGF-A, поскольку, с одной стороны, имеются сообщения о том, что NGF-опосредованный ангиогенез может быть инициирован и путём активации NGF фактора роста эндотелия сосудов VEGF-A, а с другой стороны, было показано, что селективный антагонист Flk1 рецепторов, специфичных для VEGF-A, соединение SU-5416 не влияет на ангиогенный эффект NGF. *Цель исследования.* Изучение влияния селективной блокады VEGF на антиишемическую активность агониста TrkA рецепторов соединения GK-2. *Методы.* Оценку антиишемической активности соединения GK-2 проводили в модельных экспериментах, воспроизводящих ишемию задней конечности у крыс. *Результаты.* Показано, что на фоне блокады связывания VEGF-A со специфичными для него (VEGFR1 /Flt-1/ и VEGFR2 /KDR/) рецепторами препаратом бевацизумаб (2,5 мг/кг, в/б, каждые 3 дня на протяжении 14 дней) соединение GK-2 (1 мг/кг, в/б, ежедневно, в течение 14 дней) реализует свою антиишемическую активность. *Заключение.* Результаты настоящих экспериментов свидетельствуют о том, что селективная блокада VEGF не оказывает существенного влияния на противоишемическую активность дипептидного миметика NGF – соединения GK-2, обладающего свойствами агониста TrkA рецепторов.

**Ключевые слова:** агонист TrkA-рецепторов – соединение GK-2; антагонист TrkA-рецепторов – соединение GK-1; бевацизумаб; ишемия задней конечности у крыс; антиишемическое действие

## Для цитирования:

Пекельдина Е. С., Мирошкина И. А., Сорокина А. В., Сазонова Н. М., Вититнова М. Б., Крыжановский С. А. Изучение влияния блокады VEGF рецепторов на антиишемическую активность соединения GK-2 на модели ишемии задней конечности крыс. *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2021;(4):24–29. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-4-24-29>

**Поступила:** 01 декабря 2021 г. **Принята:** 15 декабря 2021 г. **Опубликована:** 30 декабря 2021 г.

## Study of the effect of the VEGF receptor blockade on the antiischemic activity of the compound GK-2 in a rat hind limb ischemia model

Pekeldina ES, Miroshkina IA, Sorokina AV, Sazonova NM, Vititnova MB, Kryzhanovskii SA

FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russia

**Abstract.** Earlier, in experiments *in vitro* and *in vivo*, it was shown that the TrkA receptor agonist compound GK-2, which was a low molecular weight NGF mimetic, had pronounced angiogenic and antiischemic activity. However, it remained unclear whether this activity was associated with the activation of VEGF-A, since, on the one hand, there are reports that NGF-mediated angiogenesis can be initiated by activating NGF of the vascular endothelial growth factor VEGF-A, and on the other hand, it is shown that a selective antagonist of Flk1 receptors specific for VEGF-A, compound SU-5416 does not affect the angiogenic effect of NGF. *Purpose of the investigation.* Study of the selective VEGF blockade effect on the antiischemic activity of the TrkA receptor agonist GK-2. *Methods.* Evaluation of the compound GK-2 antiischemic activity was assessed in model experiments simulating hind limb ischemia in rats. *Results.* It has been shown that against the background of blockade of VEGF-A binding with specific for it (VEGFR1 / Flt-1 / and VEGFR2 / KDR /) receptors, bevacizumab (2.5 mg / kg, i.p., every 3 days for 14 days) compound GK-2 (1 mg / kg, i.p., daily, for 14 days) realizes its antiischemic activity. *Conclusion.* The results of these experiments indicate that the selective blockade of VEGF does not significantly affect the anti-ischemic activity of the dipeptide NGF mimetic compound GK-2, which has the properties of a TrkA receptor agonist.

