

## БИОФУНКЦИОНАЛИЗАЦИЯ RGD-ПЕПТИДАМИ И СОСУДИСТЫМ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМ ФАКТОРОМ РОСТА – ЭФФЕКТИВНЫЙ СПОСОБ РАННЕЙ ЭНДОТЕЛИЗАЦИИ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ СОСУДИСТЫХ ГРАФТОВ МАЛОГО ДИАМЕТРА

Е.О. Кривкина, Л.В. Антонова, В.В. Севостьянова, Е.А. Великанова, А.В. Миронов

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний", Кемерово  
E-mail: leonora92@mail.ru

## BIOFUNCTIONALIZATION WITH RGD PEPTIDES AND VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR ENHANCES ENDOTHELIALIZATION OF BIODEGRADABLE SMALL-DIAMETER VASCULAR GRAFTS

E.O. Krivkina, L.V. Antonova, V.V. Sevostyanova, E.A. Velikanova, A.V. Mironov

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo

Решением проблемы дефицита сосудистых протезов для проведения шунтирующих операций является создание тканеинженерного кровеносного сосуда. Цель исследования: сравнительная оценка *in vivo* ремоделирования сосудистой ткани на основе гraftов малого диаметра из полигидроксибутират/валерата и поликапролактона (ПГБВ/ПКЛ), немодифицированных и модифицированных сосудистым эндотелиальным фактором роста (VEGF) и RGD-пептидами. Материал и методы. ПГБВ/ПКЛ и ПГБВ/ПКЛ/VEGF-граffты изготавливали методом электротиннинга. Граffты имплантировали в брюшную часть аорты крыс на 1, 3, 6, 9 и 12 мес. Далее проводили гистологический и иммунофлуоресцентный анализ эксплантированных граffтов. Результаты. Модификация ПГБВ/ПКЛ-граffтов VEGF и RGD-пептидами способствовала эндотелиализации 75% граffтов спустя 12 мес. имплантации, при этом частота тромбообразования снизилась на 25%. Высокопористая структура стенки граffтов в совокупности с хемоаттрактантным и адгезивным эффектом модифицирующих агентов привели к активному привлечению из кровотока CD34+ прогениторных эндотелиальных клеток уже через 1 мес. имплантации, которые в последующем формировали полноценный эндотелиальный монослой и базальную мембрану на внутренней поверхности граffтов.

**Ключевые слова:** тканевая инженерия, сосудистый граffт, RGD-пептиды, сосудистый эндотелиальный фактор роста, эндотелиализация.

Tissue-engineered vascular grafts are the perfect candidates as vascular conduits for cardiovascular bypass or arterial replacement surgery. Aim: To compare efficiency of the grafts blended of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with poly(e-caprolactone) and optionally modified with either vascular endothelial growth factor (VEGF) or RGD peptides. Materials and Methods. Electrospun, 2 mm diameter grafts optionally modified with either VEGF or RGD peptides were implanted into rat abdominal aorta (n=20 per each group). In 1, 3, 6, 9, or 12 months, one-fifth of rats in each group were sacrificed (n=4 per each time point) for the following histological and immunofluorescence examination of the explanted grafts. Results. At 12 months postimplantation, modification with either VEGF or RGD peptides induced formation of endothelial cell monolayer and a basement membrane-like structure in three-fourths of the grafts, which was three-fold higher compared to unmodified grafts. Furthermore, we detected CD34-positive cells, i.e. endothelial progenitor cells, as early as 1 month postimplantation in both VEGF- and RGD-treated grafts.

**Key words:** tissue engineering, vascular graft, RGD-peptides, vascular endothelial growth factor, endothelialization.

### Введение

Реконструктивная хирургия является традиционным способом лечения ишемической болезни сердца и заболеваний периферических артерий. В качестве сосудистых шунтов широко применяют аутологичные вены и артерии. В то же время у значительного числа пациентов отсутствуют сосуды подходящего качества. Невозможность использования синтетических сосудистых протезов для шунтирования артерий малого диаметра доказана во многих исследованиях, поэтому создание функционально активных биодеградируемых сосудистых граffтов малого диаметра может решить данную проблему. С

