

ISSN 1561-8323 (Print)  
ISSN 2524-2431 (Online)

**МЕДИЦИНА**  
**MEDICINE**

УДК [615-454.1:611.018.52]:616-089.844  
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-2-138-147>

Поступило в редакцию 16.02.2024  
Received 16.02.2024

**В. Г. Богдан<sup>1</sup>, А. С. Доронькина<sup>2</sup>, И. П. Жаворонок<sup>2</sup>, Е. В. Федорова<sup>2</sup>,  
Т. А. Филиппович<sup>2</sup>, С. Г. Лепешко<sup>2</sup>, С. В. Маньковская<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Отделение медицинских наук Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь  
<sup>2</sup>Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

**АНГИОГЕННЫЕ И АНТИНОЦИЦЕПТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ  
ГЕНОТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ КОНСТРУКЦИИ pcDNA\_VEGF165 В УСЛОВИЯХ  
ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ КОНЕЧНОСТИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VIVO***

(Представлено академиком В. А. Кульчицким)

**Аннотация.** Впервые в эксперименте *in vivo* установлен положительный сочетанный (ангиогенный и антиноцицептивный) эффект применения отечественной генноинженерной конструкции pcDNA\_VEGF165 в условиях моделированной ишемии мышц конечности. Плазмида с геном, кодирующим белок VEGF165 (pcDNA\_VEGF165), может являться основой для создания первых в Республике Беларусь генотерапевтических лекарственных средств.

**Ключевые слова:** хроническая ишемия нижних конечностей, генная терапия, плазмида, фактор роста эндотелия сосудов, VEGF

**Для цитирования.** Ангиогенные и антиноцицептивные эффекты генотерапевтической конструкции pcDNA\_VEGF165 в условиях хронической ишемии конечности в эксперименте *in vivo* / В. Г. Богдан [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2024. – Т. 68, № 2. – С. 138–147. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-2-138-147>

**Vasily G. Bogdan<sup>1</sup>, Anastasiya S. Doronkina<sup>2</sup>, Irina P. Zhavoronok<sup>2</sup>, Ekaterina V. Fedorova<sup>2</sup>,  
Tatyana A. Filippovich<sup>2</sup>, Stanislav G. Lepeshko<sup>2</sup>, Svetlana V. Mankovskaya<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Department of Medical Sciences of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus  
<sup>2</sup>Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

**ANGIOGENIC AND ANTINOCICEPTIVE EFFECTS OF THE GENOTHERAPY CONSTRUCTION  
pcDNA\_VEGF165 IN THE CONDITIONS OF CHRONIC LIMB ISCHEMIA IN AN *IN VIVO* EXPERIMENT**

(Communicated by Academician Vladimir A. Kulchitsky)

**Abstract.** For the first time, an *in vivo* experiment has established a positive combined (angiogenic and antinociceptive) effect of using the domestic genetically engineered construction pcDNA\_VEGF165 under conditions of simulated limb muscle ischemia. A plasmid with a gene encoding the protein VEGF165 (pcDNA\_VEGF165) may be the basis for creating the first gene therapy drugs in the Republic of Belarus.

**Keywords:** chronic ischemia complications of the extremities, gene therapy, plasmid, vascular endothelial growth, VEGF

**For citation.** Bogdan V. G., Doronkina A. S., Zhavoronok I. P., Fedorova E. V., Filippovich T. A., Lepeshko S. G., Mankovskaya S. V. Angiogenic and antinociceptive effects of the genotherapy construction pcDNA\_VEGF165 in the conditions of chronic limb ischemia in an *in vivo* experiment. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2024, vol. 68, no. 2, pp. 138–147 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-2-138-147>

**Введение.** В настоящее время хроническая ишемия нижних конечностей (ХИНК) является одной из самых распространенных патологий сердечно-сосудистой системы среди населения старше 50 лет. Несмотря на применение современных методов лекарственного, хирургического

и эндоваскулярного лечения, ампутация конечности часто оказывается единственной возможностью продлить жизнь пациенту [1–4]. В связи с этим разработка и интеграция в клиническую практику новых эффективных медицинских технологий не теряет своей актуальности.

Одним из способов решения этой проблемы является терапевтический ангиогенез, основанный на стимуляции роста новых сосудов в ишемизированных мышцах путем введения ангиогенных факторов роста, их генов или стволовых/прогениторных клеток. В последние годы именно генная терапия считается наиболее перспективной стратегией лечения пациентов, страдающих ХИНК. При этом векторные конструкции на основе кольцевой ДНК (плазмиды), кодирующие в своей последовательности определенный белок или несколько белков, обладающих терапевтическими эффектами, привлекают все больше внимания ученых в качестве наиболее безопасного технологического инструмента для доставки целевого продукта. В мире проводится ряд экспериментальных и клинических исследований различных ДНК-препаратов, применяемых при ишемии нижних конечностей [5–9]. Значительная часть работ посвящена использованию генотерапевтических конструкций с фактором роста эндотелия сосудов (от англ. Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF) и его изоформами (VEGF165 и VEGF121) [6; 9–11]. Механизм ангиогенного эффекта данного белка обусловлен его способностью селективно стимулировать миграцию и пролиферацию эндотелиальных клеток, экспрессию в них активаторов плазминогена, увеличивать сосудистую проницаемость [10].

Целью работы является оценка ангиогенных и антиноцицептивных эффектов применения отечественной генно-инженерной плазмидной конструкции pcDNA\_VEGF165 в условиях моделированной хронической ишемии конечности у экспериментальных животных.

**Материалы и методы исследования.** Исследование проведено на 90 половозрелых крысах Wistar возрастом 8 месяцев, содержащихся в условиях вивария ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси» при температуре  $22,0 \pm 1,0$  °C и 12/12 ч цикле ночь/день со свободным доступом к воде и пище. Протокол исследования одобрен Комитетом по биоэтике (протокол № 1 от 26.01.2023).

