



<https://doi.org/10.34883/PI.2025.14.3.006>



Богдан В.Г.¹✉, Фёдорова Е.В.², Филипович Т.А.², Жаворонок И.П.², Доронькина А.С.²,
Лепешко С.Г.², Маньковская С.В.²

¹ Национальная академия наук Беларуси, Минск, Беларусь

² Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

Индукцированный ангиогенез при локальном использовании плазмидных конструкций VEGF165 и Ang-1 в условиях экспериментальной хронической ишемии нижних конечностей

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Богдан В.Г. – концепция и дизайн исследования, участие в проведении исследования, анализе материалов и результатов, корректировка содержания статьи; Фёдорова Е.В., Филипович Т.А., Жаворонок И.П., Доронькина А.С., Лепешко С.Г., Маньковская С.В. – участие в проведении исследования, сборе, анализе материалов и результатов, подготовке статьи.

Финансирование: работа выполнялась в рамках задания отдельного проекта фундаментальных и прикладных научных исследований № 20230877 «Изучение безопасности и ангиогенной активности генно-инженерных плазмидных конструкций в условиях моделирования ишемии нижних конечностей в экспериментах in vivo».

Этическое заявление: работа выполнялась в соответствии с этическими нормами, одобрена комитетом по биоэтике Института физиологии Национальной академии наук Беларуси (протокол № 1 от 24 января 2024 г.).

Подана: 20.04.2025

Принята: 15.08.2025

Контакты: bogdan-5@mail.ru

Резюме

Цель. Сравнительный анализ динамики плотности кровеносных сосудов в скелетных мышцах задней конечности после локального применения плазмидных конструкций pcDNA_VEGF165 и pcDNA_Ang-1 в эксперименте.

Материалы и методы. Экспериментальные исследования были проведены на 96 белых половозрелых крысах Wistar обоего пола (48 самок, 48 самцов) возрастом 8 месяцев. Моделирование хронической недостаточности артериального кровоснабжения конечности у лабораторного животного выполняли по разработанному способу. Животные первой (n=16) группы не получали специального лекарственного лечения. Во второй (n=16) группе в ишемизированную мышцу бедра осуществляли введение физиологического раствора. В третьей (n=32) и четвертой (n=32) группах соответственно в пораженную мышцу однократно внутримышечно вводили 100 мкг раствора pcDNA_VEGF165 и pcDNA_Ang-1. Для гистологического исследования проводили забор мягких тканей зоны инъекции задней конечности крыс до введения растворов и на 7, 14, 28 и 42-е сутки после проведенного лечения. В образцах оценивали количество капилляров и артериол, используя антитела к CD31 и α-SMA.

Результаты. В отличие от pcDNA_Ang-1 применение плазмидной конструкции pcDNA_VEGF165 в условиях моделированной хронической ишемии конечности у экспериментальных животных вне зависимости от пола сопровождается выраженным ангио- и артериогенезом, начиная с 28-х суток лечения. К 42-м суткам эксперимента установлена максимально высокая плотность как CD31-позитивных капилляров, так и α-SMA-позитивных артериол в мышцах задней конечности крыс после

моделирования патологии, значения которой не имели статистически значимых отличий от показателей здоровой конечности.

Заключение. Локальное введение плазмидной конструкции pcDNA_VEGF165 в ишемизированные мышцы задней конечности крыс формирует условия для развития эффективного индуцированного ангиогенеза с уменьшением атрофических и фибротических изменений в мышечной ткани по сравнению с инъекцией pcDNA_Ang-1.

Ключевые слова: хроническая недостаточность артериального кровоснабжения конечности, эксперимент, ангиогенез, плазмидная конструкция, кровеносные сосуды

Bogdan V.¹✉, Fiodorova E.², Filipovich T.², Zhavoronok I.², Doronkina A.², Lepeshko S.², Mankovskaya S.²

¹ National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

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

Induced Angiogenesis in Local Use of Plasmid Constructs of VEGF165 and Ang-1 in Experimental Chronic Lower Limb Ischemia

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Bogdan V. – study concept and design, participating in the research, materials and results analysis, editing; Fiodorova E., Filipovich T., Zhavoronok I., materials and results Doronkina A., Lepeshko S., Mankovskaya S. – participating in the research, materials collection, materials and results analysis, text writing.

Funding: the work was carried out within the framework of the task of a separate project of fundamental and applied scientific research No. 20230877 "Studying the safety and angiogenic activity of genetically engineered plasmid structures in conditions of modeling lower limb ischemia in in vivo experiments".

Ethics statement: the work was carried out in accordance with ethical standards, approved by the Bioethics Committee of the Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (Protocol No. 1 dated January 24, 2024).

Submitted: 20.04.2025

Accepted: 15.08.2025

Contacts: bogdan-5@mail.ru

Abstract

Purpose. To perform a comparative analysis of changes in blood vessel density in skeletal muscles of the hind limb after local application of plasmid constructs of pcDNA_VEGF165 and pcDNA_Ang-1 in an experiment.