целью повышения адгезии эндотелиальных клеток к внутренней поверхности сосудистых граffтов был разработан ряд стратегий [1]. Большинство из них включает в себя иммобилизацию белков клеточной адгезии или биоактивных пептидов на внутренней поверхности [1]. Биоактивные пептиды более стабильны и имеют более простую структуру в сравнении с белками. RGD-трипептид широко распространен в структуре белков экстрацеллюлярного матрикса и является важнейшим лигандом для интегринов – рецепторов, ответственных за клеточную адгезию, пролиферацию, выживаемость, миграцию и дифференцировку [2, 3]. Инкорпорирование факторов роста

в полимерные каркасы – другая популярная стратегия повышения клеточной адгезии и инфильтрации сосудистых граffтов [1, 4]. Среди ряда доступных факторов роста нами был выбран сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), так как он является наиболее мощным стимулятором ангиогенеза и васкулогенеза [5]. В дополнение к множеству других эффектов, VEGF индуцирует пролиферацию, выживаемость, миграцию и дифференцировку эндотелиальных клеток [6, 7].

Цель работы: сравнительная оценка *in vivo* ремоделирования сосудистой ткани на основе граffтов малого диаметра из полигидроксибутират/валерата и поликапролактона, немодифицированных и модифицированных VEGF или RGD-пептидами.

### Материал и методы

Немодифицированные сосудистые граffты диаметром 2 мм (n=32) на основе ПГБВ/ПКЛ (Sigma, США) были изготовлены методом электроспиннинга на аппарате NANON-01A (МЕСС, Япония). Половина граffтов (n=16) в дальнейшем была подвергнута модификации RGD-пептидами по следующей схеме: предварительная активация поверхности, последующая обработка линкерным раствором, конъюгация с RGD-пептидами. Сосудистые ПГБВ/ПКЛ-граffты диаметром 2 мм, содержащие VEGF (n=16), были изготовлены методом двухфазного электроспиннинга. Конечная концентрация VEGF (Sigma, США) составила 500 нг на 1 мл полимерного раствора. Все граffты имплантированы в брюшную часть аорты крыс линии Wistar на 1, 3, 6 и 12 мес. После эксплантации сосудистых граffтов проведен гистологический анализ образцов с окраской гематоксилином-эозином и иммунофлуоресцентный анализ с использованием следующих специфических антител: CD31 – маркер зрелых эндотелиальных клеток (Millipore, США), CD34 – маркер прогениторных клеток гемопоэтического происхождения (Abcam, США), коллагены I и IV типа (Abcam, США). Ядра клеток в толще

стенок граffтов докрашивали ядерным красителем Dapi (Sigma, США).

Вследствие небольшой выборки (по 4 граffта на точку вывода) данные представлены в виде процентного соотношения. Остальные результаты имели качественный характер и не подвергались статистической обработке.

### Результаты

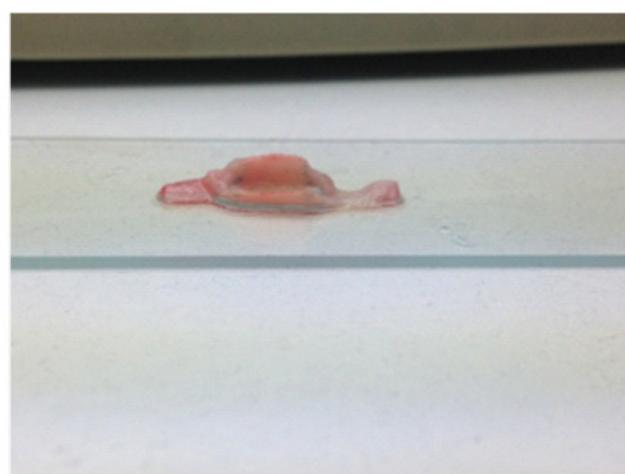
Все прооперированные животные дожили до предполагаемого срока вывода из эксперимента, все имплантированные граffты оставались проходимыми и не меняли своей формы и длины на всех сроках эксперимента (рис. 1).

При проведении гистологического исследования в 75% эксплантированных немодифицированных граffтов на всех временных точках выявлены пристеночные тромбы (рис. 2). Напротив, 75% граffтов, модифицированных RGD-пептидами (рис. 3) или VEGF (рис. 4), были первично проходимы. Более того, на их внутренней поверхности обнаружен вероятный монослой эндотелиальных клеток.

