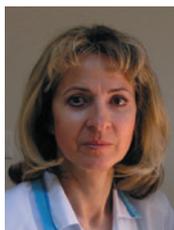
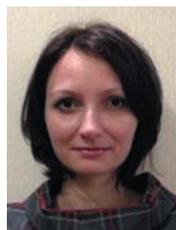


Изучение возможностей природных ингибиторов ангиогенеза эндостатина, тумстатина и фактора, выделяемого пигментным эпителием сетчатки (PEDF), в аваскулогенной терапии

В. Г. Лихванцева¹Е. В. Арутюнян¹А. И. Мирошников³А. Ю. Салихов²

О. В. Белоус², Н. Д. Нурцхалидзе², Р. С. Есипов³, К. А. Бейрахова³, В. Н. Степаненко³

¹ Кафедра офтальмологии факультета фундаментальной медицины МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия; ² Центральная клиническая больница РАН, Москва, Россия; ³ Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

РЕЗЮМЕ

Цель. Изучить возможности эндостатина, тумстатина и фактора, выделяемого пигментным эпителием сетчатки (PEDF), в аваскулогенной терапии.

Методы. Аваскулогенный потенциал природных ингибиторов ангиогенеза изучали на модели щелочного ожога, сопровождающегося ангиогенезом роговицы. Модель формировали у 8 кроликов. Препараты вводили в одно- и 10-кратной дозе после того, как сосудистая сеть завершила свое формирование. Препараты вводили ежедневно субконъюнктивально. Всего делали 10 инъекций. Наблюдали животных в течение 3-х месяцев.

Результаты. Получены клинические доказательства эффективности природных ингибиторов в аваскулогенной терапии. Максимальный клинически значимый дозозависимый аваскулогенный потенциал зафиксирован у тумстатина.

Заключение. Экспериментально изучены возможности природных ингибиторов ангиогенеза — эндостатина, тумстатина и PEDF при аваскулогенной терапии. Получены доказательства клинически значимого дозозависимого аваскулогенного потенциала природного ингибитора ангиогенеза — тумстатина.

Ключевые слова: неоваскуляризация роговицы, эндостатин, тумстатин, фактор, выделенный из пигментного эпителия сетчатки

ABSTRACT

V. G. Likhvantseva, E. V. Arutyunyan, A. I. Miroshnikov, A. Yu. Salihov, O. V. Belous, K. D. Kurtshaldize, R. S. Esipov, K. A. Bejrahova, V. N. Stepanenko
Study of endostatin, tumstatin and PEDF, the natural angiogenesis inhibitors, potential in avascularogenic therapy

Purpose: To evaluate the potential of endostatin, tumstatin and PEDF in avascularogenic therapy.

Methods: The avascularogenic potential of the natural angiogenesis inhibitors was explored on the model of alkaline burn, attended with angiogenesis of cornea. The model was developed on 8 rabbits. The injections were performed in calculated and tenfold increased dose after the vascularization had been formed. The injections were made daily, subconjunctively. There were 10 injections in total. The animals were observed for three months.

Results: The clinical findings were obtained which prove the efficiency of the natural angiogenesis inhibitors in avascularogenic therapy. Tumstatin was registered as possessing the maximum clinically significant dose-dependent avascularogenic potential.

Conclusion: The avascularogenic potential of the natural angiogenesis inhibitors — endostatin, tumstatin and PEDF — in avascularogenic therapy has been experimentally explored. As a result there was obtained the evidence of the clinically significant dose-dependent avascularogenic potential of tumstatin, the natural angiogenesis inhibitor.