**Keywords:** TrkA receptor agonist – GK-2 compound; TrkA receptor antagonist – GK-1 compound; bevacizumab; hind limb ischemia in rats; antiischemic effect

## For citations:

Pekeldina ES, Miroshkina IA, Sorokina AV, Sazonova NM, Vititnova MB, Kryzhanovskii SA. Study of the effect of the VEGF receptor blockade on the antiischemic activity of the compound GK-2 in a rat hind limb ischemia model. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics.* 2021;(4):24–29. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-4-24-29>

**Received:** December 01, 2021. **Accepted:** December 15, 2021. **Published:** December 30, 2021.

## Введение / Introduction

Одним из эндогенных регуляторов ангиогенеза является открытый в 1951 году итальянским нейрофизиологом *Levi-Montalcini R.* фактор роста нервов (NGF). Показано, что NGF может секретироваться и экскретироваться гладкомышечными клетками сосудов и кардиомиоцитами, а на их клеточных мембранах представлены специфичные для NGF TrkA рецепторы [1, 2].

Активация NGF TrkA рецепторов, расположенных на клеточной мембране эндотелиальных клеток сосудов, инициирует активацию Ras-МАРК- и/или PI3/Акт-опосредованных сигнальных путей, что в конечном итоге приводит к пролиферации, миграции и инвазии эндотелиальных клеток. Помимо активации вышеуказанных сигнальных путей, NGF-опосредованный ангиогенез может осуществляться посредством активирующего влияния NGF на фактор роста эндотелия сосудов – VEGF-A [3, 4]. Однако в

литературе имеются сообщения о том, что селективный антагонист Flk1 рецепторов, специфичных для VEGF-A, соединение SU-5416 не влияет на ангиогенный эффект NGF [5].

В НИИ фармакологии имени В.В. Закусова, начиная с 2003 года, проводятся фундаментальные исследования по созданию и фармакологическому изучению биологически активных замещённых низкомолекулярных миметиков NGF. В результате этих исследований были синтезированы дипептид HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CO-Glu-Lys-NH<sub>2</sub> (амид N-сукцинил-L-глутамил-L-лизина), получивший шифр ГК-1, и гомодимерный миметик (HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CO-Glu-Lys-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-)<sub>2</sub> гексаметилендиламид бис{N-моносукцинил-глутамил-лизина} – соединение ГК-2, являющиеся, соответственно, антагонистом и агонистом TrkA рецепторов [6].

Ранее в экспериментах *in vitro*, выполненных на культуре клеток сосудистого эндотелия человека HUVEC, нами было показано, что антагонист TrkA-рецепторов соединение ГК-1 блокирует ангиогенные эффекты агониста TrkA-рецепторов соединения ГК-2, что позднее было подтверждено результатами гистологических исследований в экспериментах *in vivo*, свидетельствующих о том, что на модели ишемии задней конечности крысы соединение ГК-1 подавляет антиишемическую активность агониста TrkA-рецепторов соединения ГК-2.

В продолжении этих исследований оценили влияние блокады VEGF на антиишемическое действие агониста TrkA рецепторов соединения ГК-2. Постановка такой задачи обусловлена тем, что с одной стороны, известно, что NGF-опосредованный ангиогенез может быть инициирован и путём активации NGF фактора роста эндотелия сосудов – VEGF-A [4], а с другой стороны, было показано, что селективный антагонист Flk1 рецепторов, специфичных для VEGF-A, соединение SU-5416 не влияет на ангиогенный эффект NGF [6].

Целью настоящего исследования было изучение влияния селективной блокады VEGF на антиишемическую активность агониста TrkA рецепторов соединения ГК-2.

