

В. Г. БОГДАН¹, Е. В. ФЁДОРОВА², Т. А. ФИЛИПОВИЧ²,
И. П. ЖАВОРОНОК², А. С. ДОРОНЬКИНА², С. Г. ЛЕПЕШКО², С. В. МАНЬКОВСКАЯ²

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ КЛЕТОЧНОГО ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА ПРИ ЛОКАЛЬНОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПЛАЗМИДНОЙ КОНСТРУКЦИИ VEGF165 / ANG-1 В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

¹Отделение медицинских наук Национальной академии наук Беларуси,
г. Минск, Республика Беларусь

²Государственное научное учреждение «Институт физиологии Национальной академии
наук Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь

Применение генно-инженерной плазмидной конструкции pcDNA_VEGF165/Ang-1 в дозе 100 мкг/жив в модели хронической ишемии нижних конечностей у крыс приводит к выраженной активизации ферментов энергетического обмена, статистически значимому повышению активности сукцинат- и лактатдегидрогеназы в клетках ишемизированной мышечной ткани лабораторных животных на 14-е сутки после терапии с последующей активацией процессов в цикле Кребса и гликолитическом пути к 42-ым суткам наблюдений. Таким образом, разработанная генно-инженерная плазмидная конструкция pcDNA_VEGF165/Ang-1 оказывает выраженное и пролонгированное цитопротективное действие.

Ключевые слова: хроническая ишемия нижних конечностей, генная терапия, фактор роста эндотелия сосудов, ангиопоэтин-1, эксперимент, крысы, гистохимический анализ.

Введение. Хроническая ишемия нижних конечностей (ХИНК) является распространенным патологическим состоянием с нарушением кровоснабжения в артериях нижних конечностей, которое снижает функциональную способность и качество жизни пациентов. Несмотря на относительно эффективные и доступные методы лечения хроническая недостаточность артериального кровоснабжения остается серьезной проблемой здравоохранения, связанной со значительной заболеваемостью и смертностью [1].

В настоящее время терапевтический ангиогенез является одной из стратегий в лечении ишемических заболеваний и направлен на стимуляцию роста и ремоделирование кровеносных сосудов. В современных условиях формирование новых функциональных сосудов достигается с помощью введения рекомбинантных ангиогенных факторов, их генов или прогениторных клеток, способных продуцировать ангиогенные факторы и факторы роста или дифференцироваться в клетки сосудов [2, 3]. Для терапевтического ангиогенеза применяются такие факторы роста как VEGF, bFGF, HGF, PDGF, ANG-1 и IGF-1 [2]. Сосудисто-эндотелиальный фактор роста (VEGF) является ключевым регулятором в физиологическом и патологическом ангиогенезе, стимулирующим образование и рост сосудов из ранее существовавших дифференцированных эндотелиальных клеток сосудистой сети [4]. Формирование новых функциональных кровеносных сосудов начинается путем миграции и пролиферации эндотелиальных клеток или их предшественников. В развитии эндотелиальных клеток важную роль играет и экспрессируемый муральными клетками ангиопоэтин-1 (Ang-1), который регулирует созревание и стабильность сосудов, связываясь с тирозинкиназными рецепторами на их поверхности. [5, 6].

При хронической недостаточности артериального кровоснабжения происходит ослабление кровотока, ухудшение кровообращения в сосудах микроциркуляторного русла, снижение доставки кислорода тканям, что вызывает тканевую гипоксию и нарушение тканевого обмена. В условиях возникшей гипоксии происходит переключение с аэробного на анаэробный путь синтеза АТФ, который является основным источником энергии в организме человека. [7]. Помимо дефицита кислорода и/или субстратов метаболизма синтез АТФ может быть нарушен и в результате снижения активности ферментов тканевого дыхания и гликолиза, повреждения и разрушения митохондрий, в которых осуществляются реакции цикла Кребса и перенос электронов к молекулярному кислороду, сопряженному с фосфорилированием АДФ. Нарушение процесса активации клеточных ферментов вызывает существенное изменение интенсивности метаболических реакций и, как следствие, приводит к нарушению жизнедеятельности клетки [8].

Критическое снижение напряжения кислорода в цитоплазме клеток при глубокой ишемии приводит к остановке транспорта электронов по дыхательной цепи митохондрий и прекращению образования АТФ путем окислительного фосфорилирования. Практически одновременно происходит активация фосфофруктокиназы – ключевого фермента анаэробного пути расщепления глюкозы (гликолиза). Активация гликолитического пути сопровождается повышением внутриклеточной, а затем и внеклеточной концентрации лактата с наступлением ацидоза. В норме лактатдегидрогеназа (ЛДГ) катализирует переход лактата в пируват, который находится на стыке аэробного и анаэробного метаболизма, и в дальнейшем вступает в цикл Кребса. Рост активности ЛДГ указывает на активацию анаэробного гликолиза [9].

Сукцинатдегидрогеназа (СДГ) является одним из важнейших ферментов цикла Кребса, локализуется на внутренней мембране митохондрий и катализирует обратимое окисление янтарной кислоты (сукцината) до фумаровой. СДГ – единственный фермент цикла Кребса, одновременно являющийся комплексом электрон-транспортной цепи [10]. Оценка изменения активности ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные реакции в мышцах, позволяет судить об интенсивности процессов, происходящих в самой клетке, и разрабатывать эффективные способы влияния на эти процессы [11].

В Институте биоорганической химии НАН Беларуси разработана отечественная генотерапевтическая конструкция на основе кольцевой ДНК, содержащая участки генов VEGF и Ang (pcDNA_VEGF165/Ang-1). В проведенных ранее исследованиях установлена положительная динамика регресса симптомов хронической ишемии с восстановлением функционального состояния оперированной конечности к 28-м суткам после использования генно-инженерной векторной конструкции VEGF165/Ang-1 в эксперименте, которая сопровождается выраженным антиноцицептивным эффектом, что указывает на высокий потенциал разработки в качестве прототипа первого отечественного комбинированного генотерапевтического средства [12].

