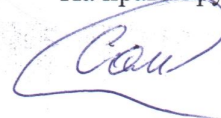


На правах рукописи



САМАТОШЕНКОВ ИГОРЬ ВАЛЕРЬЕВИЧ

**ИШЕМИЗИРОВАННАЯ СКЕЛЕТНАЯ МЫШЦА КРЫСЫ В УСЛОВИЯХ ПРЯМОГО
ВВЕДЕНИЯ И КЛЕТОЧНО-ОПОСРЕДОВАННОЙ ДОСТАВКИ КОМБИНАЦИЙ
АДЕНОВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ Ad5-VEGF165, Ad5-ANG И Ad5-GDNF**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Казань – 2021

Работа выполнена на кафедре гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,
профессор, заведующий кафедрой
гистологии, цитологии,
эмбриологии ФГБОУ ВО
Казанского ГМУ Минздрава России
Челышев Юрий Александрович

Официальные оппоненты:

Ермолин Игорь Леонидович
доктор биологических наук,
профессор, заведующий кафедрой
гистологии с цитологией и
эмбриологией ФГБОУ ВО ПИМУ
Минздрава России.

Деев Роман Вадимович
кандидат медицинских наук,
доцент, заведующий кафедрой
патологической анатомии
ФГБОУ ВО "СЗГМУ им. И.И.
Мечникова" Минздрава России

Ведущая организация:

Федеральное государственное
автономное образовательное
учреждение высшего образования
"Российский национальный
исследовательский медицинский
университет имени Н.И. Пирогова"
Министерства здравоохранения
Российской Федерации

Защита диссертации состоится «24» ноября 2021 г. в 15.00 часов на заседании диссертационного совета КФУ.03.06. при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: г. Казань, ул. К. Маркса, д.76, ауд. 208 (актовый зал).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при Казанском (Приволжском) федеральном университете.

Автореферат разослан «__» _____ 2021 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета КФУ.03.06.
д.б.н., профессор



Аникина Т.А.

Актуальность исследования

Хроническая ишемия нижних конечностей (ХИНК) является актуальной медико-социальной проблемой. Консервативное лечение данного заболевания часто неэффективно. Значительная часть пациентов имеет ограничения для реваскуляризации конечности вследствие поражения дистального русла или наличия тяжёлых соматических заболеваний (Gupta et al., 2009).

Возможность преодоления постишемических нарушений связывают с введением в область ишемии стимуляторов ангиогенеза. С целью восстановления кровотока конечности в область ишемии вводили наиболее изученные в эксперименте стимуляторы ангиогенеза – фактор роста фибробластов 2 (*FGF2*) и сосудистый эндотелиальный фактор роста 165 (*VEGF165*, далее *VEGF*) (Shing et al., 1984; Baffour et al., 1992). Введение данных факторов в опытах на животных продемонстрировало высокую эффективность, однако при использовании данного метода в клинической практике стало понятным, что для поддержания постоянной достаточной концентрации терапевтической молекулы в зоне ишемии необходимо вводить значительные количества белка из-за его активного расщепления (Deveza et al., 2012). Эти трудности стимулировали поиск иных методов повышения содержания в ишемизированной ткани ангиогенных факторов, таких как *VEGF*, *FGF2* и ангиогенин (*ANG*). Среди них одним из наиболее приемлемых оказался способ доставки генов, кодирующих ангиогенные факторы (Banai et al., 1994; Jazwa et al., 2013; Gavrilenko et al., 2013).

В исследованиях по стимулированию ангиогенеза путём прямого введения рекомбинантных генов или при их доставке на клеточных носителях преимущественно изучали эффекты одного и реже – комбинации двух трансгенов (Simovic et al., 2013; Zhang et al., 2016). При использовании генетических конструкций для стимулирования ангиогенеза и преодоления последствий ишемии особенно значим выбор оптимального способа доставки трансгена. В этом контексте актуально сравнение результатов прямой инъекции трансгенных конструкций и их клеточно-опосредованной доставки.

Клеточная терапия рассматривается как один из способов стимулирования ангиогенеза при ишемии конечности. Позитивный эффект зарегистрирован при трансплантации в область ишемии мононуклеарных клеток костного мозга (Shintani et al., 2001), гемопоэтических стволовых клеток (Ribatti et al., 2000; Hattori et al., 2001), эндотелиальных прогениторных клеток (Asahara et al., 1997), стромальных клеток костного мозга (Pesce et al., 2003), мононуклеарных клеток крови пуповины (МККП) (Yoshida et al., 2004) и мезенхимных стволовых клеток из жировой ткани (Tolar et al., 2010; Solovyeva et al., 2014). МККП рассматриваются как одни из наиболее приемлемых для стимулирования ангиогенеза вследствие их низкой иммуногенности, пригодности для алло- и аутотрансплантации у человека, доступности, простоты получения и хранения (Zhao et al., 2012; Газизов и соавт., 2014; Ballen et al., 2017). Помимо этого, крайне важным фактором является также отсутствие этических, религиозных и законодательных запретов, связанных с трансплантацией МККП.

При трансплантации клеток при ишемии нижних конечностей стало очевидным, что клеточная терапия приводит лишь к умеренному и часто недостаточному улучшению кровотока и перфузии конечности (Парфенова и соавт., 2007). Именно поэтому для стимулирования ангиогенеза наиболее целесообразно применение генетически модифицированных клеток с усиленной экспрессией генов, кодирующих ангиогенные факторы. Этот подход позволяет уменьшить необходимое для трансплантации количество клеток и повысить эффективность преодоления последствий ишемии (Парфенова и соавт., 2007).

Интерес к роли фактора иннервации в развитии ишемии и преодолении её последствий проявился уже давно (Mukouyama et al., 2002), однако немногочисленные строгие подтверждения нервного влияния на ишемизированную ткань получены сравнительно недавно (Zhonghua et al., 2015; Cen et al., 2016). Возможно, именно поэтому клеточные и молекулярные механизмы этого влияния в целом остаются неясными. Если считать установленным, что при денервации артерий ухудшается ангиогенез, то применение генов нейротрофических факторов, таких как ген глиального нейротрофического фактора (*GDNF*) и ген фактора роста нервов (*NGF*), поддерживающих выживание нейронов и рост нервных волокон, может стимулировать восстановление кровотока в конечности. *GDNF* обладает нейротрофическим действием и прямым влиянием на ишемизированную скелетную мышцу и клетки-мишени в стенке сосуда (Blais et al., 2013; Zhang et al., 2016). Одновременная доставка в ишемизированную ткань комбинации генов ангиогенных и нейротрофических факторов может оказаться наиболее эффективной для преодоления последствий ишемии.

Цель исследования – оценить эффективность реваскуляризации и преодоления последствий ишемии скелетной мышцы в условиях прямого введения комбинации аденовирусных векторов Ad5-*VEGF*, Ad5-*ANG* и Ad5-*GDNF* и их клеточно-опосредованной доставки.

Для достижения цели поставлены следующие **задачи**.

1. По критериям плотности капилляров в ишемизированной скелетной мышце выявить наиболее эффективную комбинацию векторов Ad5-*VEGF*, Ad5-*ANG* и Ad5-*GDNF* при их прямом введении и МККП-опосредованной доставке.
2. Изучить структуру ишемизированной скелетной мышцы в условиях прямого введения и МККП-опосредованной доставки векторов Ad5-*VEGF*, Ad5-*ANG* и Ad5-*GDNF* в различных комбинациях.
3. В ишемизированной мышце проследить связь между присутствием нервных волокон и процессами реваскуляризации и репаративного миогенеза в условиях прямого введения и МККП-опосредованной доставки векторов Ad5-*VEGF*, Ad5-*ANG* и Ad5-*GDNF* в различных комбинациях.

Научная новизна

На модели ишемии конечности впервые показано стимулирующее влияние на ангиогенез, репаративный миогенез и иннервацию скелетной мышцы доставки комбинации генов, кодирующих ангиогенные и нейротрофические факторы *VEGF*, *ANG* и *GDNF*. Установлено, что наиболее выраженное восстановление микроциркуляторного русла в ишемизированной скелетной мышце достигается при доставке комбинации генов *VEGF* и *ANG* при помощи МККП, по сравнению с прямым введением в область ишемии той же комбинации генов. На скелетной мышце впервые показана связь между выраженностью позитивного действия конкретных ангиогенных факторов и стадией ишемии. Исследованием впервые установлено, что вводимый прямо в мышцу или доставляемый в неё при помощи МККП трансген *GDNF* в комбинации с *VEGF* и *ANG* оказывает стимулирующее влияние на репаративный миогенез при ишемии конечности.

Научно-практическая значимость работы

Клеточно-опосредованная доставка комбинации целевых рекомбинантных генов при ишемии конечности позволяет обеспечить эффективное и пролонгированное стимулирование реваскуляризации, репаративного миогенеза и иннервации скелетной мышцы, что может иметь значение для лечения пациентов с ХИНК. Результаты, полученные в данном исследовании, являются перспективными для проведения дальнейших углублённых доклинических

исследований клеточно-опосредованной доставки комбинации генов ангиогенных и нейротрофических факторов для стимулирования ангиогенеза при ХИМК.

Положения, выносимые на защиту:

1. Из комбинаций трёх аденовирусных векторов Ad5-*VEGF165*, Ad5-*ANG* и Ad5-*GDNF*, вводимых прямо или при помощи моноклеарных клеток крови пуповины, опосредованная клетками доставка комбинации Ad5-*VEGF* и Ad5-*ANG* наиболее эффективно стимулирует реваскуляризацию, репаративный миогенез и регенерацию нервных волокон в ишемизированной скелетной мышце.
2. Включение вектора Ad5-*GDNF* в комбинацию с Ad5-*VEGF* и Ad5-*ANG*, вводимую прямо или доставляемую при помощи моноклеарных клеток крови пуповины, стимулирует репаративный миогенез в ишемизированной скелетной мышце.

Личный вклад автора заключается в постановке и формализации задач; в разработке патологической модели ишемии и методов её коррекции путём введения генного и генно-клеточного материала; разработке протоколов введения генно-клеточных конструкций; анализе полученных результатов; в апробации диссертации и публикации результатов исследования.

Апробация материалов диссертации

Результаты диссертационного исследования были доложены на следующих конгрессах и конференциях: Республиканский конкурс молодых учёных от Академии наук РТ (Казань, 2020); IV Национальный конгресс по регенеративной медицине (Москва, 2019); VIII Съезд научного медицинского общества анатомов, гистологов и эмбриологов (Воронеж, 2019); конкурс 50 инновационных идей для республики Татарстан (Казань, 2019, 2017); региональный конкурс «StartUp Tour» (Иннополис, 2019; Набережные Челны, 2018; Ульяновск, 2017); конкурс «Наш Татарстан» (Казань, 2018); Всероссийская студенческая конференция с международным участием «Белые цветы» (Казань, 2018, 2017); XII международная научная медицинская конференция им. Пирогова студентов и молодых учёных (Москва, 2018); XIV Конгресс международной ассоциации морфологов (Астрахань, 2018); III специализированный форум «Открытие талантов» (Казань, 2017); конкурс научно-исследовательских и научно-практических работ на соискание именных стипендий мэра Казани (Казань, 2017); конкурс «Молодёжная школа талантов» (Казань, 2017); грант «УМНИК» (Казань, 2017).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, получены 2 патента РФ на изобретение, 4 статьи опубликованы в рецензируемых научных журналах перечня ВАК, из них 1 статья – в журнале, индексируемом в Scopus.