Key words: neovascularization of cornea, endostatin, tumstatin, PEDF

История антиангиогенной терапии уходит корнями еще в XIII век. Именно тогда английский хирург Джон Хантер ввел термин ангиогенез для роста новых кровеносных сосудов и предложил начать поиск средств его подавления. Но истинным пионером в этой области стал американский ученый Фолкман, живший в прошлом веке. Предметом исследования Фолкмана была раковая опухоль. Изучая ангиогенез в опухоли, он предположил, что гораздо эффективнее бороться не с самой опухолью, как это делалось всегда, а с факторами, способствующими её росту и метастазированию. В конце 80-х годов прошлого века был выявлен фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF), ответственный за запуск ангиогенеза. Таким образом, была определена мишень, с которой предстояло бороться. Оставалось найти только средство, которое поразит эту мишень. Создание такого препарата было вопросом времени. Первые антиангиогенные препараты, направленные на подавление VEGF-зависимого ангиогенеза, появились в арсенале онкологов в конце XX века. В начале XXI века началась активная их разработка в офтальмологии. По мере того, как накапливался опыт по их применению, стало ясно, что препараты позволяют достичь вполне определенного положительного эффекта в виде снижения просачивания сосудистой стенки, замедления скорости прогрессирования субретинальной неоваскуляризации [12]. Клинически это проявляется уменьшением отека и геморрагий в сетчатке, замедлением скорости роста субретинальных мембран. В функциональном аспекте — стабилизацией или даже улучшением зрительных функций. Однако наряду с позитивными результатами были экспериментально выявлены некоторые побочные эффекты в виде апоптоза пигментного эпителия сетчатки и ганглиозных клеток сетчатки, что приводило к снижению ее толщины и функций [12]. В комплексе с непродолжительностью лечебного эффекта VEGF-зависимых препаратов стало вполне очевидным, что этот путь антиангиогенной терапии далек от совершенства. Взгляды офтальмофармакологов обратились на поиск природных ингибиторов ангиогенеза и изучение их биологических эффектов на моделях заболеваний глаз, сопровождающихся ангиогенезом [3-11, 13-17]. Наиболее перспективными в этих целях были признаны эндостатин, тумстатин и фактор, выделяемый пигментным эпителием сетчатки, — PEDF. В литературе представлены работы, доказывающие их ангиостатические свойства *in vitro* и *in vivo* [1, 2, 6, 8, 13]. Данных, подтверждающих возможность разрушения уже «зрелых» или сформированных сосудов — аваскулогенной терапии, в доступной литературе мы не нашли. Это и стало предметом для наших экспериментальных исследований.

Цель настоящей работы изучить возможности эндостатина, тумстатина и PEDF в аваскулогенной терапии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Биологические эффекты природных ингибиторов ангиогенеза эндостатина, тумстатина и PEDF изучали в эксперименте на животных. Модель переднего ангиогенеза формировали на глазах 8 кроликов (8 глаз) породы шиншилла (половозрелые самцы, весом 2,5-3 кг). В качестве контроля служили глаза животных (2 глаза, кролик №1 и №8), без введения ангиостатических препаратов. В опытные глаза (6 глаз) после формирования зрелой сосудистой сети вводили ангиостатические препараты.

После обездвиживания животного 1% раствором ксилы и инстилляционной местной анестезии 1% раствором дикаина на глаз накладывали векорасширитель. Модель формировали путем введения в роговицу интрастромально 0,1 мл 10% раствора щелочи инсулиновым шприцом [1]. Начиная с 8 дня эксперимента в опытные глаза кроликам №2, 4 и 6, ежедневно вводили субконъюнктивально эндостатин/тумстатин или PEDF в расчетных дозах (70,2 нг/70,2/7,02 нг, соответственно). Делали по 10 инъекций в каждый опытный глаз. Кроликам №3, 5 и 7 дозы вводимых препаратов увеличивали в 10 раз. Продолжительность наблюдения за животными составляла до 3-х мес. Животных в эксперименте лечили в полном соответствии с Резолюцией ARVO «По использованию животных в экспериментальных исследованиях» и ныне действующими правилами GMP (Good Medical Practice) [18]. Всех животных выводили из эксперимента на 90-е сутки.