Цель данной работы заключалась в проведении анализа динамики изменения активности ферментов клеточного энергетического обмена при локальном использовании плазмидной конструкции pcDNA_VEGF165/Ang-1 в модельном эксперименте *in vivo*

Материалы и методы. Эксперименты проведены на 46 половозрелых крысах Wistar возрастом 8 месяцев, содержащихся в условиях вивария Института 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 Института физиологии НАН Беларуси (протокол № 1 от 24.01.2024).

Плазмида, экспрессирующая гибридный белок VEGF165-Ang-1, разработана в Институте биоорганической химии НАН Беларуси и передана в Институт физиологии в виде стерильного раствора для инъекций. Введение исследуемой субстанции осуществляли однократно внутримышечно в правую заднюю лапу животного.

Экспериментальную модель хронической недостаточности артериального кровоснабжения (ишемии) задней конечности у крыс создавали по разработанному способу [13]. На 28-е сутки после моделирования патологии животных методом рандомизации распределили на четыре группы: интактная (3 самца и 3 самки), «ХИНК» (без лечения; 4 самца и 4 самки), «ХИНК + АФР» (ведение физиологического апирогенного раствора, 200 мкл; 4 самца и 4 самки), экспериментальная «ХИНК + VEGF165/Ang-1» (ведение pcDNA_VEGF165/Ang-1 ng-1 в дозе 100 мкг/жив; 12 самцов и 12 самок).

Образцами для исследования послужили фрагменты тканей скелетных мышц бедра и голени экспериментальных животных на 7, 14, 28 и 42 сутки после лечения. Срезы образцов толщиной 14 мкм изготавливали с помощью микротом-криостата Microm HM 525 (Германия) и обрабатывали общепринятыми гистохимическими методами на выявление активности ферментов энергетического обмена: СДГ и ЛДГ. Активность ферментов оценивали на основании определения оптической плотности конечного продукта реакции в цитоплазме клеток с помощью компьютерной программы обработки данных Image J (1.49k, США), выражая результаты в условных единицах (у.е.) оптической плотности.

Анализ данных выполняли с помощью программы Statistica 10.0. Проверку гипотезы о нормальном распределении количественных показателей осуществляли по критерию Колмогорова-Смирнова ($p \leq 0,05$). Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартного отклонения ($M \pm Sd$). Анализ статистической значимости количественных признаков определяли с помощью t-критерия Стьюдента и уровнем значимости $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение. На 7-е сутки у самок и самцов крыс в миоцитах мышц бедра выявлена незначительная активизация аэробных процессов: активность СДГ значительно повышалась у самок на 3,4 %, 4,4 %, 4,3 %, у самцов – на 3,7 %, 3,5 %, 4,8 % (группы «ХИНК», «ХИНК + АФР», «ХИНК + VEGF165/Ang-1», $p = 0,001$ для всех групп) относительно интактной группы животных. В мышечных клетках голени крыс обоих полов отмечали аналогичные изменения: статистически значимые повышения СДГ относительно значений до операции зафиксированы в группах «ХИНК» – на 7,1 %, «ХИНК + АФР» – на 7,9 %, «ХИНК + VEGF165/Ang-1» – на 8,1 % ($p = 0,001$ для всех групп) у самок и в группах «ХИНК» – на 3,8 %, «ХИНК + АФР» – на 3,7 %, «ХИНК + VEGF165/Ang-1» – на 7,6 % ($p = 0,001$ для всех групп) у самцов (рисунок 1 А, Б).

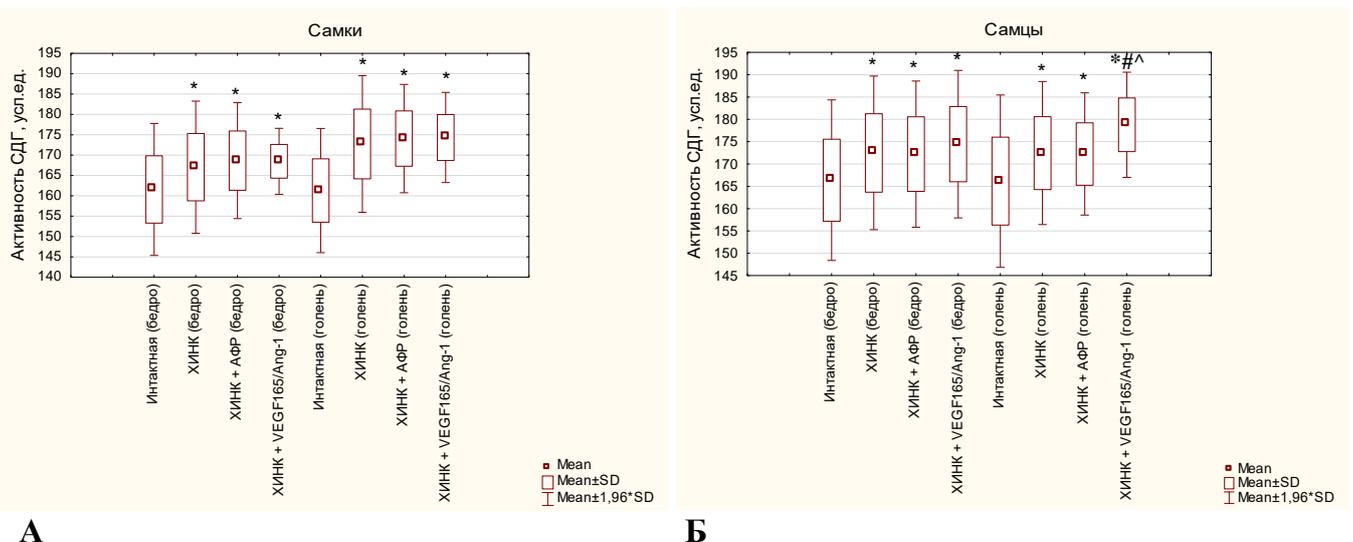


Рисунок 1. Активность сукцинатдегидрогеназы в миоцитах скелетных мышцах нижней конечности крыс экспериментальных групп на 7-е сутки наблюдения. А – самки, Б – самцы. * – $p < 0,001$ по отношению к показателям интактной группы, # – $p < 0,001$ по отношению к показателям группы «ХИНК», ^ – $p < 0,001$ по отношению к показателям группы «ХИНК + АФР»

Введение раствора pcDNA_VEGF165/Ang-1 самцам с ишемией сопровождалось достоверным повышением в мышцах голени СДГ на 3,7 % ($p = 0,001$) и на 3,8 % ($p = 0,001$) – по сравнению с группами «ХИНК» и «ХИНК + АФР» соответственно (рисунок 1 Б).