Немодифицированные граffты содержали на внутренней поверхности единичные дезорганизованные эндотелиальные клетки, что не характерно для нормальной сосудистой сети (рис. 5а), в то время как на внутренней поверхности RGD- и VEGF-модифицированных граffтов уже через 1 мес. имплантации выявлен монослой клеток с переходным фенотипом CD31+, CD34+ (рис. 5б, с). Через 3 мес. эксперимента эндотелиальные клетки в граffтах, модифицированных RGD-пептидами или VEGF, приобрели удлиненную форму, что характерно для эндотелиальной выстилки сосудов, и имели фенотип CD31+, CD34-, соответствующий зрелым эндотелиальным клеткам (рис. 5б, с). Таким образом, данные результаты отражают формирование монослоя эндотелиальных клеток и улучшенную эндотелиализацию граffтов, модифицированных RGD-пептидами или VEGF.



До имплантации



Через 12 мес. имплантации

Рис. 1. Вид ПГБВ/ПКЛ-граffтов до и после имплантации

**ПГБВ/ПКЛ немодифицированные**

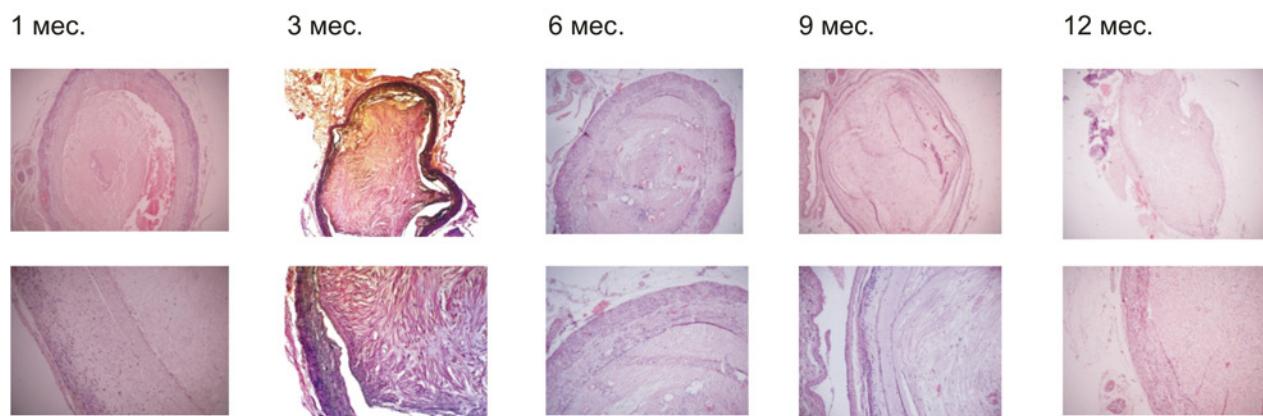


Рис. 2. Результаты имплантации немодифицированных ПГБВ/ПКЛ-графтов, окраска гематоксилин-эозином, ув. x50 и x200

**ПГБВ/ПКЛ/RGD**

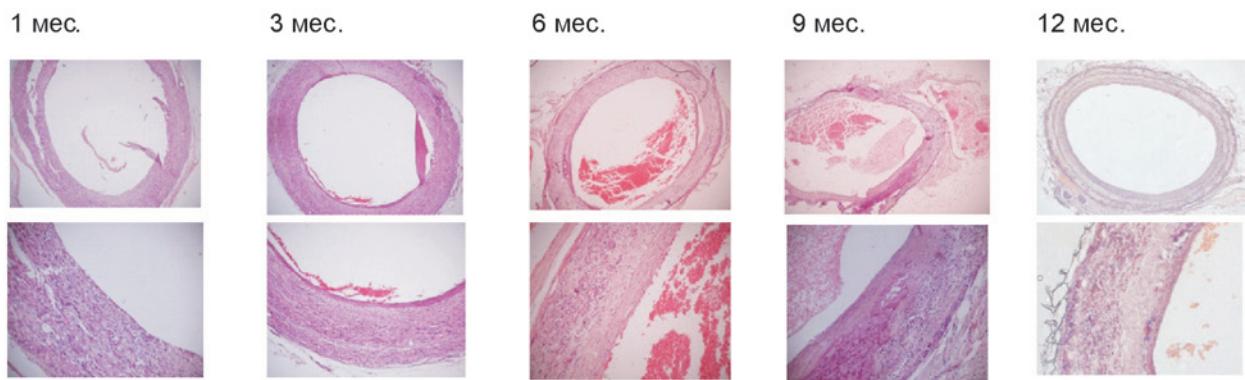


Рис. 3. Результаты имплантации ПГБВ/ПКЛ/RGD-графтов, окраска гематоксилин-эозином, ув. x50 и x200