Генотерапевтическая конструкция – плазида с геном, кодирующим белок VEGF165 (pcDNA\_VEGF165), разработана в ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси». Субстанция передана в ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси» в виде стерильного раствора для инъекций.

Моделирование хронической недостаточности артериального кровоснабжения (ишемии) задней конечности у крыс выполняли по разработанному нами способу [уведомление о положительном результате предварительной экспертизы по заявке на выдачу патента на изобретение № а20230305 от 26.01.2024]. В стерильных условиях под внутривенным тиопенталовым наркозом (30 мг/кг массы животного) крысу фиксировали за лапки с помощью четырех держалок. После этого выполняли местное обезболивание (40 мкл 1 %-ного раствора лидокаина гидрохлорида, подкожно) вдоль места предполагаемого разреза. Затем производили рассечение кожи в проекции прохождения сосудисто-нервного пучка на внутренней поверхности бедра с последующим выделением, перевязыванием бедренной артерии двумя лигатурами под паховой связкой и выше места ее подколенной бифуркации. После этого участок бедренной артерии между лигатурами длиной не менее 12 мм иссекали. После операции в течение 28 суток лабораторную крысу размещали в индивидуальной клетке в условиях ограничения подвижности.

На 28-е сутки после моделирования патологии животных методом рандомизации распределили на 3 группы (по 30 крыс в каждой). В качестве критериев приемлемости рандомизации считали отсутствие внешних признаков заболеваний и гомогенность групп по массе тела ( $\pm 10$  %). Животные первой группы (группа «Ишемия») не получали специального лекарственного лечения. Во второй группе на 28-е сутки в ишемизированную мышцу бедра осуществляли однократное введение физиологического раствора в объеме 200 мкл (группа «Ишемия + ФР»). В третьей группе в этот же временной срок в пораженную мышцу однократно внутримышечно вводили раствор pcDNA\_VEGF165 в дозе 100 мкг (группа «Ишемия + VEGF165»). Общий период наблюдения составил 70 суток.

Оценку ангиогенного эффекта проводили на основании сравнительного морфометрического исследования скелетных мышц конечности у лабораторных крыс до лечения, а также на 7, 14, 28 и 42 сутки после генной терапии/введения физиологического раствора (соответственно на 28, 35,

42, 56 и 70 сутки моделирования ишемии). Животных всех групп (по 6 особей) выводили из эксперимента в вышеуказанные сроки.

Для гистологического исследования проводили забор мышц бедра и голени оперированной и здоровой задней конечности. Фрагменты тканей фиксировали в 10 %-ном нейтральном забуференном растворе формалина в течение не менее 24 ч. Далее осуществляли гистологическую подготовку в вакуумном тканевом процессоре KD-TS6B (Китай) и заливку в парафин. Парафиновые срезы толщиной 4–5 мкм, полученные при помощи ротационного микротомы CUT 5062 (SLEE medical, Германия), наносили на предметные стекла с адгезивным покрытием. После депарафинизации в ксилоле и обезживания в растворах этилового спирта возрастающей концентрации гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике. Для объективной оценки состояния артериального кровоснабжения мышц проводили морфометрический анализ соотношения количества кровеносных сосудов, приходящихся на одно мышечное волокно, в 10 полях зрения при увеличении  $\times 400$ .

Исследование функций ишемизированных мышц задних конечностей у экспериментальных животных во всех группах выполняли путем измерения порога ноцицептивной реакции, паттернов походки до-, а также на 7, 14, 21, 28, 35, 42, 56 и 70 сутки после оперативного вмешательства.

Оценку порога ноцицептивной реакции (ПНР) у экспериментальных животных проводили с помощью теста «Рандалла-Селитто» [12]. Процедуру осуществляли поочередно на обеих задних конечностях для каждой особи с применением аппарата PanLab (Испания).

Изменения паттернов походки изучали используя аппаратно-программный комплекс CatWalk ХТ версии 10.6 (Noldus, Голландия). Каждое животное тестировали до получения трех адекватных пробежек (вариация  $< 75$  %, время пробежки  $< 5$  с).

Площадь отпечатка оценивали в квадратных сантиметрах ( $\text{см}^2$ ), а интенсивность отпечатка – в абсолютных единицах измерения (абс. ед.).

Статистическую обработку полученных результатов исследования выполняли с помощью программ Statistica 10. При нормальном распределении признака данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартного отклонения ( $M \pm Sd$ ), при распределении признака, отличного от нормального, – в виде медианы и межквартильного интервала (Me [Q25 %; Q75 %]). Оценку статистической значимости количественных признаков определяли с помощью  $t$ -критерия Стьюдента и критериев Вилкоксона для зависимых и Манна–Уитни для независимых выборок в парных сравнениях.

**Результаты и их обсуждение.** До проведения терапии (на 28-е сутки после выполнения оперативного вмешательства) в ишемизированных мышцах бедра и голени во всех трех опытных группах зафиксировано снижение более чем в 2 раза количества кровеносных сосудов по сравнению со здоровой конечностью, при  $p = 0,001$  для всех групп (таблица).

В группе «Ишемия» у животных в скелетных мышцах *бедра* количество сосудов на 7-е сутки наблюдения продолжало оставаться сниженным в сравнении со здоровой конечностью на 54,30 %, на 14-е – на 46,95 %, на 28-е – на 43,76 %, на 42-е – на 43,24 % ( $p = 0,001$  для всех групп). В мышцах *голени* – на 49,37 %, на 14-е – на 54,18 %, на 28-е – на 53,06 %, на 42-е – на 41,06 % ( $p = 0,001$  для всех групп).

При введении физиологического раствора у лабораторных животных второй группы на протяжении всего эксперимента отмечено стабильно низкое количество кровеносных сосудов в скелетных мышцах бедра и голени оперированной конечности в сравнении с исследуемыми мышцами здоровой конечности. Указанные показатели были сопоставимы со значениями группы «Ишемия» ( $p > 0,05$ ).