Активность ЛДГ, показателя гликолиза, на **7-е сутки** наблюдения значимо повышалась как в бедре, так и в голени самок лабораторных животных. Так, в миоцитах мышц бедра регистрировали достоверное увеличение ЛДГ на 14,5 % в группе «ХИНК», на 13,4 % в группе «ХИНК + АФР» и на 14,2 % в группе «ХИНК + VEGF165/Ang-1» в сравнении с показателями интактной группы крыс ($p = 0,001$ для всех групп). В голени самок отмечено возрастание ЛДГ на 14,9 %, 13,4 %, 14,8 % (группы «ХИНК», «ХИНК + АФР», «ХИНК + VEGF165/Ang-1», $p = 0,001$ для всех групп) относительно значений, характерных для здоровой конечности животного (рисунок 2 А). У самцов наблюдалась активизация гликолитических процессов в ишемизированных мышцах во всех опытных группах относительно здоровой конечности на 7-е сутки мониторинга, что выражалось в повышении активности ЛДГ в бедре на 11,0 %, 12,0 %, 11,0 % (группы «ХИНК», «ХИНК + АФР», «ХИНК + VEGF165/Ang-1», $p = 0,001$ для всех групп) и голени на 6,1 %, 5,2 %, 11,9 % ($p = 0,001$ для всех групп) соответственно аналогичным группам сравнения. Применение генно-инженерной плазмидной конструкции, приводило к статистически значимому повышению активности ЛДГ в мышцах голени относительно групп «ХИНК» на 5,5 % и «ХИНК + АФР» на 6,4 % ($p = 0,001$ для обеих групп) (рисунок 2 Б).

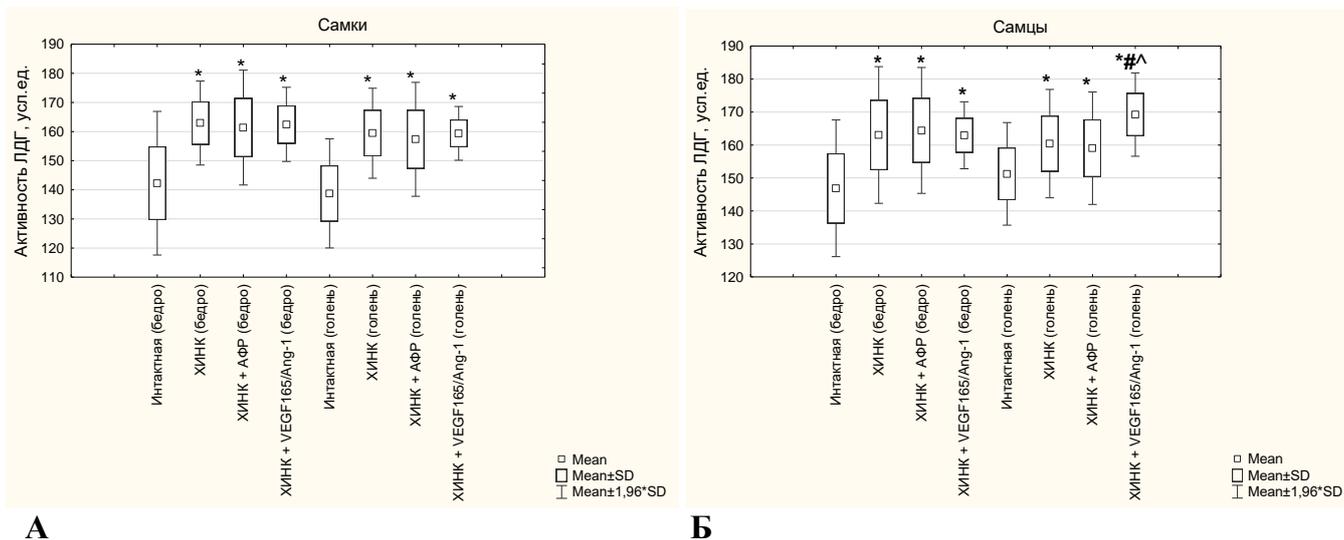


Рисунок 2. Активность лактатдегидрогеназы в миоцитах скелетных мышц нижней конечности крыс экспериментальных групп на 7-е сутки наблюдения. А – самки, Б – самцы. * – $p < 0,001$ по отношению к показателям интактной группы, # – $p < 0,001$ по отношению к показателям группы «ХИНК», ^ – $p < 0,001$ по отношению к показателям группы «ХИНК + АФР»

На **14-е сутки** наблюдения статистически значимых различий активности СДГ в клетках мышечной ткани бедра самок крыс между группами животных не обнаружено ($p > 0,05$ для всех групп). У самцов в ишемизированных мышцах бедра отмечали повышение активности аэробного окисления глюкозы в группах «ХИНК» – на 4,2 %, «ХИНК + АФР» – на 4,3 %, «ХИНК + VEGF165/Ang-1» – на 6,8 % ($p = 0,001$ для всех групп) по сравнению со значениями для здоровой конечности. В голени грызунов обоего пола также выявлены статистически значимые повышения СДГ относительно интактных значений в группах «ХИНК» – на 4,9 %, «ХИНК + АФР» – на 5,4 %, «ХИНК + VEGF165/Ang-1» – на 8,9 % ($p = 0,001$ для всех групп) у самок и в группах «ХИНК» – на 6,5 %, «ХИНК + АФР» – на 6,8 %, «ХИНК + VEGF165/Ang-1» – на 9,3 % ($p = 0,001$ для всех групп) у самцов. Введение раствора pcDNA_VEGF165/Ang-1 животным с ХИНК сопровождалось повышением СДГ в мышечной ткани голени самок на 3,8 % и 3,3 % ($p = 0,001$ для обеих групп), в голени на 2,6 %

($p = 0,007$) и 2,3 % ($p = 0,001$) и бедре на 2,5 % и 2,4 % ($p = 0,001$ для обеих групп) самцов относительно групп «ХИНК» и «ХИНК + АФР» (рисунок 3 А, Б).

