

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-116

**РАЗРАБОТКА КОМБИНИРОВАННОЙ ПЛАЗМИДНОЙ КОНСТРУКЦИИ VEGF165/ANG-1  
И ОЦЕНКА ЕЕ ВЛИЯНИЯ НА ВОССТАНОВЛЕНИЕ ФУНКЦИЙ  
ИШЕМИЗИРОВАННЫХ КОНЕЧНОСТЕЙ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ *IN VIVO*<sup>\*</sup>**

**DEVELOPMENT OF A COMBINED PLASMID CONSTRUCT ENCODING VEGF165 AND ANG-1  
AND EVALUATION OF ITS EFFECT ON THE RESTORATION  
OF ISCHEMIC LIMB FUNCTION *IN VIVO***

Е. А. Попичева<sup>1</sup>, А. Б. Саченко<sup>1</sup>, В. В. Щур<sup>1</sup>, В. Г. Богдан<sup>2</sup>,  
А. С. Доронькина<sup>3</sup>, С. В. Маньковская<sup>3</sup>, А. В. Янцевич<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск

<sup>2</sup>Национальная академия наук Беларусь, Минск

<sup>3</sup>Институт физиологии НАН Беларусь, Минск

E.A. Popicheva<sup>1</sup>, A.B. Sachanka<sup>1</sup>, V.V. Shchur<sup>1</sup>, V.G. Bogdan<sup>2</sup>,  
A.S. Doronkina<sup>3</sup>, S.V. Mankovskaya<sup>3</sup>, A.V. Yantsevich<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Bioorganic Chemistry NAS of Belarus, Minsk

<sup>2</sup>National Academy of Sciences of Belarus, Minsk

<sup>3</sup>Institute of Physiology NAS of Belarus, Minsk

✉ ekaterinapopicheva@mail.ru

**Аннотация**

Исследование посвящено разработке комбинированной плазмидной конструкции pcDNA\_VEGF165/Ang-1 для лечения хронической ишемии нижних конечностей. Введение плазмиды крысам с моделированной ишемией конечностей показало значительное улучшение кровоснабжения и снижение болевых реакций.

**Abstract**

The study focuses on the development of a combined plasmid construct pcDNA\_VEGF165/Ang-1, for the treatment of chronic limb ischemia. Injection of this plasmid into rats with limb ischemia resulted in significant improvements in tissue perfusion and reductions in pain responses.

Хроническая ишемия нижних конечностей (ХИНК) является одной из самых распространенных и социально значимых патологий сердечно-сосудистой системы человека. Перспективным методом лечения ХИНК является терапевтический ангиогенез, основанный на введении в ишемизированные ткани генетических конструкций (ДНК-плазмид) с генами факторов роста [1]. ДНК-плазмиды, кодирующие гены фактора роста эндотелия сосудов (особенно изоформу VEGF165) и ангиопоэтина-1 (Ang-1), продемонстрировали свою эффективность в лечении ХИНК [2]. Мы предполагаем, что объединение этих двух генов в одной плазмидной конструкции усилит восстановление кровоснабжения и вызовет более выраженный ангиогенез.

Оптимизированные гены для экспрессии белков Ang-1\_VEGF165 в клетках человека синтезировали *de novo*, используя полимеразную цепную сборку. Синтетические гены лигировали в экспрессионный вектор pcDNA 3.1(–) по сайтам рестрикции NheI и HindIII. Плазмиды с генами трансформировали в клетки *E. coli* штамма DH5α и культивировали в ТБ-среде. Полученные клетки подвергали щелочному лизису с последующим удалением клеточного дебриса фильтрацией и концентрированием ультрафильтрацией. Сконцентрированный ретентант обрабатывали детергентом для удаления эндотоксина. Стерилизацию препарата проводили фильтрацией через 0,2 нм полиэфирсульфоновый (PES) фильтр.

Оценку восстановления функций ишемизированных задних конечностей *in vivo* проводили на крысах Wistar (*n* = 40) обоих полов, возрастом 8 месяцев. Введение исследуемой субстанции и апирогенного физиологического раствора (АФР) осуществляли внутримышечно в дозе 100 мкг/кг на 28-е сутки после моделирования ХИНК. Прогрессирование ХИНК оценивали по порогу ноцицептивной реакции (ПНР; тест Рандалла — Селитто) и изменению паттерна походки.

\* Исследование выполнено при поддержке НАН Беларусь, рег. № НИОКТР 20230178.

© Е. А. Попичева, А. Б. Саченко, В. В. Щур, В. Г. Богдан, А. С. Доронькина, С. В. Маньковская, А. В. Янцевич, 2025

В результате культивирования было собрано 115 г клеточной массы, из которой выделено 50 мг плазмидной ДНК. После завершения всех этапов очистки плазмидной ДНК ее содержание в суперскрученной форме составило более 85 %, уровень эндотоксина — менее 5 ЕЭ на 1 мг ДНК, а количество остаточной РНК продукента — менее 2 %, что соответствует международным требованиям к препаратам на основе суперскрученных кольцевых ДНК.

Введение раствора pcDNA-VEGF165/Ang-1 в дозе 100 мкг/кг оказывало протекторное действие и сопровождалось выраженным антиноцицептивным эффектом с 14-х суток после инъекции. Это проявлялось достоверным повышением ПНР на 23 %, увеличением площади отпечатка ипсильатеральной конечности на 50 % и его интенсивности на 24 % по сравнению с показателями до инъекции. К 28-м суткам после инъекции ПНР выросла на 34,0 % у самок и на 40,2 % у самцов, при этом площадь и интенсивность отпечатка травмированной конечности вернулись к исходным значениям.

Таким образом, комбинированная плазмидная конструкция pcDNA-VEGF165/Ang-1 продемонстрировала выраженные антиноцицептивные эффекты, проявляющиеся с 14-х суток, и восстановление функциональной активности конечности к 28-м суткам после введения, что свидетельствует о высоком потенциале препарата как перспективного лекарственного средства.

### Литература

1. Pereira V. B. et al. DNA vaccines approach: from concepts to applications // World J. Vac. 2014. Vol. 4. P. 50–71.
2. Lederman R. J. et al. Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomised trial // The Lancet. 2002. Vol. 359 (9323). P. 2053–2058.