Морфометрический анализ мышечной ткани бедра и голени группы «Ишемия + VEGF165» на 7-е и 14-е сутки после лечения показал, что введение раствора pcDNA\_VEGF165 крысам не приводило к значимым различиям между количеством сосудов, приходящихся на одно мышечное волокно, по сравнению с группами «Ишемия» и «Ишемия + ФР» ( $p > 0,05$ ).

Вместе с тем введение раствора модифицированной плазмиды лабораторным животным сопровождалось достоверным увеличением количества сосудов в ишемизированных мышцах *бедра* относительно группы «Ишемия» на 28-е сутки на 55,24 % и на 42-е – на 71,03 % ( $p = 0,001$ ).

Динамика изменения количества кровеносных сосудов в скелетных мышцах задних конечностей крыс  
Dynamics of changes in the number of blood vessels in the skeletal muscles of the hindlimbs of rats

Задняя конечность Hindlimb		Срок наблюдения, сутки Observation period, days				
		до введения / 28 после операции	7 после введения / 35 после операции	14 после введения / 42 после операции	28 после введения / 56 после операции	42 после введения / 70 после операции
Здоровая	бедро	4,39 ± 0,82	4,42 ± 0,82	4,43 ± 0,80	4,41 ± 0,81	4,44 ± 0,79
	голень	3,98 ± 0,70	3,97 ± 0,69	3,98 ± 0,71	3,97 ± 0,76	3,97 ± 0,69
Ишемия	бедро	1,96 ± 0,80*	2,02 ± 0,79*	2,35 ± 1,01*	2,48 ± 0,97*	2,52 ± 0,79*
	голень	1,99 ± 0,90*	2,01 ± 0,94*	2,03 ± 0,86*	2,07 ± 0,95*	2,34 ± 1,10*
Ишемия + ФР	бедро	1,92 ± 0,87*	1,91 ± 0,88*	2,24 ± 0,88*	2,50 ± 0,96*	2,56 ± 1,12*
	голень	1,88 ± 0,90*	1,91 ± 0,90*	2,10 ± 0,91*	2,19 ± 0,69*	2,55 ± 0,86*
Ишемия + VEGF	бедро	1,97 ± 0,74*	2,01 ± 0,73*	2,52 ± 0,80*	3,85 ± 1,19*#^	4,31 ± 1,31#^
	голень	1,99 ± 0,77*	2,02 ± 0,79*	2,17 ± 0,72*	4,00 ± 1,23#^	4,35 ± 1,23#^

Примечание: \* – наличие статистически значимых отличий средних значений относительно здоровой конечности ( $p < 0,05$ ); # – наличие статистически значимых отличий средних значений относительно группы «Ишемия» ( $p < 0,05$ ); ^ – наличие статистически значимых отличий средних значений относительно группы «Ишемия + ФР» ( $p < 0,05$ ).

Note: \* – the presence of statistically significant differences in the average values relative to a healthy limb ( $p < 0.05$ ); # – the presence of statistically significant differences in the average values relative to the “Ischemia” group ( $p < 0.05$ ); ^ – the presence of statistically significant differences in the average values relative to the “Ischemia + FR” group ( $p < 0.05$ ).

для обеих групп). При этом по отношению к показателям для мышц здоровой конечности лабораторных животных количество капилляров оставалось сниженным на 7-е сутки – на 54,52 % ( $p = 0,001$ ), на 14-е – на 43,11 % ( $p = 0,001$ ), на 28-е – на 12,70 % ( $p = 0,04$ ). К 42-м суткам количество сосудов в мышечной ткани бедра оперированной конечности соответствовало значениям, характерным для здоровой конечности животного ( $p = 0,31$ ), что указывало на процесс восстановления кровоснабжения в ишемизированной мышце.

После введения pcDNA\_VEGF165 в мышечных волокнах голени крыс количество сосудов также увеличивалось относительно группы «Ишемия» на 28-е – на 93,24 %, на 42-е – на 85,90 % ( $p = 0,001$  для обеих групп). Однако показатели не достигали значений для аналогичных мышц здоровой конечности крыс и оставались сниженными на 7-е сутки – на 49,11 % ( $p = 0,001$ ), на 14-е – на 45,48 % ( $p = 0,001$ ). Вместе с тем на 28-е и 42-е сутки наблюдения установлено, что количество сосудов в ишемизированных мышцах голени достигло значений, полученных при исследовании мышц здоровой конечности и даже имело тенденцию к увеличению на 0,75 % ( $p = 0,75$ ) и 9,57 % ( $p = 0,021$ ) соответственно. Это подтверждало выраженный стимулирующий ангиогенный эффект генно-инженерной плазмидной конструкции.

Морфологическая картина скелетных мышц (бедра и голени) здоровой конечности крыс на 28-е, 42-е и 70-е сутки эксперимента представлена плотными пучками миоцитов, в толще которых проходили полнокровные венулы и артериолы, содержавшие единичные эритроциты. Просветы сосудов были широкими, эндотелиальные клетки – без патологических изменений (рис. 1, a–f).

При гистологическом исследовании мышц бедра и голени на 28-е сутки наблюдений в группах «Ишемия» и «Ишемия + VEGF165» зафиксировано отсутствие существенных различий в морфологической картине. В обоих случаях зарегистрированы ишемические и атрофические изменения мышечных клеток, пролиферация клеток эндо- и перимизия (рис. 1, g, j, m, p).