Связь работы с базовыми научными программами

Исследование было проведено с помощью гранта Фонда содействия развитию малых форм предприятий в инновационной сфере «УМНИК» 12179ГУ/2017 «Разработка генно-клеточного препарата для лечения ишемии нижних конечностей» (2017-2019).

Структура и объём диссертации

Объём диссертации составляет 142 страницы машинописного текста, содержит введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключение, выводы, список литературы. В работе представлены 8 таблиц и 36 рисунков, которые включают 32 микрофотографии световой, 6 флуоресцентной и 29 конфокальной микроскопии. Список литературы состоит из 251 источника.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на 100 белых половозрелых лабораторных крысах линии Wistar, самках и самцах весом 200–250 г. Содержание лабораторных животных и работу с ними проводили в соответствии с требованиями приказа Министерства здравоохранения Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики». Животных содержали в отдельных клетках со стандартным суточным режимом и свободным доступом к воде и корму. Проведение диссертационного исследования одобрено локальным этическим комитетом Казанского государственного медицинского университета (выписка из протокола заседания №2 от 20.02.2018 года).

Подготовка аденовирусных векторов

Рекомбинантные аденовирусы, разработанные в НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, были любезно предоставлены профессором Исламовым Р.Р. Для получения рекомбинантного аденовируса Ad5-VEGV, Ad5-ANG, Ad5-VEGV+Ad5-ANG, Ad5-VEGV+Ad5-ANG+Ad5-GDNF была линейаризована аденовирусная векторная плаزمида с использованием фермента рестрикции *PacI*. Очищенную линейную плазмиду использовали для генетической модификации клеток HEK293A с помощью трансфекционного реагента TurboFect. После трансфекции среду заменяли каждые 2–3 суток свежей средой до появления цитопатических изменений в морфологии клеток. На 10-е сутки после трансфекции клеточные суспензии собирали в стерильные пробирки по 2 мл и подвергали нескольким циклам замораживания/оттаивания, а затем центрифугировали для получения сырого вирусного лизата. Вирусный запас хранили при -80°C.

Для получения препаративных количеств аденовирусного вектора клетки HEK293A инфицировали сырым вирусным лизатом. Через 72 ч клеточные лизаты собирали в 15 мл пробирки и подвергали нескольким циклам замораживания/оттаивания, а затем центрифугировали. Супернатант фильтровали и далее очищали с использованием двух раундов изопикового градиентного центрифугирования хлорида цезия, диализировали против 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, а затем титровали в соответствии с рекомендациями производителя для системы pAd/CMV/V5-Dest (Invitrogen).

Выделение и генетическая модификация мононуклеарных клеток крови пуповины человека

Выделение ядросодержащих клеток крови проводили в пробирках объёмом 50 мл. В каждую пробирку вносили по 25 мл раствора фикола плотностью 1,077 г/мл (ПанЭко), на который аккуратно при помощи автоматического дозатора наслаивали равный объём крови с антикоагулянтом (соотношение крови и антикоагулянта колебалось в пределах 1:1–3:1). Проводили центрифугирование при 720×g в течение 20 мин и получали чёткое разделение крови на 4 фракции: эритроциты, фиколл, лейкоциты и плазму. Лейкоцитарную фракцию отбирали в отдельную пробирку, ресуспендировали в стерильном растворе DPBS в соотношении 1:2 и центрифугировали при 305×g в течение 15 мин. Полученный клеточный осадок ресуспендировали в 10 мл раствора DPBS и повторно центрифугировали при 305×g в течение 15 мин. Для удаления эритроцитов клетки ресуспендировали в гипотоническом лизирующем буфере (0,168 M NH₄Cl, 0,1 M KHCO₃, 1,27 mM ЭДТА pH 7,3), на заключительном этапе клетки отмывали раствором DPBS. Клетки мононуклеарной фракции крови после выделения поддерживали на низкоадгезивных чашках (d=10 см) со средой RPMI 1640 (ПанЭко) с добавлением 10% FBS (HyClone) и смеси пенициллина и стрептомицина (100 ЕД/мл; 100 мкг/мл) (ПанЭко). Генетическую модификацию МККП проводили рекомбинантными аденовирусами с клонированными генами Ad5-VEGV165, Ad5-ANG и Ad5-GDNF непосредственно после

выделения клеток. Клетки инфицировали предварительно диализованным аденовирусом с титром вирусных частиц 10 (MOI 10). После добавления вируса клетки содержали в среде RPMI 1640 + 10% FBS в течение 16–18 часов в CO₂-инкубаторе с 5% содержанием CO₂. Впоследствии клетки отмывали раствором DPBS и ресуспендировали в физиологическом растворе. Подготовка генетических конструкций, выделение и генетическая модификация МККП проведена совместно с к.б.н. Салафутдиновым И.И. (Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета).

Экспериментальные группы

Ишемию конечности создавали наложением на бедренную артерию двух лигатур (Ethicon 4\0), участок между лигатурами пересекали. Интенсивность кровотока измеряли методом доплеровской флоуметрии (Easy LDI, England) и выражали в абсолютных перфузионных единицах (ару).

Через 14 суток после моделирования ишемии животные были разделены на 2 группы: 1-я группа (n=40) – с прямым введением генетических конструкций; 2-я группа (n=40) с клеточно-опосредованной их доставкой. Каждая из групп включала 4 подгруппы с введением различных векторов или их комбинаций в варианте прямой инъекции генетических конструкций и клеточно-опосредованной доставки. Животным контрольной группы (n=10) в тех же условиях вводили физиологический раствор (NaCl).

Животным первой группы инъецировали аденовирусные векторы Ad5-*VEGV*, Ad5-*ANG*, Ad5-*VEGV*+Ad5-*ANG* и Ad5-*VEGV*+Ad5-*ANG*+Ad5-*GDNF* по 2×10^{10} вирусных частиц в 60 мкл NaCl в дистальную часть икроножной мышцы в 4 точки по 15 мкл в каждую точку. Животные второй группы получили инъекцию МККП, трансдуцированных этими же векторами – МККП Ad5-*VEGV*, МККП Ad5-*ANG*, МККП Ad5-*VEGV*+Ad5-*ANG* и МККП Ad5-*VEGV*+Ad5-*ANG*+Ad5-*GDNF* по 2×10^6 клеток в 60 мкл NaCl в те же 4 точки по 15 мкл в каждую точку. Для оценки экспрессии гена *EGFP* животные третьей группы (n=10) на 14-е сутки после операции получали инъекцию Ad5-*EGFP* или МККП Ad5-*EGFP*. Животных каждой подгруппы выводили из эксперимента через 14 и 28 суток после введения векторов или генетически модифицированных клеток.

Гистологические и иммуногистохимические методы

Дистальную часть икроножной мышцы забирали и обрабатывали по стандартной методике для последующего иммуногистохимического анализа. Морфометрию мышцы проводили на поперечных срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. Световые изображения оцифровывали с помощью сканера Aperio CS2. Морфометрический анализ проводили с помощью программного обеспечения Image Scope. Оценку плотности капилляров и подсчёт количества центральоядерных мышечных волокон (ЦЯМВ) осуществляли в области ишемии и на расстоянии 500 мкм от компактной зоны введения генетических конструкций. Наличие соединительной ткани на единицу площади оценивали при помощи окраски по Ван-Гизону на 14-е и 28-е сутки после создания ишемии.

Для проведения иммуногистохимического анализа икроножную мышцу забирали и заливали в парафин по стандартной методике. На поперечных срезах мышцы толщиной 5 мкм проводили иммуногистохимическую реакцию с антителами против маркера эндотелиальных клеток CD31 (1:150, Abcam). Для визуализации использовали вторичные антитела осла против IgG кролика, конъюгированные с флуорохромом Alexa Fluor 555 (Invitrogen, A-31572). Ядра окрашивали DAPI.

Идентификацию нервных волокон в мышце проводили с антителами против маркера шванновских клеток белка S100b (1:1000, Abcam, ab52642, клон EP1576Y) и маркера аксонов β 3-тубулина (1:100, Abcam). Нанесение на срезы антител производили после их дегидратации и депарафинирования с последующей демаскировкой антигенов в Tris-EDTA (pH=9,0). Для детекции антигенов применяли систему Novolink ((Leica Biosystems, USA), визуализацию проводили хромогеном аминоэтилкарбазолом (АЭК), ядра окрашивали гематоксилином. Флуоресцентные изображения получены с помощью лазерного конфокального микроскопа LSM 700 (Carl Zeiss) при увеличении $\times 630$.

ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ)

Общую РНК выделяли из свежей икроножной мышцы путём гомогенизации образца со стеклянными шариками разного диаметра с помощью набора Yellow Solve Kit (Silex, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Для синтеза кДНК предварительно измеряли концентрацию РНК на спектрофотометре. К необходимому количеству РНК добавляли 0,3 мкл RandomPrimer и помещали в амплификатор на 5 минут при 65°C. кДНК-матрицы синтезировали из 100 нг общей РНК, 100 ЕД обратной транскриптазы RevertAid (Thermo Fisher Scientific), 100 пмоль случайных гексамерных праймеров и 5U ингибитора РНКазы по протоколу производителя. Количественный анализ мРНК генов *VEGF*, *ANG*, *GDNF* и десмина проводили с использованием ПЦР-системы CFX 96 в режиме реального времени (Bio-Rad, Hercules, CA). В качестве интеркалирующего красителя был применён SYBR Green. Были использованы праймеры: *VEGF*165 (5'-AAGGAGGAGGGCAGAATCATCACG-3' и 5'-CTCAGTGGGCACACACTCCAG-3'), *ANG* - (5'-ACCTCACCCTGCAAAGACAT-3' и 5'-GCAAGTGGTGACCTGGAAAG-3'), *GDNF* (5'-CGCTGAGTGACTCAAAT-3' и 5'-CGATTCCGCTCTCTTCTAGG-3'), десмин (5'-CTTCAGGAACAGCAGGTC-3' и 5'-ATCTCGCAGGTGTAGGAC-3'). Экспрессию мРНК нормализовали с помощью 18S рРНК.

Вестерн-блот

Крыс анестезировали хлоралгидратом (80 мг/мл, 2 мл, Sigma), икроножную мышцу в области ишемии немедленно выделяли. Общий белок экстрагировали по стандартному протоколу в буфере RIPA с ингибиторами протеаз (Sigma). После измерения концентрации белка в каждом образце лизаты подвергали SDS-PAGE. Образцы нагревали до 95°C в течение 5 мин, электрофорез проводили в 12% полиакриламидном геле, при 150В в течение 50 мин при комнатной температуре и переносили бэнды на поливинилиденфторидные мембраны. Неспецифическое связывание белковых комплексов предотвращали блокированием мембраны в течение 2 ч при RT в 5% обезжиренном сухом молоке с PBST (0,5% Tween 20). Затем мембраны промывали в PBST (0,5% Tween 20) и инкубировали в течение 12 часов при 4°C с антителом. Комплексы антиген-антитело выявляли с использованием конъюгированных с пероксидазой хрена (HRP) антител против CD34 (1:100, Santa Cruz), фактора фон Виллебранда (vWF, 1:200, Dako) и β -актина (1:2000, GenScript). Мембрану просматривали с помощью системы гель-документирования ChemiDoc XRS+ (BioRad). Плотность полос была определена с использованием изображения Image J версии 1.46 после вычитания фона и нормализована относительно уровня β -актина.