Materials and methods. Experimental studies were conducted on 96 white mature Wistar rats of both sexes (48 females, 48 males) aged 8 months. Modeling of chronic insufficiency of arterial blood supply to a limb in a laboratory animal was performed according to the method elaborated. Animals of the first (n=16) group did not receive any special drug treatment. In the second (n=16) group, saline solution was injected into the ischemic thigh muscle. In the third (n=32) and fourth (n=32) groups, respectively, the pcDNA_VEGF165 and pcDNA_Ang-1 solutions were injected intramuscularly into the affected muscle at a dose of 100 µg. For histological tests, the soft tissues of the injection zone of the hind limb of rats were sampled before the administration of solutions and on days 7, 14, 28 and 42 after the treatment. The number of capillaries and arterioles were assessed in the samples using antibodies to CD31 and α-SMA.



Results. In contrast to pcDNA_Ang-1, the use of the plasmid construct pcDNA_VEGF165 under conditions of simulated chronic limb ischemia in experimental animals, regardless of gender, was accompanied by pronounced angio- and arteriogenesis, starting from the 28th day of treatment. By the 42nd day of the experiment, the highest density of both CD31-positive capillaries and α -SMA-positive arterioles in the muscles of the hind limb of rats was established after modeling the pathology, the values of which did not have statistically significant differences from healthy limb indicators.

Conclusion. The local administration of the plasmid construct pcDNA_VEGF165 into ischemic hindlimb muscles of rats creates conditions for effective induced angiogenesis with a decrease in atrophic and fibrotic changes in muscle tissue compared to the injection of pcDNA_Ang-1.

Keywords: chronic insufficiency of arterial blood supply to the limb, experiment, angiogenesis, ischemia, blood vessels

■ ВВЕДЕНИЕ

Хроническая ишемия нижних конечностей занимает одно из первых мест в структуре сердечно-сосудистых заболеваний. Распространенность этой патологии среди населения старше 50 лет составляет 5–8%, а при наличии таких факторов риска, как гиперлипидемия, курение, артериальная гипертензия или сахарный диабет, достигает 30% [1, 2]. Хирургическое лечение является основным методом помощи данной категории пациентов, однако, к сожалению, радикальные реваскуляризирующие операции у части из них не могут быть выполнены по причине наличия тяжелой сопутствующей патологии либо ввиду отсутствия необходимых анатомических условий для ее реализации.

В последние годы наиболее перспективным подходом к решению этой проблемы считается принцип реализации терапевтического ангиогенеза и, в частности, генная терапия с использованием искусственных ангиогенных факторов роста. Механизм их действия основан на доставке внутрь ядра клетки генов, кодирующих факторы роста и обладающих ангиогенной активностью, с целью увеличения их локальной экспрессии в количестве, необходимом для индукции роста и формирования капилляров микроциркуляторного русла. Это позволяет восстановить перфузию ишемизированных тканей и приостановить прогрессирование ишемии. В настоящее время в мире проводится ряд экспериментальных и клинических исследований различных ДНК-препаратов, применяемых при ишемии нижних конечностей [3–6].

На базе ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси» разработаны две генно-инженерные конструкции на основе кольцевой ДНК: pcDNA_VEGF165 и pcDNA_Ang-1. Первая из них кодирует эндотелиальный фактор роста сосудов (от англ. Vascular endothelial growth factor; VEGF). Механизм ангиогенного эффекта данного протеина обусловлен его способностью селективно стимулировать миграцию и пролиферацию эндотелиальных клеток, экспрессию в них активаторов плазминогена, увеличивать сосудистую проницаемость [7]. Вторая плазмидная конструкция кодирует ангиопоэтин-1 (от англ. Angiopoietin-1; Ang-1), который регулирует созревание и стабильность сосудов, связываясь с тирозинкиназными рецепторами на их поверхности [8].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнительный анализ динамики плотности кровеносных сосудов в скелетных мышцах задней конечности после локального применения плазмидных конструкций pcDNA_VEGF165 и pcDNA_Ang-1 в эксперименте.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на 96 половозрелых крысах линии Wistar возрастом 8 мес., содержащихся в условиях вивария ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси» при температуре $22,0 \pm 1,0$ °C, 12/12 ч. цикле ночь/день, со свободным доступом к воде и пище. Протокол эксперимента (№ 1 от 24.01.2024) одобрен комитетом по биоэтике Института физиологии НАН Беларуси.

Генно-инженерные конструкции на основе кольцевой ДНК (pcDNA_VEGF165 и pcDNA_Ang-1) переданы в ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси» в виде стерильного раствора для инъекций.

Создание экспериментальной модели хронической недостаточности артериального кровоснабжения (ишемии) правой задней конечности у крыс выполняли по разработанному нами способу (Патент Республики Беларусь на изобретение № 24578) [9]. На 28-е сутки после моделирования патологии животных методом рандомизации распределили на четыре группы: «ХИНК» (без лечения; 16 особей), «ХИНК + АФР» (введение апиогенного физиологического раствора, 200 мкл; 16 особей), экспериментальная «ХИНК + VEGF165» (введение pcDNA_VEGF165 в дозе 100 мкг/жив; 32 особи), экспериментальная «ХИНК + Ang-1» (введение pcDNA_Ang-1 в дозе 100 мкг/жив; 32 особи). Введение генотерапевтической субстанции осуществляли однократно внутримышечно в правую заднюю лапу животного.