## Материалы и методы / Materials and methods

Опыты проводили на белых беспородных крысах самцах массой 180–200 г, полученных из ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», филиал «Столбовая». Животные имели ветеринарный сертификат и прошли карантин в виварии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Животных содержали в соответствии с приказом Минздрава России № 199н 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. Животных основных и контрольных групп содержали в стандартных клетках по 5–7 особей в каждой, в стандартных условиях вивария ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» с предоставлением брикетированного корма и воды *ad libitum* при регулируемом 12/12 (свет/темнота) световом режиме. Все работы с лабораторными животными были выполнены в соответствии с общепринятыми нормами обращения с животными, на основе стандартных операционных процедур, принятых в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова, международными правилами (European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/ЕЕС)), а также в соответствии с «Правилами работы с животными», утверждёнными биоэтической комиссией ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Животные были рандомизированы на 6 групп: 1-я ( $n = 5$ ) – интактные; 2-я ( $n = 6$ ) – ишемия; 3-я ( $n = 6$ ) – ишемия + ГК-2; 4-я ( $n = 6$ ) – ишемия + ГК-1 + ГК-2; 5-я ( $n = 6$ ) – ишемия + бевацизумаб и 6-я ( $n = 8$ ) – ишемия + бевацизумаб + ГК-2. Соединения ГК-1 (1 мг/кг) и ГК-2 (1 мг/кг) вводили в/б, ежедневно, в течение 14 дней). Первая инъекция – через 1 час после перевязки. В 4-й группе соединение ГК-1 вводили за 1 час до инъекции ГК-2. Животным 5-й и 6-й групп препарат бевацизумаб вводили в/б по известной схеме [7, 8] – 2,5 мг/кг, каждые 3 дня на протяжении 14 дней (всего 4 инъекции). В 5-й группе первая инъекция бевацизумаба – через 1 час после перевязки. В 6-й группе бевацизумаб вводили по вышеуказанной схеме, соединение ГК-2 – ежедневно. Животные 1-й и 2-й групп получали эквивалентный объём изотонического раствора натрия хлорида.

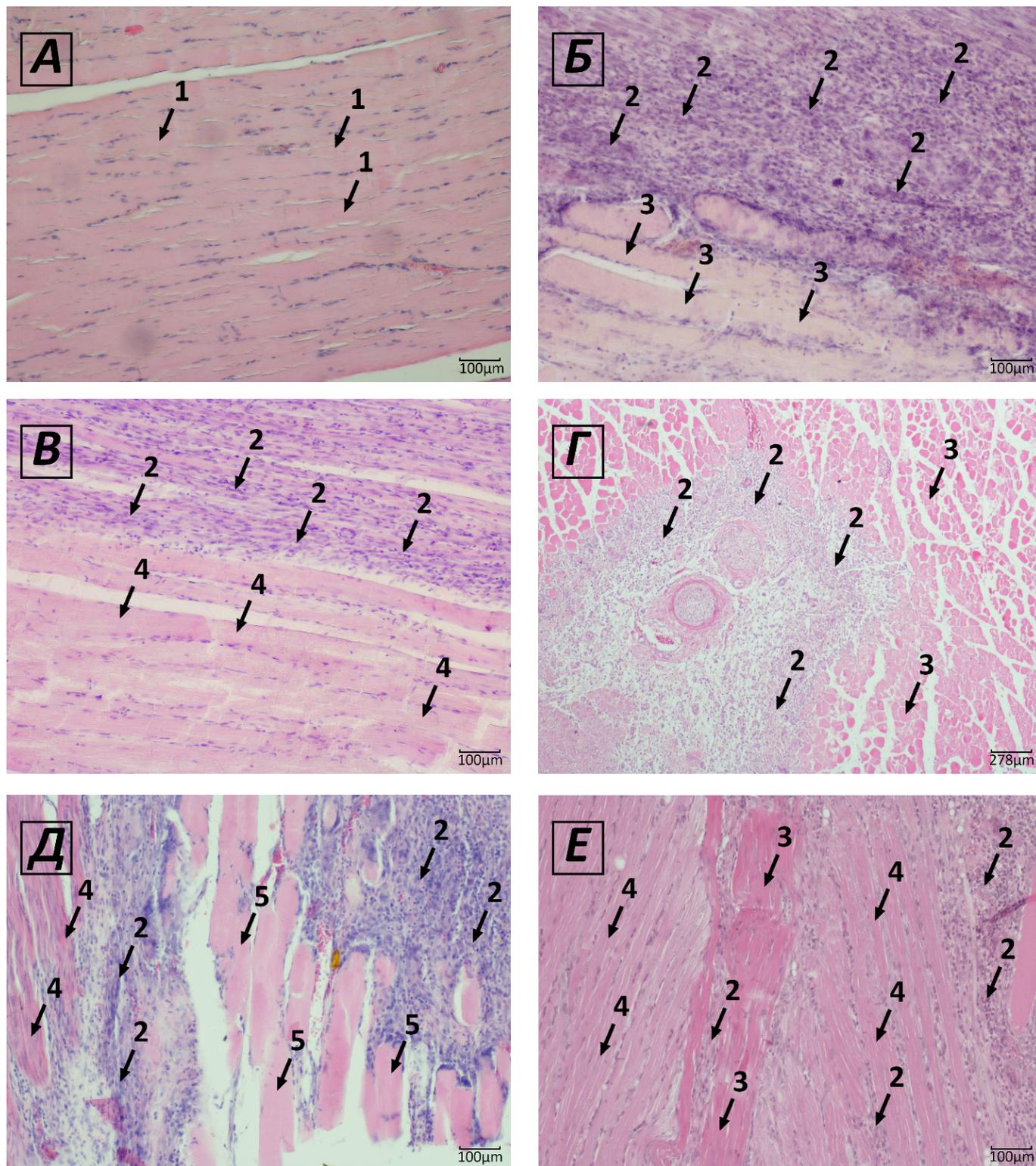
Ишемию задних конечностей у анестезированных (хлоралгидрат, 350 мг/кг, в/б) крыс вызывали путём одномоментной резекции участка бедренной артерии.