Статистическая обработка результатов

Статистический анализ и визуализация полученных данных проводили с использованием среды для статистических вычислений R 3.6.3 (R Foundation for Statistical Computing). Описательные статистики для количественных переменных представлены в виде среднего (стандартное отклонение) и медианы (1-й и 3-й квартили). При сравнении исследуемых групп использовали однофакторный дисперсионный анализ и тест Краскела-Уоллиса, в качестве post hoc

методов – t-тест Уэлча и тест Данна соответственно, различия считались статистически значимыми при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Структура ишемизированной икроножной мышцы крысы

В задней конечности крысы зарегистрировано стойкое снижение кровотока на 45%. Сразу после операции кровотока в прооперированной конечности уменьшился с $123 \pm 0,8$ до $56 \pm 0,5$ ари. В последующем значения кровотока сохранялись в пределах $62 \pm 1,3$ ари до введения генетических конструкций на 14-е сутки после создания ишемии. Показатель «количество капилляров/мышечное волокно» уменьшался на 14-е сутки после создания ишемии ($0,66 \pm 0,14$ в ишемизированной мышце против $1,01 \pm 0,31$ в интактной мышце, $P < 0,05$) и оставался сниженным до конца эксперимента на 28-е сутки после моделирования ишемии ($0,84 \pm 0,11$ в ишемизированной мышце против $1,21 \pm 0,13$ в интактной мышце, $P < 0,05$).

На 1-е сутки гистологический анализ икроножной мышцы оперированной конечности показал незначительные ишемические изменения. Количество капилляров, находящихся в контакте с одним мышечным волокном, – от 2 до 5. Мышечные волокна полностью сохраняют свою характерную структуру. В незначительном количестве присутствуют ЦЯМВ.

На 14-е сутки после создания ишемии наблюдали выраженные ишемические изменения. Плотность капилляров уменьшается. Мышечные волокна расслаиваются, содержат эозинофильную и дезинтегрированную саркоплазму. У части мышечных волокон нарушается или исчезает поперечная исчерченность. В отдельных участках определяются скопления мышечных волокон меньшего диаметра, их гетерогенность по форме и диаметру. Присутствуют многочисленные ЦЯМВ. Мышечные волокна разобщены утолщёнными прослойками эндомизия. Деструктивная мышечная ткань в значительном объёме замещена соединительной тканью, присутствуют многочисленные фибробласты. Площадь эндомизия и перимизия прооперированной конечности значительно увеличилась ($12,70 \pm 2,36\%$ в ишемизированной мышце против $4,22 \pm 0,44\%$ в интактной мышце, $P < 0,05$). Отмечена выраженная лимфогистиоцитарная инфильтрация.

Наблюдаемые морфологические сдвиги свидетельствуют о выраженной патологической реакции скелетной мышечной ткани в ответ на ишемию. Комплекс патологических сдвигов в структуре скелетной мышцы устойчиво воспроизводился в эксперименте, что позволяет рассматривать выбранную нами модель ишемии конечности как адекватную для тестирования влияния трансгенов на преодоление последствий ишемии.

Экспрессия *EGFP* при введении в мышцу *Ad5-EGFP* и МККП *Ad5-EGFP*

Для наиболее полного достижения основных целей прямой и клеточно-опосредованной генной терапии для стимулирования ангиогенеза, репаративного миогенеза и усиления процессов постишемической нейрорегенерации в мышце важно обеспечить максимально длительное присутствие в повреждённой ткани трансгенных конструкций, вводимых прямо или при помощи клеток. Общеизвестный подход для их обнаружения в ткани-мишени связан с применением флуоресцентных меток, таких как *EGFP*. Влияние трансплантируемых клеток и доставляемых ими целевых генов в значительной мере зависит от длительности присутствия клеточных носителей, что можно оценить при помощи *EGFP*.

Через 14 суток после инъекции *Ad5-EGFP* отмечено специфическое свечение *EGFP* в дистальной части икроножной мышцы, что соответствовало точкам инъекции. Свечение было наиболее интенсивным по периферии мышечных волокон вблизи сарколеммы. Интенсивная флуоресценция была также отмечена в области ядер мышечных волокон (Рис. 1А).

При трансплантации МККП Ad5-EGFP в дистальную часть скелетной мышцы крысы обнаружена интенсивная диффузная флуоресценция EGFP в области инъекции (Рис. 1Б, В). Результаты исследования позволили установить продолжительность присутствия и эффективную экспрессию гена EGFP в генетически модифицированных МККП in vivo. Специфическое свечение EGFP на 14-е сутки после трансплантации МККП Ad5-EGFP в область ишемии скелетной мышцы крысы является результатом экспрессии и накопления EGFP в МККП. При этом экспрессионный аденовирусный вектор, содержащий ген EGFP, активно функционирует в трансплантированных клетках, а продукт гена EGFP имеет потенциальную возможность секретироваться. Полученные данные свидетельствуют о том, что при введении в область ишемии Ad5-EGFP или МККП Ad5-EGFP сохраняется экспрессионная активность генетических конструкций как минимум 14 суток.

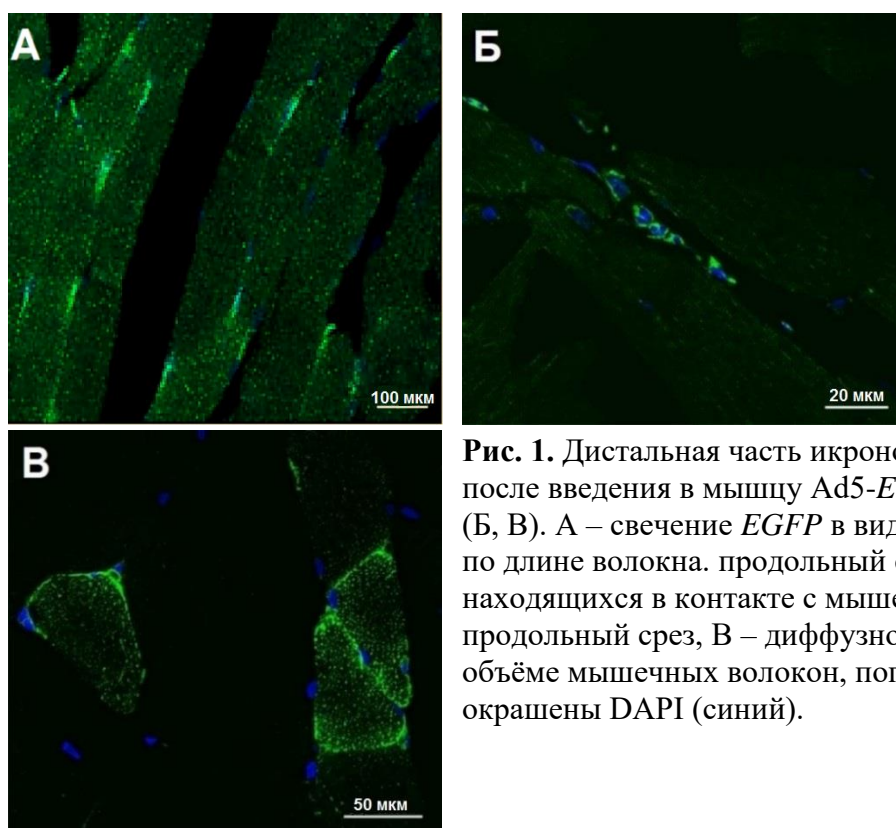


Рис. 1. Дистальная часть икроножной мышцы на 14-е сутки после введения в мышцу Ad5-EGFP (А) и МККП Ad5-EGFP (Б, В). А – свечение EGFP в виде кластеров, распределённых по длине волокна, продольный срез, Б – EGFP в клетках, находящихся в контакте с мышечными волокнами, продольный срез, В – диффузное распределение EGFP в объёме мышечных волокон, поперечный срез. Ядра окрашены DAPI (синий).

Генетически модифицированные стволовые клетки из крови пуповины и плаценты человека, включая МККП, в условиях ксенотрансплантации обладают способностью к выживанию в течение не менее 4-х недель (Mukhamedshina et al., 2013; Yin et al., 2015). Это может указывать на потенциальную возможность влияния самих трансплантированных клеток и молекул, кодируемых трансгенами, практически на всех этапах постишемического репаративного миогенеза, начиная с ранних его событий, тотчас следующих за повреждением, и заканчивая формированием дефинитивных мышечных волокон, восстанавливающих дезинтегрированную ткань и функцию скелетной мышцы. В условиях генно-клеточной терапии выраженность миграционного потенциала трансплантированных клеток имеет значение для доставки терапевтических генов в области, которые расположены не только в непосредственной близости от точек введения клеток, но и на удалении от них.

Следовательно, используемые нами генетически модифицированные МККП по критериям жизнеспособности и миграционному потенциалу адекватны задачам генно-клеточной

терапии при хронической ишемии конечности. Увеличение сроков пребывания векторов с целевыми генами в области наибольшего повреждения кровеносного русла критически важно для эффективной экспрессии продуктов рекомбинантных генов в течение длительного периода, что может иметь значение для лечения пациентов с ХИНК.

Влияние прямого введения и клеточно-опосредованной доставки генетических конструкций на ангиогенез в ишемизированной скелетной мышце

На 14-е сутки после прямого введения или клеточно-опосредованной доставки генетических конструкций (28-е сутки после моделирования ишемии) по критерию плотности капилляров в мышечной ткани ишемизированной конечности наиболее выраженное действие зарегистрировано в группе МККП Ad5-ANG. Выраженность этого показателя убывает в следующей последовательности: МККП Ad5-ANG → МККП Ad5-VEGF+Ad5-ANG → Ad5-VEGF+Ad5-ANG → Ad5-ANG → Ad5-VEGF+Ad5-ANG+Ad5-GDNF → МККП Ad5-VEGF → Ad5-VEGF → МККП Ad5-VEGF+Ad5-ANG+Ad5-GDNF (Рис. 2А).

В группе МККП Ad5-ANG плотность капилляров в дистальной части икроножной мышцы в 2,0 раза ($P<0,05$) превышала значение данного показателя в группе контроля (Рис. 2А). В группе МККП Ad5-VEGF+Ad5-ANG плотность капилляров увеличивалась в 1,4 раза ($P<0,05$) по сравнению с контролем (Рис. 2А).

По приросту плотности капилляров группа МККП Ad5-VEGF+Ad5-ANG превосходит группу МККП Ad5-VEGF+Ad5-ANG+Ad5-GDNF в 2,1 раза ($P<0,05$). В группе МККП Ad5-ANG плотность капилляров выше, чем в группах МККП Ad5-VEGF и МККП Ad5-VEGF+Ad5-ANG соответственно в 2,1 и 1,4 раза ($P<0,05$). При сравнении групп Ad5-ANG и МККП Ad5-ANG большая плотность капилляров в 1,6 раза ($P<0,05$) выявлена при клеточно-опосредованной доставке трансгена. Плотность капилляров в группе Ad5-VEGF+Ad5-ANG+Ad5-GDNF в 1,5 раза ($P<0,05$) превышает данный показатель в группе МККП Ad5-VEGF+Ad5-ANG+Ad5-GDNF (Рис. 2А).