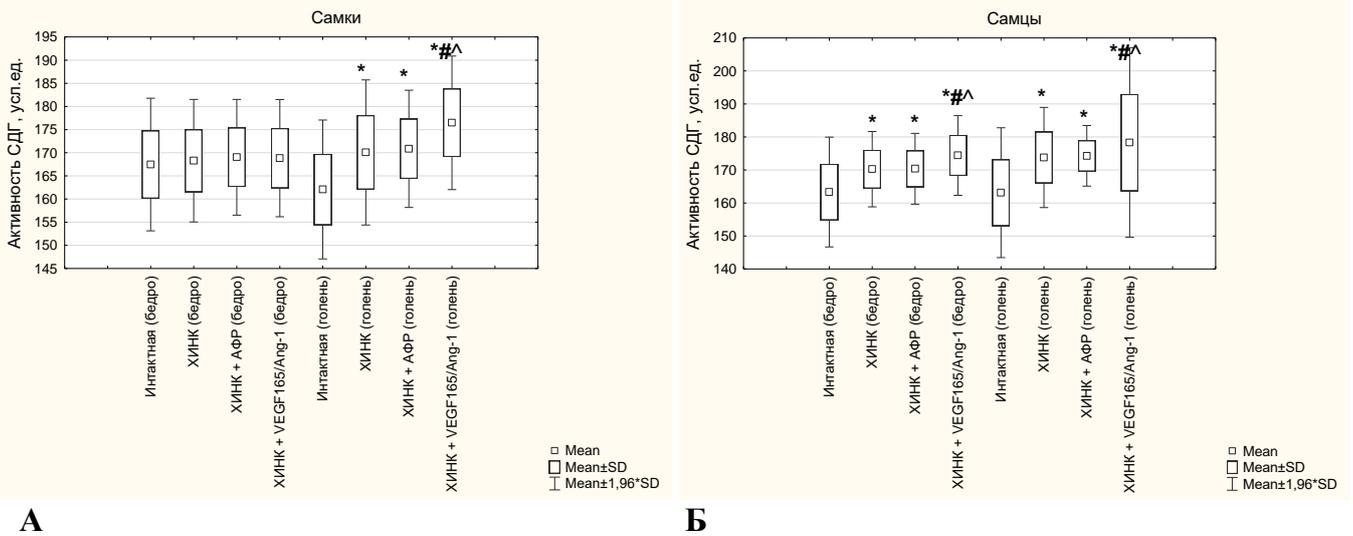


Рисунок 3. Активность сукцинатдегидрогеназы в миоцитах скелетных мышц нижней конечности крыс экспериментальных групп на 14-е сутки наблюдения. А – самки, Б – самцы. * – $p < 0,001$ по отношению к показателям интактной группы, # – $p < 0,001$ по отношению к показателям группы «ХИНК», ^ – $p < 0,001$ по отношению к показателям группы «ХИНК + АФР»

К 14-м суткам мониторинга статистически значимых различий активности ЛДГ в клетках мышечной ткани бедра самцов крыс между группами животных (кроме группы «ХИНК + VEGF165/Ang-1») не обнаружено ($p > 0,05$ для всех групп). При этом в голени самцов и в бедре и голени самок отмечено снижение гликолитических процессов в ишемизированных мышцах во всех опытных группах относительно здоровой конечности. Так, активность ЛДГ значительно снижалась в бедре самок на 5,0 %, 4,1 % ($p = 0,001$ для всех групп), 2,9 % ($p = 0,002$) (группы «ХИНК», «ХИНК + АФР», «ХИНК + VEGF165/Ang-1»); в голени самок на 6,8 %, 6,7 % ($p = 0,001$ для всех групп) и голени самцов на 2,9 %, 3,3 % ($p = 0,001$ для всех групп) соответственно группам «ХИНК», «ХИНК + АФР» (рисунок 4 А, Б).

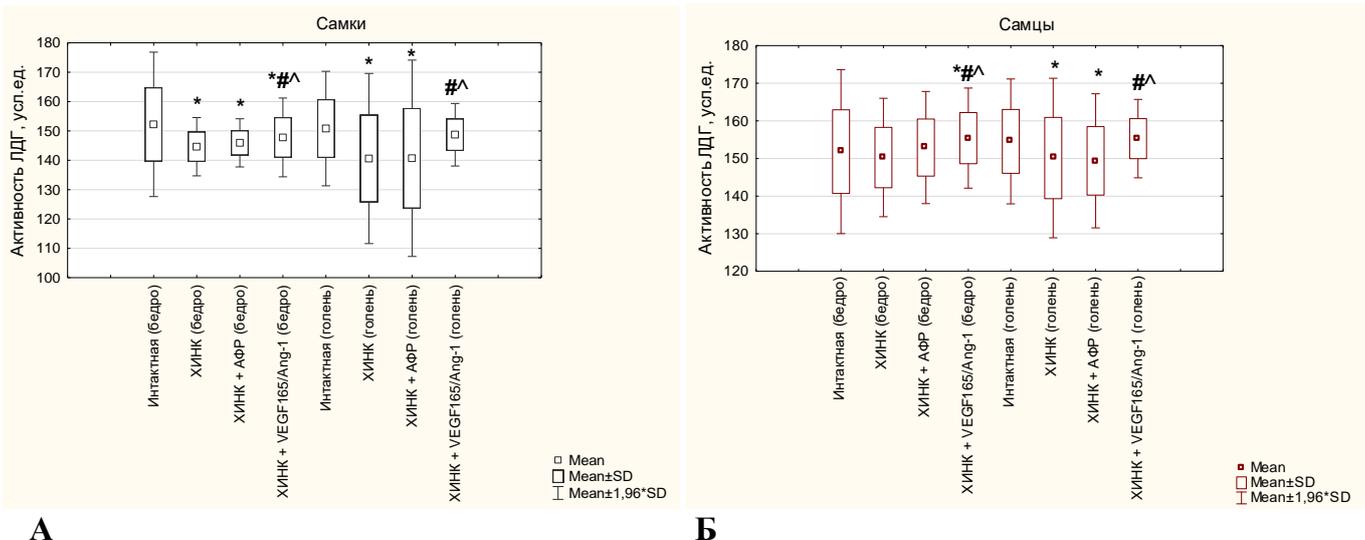


Рисунок 4. Активность лактатдегидрогеназы в миоцитах скелетных мышц нижней конечности крыс экспериментальных групп на 14-е сутки наблюдения. А – самки, Б – самцы. * – $p < 0,05$ по отношению к показателям интактной группы, # – $p < 0,05$ по отношению к показателям группы «ХИНК», ^ – $p < 0,05$ по отношению к показателям группы «ХИНК + АФР»