Для гистологического исследования проводили забор мягких тканей зоны инъекции правой задней конечности крыс до введения растворов и на 7, 14, 28 и 42-е сутки после проведенного лечения (28, 35, 42, 56 и 70-е сутки соответственно после оперативного вмешательства по моделированию ишемии) и левой задней конечности (здоровой, неоперированной) в эти же сроки. Общий период наблюдения составил 70 сут.

Фрагменты тканей фиксировали в 10%-м нейтральном забуференном растворе формалина в течение не менее 24 ч. Далее осуществляли гистологическую проводку 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 обезвоживания в растворах этилового спирта возрастающей концентрации гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике. Для оценки изменений в соединительной ткани применяли окраску азаном по Гейденгайну (БиоВитрум, РФ).

Парафиновые срезы подвергали иммуногистохимическому (ИГХ) окрашиванию. Эндогенную пероксидазную активность блокировали с помощью Peroxide Block (3%-ная перекись водорода) в течение 10 мин., затем проводили демаскировку антигенов в цитратном буферном растворе pH 6,0 (PS007, PathnSitu Biotechnologies, США) на водяной бане при 96 °C в течение 20 мин. В качестве первичных антител использовали моноклональные антитела к клеткам эндотелия кровеносных сосудов CD31 (Z2725RS, Zeta Corporation, США) в рабочем разведении 1 : 100, к гладкомышечному



α -актину (α -SMA) (Z2066MS, Zeta Corporation, США) в рабочем разведении 1 : 200. Инкубацию с первичными антителами проводили на протяжении 18 часов при $t=4^\circ\text{C}$ во влажной камере. Для визуализации ИГХ-реакции была выбрана система детекции с использованием набора 2-step plus Poly-HRP Anti Rabbit IgG Detection System (E-IR-R217, Elabscience, Китай). В роли хромогена выступал 1%-ный раствор 3,3'-диаминобензидина тетрагидрохлорида. Клеточные ядра докрашивали гематоксилином Гарриса в течение 1 минуты. Препараты заключали в монтирующую среду Glasseal («Лабико», РФ).

Исследование микропрепаратов и изготовление микрофотографий проводили на световом микроскопе Optec BK 5000 (КНР), оснащенном цифровой камерой, а также на гистологическом сканере MoticEasyScan One N FS-Live (КНР). В образцах оценивали плотность CD31-позитивных капилляров и α -SMA-позитивных артериол (количество сосудов в 1 мм^2) в максимально возможном количестве неперекрывающихся полей зрения при увеличении $\times 200$, площадь которого составила $0,31\text{ мм}^2$. Количественный показатель выражали в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение ($M \pm Sd$). Статистическую обработку результатов исследования выполняли с использованием программы Statistica 10.0. Различия считались статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После моделирования хронической ишемии нижних конечностей у лабораторных крыс и до проведения терапии (на 28-е сутки после выполнения оперативного вмешательства) в скелетных мышцах задних конечностей животных во всех четырех опытных группах выявлены ишемические и атрофические изменения мышечных волокон, пролиферация клеток эндо- и перимизия наряду со структурной перестройкой капиллярного русла и редукцией кровеносных сосудов.

К 28-м суткам после терапии / 56-м после операции в скелетных мышцах лабораторных животных группы «ХИНК» прогрессировали ишемические изменения миоцитов, появлялись очаги регенерации миобластов и признаки гиперплазии соединительной ткани (рис. 1b, f). Указанные морфологические признаки сохранялись до 70 суток наблюдения.

При введении апирогенного физиологического раствора на протяжении всего эксперимента отмечена морфологическая картина структурной перестройки скелетных мышц и капиллярного русла задних конечностей животных, аналогичная группе «ХИНК».

Введение раствора плазмидной конструкции, содержащей VEGF165, лабораторным крысам с хронической ишемией на 28-е сутки после терапии приводило к уменьшению очагов некроза и очаговой пролиферации микрососудов в мышцах бедра; на 56-е – усиленному новообразованию сосудов микроциркуляторного русла, ослаблению ишемических и фибротических изменений мышечной ткани, регенерации миобластов (рис. 1c, g).

Локальная инъекция раствора pcDNA_Ang-1 крысам с моделью хронического ишемического повреждения задней конечности к 28-м суткам наблюдений незначительно снижала прогрессирование фиброза, однако не нивелировала ишемические и атрофические изменения мышечных волокон. К 70-м суткам мониторинга сохранялось прогрессирование патологических изменений мышечной ткани.