Оценку клинической эффективности аваскулогенной терапии тестируемых препаратов проводили с помощью биомикроскопии на щелевой лампе (Takagi, Япония). При этом проводили визуальный мониторинг паралимбальной зоны роговицы с максимальной плотностью новообразованных сосудов. Выполняли фоторегистрацию переднего отрезка глаза 1 раз в неделю.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В контрольных глазах, начиная с 3 дня после нанесения ожоговой травмы, отмечали бурное вращение сосудов в роговицу с паралимбальной зоны. Новообразованные сосуды образовывали сплошной красный «ореол». К 18-м суткам роговица контрольного глаза оказывалась пронизанной сетью сосудов (рис. 1а), распространяющихся в оптический центр и иногда переплетающихся между собой.

Введение ангиостатических препаратов в опытных глазах начинали с 8 дня эксперимента, когда вросшие в роговицу сосуды образовывали «венчик», в котором дифференцировались полноценные «зрелые» сосуды с кровотоком. Мониторинг опытных глаз, леченных природными ингибиторами ангиогенеза, показал, что аваскулогенный эффект присутствует у одного тумстатина. Клинически значимый, визуально регистрируемый эффект имел место на глазах кроли-

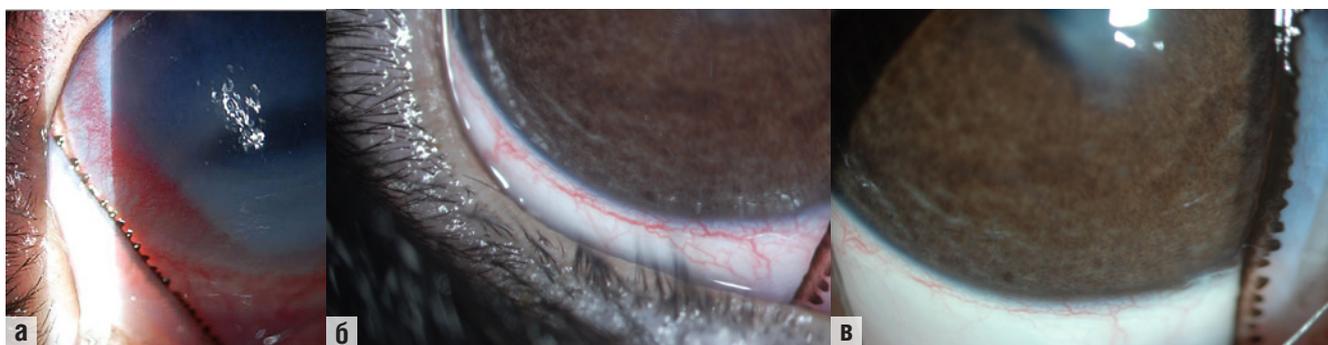


Рисунок 1. Фотография глаза кролика № 3: а – до лечения, 8-е сутки после ожоговой травмы. Формируется сосудистая сеть (опыт); б – после 5 инъекций тумстатина (опыт, x10-кратная доза); в – после 10 инъекций тумстатина (опыт, x10-кратная доза).

ков уже после 5 инъекций тумстатина. Он проявлялся в виде снижения плотности новообразованных сосудов в паралимбальной зоне роговицы, регрессии концевой части наиболее разветвленного отдела новообразованных сосудов, а также сокращении диаметра «зрелых» сосудов с циркулирующим кровотоком. Он был выше на глазах с более высокой (10-кратной) дозой тумстатина (рис. 16, в).

Эндостатин оказывал эффект исключительно на ранних стадиях прерывания ангиогенеза: с 8 по 15 день. Это проявлялось незначительным снижением плотности сосудистой лимбальной сети. По мере того, как сосудистая сеть заканчивала свое формирование, активность препарата нивелировалась.

PEDF, даже при использовании его в 10-кратной дозе, в указанный временной интервал, обладал слабой аваскулогенной активностью. Сосудистая сеть в области лимба практически сохраняла свою исходную плотность на единицу площади, диаметр сосудов изменялся незначительно, а кровоток в них сохранялся. Элементы ремоделирования сосудистой сети проявлялись незначительно.