## Морфогистологические исследования

Ткани фиксировали в 10 % забуференном растворе формалина для дальнейшего морфометрического и гистологического изучения. После окончания фиксации и стандартной проводки образцы заливали в парафиновые блоки. Готовили гистологические срезы толщиной 5 мкм, которые помещали на стекло с полилизинным покрытием (Menzel), затем окрашивали галлоцианин-хромовыми квасцами с последующей докраской 1 % водным раствором эозина. Гистологические препараты микроскопировали в проходящем свете (микроскоп Nikon eclipse 55i, увеличение  $\times 100$ ,  $\times 40$ ).

Субстанция соединений ГК-1 и ГК-2 синтезирована в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова.

В качестве антагониста VEGF использовали препарат бевацизумаб концентрат для приготовления раствора, который представляет собой рекомбинантные гиперхимерные моноклональные IgG1 антитела, селективно связывающиеся и ингибирующие биологическую активность VEGF.



**Рис. 1.** Гистологические препараты икрожной мышцы крысы:

А – интактные (ув.  $\times 100$ ); Б – контроль ишемии (ув.  $\times 100$ ); В – ишемия + ГК-2 (ув.  $\times 100$ ); Г – ишемия+ГК-1+ ГК-2 (ув.  $\times 40$ ); Д – ишемия +Бевацизумаб (ув.  $\times 100$ ); Е – Бевацизумаб+ГК-2 (ув.  $\times 100$ )

**Fig. 1.** Histological preparations of the rat gastrocnemius muscle:

А – intact ( $\times 100$ ); Б – ischemia control ( $\times 100$ ); В – ischemia + GK-2 ( $\times 100$ ); Г – ischemia + GK-1 + GK-2 ( $\times 40$ ); Д – ischemia + Bevacizumab ( $\times 100$ ); Е – Bevacizumab + GK-2 ( $\times 100$ )

*Примечания.* 1 – интактные мышечные волокна; 2 – лимфомакрофагальный инфильтрат; 3 – некробиотически изменённые мышечные волокна; 4 – сохранённые мышечные волокна; 5 – восковидный некроз мышечных волокон.

*Notes:* 1 – intact muscle fibers; 2 – lymphomacrophage infiltrate; 3 – necrobiotically altered muscle fibers; 4 – preserved muscle fibers; 5 – waxy necrosis of muscle fibers.

## Результаты и обсуждение / Results and discussion

При изучении микроскопической картины поперечнополосатых мышц, полученных из задней конечности крыс 1-й группы (интактные), показано, что гистоархитектоника мышечной ткани не изменена. На поперечных срезах заметен эпимизий и перимизий. На продольных срезах видны параллельно идущие мышечные волокна. Саркоплазма равномерно окрашена в бледно-розовый цвет. Во всех мышечных волокнах чётко определяется поперечная исчерченность. По периферии мышечных волокон определяются продолговатые, базофильно окрашенные ядра. В эндомизии между мышечными волокнами обнаруживаются ядра фибробластов (рис. 1А).