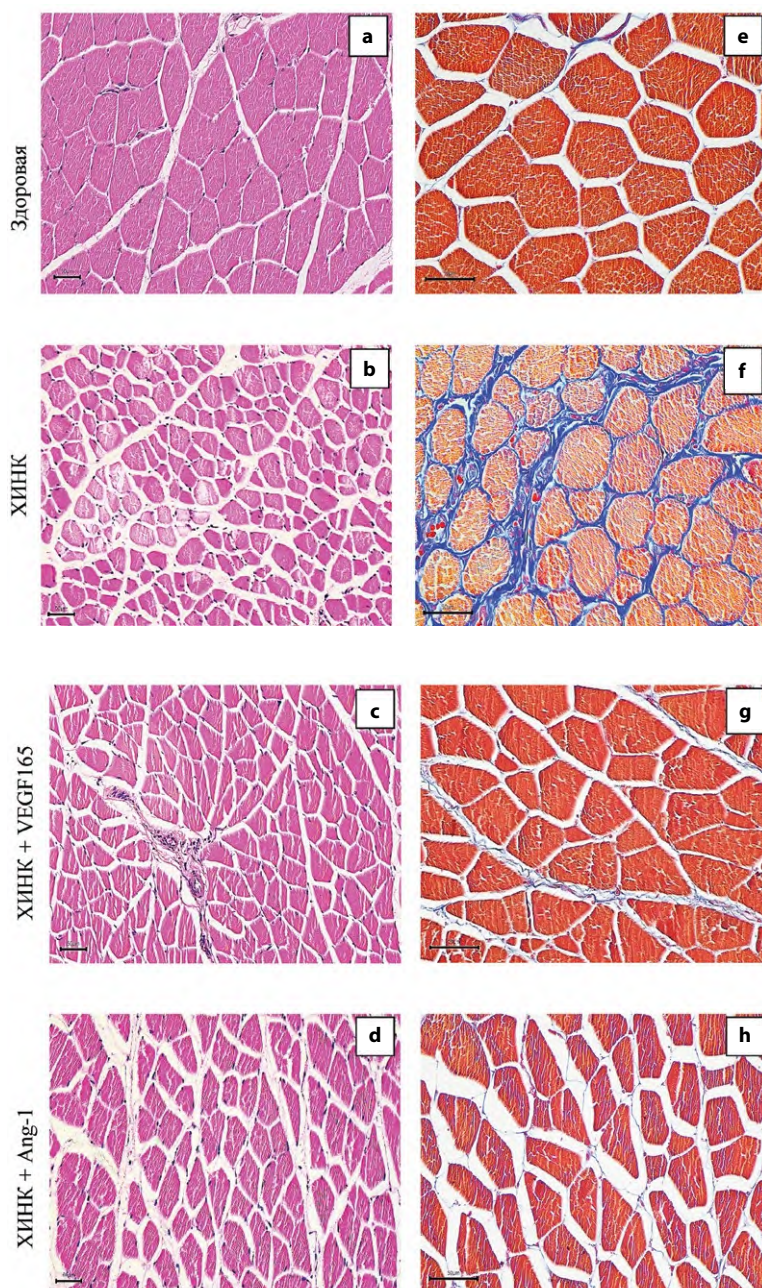


Рис. 1. Морфологическая структура скелетных мышц задних конечностей крыс на 56-е сутки эксперимента (28-е сутки после терапии): а-д – окраска гематоксилином и эозином, е-г – окраска азаном по Гейденгайну, шкала – 50 мкм

Fig. 1. Morphological structure of the skeletal muscles of the hind limbs of rats on the 56th day of the experiment (28th day after therapy): а-d – hematoxylin and eosin staining, е-г – Heidenhain's azan trichrome staining, scale – 50 μ m



Применение селективной окраски эндотелиальных клеток при ИГХ-реакции с антителами к CD31 после моделирования хронической ишемии нижних конечностей у крыс зафиксировало снижение капиллярной плотности ($p=0,001$ для всех групп) по отношению к значениям здоровой конечности в мышцах бедра на 7-е сутки эксперимента на 32,33%, на 14-е – на 18,47%, на 28-е – на 15,98%, на 42-е – на 12,56%, в мышцах голени: на 7-е сутки – на 45,82%, на 14-е – на 32,64%, на 28-е – на 13,97%, на 42-е – на 10,61% ($p=0,001$ для всех групп) (табл. 1, рис. 2).

При введении апириногенного физиологического раствора лабораторным животным на всех сроках эксперимента отмечено снижение капиллярной плотности в скелетных мышцах бедра и голени оперированной конечности по отношению к значениям в мышцах здоровых животных, которое статистически не отличалось от сравниваемых показателей в группе «ХИНК» ($p>0,05$).

Введение в ишемизированную заднюю конечность лабораторным крысам раствора плазмидной конструкции с участком гена VEGF165 на 7-е (35-е после операции) и 14-е (42-е после операции) сутки не приводило к статистически значимым различиям в плотности кровеносных сосудов по сравнению с группами «ХИНК» и «ХИНК + АФР» ($p>0,05$). А к 28-м суткам (56-е после операции) наблюдался выраженный рост плотности CD31-позитивных капилляров в ишемизированной мышечной ткани грызунов как в бедре (на 10,53%, $p=0,001$), так и в голени (на 7,32%, $p=0,001$) по сравнению с данными в группах «ХИНК» и «ХИНК + АФР». В то же время по отношению к показателям в мышцах до операции капиллярная плотность оставалась сниженной на 7-е, 14-е и 28-е сутки эксперимента ($p=0,001$ для всех групп). К 42-м суткам наблюдения (70-е сутки после операции) лечение хронической недостаточности артериального кровоснабжения конечности путем внутримышечного введения раствора модифицированной плазмиды pcDNA_VEGF165 сопровождалось значительным увеличением плотности кровеносных микрососудов в оперированной конечности (бедро – на 10,02%, голень – на 8,11%) лабораторных крыс по отношению к группам «ХИНК» и «ХИНК + АФР» и не имело статистически значимых отличий ($p>0,05$) относительно здоровой конечности (табл. 1, рис. 2).

