



## Оценка системного распределения и ангиогенного эффекта рI-VEGF165 в модели ишемии конечностей

Юдин М.А.<sup>1</sup>, Плакса И.Л.<sup>2</sup>, Мжаванадзе Н.Д.<sup>3</sup>, Краковский М.А.<sup>2</sup>, Быков В.Н.<sup>1</sup>, Мавликеев М.О.<sup>4</sup>, Исаев А.А.<sup>2</sup>, Калинин Р.Е.<sup>3</sup>, Деев Р.В.<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup> Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации, 194044, Санкт-Петербург, ул. академика Лебедева, 6, лит. Ж

<sup>2</sup> Институт стволовых клеток человека, 129110, Москва, Олимпийский проспект, 18/1

<sup>3</sup> Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова Министерства здравоохранения Российской Федерации, 390026, Рязань, ул. Высоковольтная, 9

<sup>4</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18

Поступила в редакцию 14 октября 2015 г. Принята к печати 29 ноября 2015 г.

Сердечно-сосудистые заболевания, сопровождающиеся ишемией, являются основными причинами смертей в мире. Разработка и интеграция в клиническую практику новых лекарственных препаратов, воздействующих на ишемию, не теряют актуальности. Часть методов регенеративной медицины направлена не только на коррекцию ишемического повреждения тканей, но и индукцию роста кровеносных сосудов. Применение генотерапевтических конструкций, несущих ген одного из факторов роста, обладающих ангиогенной активностью, приводит к индукции роста сосудов микроциркуляторного русла, артериогенезу в области ишемии и может компенсировать нарушение перфузии. Однако возможность системного действия генотерапевтических средств и связанный с этим риск развития заболеваний с неконтролируемым ангиогенезом остаются предметом дискуссий. В исследовании изучены особенности распределения плазмидной генотерапевтической конструкции с геном сосудистого эндотелиального фактора роста, а также ее ангиогенный эффект при экспериментальном эквиваленте хронической ишемии нижней конечности у животных.

**Ключевые слова** • Генная терапия • Хроническая ишемия нижних конечностей • Сосудистый эндотелиальный фактор роста VEGF • Плазида • Фармакокинетика

Хронические облитерирующие заболевания сосудов нижних конечностей – одна из причин инвалидизации населения Российской Федерации [1]. Несмотря на широкое применение ангиохирургических и эндоваскулярных технологий при оказании помощи этой группе пациентов, проблема сохраняется, что обусловлено небольшой длительностью лечебного эффекта при дистальных формах поражения [2]. Современным направлением в этой области является применение генной терапии с целью индукции ангиогенеза. Одним из наиболее используемых векторов при создании генотерапевтических конструкций в контексте ангиогенной терапии хронических облитерирующих заболеваний сосудов нижних конечностей является плазида –

кольцевая двухцепочечная молекула дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК).

Внедрение ангиогенной терапии в клиническую практику требует изучения фармакокинетики генных конструкций. Более 300 клинических исследований проведены с применением генных конструкций на основе плазмиды, однако остаются нерешенными вопросы, связанные с отсутствием стандартных способов оценки ее трансфекционной активности, уровня и продолжительности экспрессии интегрированного гена, а также распределения плазмидной конструкции в тканях пациента, что связано как с особенностями ее структуры, так и этическими нормами проведения клинических исследований [3, 4]. Методы, рутинно при-

меняемые для оценки трансфекции *in vivo* и *in vitro* посредством интеграции в состав вектора гена какого-либо из флуоресцентных белков с последующим анализом на светооптическом уровне, или метод проточной цитометрии не применимы при изучении кинетики препарата у людей. Для оценки экспрессии терапевтического гена и синтеза кодируемого белка можно использовать метод иммуногистохимического исследования биоптатов, полученных из места введения генной конструкции, однако данный способ не обладает специфичностью. Препарат – кольцевая молекула ДНК, поэтому для того чтобы определить его распределение в тканях, можно использовать метод полимеразной цепной реакции. С помощью данного способа, ввиду большого количества нуклеотидов в составе генной конструкции, возможно определить лишь концентрацию ее фрагментов. Это дает косвенное представление о ее распределении, так как не позволяет идентифицировать целостность плазмиды, что является обязательным для функциональной активности препарата. Эффективная лабораторная оценка свойств ангиогенных препаратов на основе плазмиды у пациентов отсутствует, поэтому единственным способом, который приближенно отражает происходящее с генной конструкцией после ее введения, является экспериментальное исследование на животных.

