

В. Г. БОГДАН¹, А. С. ДОРОНЬКИНА², И. П. ЖАВОРОНОК², Е. В. ФЕДОРОВА²,
Т. А. ФИЛИПОВИЧ², С. Г. ЛЕПЕШКО², С. В. МАНЬКОВСКАЯ²

ПРИМЕНЕНИЕ ПЛАЗМИДНОЙ КОНСТРУКЦИИ pcDNA_Ang-1 ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ КОНЕЧНОСТИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

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

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

Оценена возможность восстановления функций ишемизированных мышц задних конечностей у экспериментальных животных после применения генно-инженерной плазмидной конструкции, кодирующей белок Ang-1. Установлено, что данная субстанция демонстрирует слабый ангиогенный и антиноцицептивный эффект в модельном эксперименте.

Ключевые слова: хроническая ишемия нижних конечностей, плазмидная ДНК, порог ноцицептивной реакции, паттерны походки, количество кровеносных сосудов.

Введение. Снижение кровоснабжения нижних конечностей считается основным патогенетическим механизмом развития хронической ишемии. Одним из методов лечения данной патологии является терапевтический ангиогенез, основанный на локальном введении в ишемизированные ткани генетических конструкций с генами факторов роста и/или стволовыми/прогениторными клетками, что сопровождается стимуляцией образования новых капилляров микроциркуляторного русла [1–4]. В последнее десятилетие в качестве носителей используют векторные конструкции на основе плазмидной (кольцевой) ДНК, кодирующие в своей последовательности определенный белок или несколько белков, обладающих терапевтическими эффектами [5–8].

Цель данной работы – изучение ангиогенного и антиноцицептивного эффекта локального применения отечественного раствора плазмидной ДНК (pcDNA_Ang-1) в модельном эксперименте *in vivo*.

Материалы и методы исследования. Экспериментальные исследования проводились на 40 крысах Вистар возрастом 8 месяцев, 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. Протоколы экспериментов утверждены биоэтической комиссией Института физиологии НАН Беларуси (протокол № 1 от 24.01.2024 г.).

Генно-инженерная конструкция – плазида с экспрессионной кассетой ангиопоэтина 1 (pcDNA_Ang-1) разработана и синтезирована в Государственном научном учреждении «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси». Субстанция передана в Институт физиологии в виде стерильного раствора для инъекций.

Моделирование хронической ишемии правой задней конечности животного осуществляли по разработанному нами способу [9]. На 28-сут лабораторные животные были разделены на группы: «Ишемия» (n = 5, контроль); «Ишемия + АФР» (n = 5; введение апиогенного физиологического раствора (АФР), 200 мкл); «Ишемия + pcDNA_Ang-1» (n = 30; pcDNA_Ang-1 растворенный в АФР, далее Ang-1, 100 мкг/жив). Введение исследуемой субстанции и АФР осуществляли однократно внутримышечно в правую заднюю конечность животного на 28-е сут после моделирования хронической ишемии.

Антиноцицептивный эффект оценивали по изменениям значений порога ноцицептивной реакции (ПНР, г) при воздействии механического стимула (тест «Randall-Selitto»; PanLab, Испания), а также путем анализа особенностей походки с использованием аппаратно-

программного комплекса CatWalk XT 10.6 (Noldus, Нидерланды). Для оценки походки были выбраны следующие параметры: интенсивность отпечатка (абс. ед.) и площадь отпечатка (см²).

Для гистологического исследования проводили забор мягких тканей зоны инъекции правой задней конечности крыс. Фрагменты тканей фиксировали в 10 %-м нейтральном забуференном растворе формалина в течение не менее 24 часов. 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. На гистологических срезах анализировали морфологические изменения скелетных мышц в программе Image J (США).