Таблица 1

Плотность CD31-позитивных капилляров (в 1 мм²) в скелетных мышцах задних конечностей крыс, M±Sd

Table 1

Density of CD31-positive capillaries (per 1 mm²) in skeletal muscles of hind limbs of rats, M±Sd

Задняя конечность		Сроки после лечения			
		7-е сутки	14-е сутки	28-е сутки	42-е сутки
Здоровая	бедро	998,45±94,49	998,45±94,49	998,45±94,49	998,45±94,49
	голень	849,23±51,05	849,23±51,05	849,23±51,05	849,23±51,05
ХИНК	бедро	675,65±83,42*	814,00±138,71*	838,87±177,34*	873,06±83,50*
	голень	460,11±88,20*	572,03±63,87*	730,58±93,27*	759,07±89,40*
ХИНК + АФР	бедро	647,67±62,52*	750,27±140,38*	823,32±132,91*	883,95±101,12*
	голень	473,58±68,34*	582,39±60,59*	699,49±92,50*	775,14±83,81*
ХИНК + VEGF165	бедро	722,29±238,63*	864,26±122,18*	944,05±72,63**^	973,07±109,37^
	голень	503,11±67,27*	622,29±139,09*	792,75±103,30**^	827,99±118,61*^
ХИНК + Ang-1	бедро	684,98±81,27*	772,03±103,59*	845,60±105,10*	884,98±89,74*
	голень	493,27±61,70*	567,88±105,82*	700,52±58,67*	765,29±90,06*

Примечания: * $p<0,05$ относительно здоровой конечности; * $p<0,05$ относительно группы «ХИНК»; ^ $p<0,05$ относительно группы «ХИНК + АФР».