Известно, что ангиостатическая (синоним: антиангиогенная терапия) и аваскулогенная терапии имеют разные точки приложения и разные мишени. Мишенью ангиостатической терапии чаще всего являются сигнальные молекулы, регулирующие их активность (VEGF, bFGF — фактор роста фибробластов бета, интерферон альфа, интерлейкин 8, фактор некроза опухоли), а также рецепторы, благодаря которым ангиогенез запускается (VEGFR1, VEGFR2), и гены-регуляторы экспрессии белков, запускающих ангиогенез. Мишенью аваскулогенной терапии служат в основном эндотелиальные клетки (ЭК) и экстрацеллюлярный матрикс (ЭЦМ), на котором эти ЭК базируются. Предполагается, что клетки эндотелия кровеносных сосудов, адгези-

рованные на нормальном экстрацеллюлярном матриксе, неподвижны. Компоненты ЭЦМ, являющиеся частью базальной мембраны, необычайно высокой эластичности и растяжимости, состоят в основном из гликозаминогликанов. Они синтезируются и секретируются ЭК в ходе ангиогенеза и васкулогенеза. Эндотелий зрелых сосудов способен постоянно ремоделировать свой ЭЦМ [13]. Сокращение/сжатие ЭЦМ предлагается как цель терапии для предупреждения рестенозов в кардиохирургии. В офтальмопатологии активно обсуждается возможность ремоделирования плотности мембраны Бруха при возрастной макулярной дегенерации (ВМД) [13-17]. Полученные нами экспериментальные данные имеют важное научно-практическое значение. Они подтверждают патогенетически значимую роль баланса природных ингибиторов в поддержании и сохранении нормальной архитектоники хориоретинального комплекса. Известно, что именно снижение содержания в тканях глаза природных ингибиторов ангиогенеза приводит к истончению и разрушению мембраны Бруха с последующим каскадом событий, клинически проявляющихся симптомами возрастной макулярной дегенерации сетчатки [3, 16].

ВЫВОДЫ

Экспериментально изучены возможности природных ингибиторов ангиогенеза — эндостатина, тумстатина и PEDF — при аваскулогенной терапии.

Получены доказательства клинически значимого дозозависимого аваскулогенного потенциала природного ингибитора ангиогенеза — тумстатина.

Экспериментальные исследования, представленные в статье, проведены при финансовой поддержке Федерального агентства по науке и инновациям (ГК № 02.740.11.0717)

ЛИТЕРАТУРА

1. Лихванцева В.Г., Арутюнян Е.В., Мирошников А.И., Есипов Р.С., Салихов А.Ю., Андреев Ю.В. и др. Изучение *in vivo* антиангиогенной активности природных ингибиторов ангиогенеза: эндостатина, тумстатина и PEDF // Офтальмохирургия. 2011. № 1. С. 76-81.
2. Лихванцева В.Г., Арутюнян Е.В., Белоус О.В. VEGF-зависимая антиангиогенная терапия в офтальмологии // Офтальмохирургия. 2011. № 1. С. 82-87.
3. Agnès Noël, Maud Jost, Vincent Lambert, et al. Anti-angiogenic therapy of exudative age-related macular degeneration: current progress and emerging concepts // Trends Mol. Med. 2007. V. 13. P. 345-352.
4. Apte, R. S. (2004) Stimulation of neovascularization by the anti-angiogenic fac-