Все вышеупомянутые процедуры выполнены до- и на 7-, 14-, 21-, 28-, 35-, 42-, 56-, 70-е сутки после оперативного вмешательства.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программных пакетов OriginPro 9.1 (Origin Lab Corp., США) и Statistica 10.0 (Statsoft, США). Анализ различий количественных признаков проводили с помощью непараметрических тестов: для зависимых выборок использовался тест Уилкоксона, для независимых выборок – тест Манна-Уитни в парных сравнениях. Данные представлены в виде медианы (Me) и интервального размаха с указанием 25-го и 75-го квартилей. Отличия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. 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 27,3 % (с 129,8 [125,3; 135,3] до 88,5 [84,1; 95,4] г; $p = 0,0022$) по сравнению со значениями до операции. Последующий 3-недельный мониторинг показал незначительное снижение параметров ПНР у экспериментальных животных (рисунок 1).

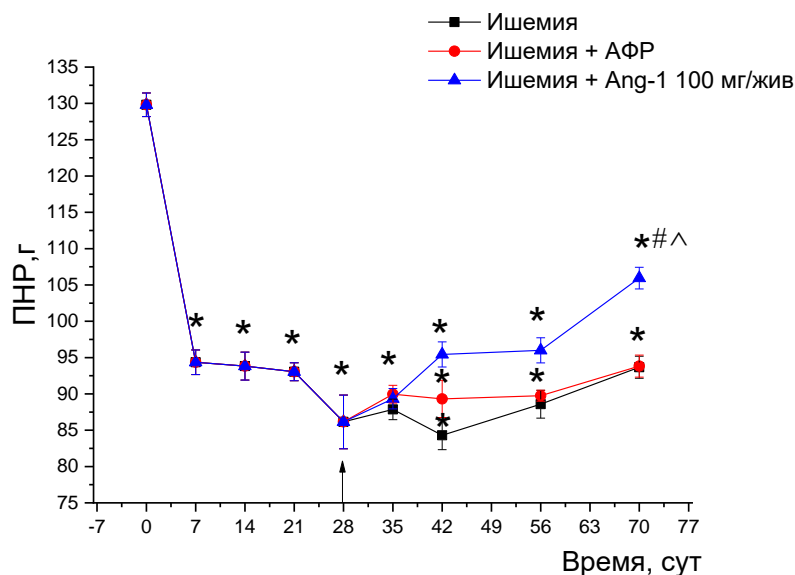


Рисунок 1. Изменения порога ноцицептивной реакции (ПНР) оперированной конечности крыс на механический стимул: * – $p < 0,05$ по сравнению со значениями до операции, # – $p < 0,05$ по сравнению со значениями на 28-е сутки, ^ – $p < 0,05$ по сравнению с группой «Ишемия»

На 35-е, 42-е и 56-е сутки после операции (7-е, 14-е и 28-е сутки после введения препарата соответственно) при межгрупповом сравнении не наблюдали статистически значимых различий ПНР ($p \geq 0,05$) относительно групп контроля. На 70-е сутки наблюдения (42-е сутки после введения препарата) в группе «Ишемия + Ang-1» зарегистрировано

статистически значимое увеличение значений ПНР оперированной конечности на 22,9 % в сравнении со значениями полученными на 28-е сутки после моделирования патологии и на 13,1 % ($p = 0,0013$) относительно значений, зафиксированных в группе «Ишемия» ($p = 0,0255$, соответственно, рисунок 1). Однако анализируемый показатель так и не достигает значений для здоровой конечности.

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 площади отпечатка на 54,8 % (с 1,4 [1,1; 1,8] до 0,6 [0,5; 0,8] см²; $p = 0,0009$) относительно значений до операции (рисунок 2).