При микроскопическом исследовании мышц бедра задней конечности лабораторных животных из группы «Ишемия» на 42-е сутки эксперимента прогрессировали ишемические изменения миоцитов, появлялись единичные очаги регенерации миобластов; на 70-е сутки – выявляли нарастание атрофических изменений мышечных клеток, фиброз стромы (рис. 1, h, i). В скелетных мышцах голени грызунов после моделирования хронической ишемии нижней конечности на 42-е сутки после моделирования прогрессировали атрофические и ишемические изменения мышечных клеток; на 70-е – нарастали атрофические изменения миоцитов, выявляли пролиферацию микрососудов и признаки гиперплазии соединительной ткани (рис. 1, k, l).

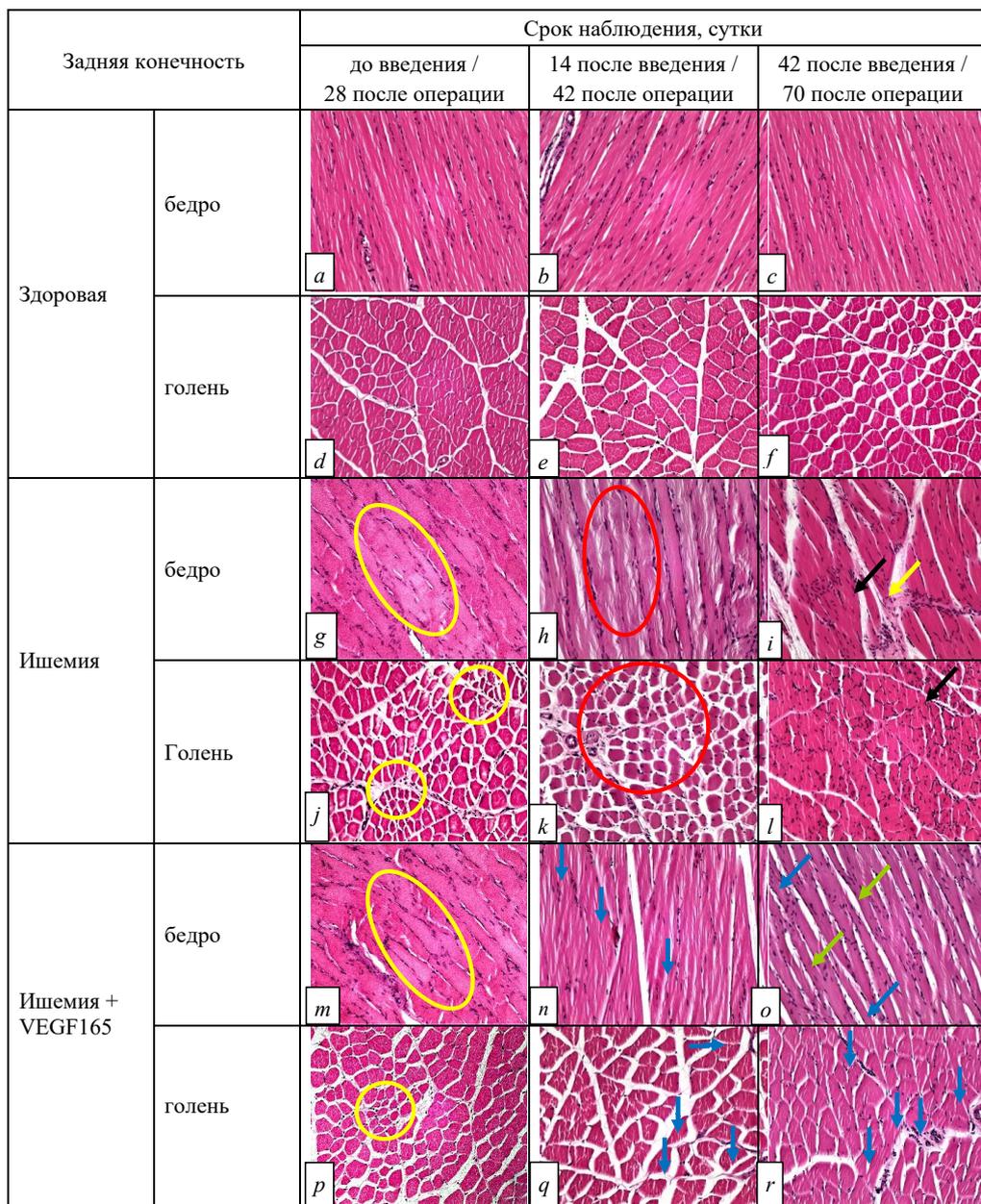


Рис. 1. Морфологическая структура скелетных мышц бедра и голени опытных крыс (окраска гематоксилином и эозином, увеличение  $\times 200$ ): *a–f* – гистологическая картина без особенностей; *g, j, m, p* – мышечные волокна с признаками ишемии и атрофии (желтый овал); *h, k* – мышечные волокна с признаками ишемии (красный овал); *i, l* – мышечные волокна с признаками ишемии и атрофии (черная стрелка), фиброз стромы (желтая стрелка); *n, q, o, r* – пролиферация сосудов (синяя стрелка), очаги регенерирующих миобластов (зеленая стрелка)

Fig. 1. Morphological structure of skeletal muscles of the thigh and lower leg of experimental rats (stained with hematoxylin and eosin, magnification  $\times 200$ ): *a–f* – histological picture without features; *g, j, m, p* – muscle fibers with signs of ischemia and atrophy (yellow oval); *h, k* – muscle fibers with signs of ischemia (red oval); *i, l* – muscle fibers with signs of ischemia and atrophy (black arrow), stroma fibrosis (yellow arrow); *n, q, o, r* – vascular proliferation (blue arrow), foci of regenerating myoblasts (green arrow)

Введение раствора плазмидной конструкции с участком гена VEGF165 лабораторным крысам с хронической ишемией на 14-е сутки после терапии приводило к уменьшению очагов некроза и очаговой пролиферации микрососудов в мышцах бедра; на 42-е – усиленному новообразованию сосудов микроциркуляторного русла, ослаблению ишемических и фибротических изменений мышечной ткани, регенерации миобластов (рис. 1, *n, o*). В мышцах голени грызунов

наблюдалась аналогичная морфологическая картина: на 14-е сутки выявлялась очаговая пролиферация микрососудов среди мышечных волокон; на 42-е – усиленное новообразование кровеносных сосудов капиллярного типа, ослабление ишемических и фибротических изменений мышечной ткани, регенерация миобластов (рис. 1, *q, r*).