**ПГБВ/ПКЛ/VEGF**

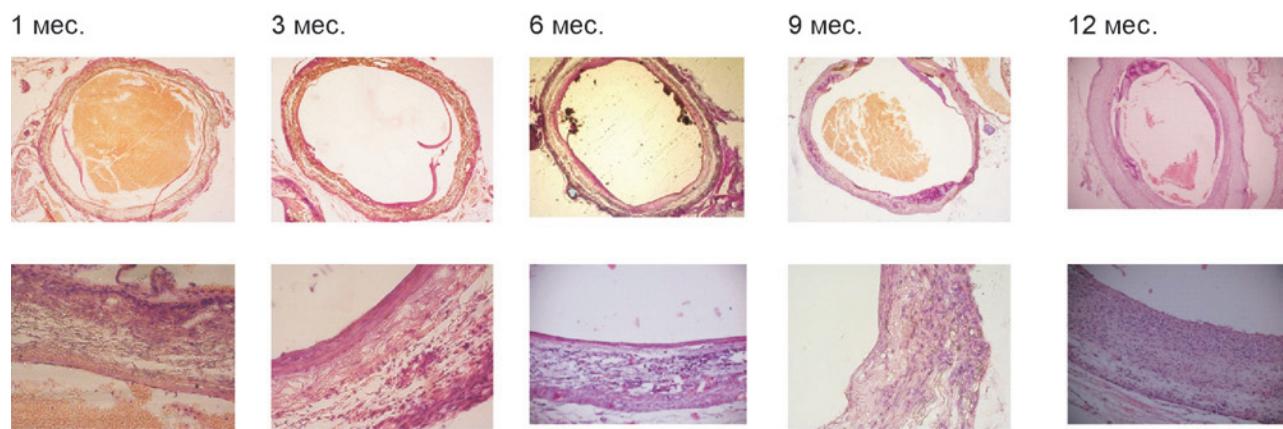


Рис. 4. Результаты имплантации ПГБВ/ПКЛ/VEGF-графтов, окраска гематоксилин-эозином, ув. x50 и x200

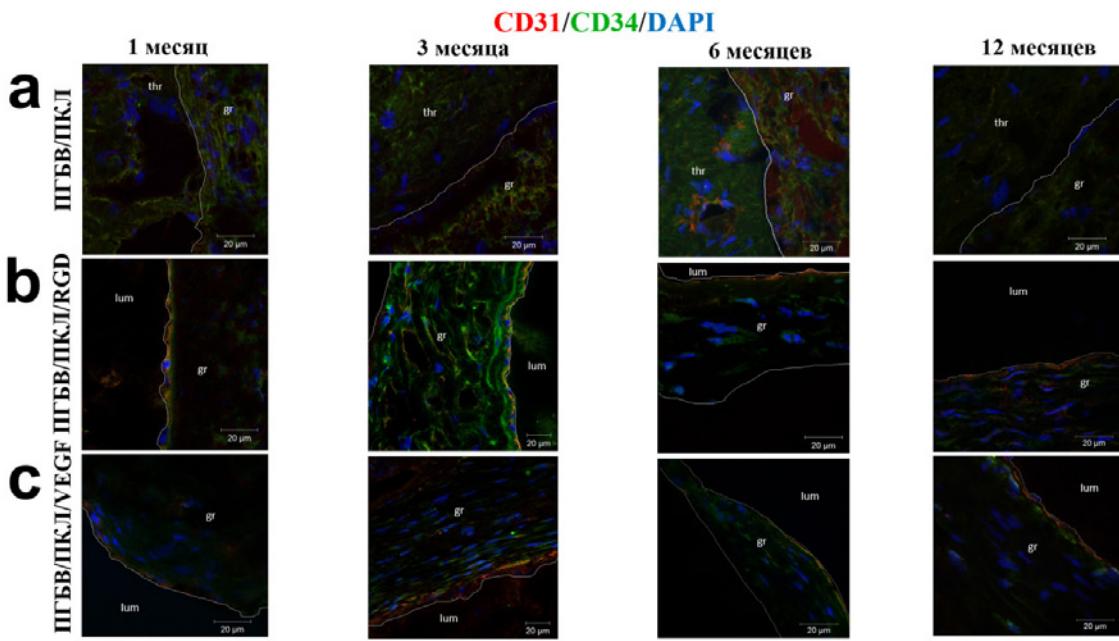


Рис. 5. Сочетанное окрашивание антителами к CD31 (красный цвет), CD34 (зеленый цвет) и DAPI (синий цвет): а – немодифицированные граffты; б – ПГБВ/ПКЛ/RGD-граffты; в – ПГБВ/ПКЛ/VEGF-граffты. Thr – тромб, gr – граffт, lum – просвет сосуда