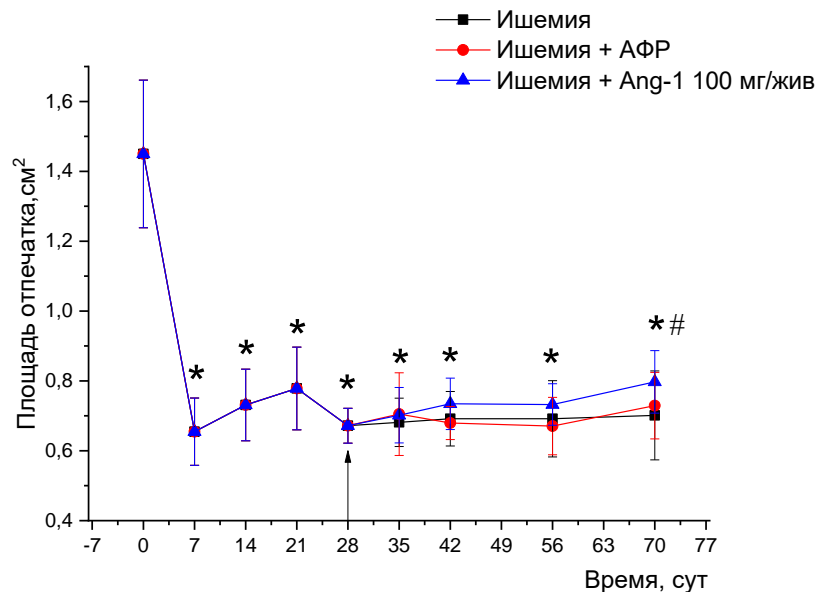


Рисунок 2. Изменение площади отпечатка оперированной конечности крыс: * – $p < 0,05$ по сравнению со значениями до операции, # – $p < 0,05$ по сравнению со значениями на 28-е сутки

При дальнейшем мониторинге наблюдали незначительные колебания данного параметра и к 28-м суткам площадь отпечатка оперированной конечности составила 53,6 % относительно данных до операции ($p = 0,037$). С 35-х по 70-е сутки после операции (с 7-х по 42-е сутки после введения препарата соответственно) статистически значимых различий исследуемого параметра между группами не обнаружено. На 70-е сутки после операции (42-е сутки после введения раствора плазмидной ДНК), регистрировали увеличение площади отпечатка ипсилатеральной конечности на 18,7 % ($p = 0,0009$) относительно значений, полученных на 28-е сутки после моделирования ишемии (см. рисунок 2).

На 7-е сутки после моделирования ишемии задней конечности также отмечали статистически значимое снижение интенсивности отпечатка оперированной конечности на 23,6 % (с 92,2 [89,4; 98,1] до 74,9 [68,3; 76,2] абс. ед; $p = 0,0277$) относительно значений до операции (рисунок 3).

В последующий 3-недельный период данный параметр составил 20–29 % относительно значений до моделирования патологии. На 35-е, 42-е, 56-е и сутки после операции (7-е, 14-е и 28-е сутки после введения препарата соответственно) у крыс с ишемией правой задней конечности достоверных различий относительно 28-х суток после операции и в сравнении с группами контроля «Ишемия» и «Ишемия + АФР» не выявлено. Однако на 56-е и 70-е сутки эксперимента (28-е и 42-е сутки после введения препарата) в группе «Ишемия + Ang-1» регистрировали увеличение интенсивности отпечатка на 17,1 % ($p = 0,0467$), 18,8 % ($p = 0,0389$), соответственно, относительно значений, полученных на 28-е сутки (см. рисунок 3).