- tor PEDF // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2004. V. 45. P. 4491-4497.
5. Atchaneeyasakul L.O., Davis E., Alsheikh O.J., et al. Lentiviral vector transfer of either tumstatin or tum - 4 gene fails to inhibit proliferation of ocular choroidal melanoma and retinoblastoma cell cultures // Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005. V. 46. E-Abstract 4249.
 6. Bouck N. PEDF: anti-angiogenic guardian of ocular function // Trends. Mol. Med. 2002. V. 8. P. 330-334.
 7. Hajitou A., Grignet C., Devy L., et al. The antitumoral effect of endostatin and angiostatin is associated with a down-regulation of vascular endothelial growth factor expression in tumor cells // FASEB J. 2002. V. 16. P. 1802-1804.
 8. Hajitou A., Sounni N.E., Devy L., et al. Down-regulation of vascular endothelial growth factor by tissue inhibitor of metalloproteinase-2: effect on *in vivo* mammary tumor growth and angiogenesis // Cancer Res. 2001. V. 61. P. 3450-3457.
 9. Cai J., Jiang W., Grant M.B., et al. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) inhibits angiogenesis via regulated intracellular proteolysis of VEGFR1 // J Biol Chem. 2006. V. 281. P. 3604-3613.
 10. Barnstable C.J., Tombran-Tink J. Neuroprotective and antiangiogenic actions of PEDF in the eye: molecular targets and therapeutic potential // Progress in Retinal and Eye Res. 2004. V. 23. P. 561-577. Переставить по алфавиту
 11. Dawson D.W., Volpert O.V., Gillis P., et al. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis // Science. 1999. V. 285. P. 245-248.
 12. Developments in Ophthalmology. Anti-VEGF/Ed. F Bandello, M. Battaglia Parodi. KARGER, Basel-Freiburg-Paris-London, 2010. V. 46. P. 144.
 13. Maeshima Y., Manfredi M., Reimer C., et al. Extracellular Matrix-derived Peptide Binds to Integrin and Inhibits Angiogenesis // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 15240-15248.
 14. Marneros A.G., Olsen B.R. The role of collagen-derived proteolytic fragments in angiogenesis // Matrix Biol. 2001. V. 20. P. 337-345.
 15. Marneros AG, Olsen BR. Age-dependent iris abnormalities in collagen XVIII/endostatin deficient mice with similarities to human pigment dispersion syndrome // Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003. V. 44. P. 2367-2372.
 16. Marneros A.G., Douglas R.K., Uwe H., et al. Collagen XVIII/endostatin is essential for vision and retinal pigment epithelial function // EMBO J. 2004. V. 23. P. 89-99.
 17. Marneros A.G., Olsen B.R. Physiological role of collagen XVIII and endostatin // FASEB J. 2005. V. 19. P. 716-728.
 18. National Academy of Sciences. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. – Washington, DC: National Academy Press, 1996. P. 274
 19. Sertie, A. L., Sossi V., Camargo A.A., Zatz M., Brahe C., Passos-Bueno M.R. Collagen XVIII, containing an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth, plays a critical role in the maintenance of retinal structure and in neural tube closure // Hum. Mol. Genet. 2000. V. 9. P. 2051-2058.

ОКОМИСТИН®

**новый эффективный препарат
в офтальмологии**

ОКОМИСТИН® - современный препарат для лечения и профилактики инфекционно-воспалительных заболеваний глаз.

Действующее вещество препарата - (бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил] аммоний хлорид моногидрат). Препарат высокоэффективен в отношении бактерий, грибов, вирусов и простейших. Оказывает противовоспалительное действие и ускоряет регенерацию. Стимулирует местные защитные реакции. Не всасывается через слизистые оболочки глаз, слезных путей и носа. Не содержит консервантов.

Показания:

- 💧 **инфекционно-воспалительные заболевания (конъюнктивиты, блефариты, кератиты, кератouveиты);**
- 💧 **травмы глаза;**



- 💧 **ожоги глаза (термические и химические);**
- 💧 **профилактика и лечение гнойно-воспалительных осложнений в пред- и послеоперационном периоде**

Компания ИНФАМЕД

115522, г. Москва, Пролетарский проспект 19, корп. 3
Тел.: (495) 775-83-22, 775-83-23
e-mail: infamed@infamed.ru

www.okomistin.ru