В гистологических препаратах мышечной ткани голени и бедра группы «Ишемия + VEGF165» на 14-е сутки после локального введения плазмидной конструкции отмечена активная пролиферация сосудов с увеличением их количества к 42-м суткам наблюдения.

Моделирование ишемии правой задней конечности у крыс приводило к развитию механической гипералгезии на 7-е сутки после операции, что выражалось в снижении значений ПНР оперированной конечности на 32,4 % (с 132,5 [129,5; 138,8] до 89,5 [83,0; 92,0] г;  $p = 0,0015$ ) по сравнению со значениями до операции. Последующий 3-недельный мониторинг показал незначительное снижение параметров ПНР у экспериментальных животных. На 35-е и 42-е сутки после операции (7-е и 14-е сутки после введения препарата соответственно) при межгрупповом сравнении зафиксировано отсутствие статистически значимых различий ПНР ( $p \geq 0,05$ ). На 56-е сутки наблюдения (28-е сутки после введения препарата) в группе «Ишемия + VEGF165» зарегистрировано статистически значимое увеличение показателя ПНР оперированной конечности на 18,2 и 19,5 % относительно значений, зафиксированных в группах «Ишемия» и «Ишемия + ФР» ( $p = 0,023$  и  $p = 0,012$  соответственно). К 70-м суткам исследования (42-е сутки после введения препарата) отмечали дальнейшее статистически значимое увеличение ПНР у животных из группы, получивших генную терапию, хотя он не достиг значений до операции ( $p = 0,012$ ; рис. 2).

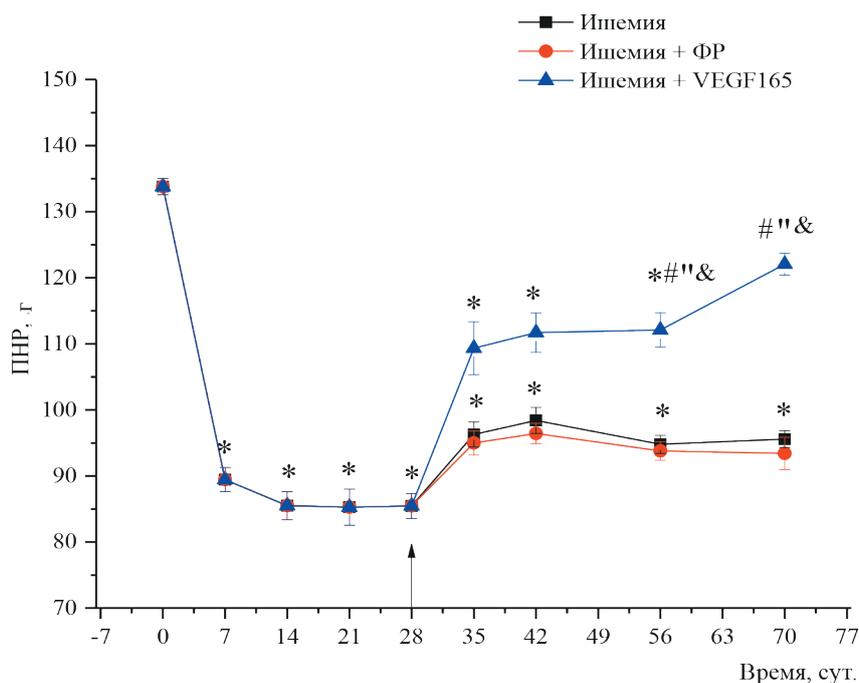


Рис. 2. Изменения порога ноцицептивной реакции (ПНР) оперированной конечности крыс на механический стимул:

\* –  $p < 0,05$  по сравнению со значениями до операции, # –  $p < 0,05$  по сравнению со значениями на 28-е сутки,  
" –  $p < 0,05$  по сравнению с группой «Ишемия», & –  $p < 0,05$  по сравнению с группой «Ишемия + ФР»

Fig. 2. Changes in the threshold of nociceptive response (NPR) of the operated limb of rats to a mechanical stimulus:

\* –  $p < 0.05$  compared to the values before surgery, # –  $p < 0.05$  compared to the values on day 28, " –  $p < 0.05$  compared to the "Ischemia" group, & –  $p < 0.05$  compared to the "Ischemia + SS" group

У лабораторных животных с ишемией правой задней конечности были зарегистрированы статистически значимые изменения исследуемых показателей походки с использованием аппаратно-программного комплекса CatWalk TX. На 7-е сутки после операции выявляли снижение значений площади отпечатка на 68,8 % (с 1,6 [1,4; 1,8] до 0,5 [0,4; 0,7] см<sup>2</sup>;  $p = 0,002$ ) относительно

значений до операции. При дальнейшем мониторинге наблюдали незначительные колебания данного параметра и к 28-м суткам площадь отпечатка оперированной конечности составила 61,6 % относительно данных до операции ( $p = 0,0015$ ). На 35-е и 42-е сутки после операции (7-е и 14-е сутки после введения препарата соответственно) статистически значимых различий в изучаемом параметре между группами животных не обнаружено, что согласуется с данными при анализе ПНР. На 56-е сутки эксперимента (28-е сутки после введения препарата) в третьей группе, получивших генную терапию, регистрировали увеличение значений площади отпечатка на 88,1 и 83,5 % относительно групп «Ишемия» ( $p = 0,023$ ) и «Ишемия + ФР» ( $p = 0,025$ ). На 70-е сутки после операции (42-е сутки после введения препарата) в группе «Ишемия + VEGF165» площадь отпечатка оперированной конечности увеличилась у крыс с 0,6 [0,5; 0,8] до 1,1 [0,9; 1,4] см<sup>2</sup> ( $p = 0,0277$ ), относительно 28-х суток после операции, и практически достигла значений до операции (1,1 [0,9; 1,4] и 1,6 [1,4; 1,8] см<sup>2</sup> соответственно;  $p = 0,046$ ; рис. 3).