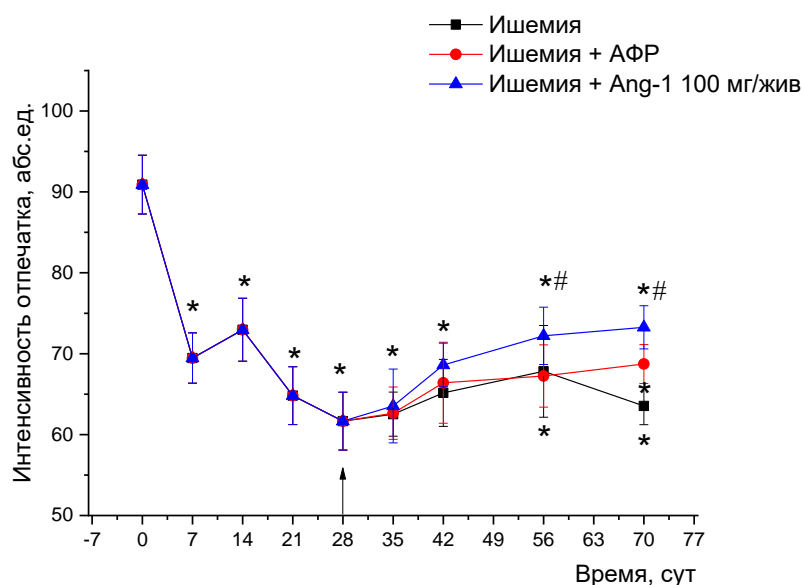


Рисунок 3. Изменение площади отпечатка оперированной конечности крыс: * – $p < 0,05$ по сравнению со значениями до операции, # – $p < 0,05$ по сравнению со значениями на 28-е сутки

После моделирования хронической ишемии задней конечности у крыс в скелетных мышцах *бедро* количество сосудов в сравнении с интактной группой (здоровая конечность) наблюдения значимо снижалось на 7-е сутки (35-е сутки после операции) в среднем на 56,82 %, на 14-е (42-е сутки после операции) – на 54,88 %, на 28-е (56-е сутки после операции) – на 43,64 %, на 42-е (70-е сутки после операции) – на 42,04 % ($p = 0,001$ для всех групп; таблица). В мышцах *голень* количество сосудов также достоверно уменьшалось на 7-е сутки в среднем на 54,04 %, на 14-е – на 52,41 %, на 28-е – на 48,11 %, на 42-е – на 42,28 % ($p = 0,001$ для всех групп).

Таблица. Динамика количества кровеносных сосудов в скелетных мышцах задней конечности крыс опытных групп, $M \pm Sd$

Группа животных		7 сутки	14 сутки	28 сутки	42 сутки
Интактная (здоровая конечность)	бедро	$4,40 \pm 0,81$	$4,41 \pm 0,79$	$4,40 \pm 0,82$	$4,40 \pm 0,79$
	голень	$3,96 \pm 0,69$	$3,95 \pm 0,70$	$3,97 \pm 0,69$	$3,95 \pm 0,71$
Ишемия (контроль)	бедро	$1,90 \pm 0,67^*$	$1,99 \pm 0,73^*$	$2,48 \pm 0,85^*$	$2,55 \pm 0,85^*$
	голень	$1,82 \pm 0,75^*$	$1,88 \pm 0,67^*$	$2,06 \pm 0,78^*$	$2,28 \pm 0,74^*$
Ишемия + АФР	бедро	$1,80 \pm 0,76^*$	$1,89 \pm 0,70^*$	$2,44 \pm 0,87^*$	$2,54 \pm 0,73^*$
	голень	$1,78 \pm 0,68^*$	$1,82 \pm 0,65^*$	$2,12 \pm 0,85^*$	$2,32 \pm 0,74^*$
Ишемия + Ang-1	бедро	$1,89 \pm 0,78^*$	$2,01 \pm 0,84^*$	$2,56 \pm 0,93^*$	$2,72 \pm 0,84^*$
	голень	$1,83 \pm 0,71^*$	$1,91 \pm 0,73^*$	$2,29 \pm 0,79^{* \# \wedge}$	$2,32 \pm 0,76^*$

Примечание: * – наличие статистически значимых отличий относительно интактной группы ($p < 0,05$); # – наличие статистически значимых отличий относительно группы Ишемии ($p < 0,05$); ^ – наличие статистически значимых отличий относительно группы Ишемии с АФР ($p < 0,05$)

Моделирование хронической ишемии с последующим введением апиогенного физиологического раствора у лабораторных крыс в мышцах бедра и голени сопровождалось достоверным снижением количества капилляров относительно интактной группы (здоровая конечность) животных в течение всего периода наблюдения (см. таблицу).