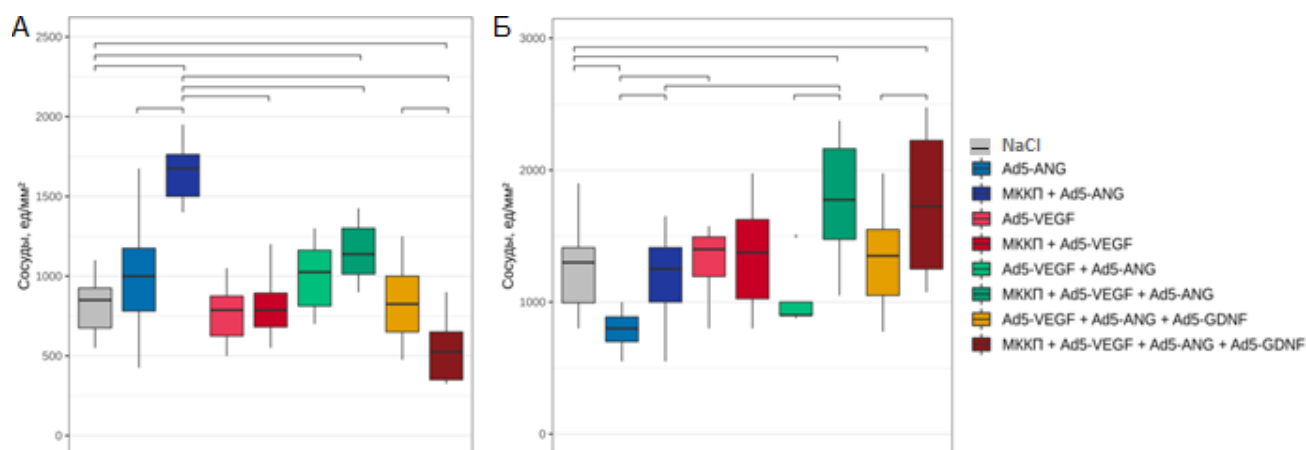


Рис. 2. Влияние прямого введения и МККП-опосредованной доставки генетических конструкций на плотность капилляров в дистальной части икроножной мышцы на 14-е (А) и 28-е (Б) сутки. Здесь и на последующих графиках группы с достоверным различием объединены горизонтальными линиями с засечками ($P<0,05$).

На 28-е сутки после прямого введения или клеточно-опосредованной доставки генетических конструкций (42-е сутки после моделирования ишемии) по критерию плотности капилляров в мышечной ткани ишемизированной конечности наиболее выраженное действие зарегистрировано в группе МККП Ad5-VEGF+Ad5-ANG. Выраженность этого показателя

убывает в следующей последовательности: МККП Ad5-VEGV+Ad5-ANG → МККП Ad5-VEGV+Ad5-ANG+Ad5-GDNF → Ad5-VEGV → МККП Ad5-VEGV → Ad5-VEGV+Ad5-ANG+Ad5-GDNF → МККП Ad5-ANG → Ad5-VEGV+Ad5-ANG → Ad5-ANG (Рис. 2Б).

На этом сроке среди групп с прямым введением генетических конструкций наибольшая плотность капилляров была зарегистрирована в группе Ad5-VEGV (Рис. 2Б).

При сравнении групп Ad5-ANG и МККП Ad5-ANG в 1,5 раза ($P<0,05$) большее количество капилляров выявлено в группе МККП Ad5-ANG. На данном сроке наблюдений в группе МККП Ad5-VEGV+Ad5-ANG численность капилляров превышает их количество в группе Ad5-VEGV+Ad5-ANG в 2,4 раза ($P<0,05$). МККП-опосредованная доставка сочетания генов VEGV+ANG+GDNF обеспечивает в 1,2 раза ($P<0,05$) более выраженный прирост количества капилляров, чем при прямом введении векторов в данном сочетании (Рис. 2Б).

На 14-е сутки по показателю «капилляры/мышечные волокна» наибольшее значение было выявлено в группе МККП Ad5-ANG. По данному показателю группа МККП Ad5-ANG превосходит группу контроля в 1,5 раза, а группу Ad5-ANG в 1,4 раза (Рис. 3А). На этом сроке по обоим показателям, «плотность капилляров» и «капилляры/мышечные волокна», максимальный эффект был достигнут при введении МККП Ad5-ANG (Рис. 3А).

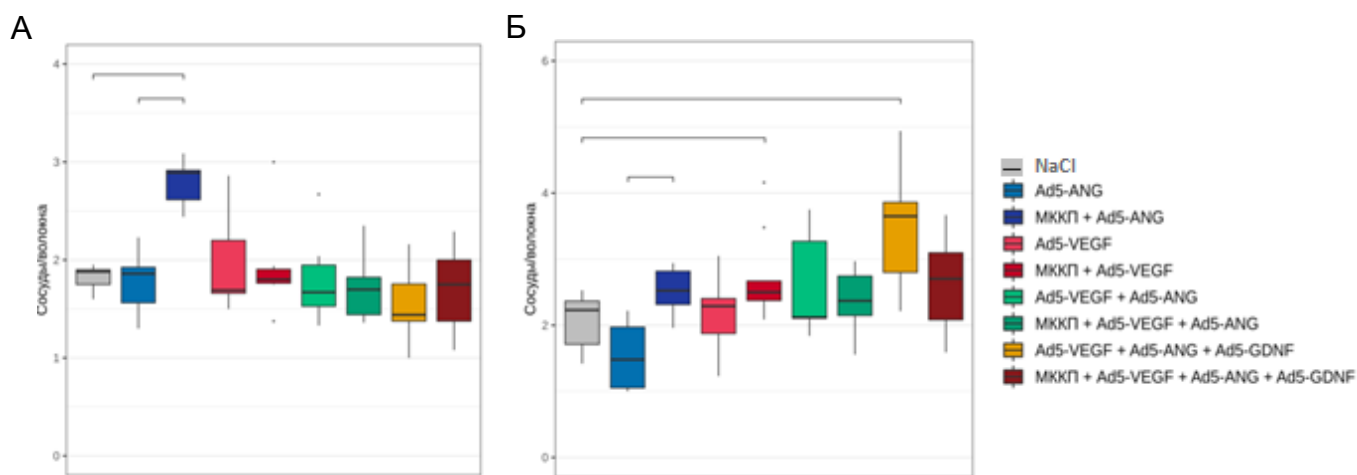


Рис. 3. Соотношение «капилляры/мышечные волокна» на 14-е (А) и 28-е (Б) сутки после прямого введения и МККП-опосредованной доставки трансгенных конструкций в дистальную часть ишемизированной икроножной мышцы.

На 28-е сутки по показателю «капилляры/мышечные волокна» наибольшее значение было выявлено в группе Ad5-VEGV+Ad5-ANG+Ad5-GDNF. По данному показателю группа Ad5-VEGV+Ad5-ANG+Ad5-GDNF превосходит группу контроля в 1,6 раза ($P<0,05$). В группе МККП Ad5-VEGV данный показатель больше, чем в группе контроля в 1,2 раза. ($P<0,05$). Выявлено увеличение значения данного показателя в группе МККП Ad5-ANG по сравнению с группой Ad5-ANG в 1,6 раза ($P<0,05$). При сравнении показателей «плотность капилляров» и «капилляры/мышечные волокна» максимальный эффект по первому из них был зарегистрирован в группе МККП Ad5-VEGV+Ad5-ANG, а по второму – при введении Ad5-VEGV+Ad5-ANG+Ad5-GDNF (Рис. 3Б). Данное различие может быть связано со спецификой влияния сравниваемых комбинаций на количество мышечных волокон. Так, при введении комбинации Ad5-VEGV+Ad5-ANG+Ad5-GDNF выявляется большее количество мышечных волокон и меньшее количество кровеносных сосудов, поскольку данная комбинация в большей степени усиливает репаративный миогенез, а при введении МККП Ad5-VEGV+Ad5-ANG зарегистрировано большее количество

сосудов и меньшее количество мышечных волокон в связи с более выраженным влиянием на ангиогенез.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что более выраженное стимулирование постишемического ангиогенеза в скелетной мышце достигается при доставке комбинации генов *VEGV* и *ANG* при помощи МККП, по сравнению с прямым введением в область ишемии той же комбинации генов.

Более эффективное действие МККП-опосредованной доставки трансгенов может быть связано с позитивным эффектом самих клеточных носителей, которые продуцируют ряд факторов, способных поддерживать выживание, пролиферативный потенциал и дифференцировку клеток стенки сосуда. В этом отношении показано, что стволовые клетки из ткани пуповины человека улучшают перфузию ткани, стимулируют ангиогенез и артериогенез при экспериментально индуцированной ишемии задних конечностей мыши (Pereira et al., 2016). При этом стимулирование ангиогенеза может осуществляться за счёт паракринного действия стволовых клеток на эндотелиальные клетки, индуцируя в них экспрессию *TGFβ2*, ангиопоэтина2, *FGF2* и *HGF* (Pereira et al., 2016). Следовательно, прогениторные клетки, полученные из пуповины человека, улучшают ангиогенную активность эндотелиальных клеток в ишемизированной конечности, что указывает на их потенциал в качестве нового терапевтического инструмента для лечения хронической ишемии конечности.

Наши данные по влиянию различных комбинаций генов на ангиогенез позволяют сделать вывод о том, что выраженность позитивного действия конкретных ангиогенных факторов на восстановление микроциркуляторного русла при ишемии скелетной мышцы проявляется в различной степени в зависимости от стадии течения процесса. Анализ результатов прямой инъекции генов (не МККП-опосредованная доставка) показывает, что по критерию плотности капилляров в мышце на более ранних сроках (14 суток после введения, или 28 суток после создания ишемии) наибольшую активность проявляет *ANG*. Этот вывод находит подтверждение также при МККП-опосредованной доставке гена *ANG*. На более поздних сроках (28 суток после введения или 42 суток после создания ишемии) *VEGV* при аналогичном прямом введении кодирующего гена имеет преимущество перед *ANG*. Более того, при прямой инъекции Ad-*ANG* плотность капилляров в мышце на данном сроке была минимальной и даже существенно меньшей, чем в контрольной группе.

Добавление гена *GDNF* к комбинации прямо инъектируемых или доставляемых при помощи МККП генов *VEGV* и *ANG* не приводит к заметному усилению ангиогенеза на сроке 14 суток, но стимулирует ангиогенез на более поздних сроках. Добавление гена *GDNF* к 28-м суткам выводит комбинацию МККП Ad5-*VEGV*+Ad5-*ANG*+Ad5-*GDNF* на вторую позицию по показателю плотности капилляров после МККП Ad5-*VEGV*+Ad5. Этот результат можно интерпретировать в аспекте отсутствия реакции на *GDNF* участвующих в ангиогенезе клеток стенки капилляра на более ранних сроках ишемического процесса и появление запроса на действие данного нейротрофического фактора на более поздних сроках течения постишемических реакций.

Усиление ангиогенного эффекта *GDNF* на более поздних сроках хронической ишемии в скелетной мышце подтверждается возможностью прямого активирующего влияния этого нейротрофического фактора на пролиферацию эндотелиальных клеток, которое реализуется с участием рецепторного комплекса GFRα-1 и c-ret (Blais et al., 2013). В пролиферирующих эндотелиальных клетках это влияние *GDNF* опосредовано фосфорилированием транскрипционного фактора Stat1 (Gomez, Reich, 2003). Усиление ангиогенного эффекта *GDNF*

при хронической ишемии в скелетной мышце может быть также опосредовано его регулирующим влиянием на *VEGF*-зависимый ангиогенез (Shvartsman et al., 2014). Однако, имеются данные о том, что *GDNF* может также оказывать стимулирующее влияние на *VEGF*-независимый ангиогенез (Zhong et al., 2016). Стимулирующее действие *GDNF* на более поздних сроках может быть связано с позитивным влиянием этого нейротрофического фактора на нервные волокна, что также усиливает ангиогенез.

Влияние прямого введения и клеточно-опосредованной доставки генетических конструкций на ишемизированную скелетную мышцу

В группах с прямым введением и клеточно-опосредованной доставкой трансгенов оценивали структуру мышцы, количество мышечных волокон и количество ЦЯМВ.