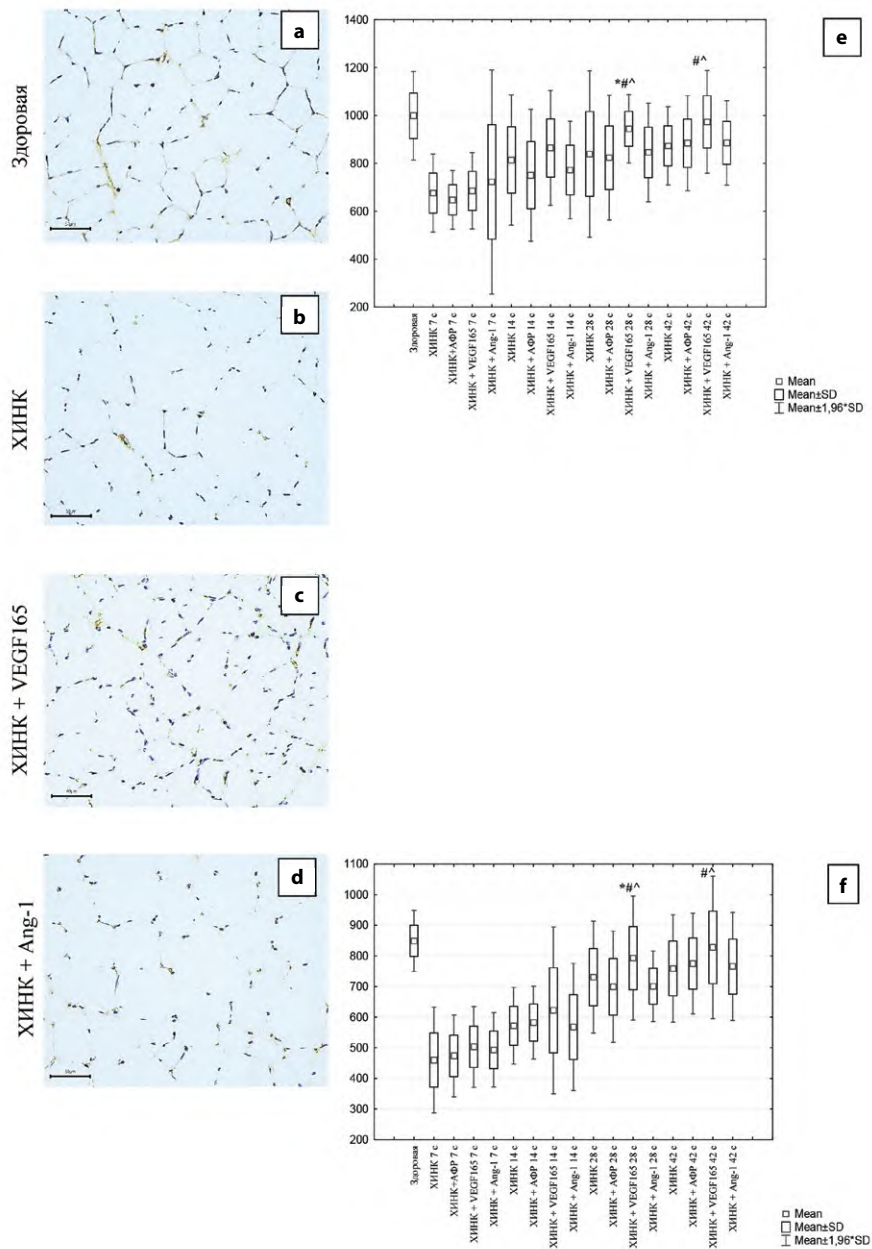


Рис. 2. Капиллярная плотность в скелетных мышцах задних конечностей крыс:
a–d – иммуногистохимическая реакция с антителами к CD31, шкала – 50 мкм; e (бедро), f (голень) – морфометрические данные; * p<0,05 относительно здоровой конечности; # p<0,05 относительно группы «ХИНК»; ^ p<0,05 относительно группы «ХИНК + АФР»
Fig. 2. Capillary density in rat hind limb skeletal muscle:
a–d – immunohistochemical reaction with antibodies to CD31, scale – 50 μm; e (thigh), f (lower leg) – morphometric data; * p<0.05 compared to the values of the healthy limb; # p<0.05 compared to the values of the "Ischemia" group; ^ p<0.05 compared to the values of the "Ischemia + PSS" group



После инъекции раствора pcDNA_Ang-1 в дозе 100 мкг/жив в заднюю конечность крыс с хронической ишемией мышечной ткани не выявлено статистически значимых различий среди плотности CD-31 позитивных микрососудов в бедре и голени на 7, 14, 28, 42-е сутки эксперимента по сравнению с группами «ХИНК» и «ХИНК + АФР» ($p>0,05$) и анализируемая плотность достоверно была ниже по отношению к значениям здоровой конечности животных ($p=0,001$) (табл. 1, рис. 2).

Применение ИГХ-реакции с антителами к гладкомышечному альфа-актину за счет селективной окраски гладкомышечных клеток в составе стенки сосудов показало статистически значимое ($p=0,00$) уменьшение плотности α -SMA-позитивных артериол в скелетных мышцах лабораторных крыс в группе «ХИНК» на протяжении всего эксперимента относительно значений здоровых животных (табл. 2, рис. 3).

Введение физиологического раствора лабораторным животным на всех сроках мониторинга сопровождалось снижением плотности α -SMA-позитивных артериол в мышечной ткани бедра и голени оперированной конечности по отношению к значениям до операции ($p=0,00$), которое статистически не отличалось от полученных значений при моделировании патологического процесса ($p>0,05$) (табл. 2, рис. 3).

На 7-е сутки наблюдений плотность артериол в скелетных мышцах бедра и голени задней конечности крыс всех групп исследования статистически значимо оставалась сниженной в 1,5–2 раза ($p=0,001$) относительно показателей здоровой конечности. Так, плотность α -SMA-позитивных артериол в мышечной ткани бедра крыс в группах составила: «ХИНК» – 41,80%, «ХИНК + АФР» – 42,44%, «ХИНК + VEGF165» – 41,16%, «ХИНК + Ang-1» – 42,12%. Подобная тенденция наблюдалась и в мышцах голени лабораторных животных, где положительная реакция на маркер α -гладкомышечного актина в сосудах микроциркуляторного русла в аналогичных группах сравнения составила: «ХИНК» – 67,79%, «ХИНК + АФР» – 61,66%, «ХИНК + VEGF165» – 69,02%, «ХИНК + Ang-1» – 68,41% (табл. 2, рис. 3).

Таблица 2

Плотность α -SMA-позитивных артериол (в 1 мм²) в скелетных мышцах задних конечностей крыс, $M \pm Sd$

Table 2

Density of α -SMA-positive arterioles (per 1 mm²) in rat hind limb skeletal muscle, $M \pm Sd$

Задняя конечность		Сроки после лечения			
		7-е сутки	14-е сутки	28-е сутки	42-е сутки
Здоровая	бедро	24,29 $\pm$ 3,34	24,29 $\pm$ 3,34	24,29 $\pm$ 3,34	24,29 $\pm$ 3,34
	голень	16,81 $\pm$ 5,18	16,81 $\pm$ 5,18	16,81 $\pm$ 5,18	16,81 $\pm$ 5,18
ХИНК (контроль)	бедро	15,16 $\pm$ 2,32*	16,66 $\pm$ 1,86*	17,22 $\pm$ 2,49*	17,38 $\pm$ 2,40*
	голень	11,40 $\pm$ 3,24*	11,76 $\pm$ 2,33*	12,74 $\pm$ 3,19*	13,20 $\pm$ 2,99*
ХИНК + АФР	бедро	15,63 $\pm$ 2,05*	17,02 $\pm$ 2,85*	17,43 $\pm$ 2,62*	17,48 $\pm$ 2,43*
	голень	10,37 $\pm$ 2,11*	12,02 $\pm$ 4,29*	12,63 $\pm$ 4,01*	13,41 $\pm$ 1,60*
ХИНК + VEGF165	бедро	15,52 $\pm$ 2,32*	16,76 $\pm$ 2,57*	18,98$\pm$3,26**$\wedge$	22,95$\pm$3,05**$\wedge$
	голень	11,60 $\pm$ 2,88*	12,22 $\pm$ 3,53*	14,90$\pm$1,34**$\wedge$	16,09$\pm$3,20**$\wedge$
ХИНК + Ang-1	бедро	15,37 $\pm$ 1,88*	16,50 $\pm$ 2,63*	17,28 $\pm$ 2,16*	17,48 $\pm$ 2,26*
	голень	11,50 $\pm$ 5,16*	11,91 $\pm$ 2,56*	13,36 $\pm$ 4,38*	13,41 $\pm$ 2,37*

Примечания: * $p<0,05$ относительно здоровой конечности; * $p<0,05$ относительно группы «ХИНК»; $\wedge$ $p<0,05$ относительно группы «ХИНК + АФР».