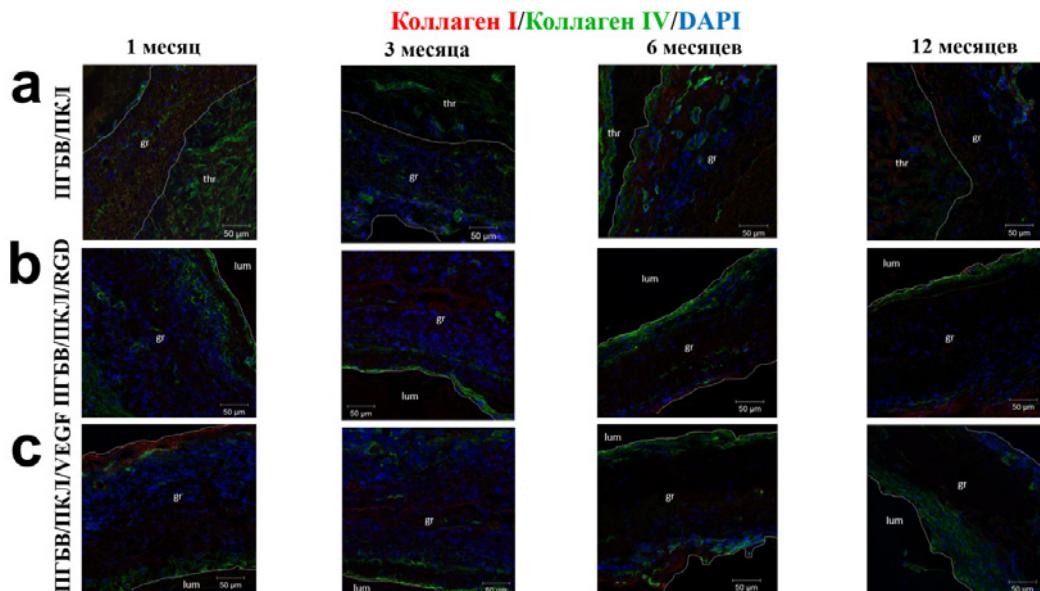


Рис. 6. Сочетанное окрашивание антителами к коллагену I типа (красный цвет), IV типа (зеленый цвет) и DAPI (синий цвет): (а) – контрольные граffты; (б) – ПГБВ/ПКЛ/RGD-граffты; (в) – ПГБВ/ПКЛ/VEGF-граffты. Thr – тромб, gr – граffт, lum – просвет сосуда

Образование базальной мембранны требует отложения цепей коллагена I и IV типа [8]. Чтобы понять, способен ли выявленный монослой эндотелиальных клеток синтезировать коллаген для создания базальной мембранны, мы провели двойное иммуноокрашивание на коллагены I и IV типа. Как и ожидалось, на всех временных точках под эндотелиальными клетками на внутренней поверхности граffтов, конъюгированных с RGD-пептидами или

с инкорпорированным VEGF, выявлен слой положительно окрашенных волокон коллагена IV типа. Ничего подобного в немодифицированных граffтах не наблюдалось (рис. 6). Таким образом, мы показали, что эндотелиальные клетки, прикрепившиеся к внутренней поверхности RGD- и VEGF-модифицированных граffтов, формируют аналог базальной мембранны.

## Обсуждение

Ранее нами было обнаружено, что конъюгация с RGD-пептидами и инкорпорирование VEGF улучшают биофизические свойства, способствуют эндотелиализации и повышают первичную проходимость гравтолов малого диаметра из ПГБВ/ПКЛ на ранних сроках имплантации [9, 10]. Кроме того, модификация VEGF статистически значимо снижала средний диаметр волокон и среднюю площадь пор в сравнении с модификацией RGD-пептидами [9, 10]. Таким образом, структура гравтолов с VEGF была более схожа с нативным экстрацеллюлярным матрикском [11, 12]. Более того, эластичность, жесткость и характер кривой “растяжение–деформация” у гравтолов с VEGF были более схожими с таковыми внутренней грудной артерии в сравнении с гравтами, модифицированными RGD-пептидами [9, 10].