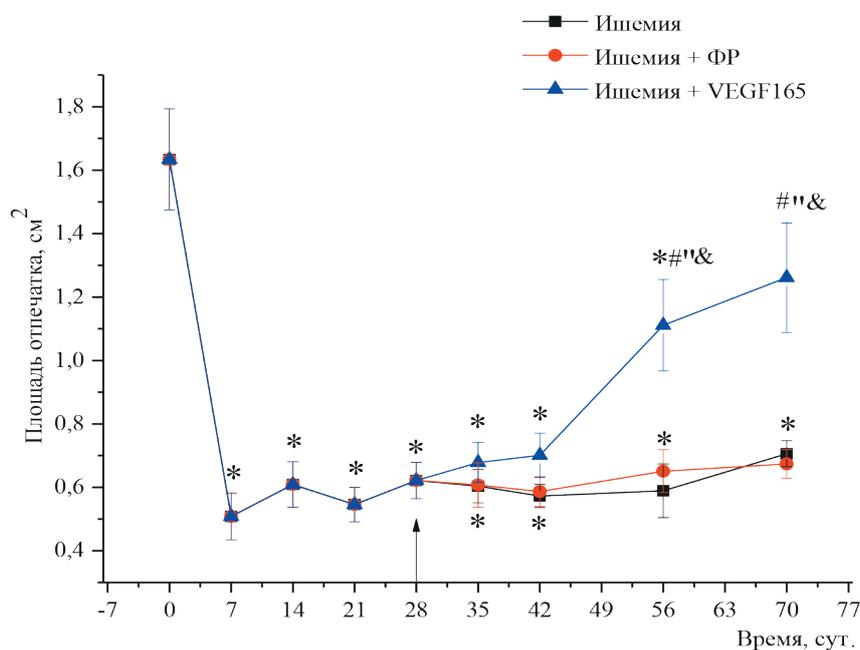


Рис. 3. Изменение площади отпечатка оперированной конечности крыс: \* –  $p < 0,05$  по сравнению со значениями до операции, # –  $p < 0,05$  по сравнению со значениями на 28-е сутки, " –  $p < 0,05$  по сравнению с группой «Ишемия», & –  $p < 0,05$  по сравнению с группой «Ишемия + ФР»

Fig. 3. Change in the footprint of the operated limb of rats: \* –  $p < 0.05$  compared to the values before surgery, # –  $p < 0.05$  compared to the values on day 28, " –  $p < 0.05$  compared to the "Ischemia" group, & –  $p < 0.05$  compared to the "Ischemia + SS" group

На 7-е сутки после моделирования ишемии задней конечности регистрировали статистически значимое снижение интенсивности отпечатка оперированной конечности на 50,2 % (с 140,7 [126,4; 145,8] до 70,1 [64,1; 80,4] абс. ед;  $p = 0,007$ ) относительно значений до операции (рис. 4).

В последующий 3-недельный период данный параметр составил 46–48 % относительно значений до моделирования патологии. На 35-е и 42-е сутки после операции (7-е и 14-е сутки после введения препарата соответственно) у крыс с ишемией правой задней конечности достоверных различий относительно 7-х суток после операции не получено. На 56-е сутки эксперимента (28-е сутки после введения препарата) в группе «Ишемия + VEGF165» регистрировали увеличение значений интенсивности отпечатка на 22,4 и 17,9 % относительно значений, зафиксированных в группах «Ишемия» и «Ишемия + ФР» ( $p = 0,002$  и  $p = 0,038$  соответственно). К 70-м суткам (42-е сутки после введения препарата) вышеупомянутый показатель составил 104,1 [95,5; 115,9], отмечено снижение на 25,6 % по отношению до операции ( $p = 0,012$ ).

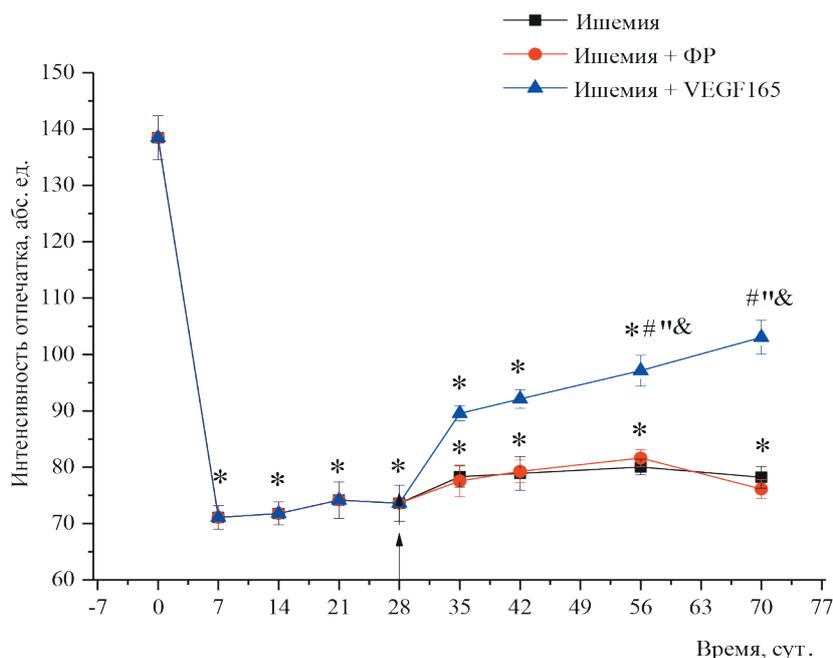


Рис. 4. Изменение интенсивности отпечатка оперированной конечности крыс: \* –  $p < 0,05$  по сравнению со значениями до операции, # –  $p < 0,05$  по сравнению со значениями на 28-е сутки, " –  $p < 0,05$  по сравнению с группой «Ишемия», & –  $p < 0,05$  по сравнению с группой «Ишемия + ФР»