Цель исследования – изучение особенностей распределения генной конструкции, представляющей собой плазмиду с геном сосудистого эндотелиального фактора роста (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF), возможности системного действия и ее ангиогенного эффекта в модели экспериментальной ишемии конечности.

## Материал и методы

Генотерапевтическая конструкция – плазида с геном сосудистого эндотелиального фактора роста, разработанная в Российской Федерации (патент № 2297848 от 11.05.2005, Иткес А.В., Киселев С.Л.).

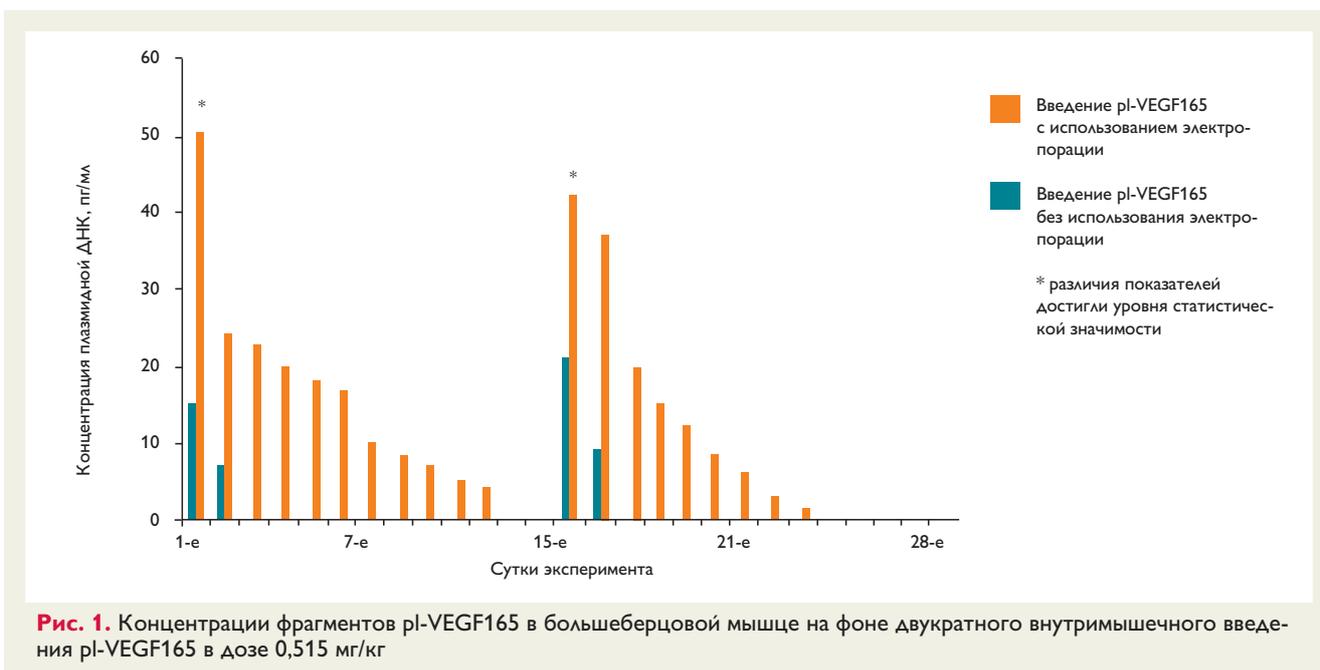
Анализировали 194 животных, которых разделили на две группы в зависимости от этапа исследования. Изучение распределения препарата после его введения проводили на 130 беспородных крысах-самцах (масса 250 г), полученных из питомника РАН «Рапполово» (Санкт-Петербург, Россия). Оценку специфической эффективности провели на 64 мышах линии CD-1 (масса 25–40 г), которых получили из лаборатории Харлан (Израиль).

*Дизайн исследования.* На первом этапе изучали системное распределение pl-VEGF165. Исследуемый препарат вводили двукратно с интервалом в 14 суток внутримышечно в суммарной дозе 0,515 мг/кг, инъекционно с применением или без применения электропорации (электропоратор NEPA21, Nera Gene Co., Ltd., Япония). В зависимости от срока выведения животных из исследования и способа введения pl-VEGF165, всех животных разделили на 13 групп по 10 животных в каждой. В 12 группах вводили pl-VEGF165 внутримышечно, в 6 из них – с применением электропорации, еще одна группа включала интактных животных. Кинетику pl-VEGF165 исследовали в течение 42 суток после первого введения генной конструкции в большеберцовую мышцу.