Введение раствора pcDNA_VEGF165/Ang-1 приводило к возрастанию активности ЛДГ как в голени, так и в бедре грызунов обоего пола: на 2,2 % ($p = 0,001$) и на 1,3 % ($p = 0,022$) – в бедре самок, на 3,4 % ($p = 0,001$) и на 1,6 % ($p = 0,015$) – в бедре самцов, на 5,7 % ($p = 0,001$) и на 5,7 % ($p = 0,002$) – в голени самок, на 4,0 % ($p = 0,042$) и на 4,0 % ($p = 0,001$) – в голени самцов относительно групп «ХИНК» и «ХИНК + АФР» (См. рисунок 4 А, Б).

К 28-м суткам у крыс обоих полов выявлено угнетение окисления глюкозы в цикле Кребса: статистически значимое снижение активности СДГ относительно интактных значений зарегистрировано у самок в группе «ХИНК» в бедре на 10,4 %, в голени – на 7,3 %, в группе «ХИНК + АФР» в бедре на 11,0 %, в голени – на 7,1 %; у самцов в группе «ХИНК» в бедре на 10,7 %, в голени – на 14,1 %, в группе «ХИНК + АФР» в бедре на 11,6 %, в голени – на 13,6 % ($p = 0,001$ для всех групп). Выраженную активизацию аэробных процессов в ишемизированных мышцах вызывало применение раствора pcDNA_VEGF165/Ang-1. Относительно показателей здоровой конечности в группе «ХИНК + VEGF165/Ang-1» установлено повышение СДГ в бедре (на 5,6 % и 6,8 %, $p = 0,001$) и голени (на 6,1 % и 10,4 %, $p = 0,001$) самок и самцов, соответственно. По отношению к группам «ХИНК» и «ХИНК + АФР» после введения раствора pcDNA_VEGF165/Ang-1 зафиксировано увеличение активности СДГ у самок (в бедре на 17,2 % и 18,0 %, в голени на 14,5 % и 14,3 %, $p = 0,001$ для всех групп) и у самцов (в бедре на 19,7 % и 20,9 %, в голени на 28,5 % и 27,8 %, $p = 0,001$ для всех групп) (рисунок 5 А, Б).

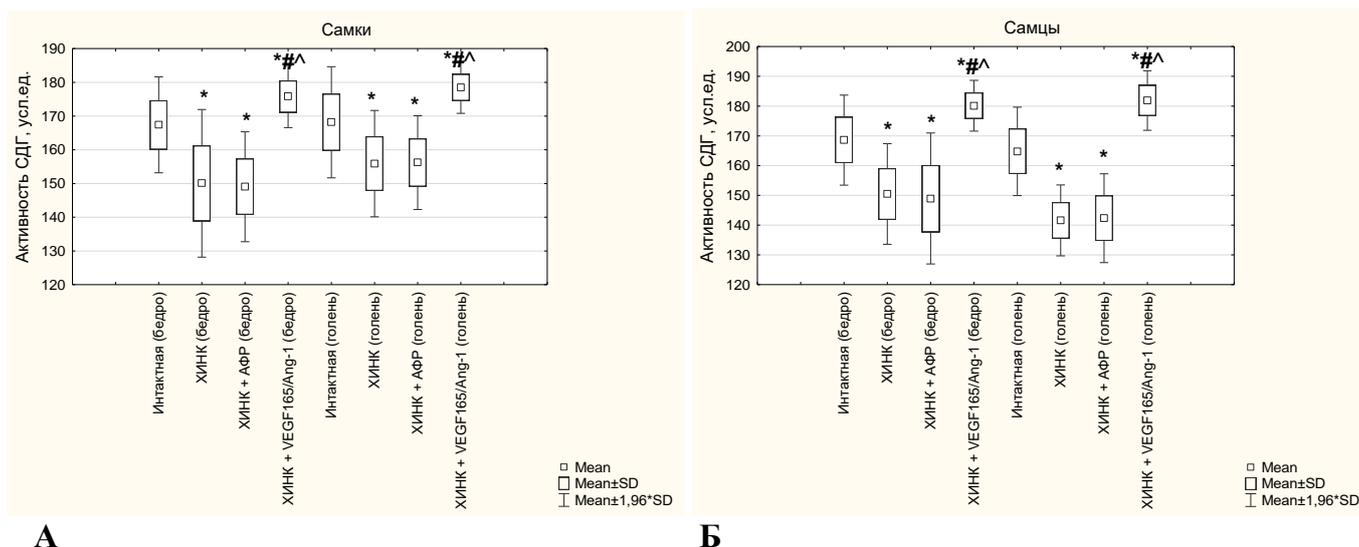


Рисунок 5. Активность сукцинатдегидрогеназы в скелетных мышцах нижней конечности крыс экспериментальных групп на 28-е сутки наблюдения. А – самки, Б – самцы. * – $p < 0,001$ по отношению к показателям интактной группы, # – $p < 0,001$ по отношению к показателям группы «ХИНК», ^ – $p < 0,001$ по отношению к показателям группы «ХИНК + АФР»

Активность ЛДГ в миоцитах скелетных мышц оперированной конечности животных обоих полов на 28-е сутки наблюдений значимо снижалась: в группе с ишемией в бедре самок и самцов соответственно на 9,5 % и 10,5 %, в голени самок и самцов – на 12,8 % и 11,1 %; в группе «ХИНК + АФР» в бедре самок и самцов соответственно на 8,7 % и 10,2 %, в голени самок и самцов – на 12,8 % и 11,2 % ($p = 0,001$ для всех групп) относительно интактной группы крыс. Применение плазмидной конструкции, содержащей VEGF165 и Ang-1, сопровождалось значимой активизацией анаэробных процессов в ишемизированных мышцах лабораторных животных. Так, у самок выявлено повышение активности ЛДГ в бедре на 11,3 % и 10,3 %, в голени на 14,9 % и 14,8 % относительно значений, зафиксированных в группах «ХИНК» и «ХИНК + АФР» ($p = 0,001$ для всех групп). У самцов наблюдали значимое увеличение ЛДГ в мышцах оперированной конечности относительно

всех групп сравнения: на 1,1 % (бедро, $p = 0,009$) и 8,1 % (голень, $p = 0,001$) относительно интактной группы, на 12,9 % (бедро, $p = 0,001$) и 21,6 % (голень, $p = 0,001$) – группы «ХИНК» и на 12,5 % (бедро, $p = 0,001$) и 21,7 % (голень, $p = 0,001$) – группы «ХИНК + АФР» (рисунок 6 А, Б).