Морфометрический анализ групп исследования показал, что введение pcDNA_Ang-1 в дозе 100 мкг не приводило к статистически значимым различиям между количеством

сосудов, приходящихся на одно мышечное волокно, в скелетных мышцах бедра на 7-е, 14-е, 28-е и 42-е сутки эксперимента по сравнению с группами «Ишемия» и «Ишемией + АФР». В мышечной ткани голени животных на 28-е сутки наблюдения после введения раствора pcDNA_Ang-1 в дозе 100 мкг/кг регистрировали достоверное увеличение количества сосудов относительно группы «Ишемия» на 11,17 % ($p = 0,001$), группы «Ишемия + АФР» на 8,02 % ($p = 0,041$), однако значения не приближались к показателям, характерных для здоровой конечности. Других изменений не зафиксировано (см. таблицу).

Заключение. Введение крысам с ишемией правой задней конечности раствора плазмидной ДНК (pcDNA_Ang-1) в дозе 100 мкг сопровождалось слабым антиноцицептивным эффектом на завершающем этапе эксперимента, т.е. к 70-м суткам (к 42-м суткам после терапии), о чем свидетельствовало достоверное повышение значений порога ноцицептивной реакции относительно группы контроля. В то же время изменение площади и интенсивности отпечатка ипсилатеральной конечности не зарегистрировано.

Статистически значимая пролиферация микрососудов после введения pcDNA_Ang-1 отмечена только в скелетных мышцах голени оперированной конечности на 28 сутки мониторинга, однако анализируемый показатель так и не достигает значений для здоровой конечности. К 42-м суткам прирост капилляров в мышечной ткани нижней конечности крыс не сохраняется, что указывает на слабый ангиогенный потенциал исследуемой субстанции.

Литература:

- [1]. Червяков Ю.В., Власенко О.Н. Эффективность генной терапии и стандартного консервативного лечения хронической ишемии нижних конечностей атеросклеротического генеза // Вест. Хир. Им. ИИ Грекова. 2018. Т. 177. № 2. С. 64–71.
- [2]. Kishwar H.K. Gene expression in mammalian cells and its applications // Adv. Pharm.l Bull. 2013. Vol. 3. № 2. P. 257–263.
- [3]. Белоглазова И.Б., Зубкова Е.С., Дергилев К.В. и др. Эндотелиальные клетки контролируют рост сосудов, регулируя Notch-сигнализацию в мезенхимальных стромальных клетках // Кардиологический вестник. 2024. Т. 19. № 2. С. 32–38.
- [4]. Богдан В.Г., Лепешко С.Г. Стимуляция ангиогенеза в комплексном лечении пациентов с хронической артериальной недостаточностью нижних конечностей // Военная медицина. 2017. № 2. С. 117–119.
- [5]. Рубина К.А., Семина Е.В., Дыйканов Д.Т. и 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.
- [6]. Kibbe M.R. Safety and efficacy of plasmid DNA expressing two isoforms of hepatocyte growth factor in patients with critical limb ischemia // Gene Therapy. 2016. Vol. 23. № 3. P. 306–312.
- [7]. Kitrou P. Gene-based therapies in patients with critical limb ischemia // Expert Opin Biol Ther. 2017. Vol.17. № 4. P. 449–456.
- [8]. Morishita R. Phase I/IIa clinical trial of therapeutic angiogenesis using hepatocyte growth factor gene transfer to treat critical limb ischemia // Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011. Vol. 31. № 3. P. 713–720.
- [9]. Богдан В.Г., Доронькина А.С., Жаворонок И.П. и др. Патогенетическая модель хронической артериальной недостаточности кровоснабжения конечности в эксперименте // Хирургия. Восточная Европа. 2024. Т.13. № 1. С. 38–48.

THE EXPERIMENTAL USE OF THE PLASMID pcDNA_ANG-1 CONSTRUCT IN CHRONIC LIMB ISCHEMIA

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

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

Summary

The study aimed to evaluate the possibility of restoring the function of ischemic muscles in the hind limbs of experimental animals after treatment with a genetically engineered plasmid construct that encodes the Ang-1 protein. The results showed that this substance has a weak angiogenic and analgesic effect in the model experiment.

Keywords: chronic lower limb ischemia, plasmid DNA, nociceptive response threshold, gait patterns, number of blood vessels.