По критерию количества мышечных волокон на 14-е сутки наиболее выраженное действие зарегистрировано в группе МККП Ad5-*VEGF*+Ad5-*ANG*. Выраженность этого показателя убывает в следующей последовательности: МККП Ad5-*VEGF*+Ad5-*ANG* → Ad5-*VEGF*+Ad5-*ANG* → Ad5-*VEGF*+Ad5-*ANG*+Ad5-*GDNF* → Ad5-*ANG* → Ad5-*VEGF* → МККП Ad5-*VEGF*+Ad5-*ANG*+Ad5-*GDNF* → МККП Ad5-*ANG* → МККП Ad5-*VEGF* (Рис. 4А).

В группе МККП Ad5-*VEGF*+Ad5-*ANG* этот показатель в 1,9 раза ($P < 0,05$) превышает его значение в группе МККП Ad5-*VEGF*. В группах с прямым введением векторов Ad5-*VEGF*+Ad5-*ANG* или Ad5-*VEGF*+Ad5-*ANG*+Ad5-*GDNF* данный показатель возрастает в 1,2 раза ($P < 0,05$) по сравнению с контролем. При сравнении по рассматриваемому показателю эффектов сочетания трёх векторов в варианте прямой их инъекции и МККП-опосредованной доставки также показано преимущественное влияние прямой генной терапии. При введении МККП Ad5-*VEGF*+Ad5-*ANG*+Ad5-*GDNF* количество мышечных волокон становится большим в 1,5 раза ($P < 0,05$), чем при введении Ad5-*VEGF*+Ad5-*ANG*+Ad5-*GDNF* (Рис. 4А).

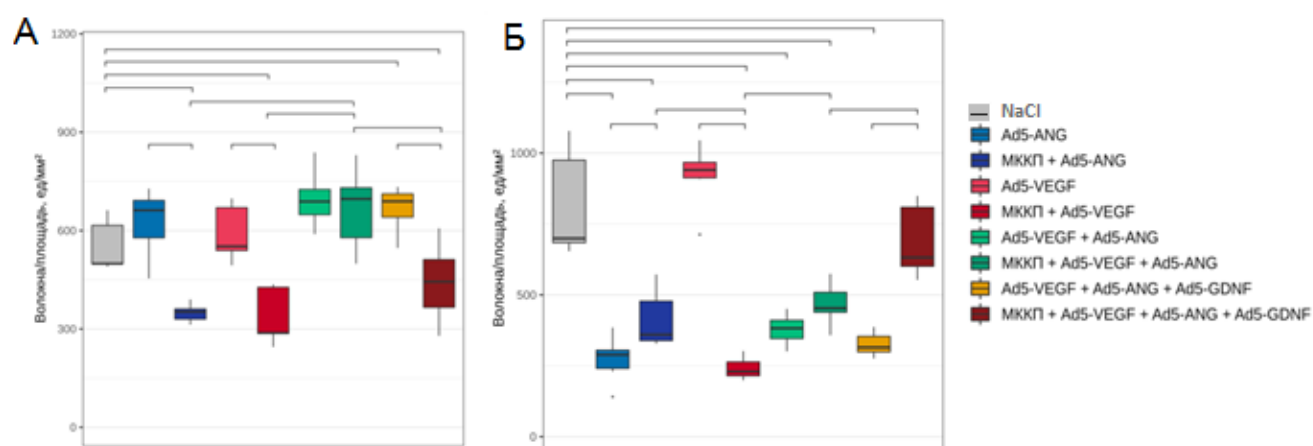


Рис. 4. Количество мышечных волокон в дистальной части икроножной мышцы на 14-е (А) и 28-е (Б) сутки после введения генетических конструкций или трансдуцированных клеток.

По количеству мышечных волокон на 28-е сутки наиболее выраженное действие зарегистрировано в группе Ad5-*VEGF*. Выраженность этого показателя убывает в следующей последовательности: Ad5-*VEGF* → МККП Ad5-*VEGF*+Ad5-*ANG*+Ad5-*GDNF* → МККП Ad5-*VEGF*+Ad5-*ANG* → Ad5-*VEGF*+Ad5-*ANG* → МККП Ad5-*ANG* → Ad5-*VEGF*+Ad5-*ANG*+Ad5-*GDNF* → Ad5-*ANG* → МККП Ad5-*VEGF* (Рис. 4Б). Через 28 суток после введения генетических конструкций или трансдуцированных клеток только в одной группе, а именно Ad5-*VEGF*, зарегистрировано большее количество мышечных волокон по сравнению с контрольной группой, однако отличие не является статистически достоверным ($P > 0,8466$, t-test; $P 0,7609$, тест Данна).

(Рис. 4Б). Это указывает на отсутствие на данном сроке наблюдений ожидаемого эффекта на постишемический миогенез при прямом введении и при клеточно-опосредованной доставке практически всех генетических конструкций.

При сравнении групп с прямым введением генетических конструкций в область ишемии получены следующие результаты. В группе Ad5-ANG количество мышечных волокон становится меньшим в 3,3 раза ($P<0,05$), чем в группе Ad5-VEGF и в 1,3 раза ($P<0,05$) меньше по сравнению с группой Ad5-VEGF+Ad5-ANG. В группе Ad5-VEGF+Ad5-ANG количество мышечных волокон уменьшается в 2,4 раза ($P<0,05$) по сравнению с группой Ad5-VEGF (Рис. 4Б).

При сравнении групп с клеточно-опосредованной доставкой генетических конструкций по тому же критерию установлено, что в группе МККП Ad5-VEGF количество мышечных волокон в 3,3 раза ($P<0,05$) меньше, чем в группе контроля. В группах МККП Ad5-ANG и МККП Ad5-VEGF+Ad5-ANG, по сравнению с группой контроля, также наблюдается меньшее количество мышечных волокон соответственно в 1,9 ($P<0,05$) и 1,7 ($P<0,05$) раза (Рис. 4Б).

При сопоставлении количества мышечных волокон в группах с клеточно-опосредованной доставкой генетических конструкций было установлено следующее. В группах МККП Ad5-ANG и МККП Ad5-VEGF+Ad5-ANG значение данного показателя превышало его значение в группе МККП Ad5-VEGF соответственно в 1,7 ($P<0,05$) и 1,9 раза ($P<0,05$). Добавление в комбинацию доставляемых векторов Ad-GDNF в 1,4 раза ($P<0,05$) увеличивало количество мышечных волокон в группе МККП Ad5-VEGF+Ad5-ANG+Ad5-GDNF по сравнению с группой без этого вектора (МККП Ad5-VEGF+Ad5-ANG) (Рис. 4Б).

При сравнении групп МККП Ad5-ANG и Ad5-ANG отмечено меньшее в 1,5 раза ($P<0,05$) количество мышечных волокон при прямом введении вектора Ad5-ANG по сравнению с его клеточно-опосредованной доставкой. При сравнении групп МККП Ad5-VEGF и Ad5-VEGF в группе МККП Ad5-VEGF становится меньше мышечных волокон в 3,8 раза ($P<0,05$). При введении МККП Ad5-VEGF+Ad5-ANG+Ad5-GDNF мышечных волокон становится меньше, чем при введении Ad5-VEGF+Ad5-ANG+Ad5-GDNF в 2,1 раза ($P<0,05$) (Рис. 4Б).

По критерию поддержания количества ЦЯМВ на 14-е сутки наиболее выраженное действие зарегистрировано в группе Ad5-ANG. Выраженность этого показателя убывает в следующей последовательности: Ad5-ANG → МККП Ad5-ANG → Ad5-VEGF → Ad5-VEGF+Ad5-ANG → МККП Ad5-VEGF+Ad5-ANG → МККП Ad5-VEGF → МККП Ad5-VEGF+Ad5-ANG+Ad5-GDNF → Ad5-VEGF+Ad5-ANG+Ad5-GDNF (Рис. 5А).

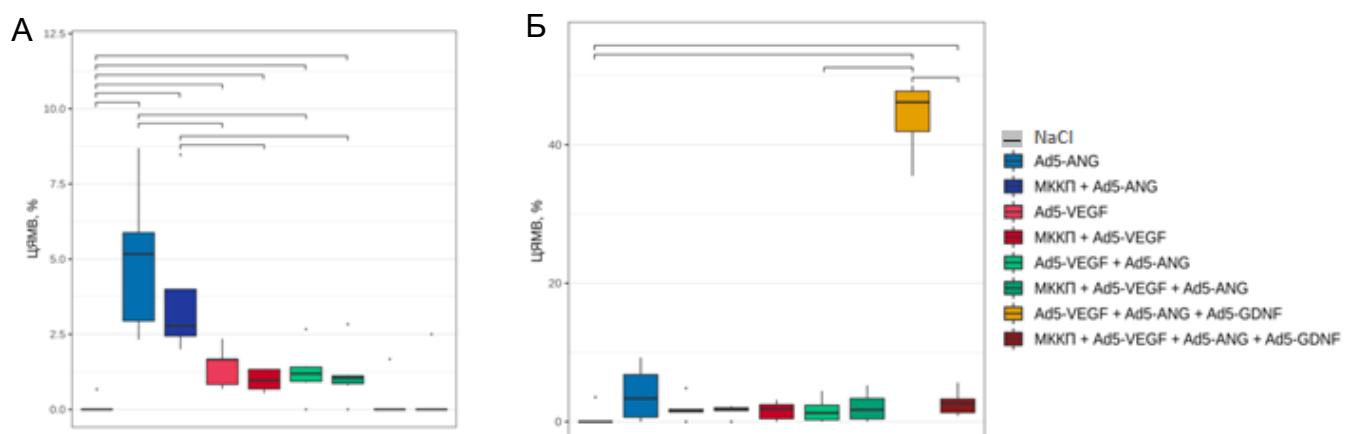


Рис. 5. Влияние прямого введения и МККП-опосредованной доставки генетических конструкций на количество ЦЯМВ в области ишемии на 14-е (А) и 28-е (Б) сутки. Ось ординат – % ЦЯМВ в общем количестве мышечных волокон в 1 мм² на поперечном срезе.

По количеству ЦЯМВ на 28-е сутки наиболее выраженное действие зарегистрировано в группе Ad5-VEGV+Ad5-ANG+Ad5-GDNF. Количество ЦЯМВ в этой группе существенно превышает этот показатель во всех других группах (Рис. 5Б).

Количество ЦЯМВ убывает в следующей последовательности: Ad5-VEGV+Ad5-ANG+Ad5-GDNF → Ad5-ANG → МККП VEGV+Ad5-ANG+Ad5-GDNF → Ad5-VEGV → МККП Ad5-VEGV → МККП Ad5-ANG → МККП Ad5-VEGV+Ad5-ANG → Ad5-VEGV+Ad5-ANG (Рис. 5Б).

Нами установлено, что количество мышечных волокон наиболее динамично восстанавливается в группах МККП Ad5-VEGV+Ad5-ANG (14 суток) и Ad5-VEGV (28 суток). Как видно, в обеих группах устойчиво проявляется положительное действие экспрессии трансгена VEGV. Наиболее очевидное объяснение стимулирующего действия VEGV на репаративный миогенез основано на детально изученном влиянии этого фактора на ангиогенез и реперфузию кровеносных сосудов в мышце, что приводит к улучшению трофики мышечной ткани. На сроке 28 суток более выраженное действие VEGV в условиях прямого введения вектора по сравнению с его клеточно-опосредованной доставкой может быть связано с уменьшением количества генетически модифицированных МККП вследствие их нарастающей гибели.