В данной работе мы провели кратко- и долговременное тестирование сосудистых гравтолов малого диаметра из ПГБВ/ПКЛ *in vivo*, включая гравты с конъюгированными RGD-пептидами и инкорпорированным VEGF. Нам удалось подтвердить, что модификации RGD-пептидами и VEGF способствуют эндотелиализации и повышают первичную проходимость на ранних и поздних сроках имплантации биодеградируемых сосудистых гравтолов малого диаметра из ПГБВ/ПКЛ. Как RGD-пептиды, так и VEGF привлекали CD31-положительные, т.е. зрелые, и CD34-положительные, т.е. прогениторные эндотелиальные клетки к внутренней поверхности с 1-го по 12-й мес. имплантации. Указанные эндотелиальные клетки синтезировали коллаген IV типа.

Таким образом, как конъюгирование с RGD-пептидами, так и инкорпорирование VEGF приводит к раннему формированию функционального эндотелиального монослоя на внутренней поверхности биодеградируемых сосудистых гравтолов, что обеспечивает краткосрочную и долгосрочную проходимость сосудистых гравтолов в эксперименте *in vivo*.

## Литература

1. Ren X., Feng Y., Guo J. et al. Surface modification and endothelialization of biomaterials as potential scaffolds for vascular tissue engineering applications // Chem. Soc. Rev. – 2015. – Vol. 44, № 15. – P. 5680–5742.
2. Wang F., Li Y., Shen Y. et al. The functions and applications of RGD in tumor therapy and tissue engineering // Int. J. Mol. Sci. – 2013. – Vol. 14, № 9. – P. 13447–13462.
3. Harburger D.S., Calderwood D.A. Integrin signalling at a glance // J. Cell Sci. – 2009. – Vol. 122, № 2. – P. 159–163.
4. Ingavle G.C., Leach J.K. Advancements in electrospinning of polymeric nanofibrous scaffolds for tissue engineering // Tissue Eng. Part B Rev. – 2014. – Vol. 20, № 4. – P. 277–293.
5. Антонова Л.В., Мухамадиев Р.А., Миронов А.В. и др. Оценка биосовместимости биодеградируемого сосудистого гравта малого диаметра из полигидроксибутират/валерата и поликапролактона: морфологическое исследование // Гены & клетки. – 2015. – Т. 10, № 2. – С. 71–77.
6. Azimi-Nezhad M. Vascular endothelial growth factor from embryonic status to cardiovascular pathology // Rep. Biochem. Mol. Biol. – 2014. – Vol. 2, № 2. – P. 59–69.
7. Thanigaimani S., Kichenadasse G., Mangoni A.A. The emerging role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in vascular

- homeostasis: lessons from recent trials with anti-VEGF drugs // Curr. Vasc. Pharmacol. – 2011. – Vol. 9, № 3. – P. 358–380.
8. Kalluri R. Basement membranes: structure: assembly and role in tumour angiogenesis // Nat. Rev. Cancer. – 2003. – № 3. – P. 422–433.
  9. Antonova L.V., Seifalian A.M., Kutikhin A.G. et al. Bioabsorbable bypass grafts biofunctionalised with RGD have enhanced biophysical properties and endothelialisation tested *in vivo* // Front. Pharmacol. – 2016. – Vol. 7. – P. 136.
  10. Antonova L.V., Sevostyanova V.V., Kutikhin A.G. et al. Vascular endothelial growth factor improves physico-mechanical properties and enhances endothelialization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/poly(e-caprolactone) small-diameter vascular grafts *in vivo* // Front. Pharmacol. – 2016. – Vol. 7. – P. 230.
  11. Rim N.G., Shin C.S., Shin H. Current approaches to electrospun nanofibers for tissue engineering // Biomed. Mater. – 2013. – Vol. 8, № 1. – P. 014102.
  12. Zhang X., Tsukada M., Morikawa H. et al. Production of silk sericin/silk fibroin blend nanofibers // Nanoscale Res. Lett. – 2011. – Vol. 6. – P. 510.

Поступила 10.01.2017

## Сведения об авторах

**Кривкина Евгения Олеговна**, младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной и клинической кардиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний”.

Адрес: 650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6.  
E-mail: leonora92@mail.ru.

**Антонова Лариса Валерьевна**, канд. мед. наук, заведующая лабораторией клеточных технологий отдела экспериментальной и клинической кардиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний”.