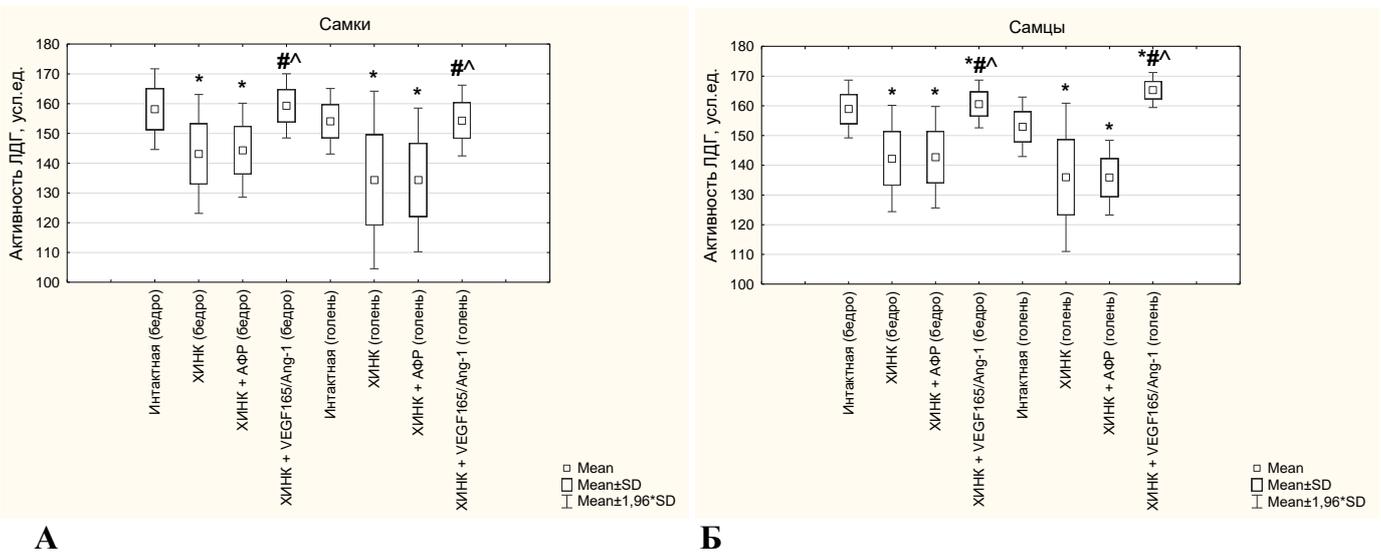


Рисунок 6. Активность лактатдегидрогеназы в скелетных мышцах нижней конечности крыс экспериментальных групп на 28-е сутки наблюдения. А – самки, Б – самцы. * – $p < 0,05$ по отношению к показателям интактной группы, # – $p < 0,05$ по отношению к показателям группы «ХИНК», ^ – $p < 0,05$ по отношению к показателям группы «ХИНК + АФР»

К **42-м суткам** мониторинга выявлено увеличение активности СДГ в ишемизированных мышцах бедра и голени самок крыс, превышающее показатели интактной группы (в группах «ХИНК» – в бедре на 3,9 %, в голени – на 5,5 %, «ХИНК + АФР» – в бедре на 4,5 %, в голени – на 5,0 %, «ХИНК + VEGF165/Ang-1» – в бедре на 8,4 %, в голени – на 9,8 % ($p = 0,001$ для всех групп; рисунок 7 А).

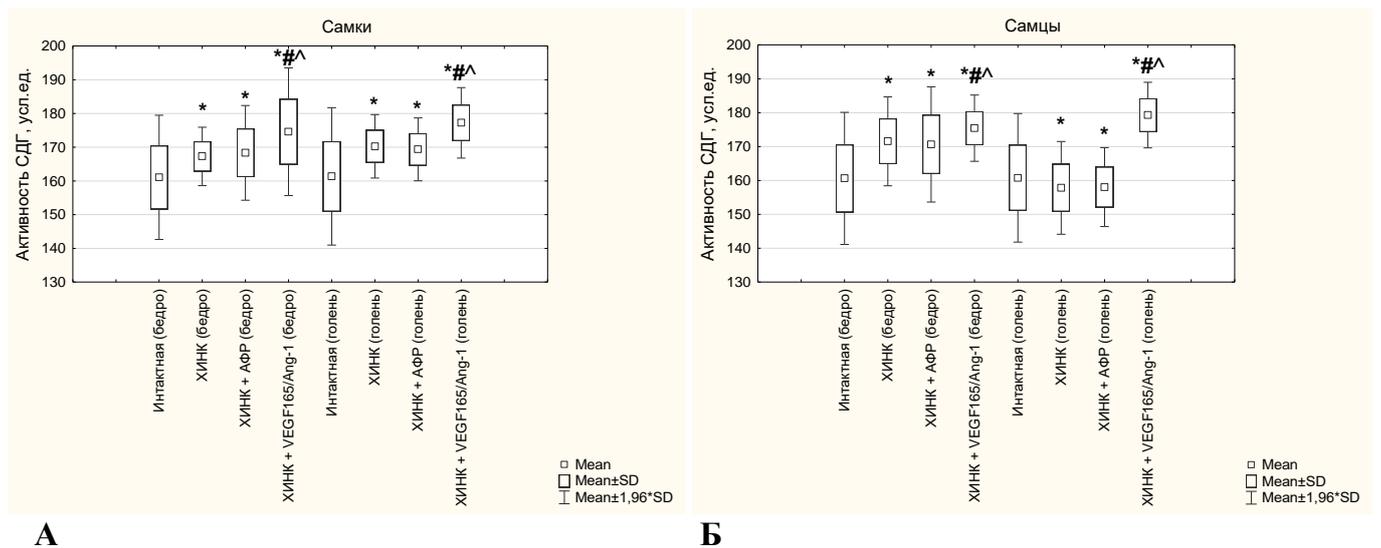


Рисунок 7. Активность сукцинатдегидрогеназы в миоцитах скелетных мышц нижней конечности крыс экспериментальных групп на 42-е сутки наблюдения. А – самки, Б – самцы. * – $p < 0,05$ по отношению к показателям интактной группы, # – $p < 0,05$ по отношению к показателям группы «ХИНК», ^ – $p < 0,05$ по отношению к показателям группы «ХИНК + АФР»