На втором этапе во второй группе животных оценивали специфическую эффективность pl-VEGF165. Продолжительность исследования – 35 суток с момента создания модели ишемии конечности. При этом животных рандомизировали на 4 группы. В первой терапевтической группе (группа 1) осуществляли местное внутримышечное однократное введение pl-VEGF165 в дозе 50 мкг на 14-е сутки после перевязки бедренной артерии. Во второй терапевтической группе (группа 2) двукратно вводили pl-VEGF165 по 50 мкг на 1-е и 14-е сутки после создания модели ишемии в суммарной дозе препарата 100 мкг. В группе сравнения (группа 3) после перевязки сосуда вводили воду для инъекций. Группа контроля (группа 4) – интактные животные. В качестве критериев эффективности использовали лазерную доплеровскую флоуметрию (ЛДФ) конечности, гистологические и иммуногистохимические методы исследования.

*Методика проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени с ДНК pl-VEGF165.* Концентрацию ДНК pl-VEGF165 оценивали в месте введения и плазме крови. Для этого использовали гомогенат большеберцовой мышцы задней конечности и плазму крови, взятые у животных перед введением pl-VEGF165 (фоновые показатели) и на сроках выведения – 1, 3, 7, 15, 28 и 42-е сутки. Для амплификации применяли праймеры F и R (структуру праймеров нельзя опубликовать).

*Методика проведения иммуноферментного анализа VEGF в плазме крови.* Для определения VEGF165 использовали наборы реагентов компании Qayee Bio «Human Vascular Endothelial Growth Factor 165 (VEGF165) ELISA kit» (Antibodies-online, ABIN1379326, Китай) методом «сэндвич» иммуноферментного анализа. В качестве стандартных образцов применяли Standard 5 000 пг/мл из набора реагентов с последующим двукратным разведе-



дением для построения калибровочной кривой (5 000, 2 500, 1 250, 625, 312, 156, 78 пг/мл).

**Модель ишемии конечности.** Под общей анестезией (севофлюран, 5%) у мышей выполняли разрез кожи в паховой области 1 см. Далее осуществляли лигирование бедренной артерии двумя лигатурами на расстоянии 0,5 см друг от друга, после чего применяли пересечение сосуда между ними и послойное ушивание операционной раны.

**Способ введения генотерапевтической конструкции.** Вводили pl-VEGF165 животным с моделью хронической ишемии нижних конечностей путем внутримышечной инъекции в область послеоперационной раны на 1-е и 14-е сутки после лигирования бедренной артерии.

**Лазерная доплеровская флоуметрия.** Перфузию мягких тканей нижней конечности определяли при помощи бесконтактной лазерной доплеровской флоуметрии (PeriScan PIM II, Perimed, Швеция) на 1, 7, 14, 21, 28 и 35-е сутки после прекращения кровотока по бедренной артерии. Для сравнения результатов использовали отношения показателя ЛДФ ишемизированной конечности к здоровой конечности контралатеральной стороны.

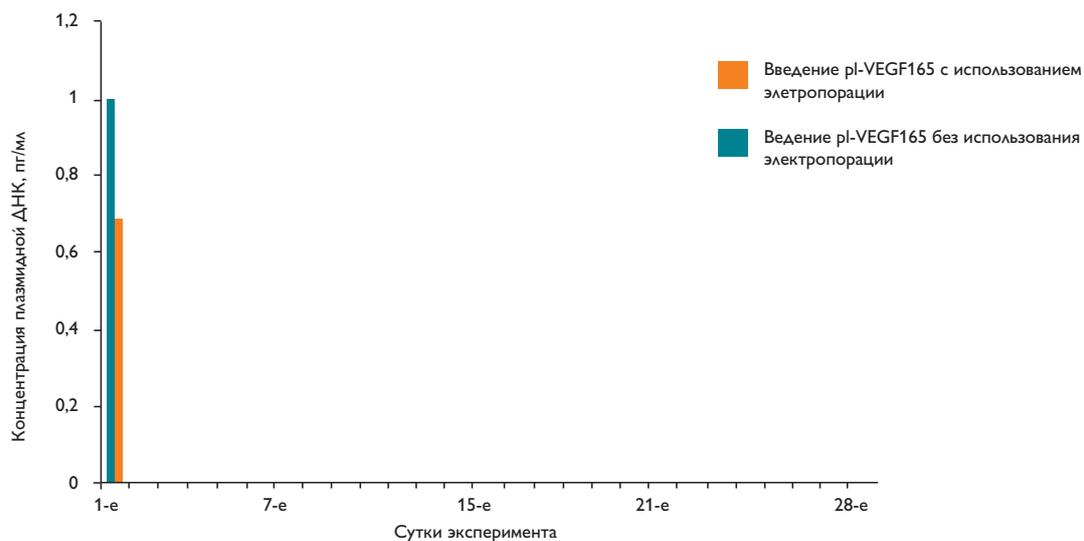
**Гистологические методы.** Для патогистологической оценки изменений скелетной мышечной ткани на фоне введения pl-VEGF165 применяли медиальную часть четырехглавой мышцы бедра. Окрашивали полученные образцы ткани двумя способами: гематоксилином и эозин