Fig. 4. Change in the intensity of the imprint of the operated limb of rats: \* –  $p < 0.05$  compared to the values before surgery, # –  $p < 0.05$  compared to the values on the 28th day, " –  $p < 0.05$  compared to the "Ischemia" group, & –  $p < 0.05$  compared to the "Ischemia + SS" group

Предполагаемой причиной этого явления, возможно, является активация пролиферации капилляров с улучшением кровоснабжения скелетных мышц и периферических нервов.

#### Выводы.

1. Впервые в эксперименте *in vivo* установлен положительный сочетанный (ангиогенный и антиноцицептивный) эффект применения отечественной генно-инженерной плазмидной конструкции pcDNA\_VEGF165 в условиях моделированной ишемии мышц конечности.

2. Локальное введение pcDNA\_VEGF165 при хронической недостаточности артериального кровоснабжения конечности обладает выраженным стимулирующим образованием сосудов микроциркуляторного русла действием, статистически значимым увеличением количества капилляров в ишемизированной скелетной мышце лабораторных животных на 28-е сутки после терапии. При этом в мышцах бедра восстановление данного показателя до уровня здоровой ткани зарегистрировано на 42-е сутки наблюдения, а в мышцах голени – на 28-е сутки. Причем в мышцах голени исследуемый параметр на 42-е сутки превысил значения для здоровой конечности на 9,57 %.

3. Доказано, что введение крысам с мышечной ишемией раствора плазмидной ДНК (pcDNA\_VEGF165) в дозе 100 мкг приводит к протекторному плеiotропному антиноцицептивному эффекту на 28-е и 42-е сутки после терапии с достоверным повышением значений порога ноцицептивной реакции, площади и интенсивности отпечатка оперированной конечности.

Плазмидная конструкция pcDNA\_VEGF165 может являться основой для создания первых в Республике Беларусь генотерапевтических лекарственных средств.

#### Список использованных источников

1. Adam, D. J. Bypass versus angioplasty in severe ischaemia of the leg (BASIL): multicentre, randomised controlled trial / D. J. Adam, J. D. Beard, T. Cleveland // *Lancet*. – 2005. – Vol. 366, N 9501. – P. 1925–1934. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(05\)67704-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(05)67704-5)

2. Григорьева, А. И. Хронические облитерирующие заболевания артерий нижних конечностей. Современное амбулаторное лечение / А. И. Григорьева // Моск. хирург. журн. – 2022. – Спецвыпуск. – С. 43–51. <https://doi.org/10.17238/2072-3180-2022-43-51>
3. Скворцов, В. В. Современные аспекты диагностики и лечения облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей / В. В. Скворцов, А. В. Сабанов, А. А. Еременко // Лечащий врач. – 2023. – Т. 26, № 6. – С. 55–60. <https://doi.org/10.51793/os.2023.26.6.008>
4. Богдан, В. Г. Стимуляция ангиогенеза в комплексном лечении пациентов с хронической артериальной недостаточностью нижних конечностей / В. Г. Богдан, С. Г. Лепешко // Военная медицина. – 2017. – № 2. – С. 117–119.
5. Safety and efficacy of plasmid DNA expressing two isoforms of hepatocyte growth factor in patients with critical limb ischemia / M. R. Kibbe [et al.] // *Gene Therapy*. – 2016. – Vol. 23, N 3. – P. 306–312. <https://doi.org/10.1038/gt.2015.110>
6. Червяков, Ю. В. Эффективность генной терапии и стандартного консервативного лечения хронической ишемии нижних конечностей атеросклеротического генеза / Ю. В. Червяков, О. Н. Власенко // Вестн. хирургии им. И. И. Грекова. – 2018. – Т. 177, № 2. – С. 64–69. <https://doi.org/10.24884/0042-4625-2018-177-2-64-69>
7. Gene-based therapies in patients with critical limb ischemia / P. Kitrou [et al.] // *Expert Opin. Biol. Ther.* – 2017. – Vol. 17, N 4. – P. 449–456. <https://doi.org/10.1080/14712598.2017.1289170>
8. Phase I/IIa clinical trial of therapeutic angiogenesis using hepatocyte growth factor gene transfer to treat critical limb ischemia / R. Morishita [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2011. – Vol. 31, N 3. – P. 713–720. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.110.219550>
9. Double VEGF/HGF gene therapy in critical limb ischemia complicated by diabetes mellitus / P. Barc [et al.] // *J. Cardiovasc. Transl. Res.* – 2021. – Vol. 14, N 3. – P. 409–415. <https://doi.org/10.1007/s12265-020-10066-9>
10. Giacca, M. VEGF gene therapy: therapeutic angiogenesis in the clinic and beyond / M. Giacca, S. Zacchigna // *Gene Ther.* – 2012. – Vol. 19, N 6. – P. 622–629. <https://doi.org/10.1038/gt.2012.17>
11. Опыт применения терапевтического ангиогенеза препаратом «Неоваскулген» у пациентов с нешунтабельным поражением артерий нижних конечностей / В. Ю. Михайличенко [и др.] // Тавр. мед.-биол. вестн. – 2022. – Т. 25, № 2. – С. 55–60.
12. Randall, L. O. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue / L. O. Randall, J. J. Selitto // *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* – 1957. – Vol. 111, N 4. – P. 409–419.