VEGV отчётливо демонстрирует более эффективное влияние на миогенез по сравнению с ANG. Так, на сроке 28 суток прямое введение вектора Ad5-VEGV обеспечивает в 3 раза более выраженную эффективность влияния на количество мышечных волокон по сравнению с Ad5-ANG. Сравнивая отсутствие различий во влиянии Ad5-VEGV и Ad5-ANG на данный показатель на сроке 14 суток с замедляющим действием ANG на сроке 28 суток, можно рекомендовать для стимулирования репаративного миогенеза проводить инъекции Ad5-ANG в область ишемии мышцы только на ранних сроках.

Клетки-сателлиты и другие миогенные клетки-предшественницы в ходе регенерации мышцы тесно взаимодействуют с эндотелиальными клетками, которые стимулируют рост миогенных клеток и, наоборот, дифференцирующиеся миогенные клетки способствуют ангиогенезу (Mounier et al., 2011). Миграция и пролиферация клеток-сателлитов в области повреждения мышцы контролируется молекулами хемоаттрактантов, к которым принадлежат факторы роста, в том числе VEGV (Mukund et al., 2019). VEGV, наряду с другими факторами роста, такими как IGF-I, HGF, FGF и PDGF, стимулирует пролиферацию миобластов (Christov et al., 2007). Следовательно, VEGV является не только ключевым фактором регуляции ангиогенеза, но и той сигнальной молекулой, которая усиливает процессы взаимодействия нервной и сосудистой систем (Carmeliet et al., 2005). Стимулирующее действие VEGV является следствием его влияния не только на ранние события ангиогенеза с участием преимущественно эндотелиальных клеток, такие как индукция их дифференцировки, миграция, пролиферация и образование эндотелиальных тяжей, но также воздействием на более поздние процессы формирования кровеносного сосуда (Shvartzman et al., 2014). Полученные нами данные о позитивном влиянии VEGV при хронической ишемии также указывают на возможность проявления эффектов VEGV на разных стадиях восстановления сосудистой сети.

Другой путь стимулирующего влияния VEGV на репаративный миогенез связан с опосредованным действием через GDNF. VEGV индуцирует экспрессию GDNF в волокнах скелетной мышцы и эндотелиальных клетках (Shvartzman et al., 2014). Кроме влияния GDNF на репаративный миогенез через стимулирование ангиогенеза (Shvartzman et al., 2014), можно указать на присутствие дополнительных путей позитивного воздействия GDNF на миогенез, которые связаны с аутокринным эффектом GDNF и паракринным влиянием со стороны

эндотелиальных клеток. Возможность аутокринного действия основана на данных об экспрессии в мышечных волокнах не только *GDNF*, но и рецептора *GDNF* (Yamamoto et al., 1996).

Гиперэкспрессия *GDNF* в скелетной мышце коррелирует с увеличением в ней холинэстераза-позитивных концевых пластинок (Zwick et al., 2001). Восстановление нервно-мышечных синапсов является более поздним событием в репаративном миогенезе, обеспечивающим восстановление двигательной функции. В этом отношении могут иметь значение наши данные о стимулирующем влиянии сверхэкспрессии *VEGV* на репаративный миогенез на его продвинутых этапах в условиях хронической ишемии.

Добавление гена *GDNF* к комбинации прямо инъецируемых или доставляемых при помощи МККП генов *VEGV* и *ANG* обеспечивает нарастание количества ЦЯМВ, что указывает на стимулирование со стороны *GDNF* репаративного миогенеза в ишемизированной конечности крысы. Образование ЦЯМВ служит значимым признаком регенерации скелетной мышцы (Totsuka et al., 1998; Чернова и соавт., 2014; Roman et al., 2018). В интактной скелетной мышечной ткани имеются лишь единичные ЦЯМВ, их количество значительно увеличивается при активной регенерации (Титова и соавт., 2017), в том числе при глубоком гипоксическом повреждении (Jazwa et al., 2013; Деев и соавт., 2015).

Количество нервных волокон в области ишемии икроножной мышцы

По количеству S100b-позитивных клеток максимальные значения на 14-е сутки были достигнуты в группах с клеточно-опосредованной доставкой генетических конструкций МККП Ad5-*VEGV*+Ad5-*ANG* и МККП Ad5-*VEGV*+Ad5-*ANG*+Ad5-*GDNF*. При сравнении по данному показателю групп с прямым введением векторов улучшение результатов было получено в группе Ad5-*VEGV* и только в этой группе исследуемый показатель достоверно отличался от контроля (Рис. 6А).

В группе МККП Ad5-*VEGV*+Ad5-*ANG* количество нервных волокон в 2,5 ($P<0,05$) раза превышало их количество в группе контроля. Группа МККП Ad5-*VEGV* превосходит по тому же параметру группу МККП Ad5-*ANG* в 1,4 раза ($P<0,05$) (Рис. 6А).

При сравнении эффектов прямого введения и МККП-опосредованной доставки векторов были получены следующие результаты. В группе МККП Ad5-*VEGV*+Ad5-*ANG*+Ad5-*GDNF* количество нервных волокон было больше, чем в группе Ad5-*VEGV* и группе Ad5-*VEGV*+Ad5-*ANG* соответственно в 1,2 ($P<0,05$) и 2,5 раза ($P<0,05$). По количеству нервных волокон клеточно-опосредованная доставка комбинации трёх векторов (МККП Ad5-*VEGV*+Ad5-*ANG*+Ad5-*GDNF*) оказалась в 2,5 раза ($P<0,05$) более эффективной, чем прямая инъекция той же комбинации векторов (Ad5-*VEGV*+Ad5-*ANG*+Ad5-*GDNF*) (Рис. 6А).

К 14-м суткам в наиболее эффективной группе МККП Ad5-*VEGV*+Ad5-*ANG* количество нервных волокон превышает данный показатель в группах с прямым введением трансгенов, таких как Ad5-*ANG* (в 2 раза, $P<0,05$), Ad5-*VEGV* (в 2,4 раза, $P<0,05$), Ad5-*VEGV*+Ad5-*ANG* (в 3,1 раза, $P<0,05$) и Ad5-*VEGV*+Ad5-*ANG*+Ad5-*GDNF* (в 3,5 раза, $P<0,05$). Группа МККП Ad5-*VEGV* также демонстрировала более высокий результат по данному показателю по сравнению с прямой доставкой генетических конструкций, таких как Ad5-*VEGV* (в 0,8 раза, $P<0,05$) и Ad5-*VEGV*+Ad5-*ANG*+Ad5-*GDNF* (в 1,7 раза, $P<0,05$) (Рис. 6А).

По критерию поддержания количества нервных волокон на 14-е сутки наиболее выраженное действие зарегистрировано в группе МККП Ad5-*VEGV*+Ad5-*ANG*. Выраженность этого показателя убывает в следующей последовательности: МККП Ad5-*VEGV*+Ad5-*ANG* → МККП Ad5-*VEGV*+Ad5-*ANG*+Ad5-*GDNF* → МККП Ad5-*VEGV* → Ad5-*VEGV* → Ad5-*ANG* → Ad5-*VEGV*+Ad5-*ANG* → МККП Ad5-*ANG* → Ad5-*VEGV*+Ad5-*ANG*+Ad5-*GDNF* (Рис. 6А).

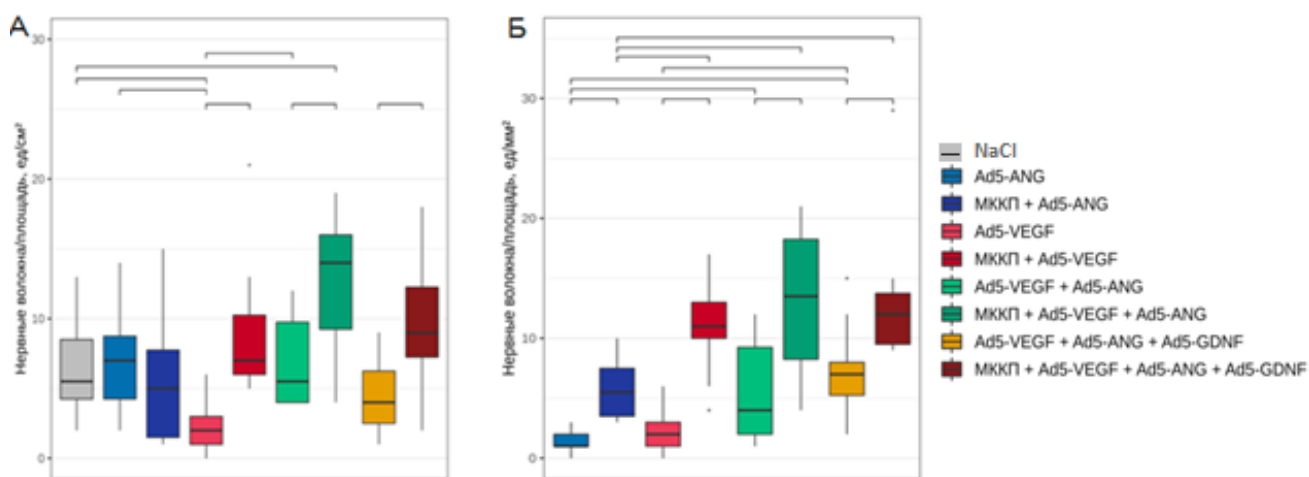


Рис. 6. Количество выявленных по локализации белка S100b нервных волокон в дистальной части икроножной мышцы на 14-е (А) и 28-е (Б) сутки после введения генетических конструкций или трансдуцированных клеток.

На 28-е сутки количество нервных волокон в группе *Ad5-VEGF+Ad5-ANG* и группе *Ad5-VEGF+Ad5-ANG+Ad5-GDNF* соответственно в 4 раза ($P<0,05$) и в 7 раз ($P<0,05$) превышало данный показатель в группе *Ad5-ANG*. Следовательно, более высокая эффективность дополнительного введения вектора *Ad5-GDNF* на количество нервных волокон подтверждается результатами подсчёта количества S100b-иммунопозитивных клеток, полученными в группе *Ad5-VEGF+Ad5-ANG+Ad5-GDNF* на данном сроке наблюдений (Рис. 6Б).

При сравнении с группой контроля показатель количества нервных волокон в области ишемии мышцы был достоверно выше в группах *МККП Ad5-VEGF* (в 2 раза), *МККП Ad5-VEGF+Ad5-ANG* (в 2,4 раза) и *МККП Ad5-VEGF+Ad5-ANG+Ad5-GDNF* (в 2,1 раза) (Рис. 6Б).

В группах *МККП Ad5-VEGF* и *МККП Ad5-VEGF+Ad5-ANG* было выявлено соответственно в 2 и 2,4 раза ($P<0,05$) больше нервных волокон, чем в группе *МККП Ad5-ANG*. В группе *МККП Ad5-VEGF+Ad5-ANG+Ad5-GDNF* этот показатель превышал его значение в группе *МККП Ad5-ANG* в 2,1 раза ($P<0,05$) (Рис. 6Б).

При сравнении групп с прямым введением и клеточно-опосредованной доставкой векторов были получены следующие результаты. В группе *МККП Ad5-ANG* выявлено в 5,5 раза ($P<0,05$) больше нервных волокон, чем в группе *Ad5-ANG*. В группе *Ad5-VEGF* их количество превышало данный показатель в группе *МККП Ad5-ANG* в 2 раза ($P<0,05$) (Рис. 6Б).

На сроке 28 суток в большинстве групп с клеточно-опосредованной доставкой генетических конструкций проявляется более активное их влияние на поддержание количества нервных волокон в ишемизированной мышце, чем при прямом введении отдельных векторов или их сочетаний.