Микроскопическая картина поперечнополосатых мышц экспериментальных крыс 2-й группы (контроль ишемии) свидетельствует о том, что гистоархитектоника поперечнополосатой мышечной ткани существенно изменена. Мышечная ткань у всех экспериментальных животных отёчна. На поперечных срезах обнаруживается заметно утолщенный перимизий. Участки ткани в ишемизированной области представляют собой обрывки мышечных волокон, где саркоплазма ярко окрашена, гомогенна. Поперечная исчерченность в таких волокнах не определяется. Ядра в большинстве случаев лизированы, поэтому визуально не определяются. В отдельных ишемизированных мышечных волокнах можно видеть мелкие тёмные пикнотичные ядра. Наряду с участками, где мышечные волокна имеют характерную толщину, встречаются участки с заметно атрофированными мышечными волокнами (рис. 1Б). Участки некробиотически изменённой мышечной ткани соседствуют с лимфомакрофагальным инфильтратом с примесью фибробластов и гигантских эпителиоидных клеток.

Микроскопическая картина икроножной мышцы крыс, которые на фоне ишемии получали соединение ГК-2, свидетельствует о том, что интенсивность альтеративных процессов в мышце этих крыс менее выражена. Ядра поперечнополосатых мышц мелкие, гиперхромные, иногда они не обнаруживаются. Саркоплазма в отдельных участках оксифильна, иногда гомогенна, поперечная исчерченность выражена слабо. Вокруг некробиотически изменённых поперечнополосатых мышц обнаружены участки лимфомакрофагального инфильтрата с примесью полиморфноядерных лейкоцитов. Размер таких участков заметно меньше

такового, наблюдаемого у контрольных крыс. Сосуды полнокровны, обнаружен околососудистый отёк. Эндомизий чётко виден. Капиллярная сеть хорошо выражена. Капилляры идут прямо, вдоль мышечных волокон (рис. 1В).

Полученные данные свидетельствуют о том, что у животных, которым после удаления бедренной артерии в течение 14 дней в/б вводили соединение ГК-2, в отличие от контрольных, хорошо выражена капиллярная сеть, а интенсивность некротических и воспалительных изменений существенно ниже, т. е. на данной модели патологии соединение ГК-2 проявляет противоишемическую активность.

В группе животных, которым соединение ГК-2 вводили на фоне инъекций антагониста TrkA рецепторов соединения ГК-1, микроскопическая картина икроножной мышцы крыс этой группы существенно не отличается от таковой у контрольных животных (рис. 1Г), что подтверждает ранее полученные нами данные о том, что антагонист TrkA соединения ГК-1 блокирует антиишемическое действие агониста TrkA-рецепторов соединения ГК-2.

У животных, получавших препарат бевацизумаб, гистологическая картина мышечной ткани близка к зарегистрированной у контрольных животных, хотя визуально интенсивность альтеративных процессов в мышце этих крыс несколько выше (рис. 1Д), а участков некробиотически изменённой мышечной ткани больше.

Иная картина наблюдается у животных, которые на фоне ишемии получали комбинацию бевацизумаб + соединение ГК-2. Интенсивность альтеративных процессов в мышечной ткани этих животных значительно ниже, чем у крыс, получавших бевацизумаб (рис. 1Е). В целом гистологическая картина близка к зарегистрированной у животных, получавших на фоне ишемии соединение ГК-2 (рис. 1В), однако визуально интенсивность воспалительных процессов у животных, получавших комбинацию бевацизумаб + соединение ГК-2 выше.

## Выводы / Conclusions

Таким образом, результаты настоящих экспериментов свидетельствуют о том, что селективная блокада VEGF не оказывает существенного влияния на противоишемическую активность дипептидного миметика NGF – соединения ГК-2, обладающего свойствами агониста TrkA рецепторов.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Пекельдина Евгения Сергеевна**

pekeldinaes@mail.ru

SPIN-код: 3225-9216

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

**Pekeldina Eugenia S.**

pekeldinaes@mail.ru

SPIN code: 3225-9216

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

**Мирошкина Ирина Александровна**

e-mail: iris10.81@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3208-198X>

SPIN-код: 4697-7938

н. с. лаборатории лекарственной токсикологии  
ФГБНУ «НИИ фармакологии имени  
В.В. Закусова», Москва, Россия**Miroshkina Irina A.**

e-mail: iris10.81@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3208-198X>

SPIN code: 4697-7938

Research scientist of the laboratory of drug toxicology FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

