

**ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПЕРВОЙ ОТЕЧЕСТВЕННОЙ
ГЕНОТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ КОНСТРУКЦИИ pcDNA_VEGF165 В
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ
КОНЕЧНОСТИ**

¹*Богдан В.Г.,* ²*Доронькина А.С.,* ²*Жаворонок И.П.,* ²*Федорова Е.В.,*
³*Янцевич А.В.,* ²*Филиппович Т.А.,* ²*Лепешко С.Г.,* ²*Маньковская С.В.*

¹*Отделение медицинских наук Национальной академии наук Беларуси,*

²*Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси»,*

³*Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси*

**EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF THE FIRST DOMESTIC
GENOTHERAPY CONSTRUCTION pcDNA_VEGF165 IN AN
EXPERIMENTAL MODEL OF CHRONIC LIMB ISCHEMIA**

¹*Bogdan V.G.,* ²*Doronkina A.S.,* ²*Zhavoronok I.P.,* ²*Fedorova E.V.,*

³*Yantsevich A.V.,* ²*Filippovich T.A.,* ²*Lepeshko S.G.,* ²*Mankovskaya S.V.*

¹*Department of Medical Sciences of the National Academy of Sciences of Belarus,*

²*Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus,*

³*Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus*

Введение. В настоящее время хроническая ишемия нижних конечностей является одной из самых распространенных патологий сердечно-сосудистой системы среди населения старше 50 лет. Несмотря на применение современных методов лекарственного, хирургического и эндоваскулярного лечения, высока доля случаев, когда условий для оперативной коррекции сосудистого статуса нет, а существующие лекарственные средства оказываются малоэффективны. 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 клеток.

Цель. Оценка эффективности применения отечественной генно-инженерной плазмидной конструкции pcDNA_VEGF165 в условиях моделированной хронической ишемии конечности у экспериментальных животных.

Материалы и методы. Исследование проведено на 90 половозрелых крысах Wistar возрастом 8 месяцев, содержащихся в условиях вивария ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси». Генотерапевтическая конструкция – плазида с геном, кодирующим белок VEGF165 (pcDNA_VEGF165), разработана и получена в ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси». Моделирование хронической недостаточности артериального кровоснабжения 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]. На 28-е сутки после моделирования патологии животных методом рандомизации распределили на 3 группы (по 30 крыс в каждой).

Животные первой группы (группа «Ишемия») не получали лекарственного лечения. Во второй группе в ишемизированную мышцу бедра осуществляли однократное введение физиологического раствора (группа «Ишемия + ФР»). В третьей группе в пораженную мышцу однократно вводили раствор pcDNA_VEGF165 в дозе 100 мкг (группа «Ишемия + VEGF165»). Общий период наблюдения составил 70 суток. Оценку ангиогенного эффекта проводили на основании морфометрического исследования скелетных мышц конечности. Исследование функции ишемизированных мышц задних конечностей выполняли путем измерения порога ноцицептивной реакции с помощью теста «Рандалла-Селитто» на аппарате PanLab (Испания) и паттернов походки, используя аппаратно-программный комплекс CatWalk XT версии 10.6 (Noldus, Голландия).

Результаты и обсуждение. До проведения терапии в ишемизированных мышцах бедра и голени во всех трех группах зафиксировано снижение более чем в 2 раза количества кровеносных сосудов по сравнению со здоровой конечностью, $p=0,001$. В группе «Ишемия» 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% ($p=0,001$). В мышцах голени – на 49,37%, на 14-е – на 54,18%, на 28-е – на 53,06%, на 42-е – на 41,06 % ($p=0,001$). При введении физиологического раствора у лабораторных животных 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 в группе «Ишемия + VEGF165» на 7-е и 14-е сутки после лечения показал, что введение раствора pcDNA_VEGF165 не приводило к значимым различиям по количеству сосудов, приходящихся на одно мышечное волокно, по сравнению с группами «Ишемия» и «Ишемия + ФР» ($p>0,05$). Вместе с тем введение раствора плазмиды лабораторным животным сопровождалось увеличением количества сосудов в ишемизированных мышцах бедра относительно группы «Ишемия» на 28-е сутки на 55,24% и на 42-е – на 71,03% ($p=0,001$). К 42-м суткам количество сосудов в мышечной ткани бедра оперированной конечности соответствовало значениям, характерным для здоровой конечности ($p=0,3$), что указывало на восстановление 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% ($p=0,001$). Однако показатели не достигали значений для аналогичных мышц здоровой конечности. Вместе с тем на 28-е и 42-е сутки наблюдения количество сосудов в ишемизированных мышцах голени достигло значений, полученных при исследовании мышц здоровой конечности с тенденцией к

увеличению на 0,75% и 9,57% ($p=0,021$) соответственно. Это подтверждало выраженный стимулирующий ангиогенный эффект генно-инженерной плазмидной конструкции.

Моделирование ишемии 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 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 42-м суткам после введения препарата отмечено дальнейшее статистически значимое увеличение ПНР у животных из группы, получивших генную терапию, хотя он не достиг значений до операции ($p=0,012$). У лабораторных животных с ишемией 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^2 ; $p=0,002$) относительно значений до операции. На 28-е сутки после введения генного препарата регистрировали увеличение значений площади отпечатка на 88,1 и 83,5 % относительно групп «Ишемия» ($p=0,023$) и «Ишемия + ФР» ($p=0,025$). На 42-е сутки в группе «Ишемия + VEGF165» площадь отпечатка оперированной конечности практически достигла значений до операции (1,1 [0,9; 1,4] и 1,6 [1,4; 1,8] см^2 соответственно; $p=0,046$).

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 однократное 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.

3. Доказано, что введение крысам с мышечной ишемией раствора плазмидной ДНК VEGF165 в дозе 100 мкг приводит к протекторному плейотропному антиноцицептивному эффекту на 28-е и 42-е сутки после терапии с достоверным повышением значений порога ноцицептивной реакции, площади отпечатка оперированной конечности.

4. Разработанная в Национальной академии наук Беларуси плазмида с геном, кодирующим белок VEGF165, потенциально может быть основой для создания первых в Республике Беларусь генотерапевтических лекарственных средств для лечения хронической артериальной недостаточности.