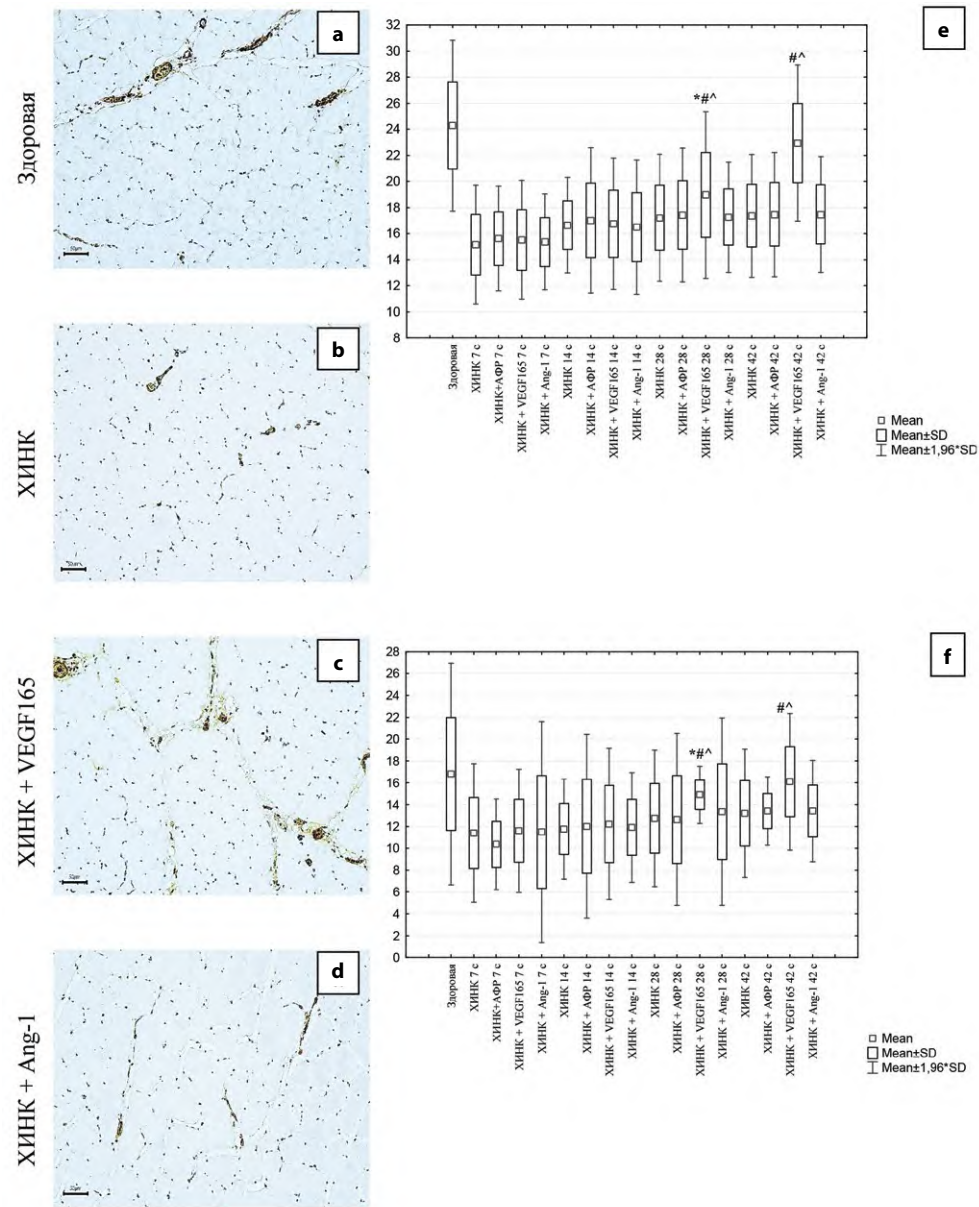


Рис. 3. Плотность артериол в скелетных мышцах задних конечностей крыс:
а–d – иммуногистохимическая реакция с антителами к α -SMA, шкала – 50 мкм; е (бедро), ф (голень) – морфометрические данные; * $p < 0,05$ относительно здоровой конечности; # $p < 0,05$ относительно группы «ХИНК»; ^ $p < 0,05$ относительно группы «ХИНК + АФР»
Fig. 3. Arteriolar density in rat hind limb skeletal muscle: а–d – immunohistochemical reaction with antibodies to α -SMA, scale – 50 μ m; е (thigh), ф (lower leg) – morphometric data; * $p < 0,05$ compared to the values of the healthy limb; # $p < 0,05$ compared to the values of the "Ischemia" group; ^ $p < 0,05$ compared to the values of the "Ischemia + PSS" group



На 14-е сутки эксперимента плотность α -SMA-позитивных артериол по-прежнему статистически значимо оставалась сниженной ($p=0,001$) для всех групп исследования по отношению к показателям здоровой группы животных (табл. 2, рис. 3).