**Сорокина Александра Валериановна**

e-mail: alex54.sorokina@icloud.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9600-7244>к. б. н., в. н. с. лаборатории лекарственной  
токсикологии ФГБНУ «НИИ фармакологии  
имени В.В. Закусова», Москва, Россия**Sorokina Alexandra V.**

e-mail: alex54.sorokina@icloud.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9600-7244>

PhD in Biology, Leading researcher of the laboratory of drug toxicology FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

**Сазонова Нелля Михайловна**

e-mail: saz-nellya@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7608-7419>

SPIN-код: 8835-7887

к. х. н., с. н. с. лаборатории пептидных  
биорегуляторов отдела химии лекарственных  
средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени  
В.В. Закусова», Москва, Россия**Sazonova Nelliya M.**

e-mail: saz-nellya@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7608-7419>

SPIN code: 8835-7887

PhD Chemical Sci., Senior research scientist of laboratory of peptide bioregulators of medicinal chemistry department FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

**Вититнова Марина Борисовна**

e-mail: MB-Vit@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/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.**

e-mail: MB-Vit@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7407-7516>

SPIN code: 1901-8919

PhD Biological Sci., Senior researcher scientist 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: <https://orcid.org/0000-0003-2832-4739>

SPIN-код: 6596-4865

д. м. н., зав. лабораторией фармакологического  
скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии  
имени В.В. Закусова», Москва, Россия**Kryzhanovskiy Sergey A.***Corresponding author*

e-mail: SAK-538@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2832-4739>

SPIN code: 6596-4865

Dr. Sci. (Med.), Head of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

**Список литературы / References**

1. Donovan MJ, Miranda RC, Kraemer R et al. Neurotrophin and neurotrophin receptors in vascular smooth muscle cells. Regulation of expression in response to injury. *Am J Pathol.* 1995;147(2):309–324. [https://hsrc.himmelfarb.gwu.edu/smhs\\_medicine\\_facpubs/4884](https://hsrc.himmelfarb.gwu.edu/smhs_medicine_facpubs/4884)
2. Martinelli PM, Camargos ER, Azevedo AA et al. Cardiac NGF and GDNF expression during *Trypanosoma cruzi* infection in rats. *Auton Neurosci.* 2006;130(1-2):32–40. DOI: 10.1016/j.autneu.2006.05.004.
3. Asanome A, Kawabe J, Matsuki M, Kabara M, Hira Y, Bochimoto H, Yamauchi A, Aonuma T, Takehara N, Watanabe T, Hasebe N. Nerve growth factor stimulates regeneration of perivascular nerve, and induces the maturation of microvessels around the injured artery. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;443(1):150–155. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.11.070.
4. Wang J, He C, Zhou T, Huang Z, Zhou L, Liu X. NGF increases VEGF expression and promotes cell proliferation via ERK1/2 and AKT signaling in Müller cells. *Mol Vis.* 2016;22: 254–263.

5. Lazarovici P, Gazit A, Stanizewska I et al. Nerve growth factor (NGF) promotes angiogenesis in the quail chorioallantoic membrane. *Endothelium.* 2006;13(1):51–59. DOI: 10.1080/10623320600669053.

6. Гудашева Т.А., Антипова Т.А., Середенин С.Б. Новые низкомолекулярные миметики фактора роста нервов. *Докл. акад. наук.* 2010;434(4):549–552. [Gudasheva TA, Antipova TA, Seredenin SB. Novel low-molecular-weight mimetics of the nerve growth factor *Dokl Biochem Biophys.* 2010;434(1): 262–265. (In Russ).]. DOI: 10.1134/S160767291005011X.

7. Ishida J, Onishi M, Kurozumi K, Ichikawa T, Fujii K, Shimazu Y, Oka T, Date I. Integrin inhibitor suppresses bevacizumab-induced glioma invasion. *Transl Oncol.* 2014;7(2):292–302.e1. DOI: 10.1016/j.tranon.2014.02.016.

8. Soysal D, Kızıldağ S, Saatlı B, Posacı C, Soysal S, Koyuncuoğlu M, Doğan Ö. A novel angiogenesis inhibitor bevacizumab induces apoptosis in the rat endometriosis model. *Balkan J Med Genet.* 2015;17(2):73–80. DOI: 10.2478/bjmg-2014-0077.