Введение исследуемой субстанции pcDNA_VEGF165/Ang-1 самкам с ХИНК приводило к возрастанию активности СДГ относительно групп с ишемией: в бедре на 4,4 % и 3,7 %, в голени на 4,6 % и 4,6 % ($p = 0,001$ для всех групп) относительно групп «ХИНК» и «ХИНК + АФР» (рисунок 7 А).

В ишемизированных мышцах бедра самцов по сравнению со здоровой конечностью фиксировали статистически значимое увеличение активности СДГ в группах «ХИНК» – на 6,8 %, «ХИНК + АФР» – на 6,2 %, «ХИНК + VEGF165/Ang-1» на 9,2 %, ($p = 0,001$ для всех групп). По сравнению с группами «ХИНК» и «ХИНК + АФР» повышение активности СДГ на 2,3 % и 2,8 % ($p = 0,001$ для обеих групп) в бедре самцов наблюдалось и после введения субстанции pcDNA_VEGF165/Ang-1. В голени самцов отмечали незначительное снижение СДГ на 1,8 % ($p = 0,014$) в группе «ХИНК», на 1,7 % ($p = 0,017$) в группе «ХИНК + АФР» относительно интактной группы животных. Введение исследуемой субстанции pcDNA_VEGF165/Ang-1 самцам с ХИНК приводило к значимому увеличению СДГ в мышцах голени относительно всех групп сравнения: на 11,5 % относительно интактной группы, на 13,6 % – группы «ХИНК» и на 13,4 % ($p = 0,001$ для всех групп) – группы «ХИНК + АФР» (рисунок 7 Б).

На **42-е сутки** наблюдения у самок крыс в клетках мышечной ткани оперированной конечности показатели активности ЛДГ в группах «ХИНК» и «ХИНК + АФР» достигали интактных значений и были статистически не значимы во всех группах сравнения ($p > 0,05$ для всех групп). Введение плазмидной конструкции приводило к статистически значимому повышению активности ЛДГ в мышцах бедра на 5,5 % относительно интактной группы, на 5,9 % – группы «ХИНК» и на 5,8 % ($p = 0,001$ для всех групп) – группы «ХИНК + АФР»; голени – на 9,8 % относительно интактной группы, на 7,8 % – «ХИНК» и на 8,5 % – «ХИНК + АФР» ($p = 0,001$ для всех групп) (рисунок 8 А).

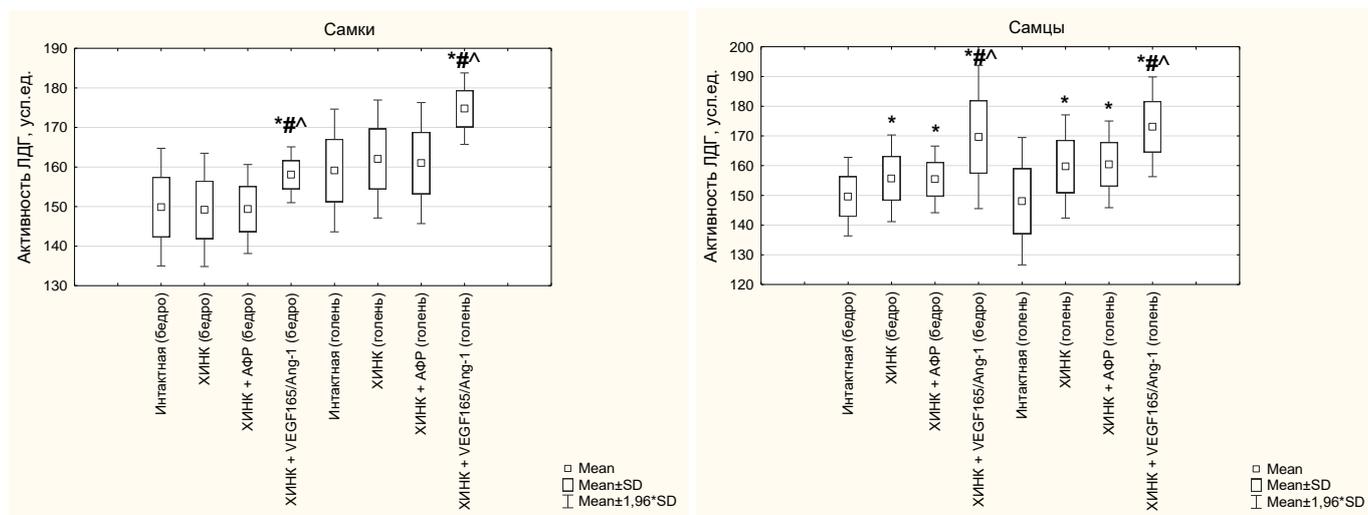


Рисунок 8. Активность лактатдегидрогеназы в скелетных мышцах нижней конечности крыс экспериментальных групп на 42-е сутки наблюдения. А – самки, Б – самцы. * – $p < 0,001$ по отношению к показателям интактной группы, # – $p < 0,001$ по отношению к показателям группы «ХИНК», ^ – $p < 0,001$ по отношению к показателям группы «ХИНК + АФР»

У самцов на **42-е сутки** мониторинга выявлена более выраженная активация гликолитических процессов по сравнению со здоровой конечностью: статистически значимое увеличение активности ЛДГ в мышечных клетках в группах «ХИНК» – в бедре на 4,1 %, в голени – на 7,9 %, «ХИНК + АФР» – в бедре на 3,9 %, в голени – на 8,4 %, «ХИНК + VEGF165/ Ang-1» – в бедре на 13,4 %, в голени – на 16,9 % ($p = 0,001$ для всех групп). По сравнению с группами с ишемией в группе «ХИНК + VEGF165/Ang-1» наблюдали повышение активности ЛДГ в бедре – на 8,9 % и 9,2 %, в голени – 8,4 % и 7,9 % ($p = 0,001$ для всех групп) (рисунок 8 Б).