## References

1. Adam D. J., Beard J. D., Cleveland T. Bypass versus angioplasty in severe ischaemia of the leg (BASIL): multicentre, randomised controlled trial. *Lancet*, 2005, vol. 366, no. 9501, pp. 1925–1934. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(05\)67704-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(05)67704-5)
2. Grigorieva A. I. Chronic obliterating diseases of the arteries of the lower extremities. Modern polyclinic treatment. *Moskovskiy khirurgicheskii zhurnal = Moscow Surgical Journal*, 2022, special iss., pp. 43–51 (in Russian). <https://doi.org/10.17238/2072-3180-2022-43-51>
3. Skvortsov V. V., Sabanov A. V., Eremenko A. A. Modern aspects of diagnosis and treatment of obliterating atherosclerosis of the lower extremities. *Lechaschi Vrach = Attending doctor*, 2023, vol. 26, no. 6, pp. 55–60 (in Russian). <https://doi.org/10.51793/os.2023.26.6.008>
4. Bogdan V. G., Lepeshko S. G. Stimulation of angiogenesis in treatment of patients with chronic arterial insufficiency of the lower limbs. *Voennaya meditsina = Military medicine*, 2017, no. 2, pp. 117–119 (in Russian).
5. Kibbe M. R., Hirsch A. T., Mendelsohn F. O., Davies M. G., Pham H., Saucedo J., Marston W., Pyun W.-B., Min S.-K., Peterson B. G., Comerota A., Choi D., Ballard J., Bartow R. A., Losordo D. W., Sherman W., Driver V., Perin E. C. Safety and efficacy of plasmid DNA expressing two isoforms of hepatocyte growth factor in patients with critical limb ischemia. *Gene Therapy*, 2016, vol. 23, no. 3, pp. 306–312. <https://doi.org/10.1038/gt.2015.110>
6. Chervyakov Yu. V., Vlasenko O. N. Comparison of the effectiveness of gene therapy and standard conservative therapy for patients with chronic lower limb ischemia due to atherosclerosis. *Vestnik khirurgii imeni I. I. Grekova = Grekov's Bulletin of Surgery*, 2018, vol. 177, no. 2, pp. 64–69 (in Russian). <https://doi.org/10.24884/0042-4625-2018-177-2-64-69>
7. Kitrou P., Karnabatidis D., Brountzos E., Katsanos K., Reppas L., Spiliopoulos S. Gene-based therapies in patients with critical limb ischemia. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2017, vol. 17, no. 4, pp. 449–456. <https://doi.org/10.1080/14712598.2017.1289170>
8. Morishita R., Makino H., Aoki M., Hashiya N., Yamasaki K., Azuma J., Taniyama Y., Sawa Y., Kaneda Y., Ogihara T. Phase I/IIa clinical trial of therapeutic angiogenesis using hepatocyte growth factor gene transfer to treat critical limb ischemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2011, vol. 31, no. 3, pp. 713–720. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.110.219550>
9. Barć P., Antkiewicz M., Śliwa B., Frączkowska K., Guziński M., Dawiskiba T., Małodobra-Mazur M., Witkiewicz W., Kupczyńska D., Strzelec B., Janczak D., Skóra J. P. Double VEGF/HGF gene therapy in critical limb ischemia complicated by diabetes mellitus. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 2021, vol. 14, no. 3, pp. 409–415. <https://doi.org/10.1007/s12265-020-10066-9>
10. Giacca M., Zacchigna S. VEGF gene therapy: therapeutic angiogenesis in the clinic and beyond. *Gene Therapy*, 2012, vol. 19, no. 6, pp. 622–629. <https://doi.org/10.1038/gt.2012.17>
11. Mykhaylichenko V. Yu., Tsaturyan A. B., Khizriev S. M., Pilipchuk A. A., Letyuk D. V., Samarin S. A. Experience with therapeutic angiogenesis in patients with non-by passable lesion of arteries of lower extremities. *Tavrisheskii mediko-biologicheskii vestnik = Tauric Medical-biological Newsletter*, 2022, vol. 25, no. 2, pp. 55–60 (in Russian).
12. Randall L. O., Selitto J. J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie*, 1957, vol. 111, no. 4, pp. 409–419.

**Информация об авторах**

*Богдан Василий Генрихович* – д-р мед. наук, профессор, академик-секретарь. Отделение медицинских наук НАН Беларуси (пр-т Независимости, 66, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: medic@presidium.bas-net.by.

*Доронькина Анастасия Сергеевна* – науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: doronkina\_nastasya1995@mail.ru.

*Жаворонок Ирина Петровна* – канд. биол. наук, заведующий центром. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: iri8308@yandex.ru.

*Федорова Екатерина Викторовна* – науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: katerina.minsk@mail.ru.

*Филипович Татьяна Александровна* – ст. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: semionik88@mail.ru.

*Лепешко Станислав Геннадьевич* – мл. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: beetrostan@live.come.

*Маньковская Светлана Владимировна* – заместитель директора. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: mankovskaya\_svet@mail.ru.

**Information about the authors**

*Bogdan Vasilij G.* – D. Sc. (Medicine), Professor, Academician-Secretary. Department of Medical Sciences of the National Academy of Sciences of Belarus (66, Nezavisimosti Ave., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: medic@presidium.bas-net.by.

*Doronkina Anastasya S.* – Researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: doronkina\_nastasya1995@mail.ru.

*Zhavoronok Irina P.* – Ph. D. (Biology), Head of the Center. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: iri8308@yandex.ru.

*Fedorova Ekaterina V.* – Researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: katerina.minsk@mail.ru.

*Filipovich Tatsiana A.* – Senior Researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: semionik88@mail.ru.

*Lepeshko Stanislav G.* – Junior Researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: beetrostan@live.come.

*Mankovskaya Svetlana V.* – Deputy Director. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: mankovskaya\_svet@mail.ru.