По влиянию на количество нервных волокон на 28-е сутки наиболее выраженное действие зарегистрировано в группе *МККП Ad5-VEGF+Ad5-ANG*. Выраженность этого показателя убывает в следующей последовательности: *МККП Ad5-VEGF+Ad5-ANG* → *МККП Ad5-VEGF+Ad5-ANG+Ad5-GDNF* → *МККП Ad5-VEGF*; *Ad5-VEGF* → *Ad5-VEGF+Ad5-ANG+Ad5-GDNF* → *МККП Ad5-ANG* → *Ad5-VEGF+Ad5-ANG* → *Ad5-ANG* (Рис. 6Б).

При оценке количества нервных волокон на 28-е сутки по результатам иммуногистохимической реакции с антителами против $\beta 3$ -тубулина в группах *Ad5-VEGF+Ad5-ANG*, *Ad5-VEGF+Ad5-ANG+Ad5-GDNF*, *МККП Ad5-VEGF+Ad5-ANG* и *МККП Ad5-VEGF+Ad5-*

ANG+Ad5-GDNF максимальное количество нервных волокон было также зарегистрировано при введении МККП *Ad5-VEGV+Ad5-ANG+Ad5-GDNF*, что соотносится с данными по количеству нервных волокон, выявленных с антителами против S100b.

По критерию количества нервных волокон, подсчитанных с использованием маркера шванновских клеток белка S100b, установлено, что клеточно-опосредованная доставка оказывается более эффективной, чем прямое введение любой из изученных комбинаций генов. Это заключение находит подтверждение на обоих сроках наблюдений, т.е. на 28-е и 42-е сутки от начала ишемии. Преимущественное действие комбинации *VEGV+ANG* отмечено не только по количеству нервных волокон в области ишемии мышцы, но также в отношении плотности капилляров на обоих сроках наблюдений и количества мышечных волокон в икроножной мышце через 14 суток после клеточно-опосредованной доставки генетических конструкций (28 суток после моделирования ишемии). Этот вывод подтверждает представление о том, что последствия ишемии преодолеваются при тесной взаимосвязи между процессами ангиогенеза, восстановления иннервации и репаративного миогенеза.

VEGV оказывает прямое стимулирующее влияние на нейроны и глию (Carmeliet et al., 2005), проявляя свойства типичного нейротрофического фактора. *VEGV* поддерживает выживание чувствительных (Sondell et al., 1999) и двигательных (Исламов и соавт., 2007) нейронов. *VEGV* стимулирует пролиферацию шванновских (Sondell et al., 1999) клеток, которые являются ключевыми для регенерации нервных волокон.

На ранних стадиях развития тканевая гипоксия активирует экспрессию *VEGV*, и её градиент регулирует рост аксонов (Carmeliet et al., 2005). *VEGV*-опосредованная сигнализация также влияет на регенерацию в нервной системе, модулируя локальную сосудистую сеть в повреждённой ткани (Ferrara, 2002). При ишемии в условиях гипоксии *VEGV* высвобождается из эндотелиальных клеток и прямо стимулирует пролиферацию нейральных предшественников и поддерживает выживание нейронов в периферической нервной системе (Schratzberger et al., 2000).

Являясь позитивным эффектором для перемещения конуса роста аксона (Dumppich et al., 2015), *VEGV* одновременно действует на разные пути передачи сигналов на актиновый цитоскелет, участвуя в его реорганизации путём активации взаимодействия кофилина и комплекса Arp2/3, как это установлено на отростках чувствительных нейронов (Schlau et al., 2018).

На каждом сроке наблюдений более выраженное действие зарегистрировано в группе МККП *Ad5-VEGV+Ad5-ANG*, по сравнению с группой МККП *Ad5-VEGV+Ad5-ANG+Ad5-GDNF*. Сопоставление этих данных с эффектами прямого введения той же пары комбинаций генов также указывает на то, что добавление гена *GDNF* к комбинации *VEGV+ANG* не выводит комбинацию *VEGV+ANG+GDNF* в категорию наиболее эффективной по критерию поддержания количества нервных волокон в области ишемии мышцы. В этой связи можно полагать, что *GDNF*-сигнализация в нервных волокнах ишемизированной мышцы не является доминирующим фактором в механизме позитивного влияния этого нейротрофического фактора на репаративный миогенез.

Экзогенный *GDNF* стимулирует регенерацию двигательных нервных волокон и восстановление функции мышцы (Feng et al., 2019). Сверхэкспрессия *GDNF* в скелетной мышце приводит к значительному увеличению количества нервно-мышечных синапсов (Zwick et al., 2001). *GDNF* не только способствует созреванию мотонейронов, но также поддерживает регенерацию повреждённых аксонов и модулирует нервно-мышечную передачу,

действуя как на пре-, так и на постсинаптическом уровнях (Cortes et al., 2017; Zahavi et al., 2015). Cortes (2017), Zahavi (2015) впервые отслежившие ретроградный транспорт секретируемого *GDNF* от мышцы к нейрону, также подтверждают существование ряда пространственно разобщённых эффектов этого нейротрофического фактора – активация роста аксонов и участия их терминалей в иннервации мышцы и улучшение выживания мотонейронов. На модели протяжённого роста двигательных аксонов эти эффекты были прослежены также при доксициклин-опосредованном контроле экспрессии доставляемого гена *GDNF* (Eggers et al., 2019).

Сформировано представление о новом сигнальном механизме регуляции выживания, регенерации и реваскуляризации нейральных элементов в скелетной мышце, в которой экспрессия *GDNF* и *NGF* повышается на начальных стадиях ишемии, что, по-видимому, частично поддерживается при доставке экзогенного *VEGV* (Shvartsman et al., 2014). Это представление основано на данных об увеличении экспрессии *GDNF* и *NGF* в ишемизированной мышечной ткани и в культивируемых миобластах в условиях доставки *VEGV*.

Экспрессия *GDNF/GDNFR* была ранее показана в мышечных волокнах (Yamamoto et al., 1996) и эндотелиальных клетках капилляров (Igarashi et al., 1999). Роль *GDNF* в адгезии и миграции эндотелиальных клеток, ведущая к восстановлению функционирующей сосудистой сети, может быть опосредована молекулой адгезии интегрином $\beta 1$, который вместе с другими партнерами участвует в передаче сигналов через рецептор *GDNFR α -1*, а также критичен для формирования сосудистого паттерна и ремоделирования сосудистой сети (Cao et al., 2008; Lei et al., 2008).

Нейротрофические факторы *NGF* и *GDNF* играют важную роль в *VEGV*-контролируемой реваскуляризации ишемизированной мышцы, включая разрастание эндотелиальных клеток и созревание кровеносных сосудов. Ингибирование *NGF* и *GDNF* в присутствии *VEGV* уменьшает образование капилляров и восстановление перфузии конечности (Shvartsman et al., 2014). При метаболическом стрессе и применении *VEGV* эндотелиальные клетки характеризуются выраженной экспрессией *GDNF* и *NGF*. При этом *VEGV*, действуя через рецепторы *VEGVR-1*, активирует пролонгированное формирование отростков эндотелиальных клеток, что также регулируется со стороны *NGF* и *GDNF* (Shvartsman et al., 2014). Экзогенный *VEGV* усиливает экспрессию этих нейротрофических факторов в повреждённой скелетной мышце, а это, в свою очередь, стимулирует в ней регенерацию нервных волокон и восстановление функции. Блокирование *NGF*- и *GDNF*-сигналикации снижает эффекты *VEGV* (Shvartsman et al., 2014). Следовательно, добавление *VEGV* приводит к ангиогенным и нейрогенным ответам, прямо влияя на рост аксонов или косвенно через повышенную экспрессию *NGF* и *GDNF* клетками реорганизуемой сосудистой сети. Выраженность этих ответов может варьировать в зависимости от стадии регенерации и преобладания того или иного компонента в конкретной области регенерации. Таким образом, доставка *VEGV* в ишемизированную ткань оказывает прямое стимулирующее влияние на регенерацию нервных волокон, а также стимулирует это процесс опосредованно через усиление эффектов *GDNF* и *NGF*. Независимо от этого пути влияния данные нейротрофические факторы усиливают рост и восстановление кровеносных сосудов. В итоге при ишемии оба эти процесса, а именно восстановление иннервации и перфузии ткани, способствуют нормализации структуры и функции ишемизированной скелетной мышцы.

Молекулярно-генетический анализ экспрессии целевых генов и маркёров ангиогенеза в ишемизированной скелетной мышце

Методом ПЦР-РТ было установлено, что экспрессия мРНК генов *VEGF*, *GDNF*, *ANG* при введении *Ad5-VEGV+Ad5-ANG+Ad5-GDNF* увеличивалась соответственно в 3,6, 186,8 и 17,9 раза ($P<0,05$) по сравнению с контролем (Рис. 7). Экспрессия тех же мРНК в группе *Ad5-VEGV+Ad5-ANG* была также повышена соответственно в 18,1, 11 и 55,2 раза. Уровень экспрессии мРНК гена *VEGF* в группе *Ad5-VEGV+Ad5-ANG* был в 3 раза ($P<0,05$) выше, чем в группе *Ad5-VEGV+Ad5-ANG+Ad5-GDNF*. Экспрессия мРНК гена *GDNF* в группе *Ad5-VEGV+Ad5-ANG+Ad5-GDNF* была достоверно выше, чем в группе *Ad5-VEGV+Ad5-ANG*, а уровень экспрессии мРНК *ANG* в этих группах не различался. Уровень мРНК десмина был также повышен ($P<0,05$) в обеих экспериментальных группах с преобладанием в группе *Ad5-VEGV+Ad5-ANG+Ad5-GDNF*, что отражает процесс усиления репаративного миогенеза в условиях применения данной комбинации генов. Таким образом, добавление вектора *GDNF* к комбинации прямо инъецируемых в мышцу комбинации векторов *Ad5-VEGV* и *Ad5-ANG* приводит к увеличению экспрессии в ней мРНК *GDNF* и мРНК десмина, что указывает на стимулирование со стороны *GDNF* постишемического репаративного миогенеза.

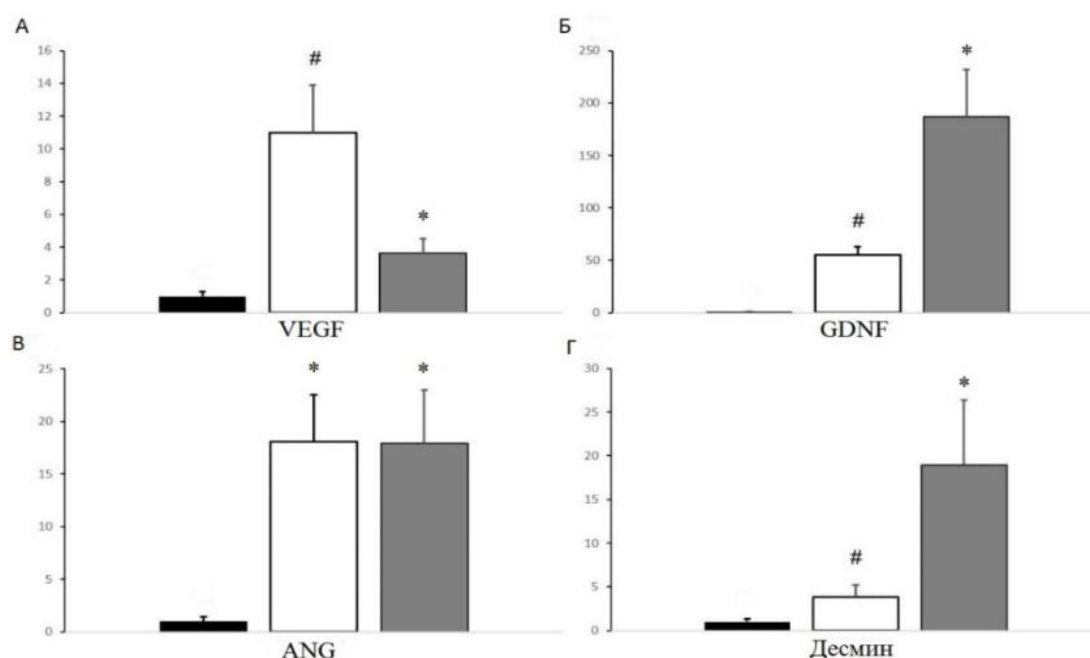


Рис. 7. Экспрессия мРНК *VEGF* (А), *GDNF* (Б), *ANG* (В) и десмина (Г) на 14-е сутки после прямого введения векторов в группах *Ad5-VEGV+Ad5-ANG* (светлые столбики) и *Ad5-VEGV+Ad5-ANG+Ad5-GDNF* (серые столбики). По оси Y обозначен относительный уровень экспрессии мРНК генов. Уровень экспрессии мРНК в группе контроля (тёмные столбики) принят за 100%. * $P<0,05$ – при сравнении с контролем, # $P<0,05$ – при сравнении групп *Ad5-VEGV+Ad5-ANG+Ad5-GDNF* и *Ad5-VEGV+Ad5-ANG*.