Адрес: 650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6.  
E-mail: antonova.la@mail.ru.

**Севостянова Виктория Владимировна**, канд. мед. наук, научный сотрудник лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной и клинической кардиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний”.

Адрес: 650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6.  
E-mail: sevostv@gmail.com.

**Великанова Елена Анатольевна**, младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной и клинической кардиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний”.

Адрес: 650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6.  
E-mail: telella@mail.ru.

**Миронов Андрей Владимирович**, младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной и клинической кардиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Научно-исследовательский институт

комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний”.

Адрес: 650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6.  
E-mail: miroav@kemcardio.ru.

УДК 616.12-008

## УЧАСТИЕ ЭНДОГЕННЫХ АГОНИСТОВ ОПИОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В ПОВЫШЕНИИ УСТОЙЧИВОСТИ СЕРДЦА К ПОВРЕЖДАЮЩЕМУ ДЕЙСТВИЮ РЕПЕРФУЗИИ

**А.В. Мухомедзянов**

Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии  
E-mail: sasha\_m91@mail.ru

## INVOLVEMENT OF ENDOGENOUS OPIOID RECEPTOR AGONISTS IN INCREASING CARDIAC RESISTANCE TO THE DAMAGING EFFECTS OF REPERFUSION

**A.V. Mukhomedzyanov**

Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences

Установлено, что при внутривенном введении неселективный антагонист опиоидных рецепторов (ОР) налтрексон (5 мг/кг), а также селективный антагонист  $\delta_1$ -ОР BNTX (0,7 мг/кг), селективный блокатор  $\delta_2$ -ОР налтрибен (0,3 мг/кг), селективный антагонист  $\kappa$ -ОР нор-биналторфимин (2 мг/кг) не влияют на реперфузионное повреждение сердца *in vivo*. Установлено, что селективный антагонист  $\mu$ -ОР СТАР ограничивает размер инфаркта.

**Ключевые слова:** опиоидные рецепторы, опиоиды, сердце, реперфузия.

It was found that an intravenous administration of the nonselective of opioid receptor (OR) antagonist naltrexone (5 mg/kg) and also the selective antagonist  $\delta_1$ -OR BNTX (0.7 mg/kg), the selective  $\delta_2$ -OR blocker naltriben (0.3 mg/kg), the  $\kappa$ -selective antagonist nor-binaltorphimine (2 mg/kg), do not affect cardiac reperfusion injury *in vivo*. It is established that the  $\mu$ -selective antagonist CTAP limits infarct size.

**Key words:** opioid peptides, opioids, heart, reperfusion.

### Введение

В 70-е и 80-е годы прошлого столетия были обнаружены эндогенные опиоиды [5]. Затем последовало открытие ОР на сарколемме кардиомиоцитов [11]. В экспериментах на изолированном сердце было установлено, что блокада  $\mu$ -ОР перед ишемией способствует уменьшению развития реперфузионной контрактуры [1]. Блокада  $\delta$ - и  $\kappa$ -ОР перед ишемией, напротив, способствует ухудшению реперфузионной сократительной дисфункции изолированного сердца [10]. Есть данные о том, что блокада всех типов периферических ОР приводит к повышению устойчивости сердца к аритмогенному действию коронароокклюзии [7]. Эти данные говорят о том, что эндогенные агонисты ОР могут регулировать устойчивость сердца к патогенному действию ишемии. Однако остается неясным, как влияют на размер зоны инфаркта эндогенные опиоиды при воздействии реперфузии *in vivo*. Впер-

вые будет изучено участие эндогенных агонистов ОР в повышении устойчивости сердца к действию реперфузии.

Цель исследования: выяснить, влияют ли эндогенные агонисты ОР на размер зоны инфаркта при действии реперфузии *in vivo*.

### Материал и методы

Исследование было выполнено на 120 крысах-самцах линии Вистар массой 250–300 г. Животных наркотизировали внутривенно введением  $\alpha$ -хлоралозы (60 мг/кг, внутривенно, Sigma) и подключали к аппарату искусственной вентиляции легких “SAR-830 Series” (CWE Inc. США). Коронароокклюзию и реперфузию осуществляли по методу J.E. Schultz и соавт. [9]. Регистрация АД осуществлялась с помощью датчика давления SS13L (BiopacSystemInc., Goleta, Калифорния, США), сопряжен-