Заключение. Применение генно-инженерной плазмидной конструкции pcDNA_VEGF165/Ang-1 в дозе 100 мкг/жив в условиях моделирования ишемии мышц конечности приводит к выраженной активизации ферментов энергетического обмена, статистически значимому повышению активности сукцинат- и лактатдегидрогеназы в клетках ишемизированной мышечной ткани лабораторных животных на 14-е сутки после терапии с последующей активацией процессов в цикле Кребса и гликолитическом пути к 42-ым суткам наблюдений.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что разработанная генно-инженерная плазмидная конструкция pcDNA_VEGF165/Ang-1 оказывает выраженное и пролонгированное цитопротективное действие, которое проявляется в способности индуцировать значимое повышение активности ферментов тканевого дыхания и гликолиза в клетках ишемизированной мышечной ткани лабораторных животных.

Литература:

- [1]. *Shahim B., Kapelios C.J., Savarese C., Lund L.H.* Global public health burden of heart failure: an updated review // *Card. Fail. Rev.* 2023. Vol. 9. e11. P. 1–8.
- [2]. *Deveza L., Choi J., Yang F.* Therapeutic angiogenesis for treating cardiovascular diseases // *Theranostics.* 2012; Vol. 2. № 8. P. 801–814.
- [3]. *Рубина К.А., Семина Е.В., Дыйканов Д.Т., Болдырева М.А. др.* Эффективность сочетанного использования плазмидных конструкций, содержащих гены HGF и ангиопоэтина-1, для восстановления кровотока в ишемизированных тканях // *Гены & Клетки.* 2018. Т. XIII. № 1. С. 56–64.
- [4]. *Калинин Р. Е., Шулькин А. В., Сучков И. А., Климентова Э. А. др.* Экспрессия сосудистого эндотелиального фактора роста в артериальной стенке при различной сосудистой патологии // *Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия.* 2020. Т. 13. № 6. С. 556–560.
- [5]. *Белоглазова И. Б., Зубкова Е. С., Дергилев К. В., Гольцева Ю. Д. др.* Эндотелиальные клетки контролируют рост сосудов, регулируя Notch-сигнализацию в мезенхимальных стромальных клетках / *Кардиологический вестник.* 2024. Т. 19. № 2. С. 32–38.
- [6] *Gan Li, Junjie Gao, Peng Ding, Youshui Gao.* The role of endothelial cell–pericyte interactions in vascularization and diseases // *Journal of Advanced Research.* 2025 Vol. 67. P. 269–288.
- [7]. *Кутепов Д. Е., Жигалова М. С., Пасечник И. Н.* Патогенез синдрома ишемии-реперфузии // *Казанский медицинский журнал.* 2018. Т. 99. № 4. С. 640–644.
- [8]. *Кабак С. Л., Кузнецова Т. Е.* Влияние факторов окружающей среды на β -клетки островков Лангерганса поджелудочной железы новорожденных крыс // *Медицинский журнал.* 2011. № 2. С. 51–55.
- [9]. *Wu M.Y., Yiang G.T., Liao W.T., Tsai A.P.Y et al.* Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury // *Cell. Physiol. Biochem.* 2018. Vol. 46. № 4. P. 1650–1667.
- [10]. *Moosavi B., Berry E.A., Zhu X.-L., Yang W.-C. et al.* The assembly of succinate dehydrogenase: a key enzyme in bioenergetics // *Cell. Mol. Life Sci.* 2019. Vol. 76. № 20. P. 4023–4042.
- [11]. *Simard M.-L., Mourier A., Greaves L.C., Taylor R.W. et al.* A novel histochemistry assay to assess and quantify focal cytochrome c oxidase deficiency // *J. Pathology.* 2018. Vol. 245. № 3. P. 311–323.
- [12]. *Богдан В.Г., Доронькина А.С., Жаворонок И.П., Лепешко С.Г. др.* Антиноцицептивная эффективность использования комбинированной плазмидной конструкции pcDNA_VEGF165-Ang-1 у животных с экспериментальной ишемией задних конечностей // *Хирургия. Восточная Европа.* 2024. Т. 13. № 3. С. 363–371.
- [13]. *Богдан В.Г., Доронькина А.С., Жаворонок И.П., Фёдорова Е.В. др.* Патогенетическая модель хронической артериальной недостаточности кровоснабжения конечности в эксперименте // *Хирургия. Восточная Европа.* 2024. Т.13. № 1. С. 38–48.

*V. G. BOGDAN¹, E. V. FIODOROVA², T. A. FILIPOVICH²,
I. P. ZHAVORONOK², A. S. DORONKINA², S. G. LEPESHKO², S. V. MANKOVSKAYA²*

**ACTIVITY OF CELLULAR ENERGY METABOLISM ENZYMES DURING LOCAL USE OF
PLASMID CONSTRUCT VEGF165 / ANG-1 IN EXPERIMENTAL CHRONIC ISCHEMIA OF
LOWER LIMBS**

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

*²State Scientific Institution "Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus", Minsk,
Republic of Belarus*

Summary

Application of genetically engineered plasmid construct pcDNA_VEGF165/Ang-1 at a dose of 100 µg/live in the model of chronic lower limb ischemia in rats leads to a pronounced activation of energy metabolism enzymes, statistically significant increase of succinate and lactate dehydrogenase activity in cells of ischemic muscle tissue of laboratory animals on the 14th day after therapy with subsequent activation of processes in Krebs cycle and glycolytic pathway by the 42nd day of observations. Thus, the developed genetically engineered plasmid construct pcDNA_VEGF165/Ang-1 has a pronounced and prolonged cytoprotective effect.

Keywords: chronic limb ischemia, gene therapy, vascular endothelial growth factor, angopietin-1, experiment, rats, histochemical analysis.