С 28-х суток наблюдения плотность α -SMA-позитивных артериол в мышцах бедра начинала увеличиваться в группе «ХИНК + VEGF165» по отношению к значениям в группах «ХИНК» и «ХИНК + АФР». Так, в скелетных мышцах бедра после введения исследуемой субстанции pcDNA_VEGF165 плотность сосудов возросла с $17,22 \pm 2,49$ до $18,98 \pm 3,26$ на 1 мм^2 (7,22%, $p=0,00$); в мышцах голени – с $12,74 \pm 3,19$ до $14,90 \pm 1,34$ на 1 мм^2 (12,88%, $p=0,00$). При этом рост α -SMA-позитивных артериол в экспериментальных группах не достигал значений здоровой конечности и был достоверно снижен ($p=0,001$ для всех групп) (табл. 2, рис. 3).

К 42-м суткам после введения модифицированной плазмиды pcDNA_VEGF165 у лабораторных животных отмечалась высокая плотность артериол в скелетных мышцах бедра и голени задней конечности, значения которой статистически значимо не отличались от показателей здоровых грызунов и значительно превышали показатели оперированной конечности в группах «ХИНК» и «ХИНК + АФР» (табл. 2, рис. 3).

После введения раствора pcDNA_Ang-1 у крыс не выявлено статистически значимых различий среди плотности артериол в мышечной ткани бедра и голени как на 7-е, так и на 14-е, 28-е, 42-е сутки эксперимента, по сравнению с группами «ХИНК» и «ХИНК + АФР» ($p>0,05$), и значения плотности сосудов достоверно были ниже относительно значений здоровых животных ($p=0,001$) (табл. 2, рис. 3).

■ ВЫВОДЫ

1. Локальное введение плазмидной конструкции pcDNA_VEGF165 в ишемизированные мышцы задней конечности крыс способствует более эффективному восстановлению кровотока, уменьшению атрофических и фибротических изменений в мышечной ткани по сравнению с инъекцией раствора плазмидной ДНК pcDNA_Ang-1.
2. Применение генно-инженерной плазмидной конструкции pcDNA_VEGF165 в условиях моделирования ишемии мышц конечности оказывает выраженный ангио- и артериогенез начиная с 28-х суток после лечения. К 42-м суткам эксперимента установлена максимально высокая плотность как CD31-позитивных капилляров, так и α -SMA-позитивных артериол в мышцах задней конечности крыс после моделирования патологии, значения которых не имели статистически значимых отличий от показателей здоровой конечности.
3. Инъекция раствора плазмидной ДНК pcDNA_Ang-1 в дозе 100 мкг/жив крысам с моделью хронической ишемии задней конечности во всех сроках наблюдений не приводила к статистически значимому росту плотности сосудов микроциркуляторного русла в ишемизированных мышцах бедра и голени крыс обоего пола.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Gavrilenko A., Voronov D., Bochkov N. Complex therapy of patients with chronic lower limb ischemia by angiogenesis gene inducitors: immediate and long-term results. *Cell Transplantation and Tissue Engineering*. 2011;6(3):84–88. (in Russian)
2. Bogdan V., Lepeshko S. Stimulation of angiogenesis in treatment of patients with chronic arterial insufficiency of the lower limbs. *Military medicine*. 2017;2:117–19. (in Russian)

3. 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 Ther.* 2016;23(3):306–12. doi: 10.1038/gt.2015.110
4. Chervyakov Yu., Vlasenko O. Comparison of the effectiveness of gene therapy and standard conservative therapy for patients with chronic lower limb ischemia due to atherosclerosis. *Grekov's Bulletin of Surgery.* 2018;177(2):64–69. (in Russian)
5. 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;17(4):449–456. doi: 10.1080/14712598.2017.1289170
6. Bogdan V., Doronkina A., Zhavoronok I., Lepeshko S., Mankovskaya S., Yantsevich A. Antinociceptive Effectiveness of Use of the Combined VEGF165-ANG-1 Plasmid Construction in Animals with Experimental Hind Limb Ischemia. *Surgery Eastern Europe.* 2024;13(3):363–371. (in Russian)
7. Giacca M., Zacchigna S. VEGF gene therapy: therapeutic angiogenesis in the clinic and beyond. *Gene Therapy.* 2012;9(6):622–629. doi: 10.1038/gt.2012.17
8. Li G., Gao J., Ding P., Gao Y. The role of endothelial cell-pericyte interactions in vascularization and diseases. *J. Adv. Res.* 2025;67:269–288. doi: 10.1016/j.jare.2024.01.016
9. Bogdan V., Doronkina A., Zhavoronok I., Fedorova E., Filippovich T., Lepeshko S., Mankovskaya S. Pathogenetic Model of Chronic Arterial Insufficiency of Blood Supply to a Limb in an Experiment. *Surgery Eastern Europe.* 2024;13(1):38–48. (in Russian)