Методом вестерн-блот произведена оценка содержания в области ишемии мышцы маркёров эндотелиальных клеток CD34 и фактора фон Виллебранда (vWF) на 14-е сутки после прямого введения комбинации генов *Ad5-VEGV+Ad5-ANG+Ad5-GDNF*, как наиболее перспективной по результатам ПЦР-РВ. Показано увеличение содержания белка CD34 в группе *Ad5-VEGV+Ad5-ANG+Ad5-GDNF* по сравнению с группой контроля (Рис. 8).

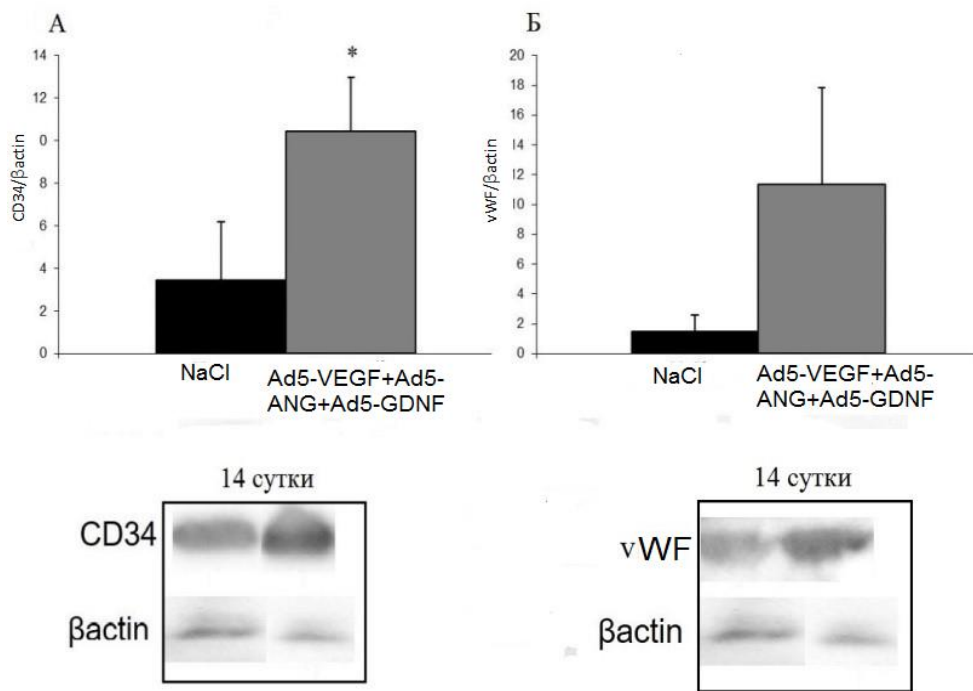


Рис. 8. Вестерн-блот CD34 (А) и vWF (Б) в ишемизированной икроножной мышце на 14-е сутки после инъекции Ad5-VEGF+Ad5-ANG+Ad5-GDNF. * $P < 0,05$.

Нарастание экспрессии CD34 в группе с прямым введением в область ишемии мышцы комбинации векторов Ad5-VEGF+Ad5-ANG+Ad5-GDNF может указывать на увеличение популяции ранних мезенхимных предшественников, в том числе для эндотелиальных клеток. Увеличение популяции CD34⁺ ранних предшественников эндотелиальных клеток, казалось бы, должно сопровождаться увеличением количества вновь образуемых капилляров. Однако, как уже упоминалось, добавление вектора Ad5-GDNF к комбинации прямо инъецируемых или доставляемых при помощи МККП генов VEGF и ANG не приводит на ранних сроках моделирования ишемии (28 суток) к заметному увеличению количества капилляров, но стимулирует ангиогенез на более поздних сроках (42 суток). Можно полагать, что в группе с комбинацией трёх трансгенов Ad5-GDNF стимулирует увеличение количества CD4⁺ эндотелиальных предшественников и, возможно, более дифференцированных CD34⁺CD31⁻ клеток. Этот эффект, в свою очередь, на более поздних сроках обеспечивает более активное образование новых капилляров.

На модели ишемии задней конечности крысы в условиях воздействия на мышцу ударными волнами показана мобилизация эндогенных CD34⁺CD31⁺. Это приводило к увеличению количества капилляров в мышце, улучшению её кровоснабжения и восстановлению функции (Терекюлу et al., 2013). В скелетной мышце CD34⁺ клетки экспрессируют фенотип CD56⁺CD34⁺CD44⁺, близкий к фенотипу клеток эндотелиальной линии (Zheng et al., 2007). В скелетной мышце присутствуют различные субпопуляции CD34⁺ клеток, способные дифференцироваться в нескольких направлениях. CD34⁺ клетки, коэкспрессирующие эндотелиальный маркер CD31, поддерживают ангиогенную дифференцировку, популяция CD34⁺CD31⁻ демонстрирует наибольший потенциал к дифференцировке по адипогенному и миогенному направлениям (Dupas et al., 2011).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На модели ишемии задней конечности крысы изучено влияние рекомбинантных аденовирусных векторов с генами ангиогенных и нейротрофических факторов при их прямой инъекции и МККП-опосредованной доставке в ишемизированную икроножную мышцу. Из восьми комбинаций трёх трансгенов *VEGF*165, *ANG* и *GDNF*, вводимых прямо или при помощи МККП в область ишемии, опосредованная клетками доставка комбинации Ad5-*VEGF* и Ad5-*ANG* наиболее эффективно стимулирует реваскуляризацию, репаративный миогенез и регенерацию нервных волокон. Выраженность позитивного действия конкретных трансгенов, кодирующих ангиогенные и нейротрофические факторы, на регенерацию ишемизированной скелетной мышцы проявляется в различной степени в зависимости от стадии течения процесса. Включение вектора Ad5-*GDNF* в комбинацию с Ad5-*VEGF* и Ad5-*ANG*, вводимую прямо или доставляемую при помощи МККП, стимулирует репаративный миогенез в ишемизированной скелетной мышце. Максимальный уровень экспрессии генов *GDNF* и десмина зарегистрирован в группе с комбинацией Ad5-*VEGF*+Ad5-*ANG*+Ad5-*GDNF*, а выраженное усиление экспрессии генов *VEGF* и *ANG* делает данную комбинацию генов привлекательной для возможного практического применения.

ВЫВОДЫ

1. Более выраженное стимулирование постишемического ангиогенеза в скелетной мышце достигается при доставке в область ишемии комбинации векторов Ad5-*VEGF* и Ad5-*ANG* при помощи моноклеарных клеток крови пуповины, по сравнению с прямым введением в область ишемии той же комбинации векторов.
2. Комбинация векторов Ad5-*VEGF* и Ad5-*ANG*, доставляемая при помощи моноклеарных клеток крови пуповины, наиболее эффективно обеспечивает восстановление иннервации мышцы как на ранних, так и на поздних сроках ишемии.
3. Включение вектора Ad5-*GDNF* в комбинацию прямо инъецируемых или доставляемых при помощи МККП векторов Ad5-*VEGF* и Ad5-*ANG*:
 - не приводит к усилению ангиогенеза на ранних сроках хронической ишемии скелетной мышцы, но активирует его на более поздних сроках;
 - обеспечивает нарастание количества центральоядерных мышечных волокон, что указывает на стимулирование постишемического репаративного миогенеза.
4. Включение вектора Ad5-*GDNF* в комбинацию прямо инъецируемых в мышцу векторов Ad5-*VEGF* и Ad5-*ANG* приводит к увеличению экспрессии в ней мРНК *GDNF* и мРНК десмина, что указывает на стимулирование со стороны *GDNF* постишемического репаративного миогенеза.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Саматошенков И.В. Эффекты прямой и опосредованной доставки гена *VEGF* клетками пуповинной крови в область ишемии конечности у крыс / И.В. Саматошенков, С.А. Андреев, Н.В. Бойчук // Морфологические ведомости. – 2017. – Т.25, № 4. – С. 14-17.
2. Саматошенков И.В. Сравнение эффективности стимулирования ангиогенеза в ишемизированных конечностях крыс при доставке комбинации генов *VEGF* и *Ang* прямым и клеточно-опосредованным способами. / И.В. Саматошенков, К.В. Алексеева, М.Н. Журавлева // Креативная кардиология. – 2019. – Т.13, №3. – С. 252-262.
3. Саматошенков И.В. Adenoviral vector delivery of vegf, angiogenin, and gdnf genes promotes angiogenesis in ischemic skeletal muscle / И.В. Саматошенков, И.И. Салафутдинов, М.Н.

Журавлева, А.А. Костенников, А.А. Ризванов, Ю.А. Челышев // BioNanoScience. – 2020, Т. 10. – 540–547.

4. *Саматошенков И.В.* Стимулирование ангиогенеза скелетной мышцы крысы путем прямого и клеточно-опосредованного введения рекомбинантного гена ангиогенина / И.В. Саматошенков // Морфология. –2020. – Т.157, № 1. С. 35-40.

5. *Саматошенков И.В.* Реваскуляризация ишемизированной скелетной мышцы крысы в условиях клеточно-опосредованной доставки генов проангиогенных факторов / И.В. Саматошенков // Сборник тезисов VIII съезда научного медицинского общества анатомов, гистологов и эмбриологов. – Воронеж, 2019. – С. 8.

6. *Саматошенков И.В.* Генная терапия хронической ишемии задних конечностей у крыс / И.В. Саматошенков, М.Н. Журавлева, Ю.А. Челышев // Сборник тезисов IV национального конгресса по регенеративной медицине. – Москва, 2019. – С. 205.

7. *Саматошенков И.В.* Генно-клеточная терапия для стимулирования ангиогенеза в ишемизированной конечности крысы / И.В. Саматошенков, К.В. Алексеева // Сборник тезисов Пироговской научной конференции. – Москва, 2018. – С. 52.

Патенты

1. Способ стимулирования ангиогенеза с использованием генетически модифицированных клеток крови пуповины. Авторы: *Саматошенков И.В.*, Челышев Ю.А., Андреев С.А. Патент РФ на изобретение № 2663470.

2. Способ регенерации нервных волокон кровеносных сосудов. Авторы: *Саматошенков И.В.*, Челышев Ю.А., Андреев С.А. Патент РФ на изобретение № 2682160.