ом и Sirius Red/Fast Green (Chondrex, Inc.), для ряда образцов выполнили иммуногистохимические реакции с антителами к CD34 и гладкомышечному  $\alpha$ -актину для определения количества капилляров и артериол. Также использовали иммуногистохимическую реакцию к ядерному антигену Ki-67 для определения уровня пролиферации. Обработку материала проводили на микроскопе Leica DM 2500 (Германия), фотосъемку осуществляли цифровой фотокамерой Leica DFC 490 с программным пакетом Leica Image Manager (Германия).

**Статистический анализ.** Для сравнения средних величин показателей и установления достоверности различий с группой сравнения проводили статистическую обработку по непараметрическому тесту Манна – Уитни. Для сравнения средних величин и установления достоверности различий с фоном использовали непараметрический критерий для парных сравнений Вилкоксона. Для оценки значимости межгрупповых различий альтернативных показателей применяли  $\chi^2$ -критерий Пирсона и точный метод Фишера. Различия по сравнению с контролем считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты

**Характеристика распределения pl-VEGF165.** Наличие фрагментов pl-VEGF165 в области введения без использования электропорации наблюдали на 1-е и 15-е сутки в пробах, полученных от 8 из 10 и 9 из 10 животных



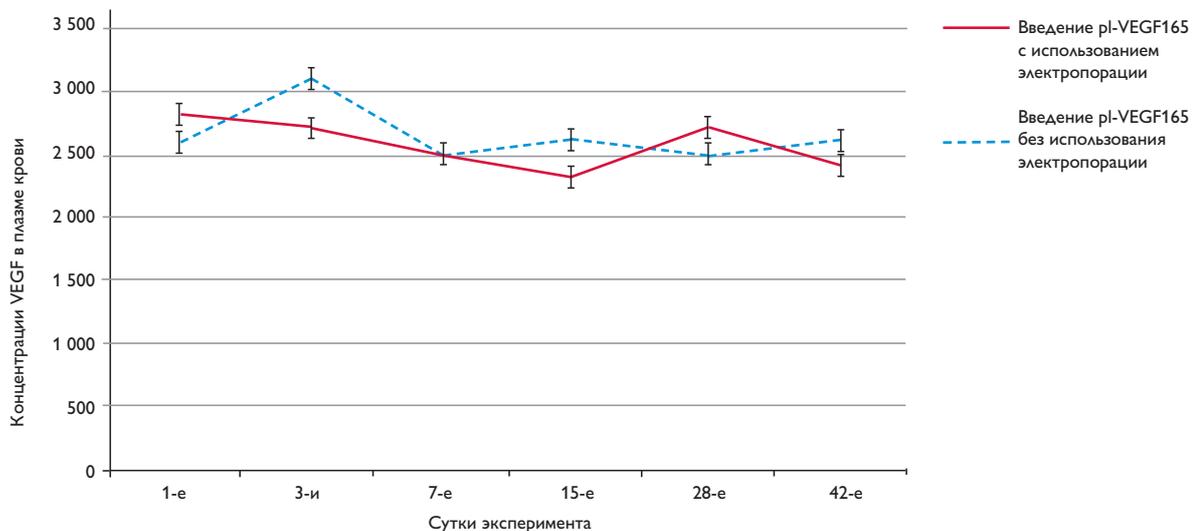
**Рис. 2.** Концентрации фрагментов pl-VEGF165 в плазме крови на фоне двукратного внутримышечного введения pl-VEGF165 в дозе 0,515 мг/кг

соответственно срокам; средние значения концентрации –  $15,25 \pm 1,305$  и  $21,83 \pm 5,594$  пг/мг.

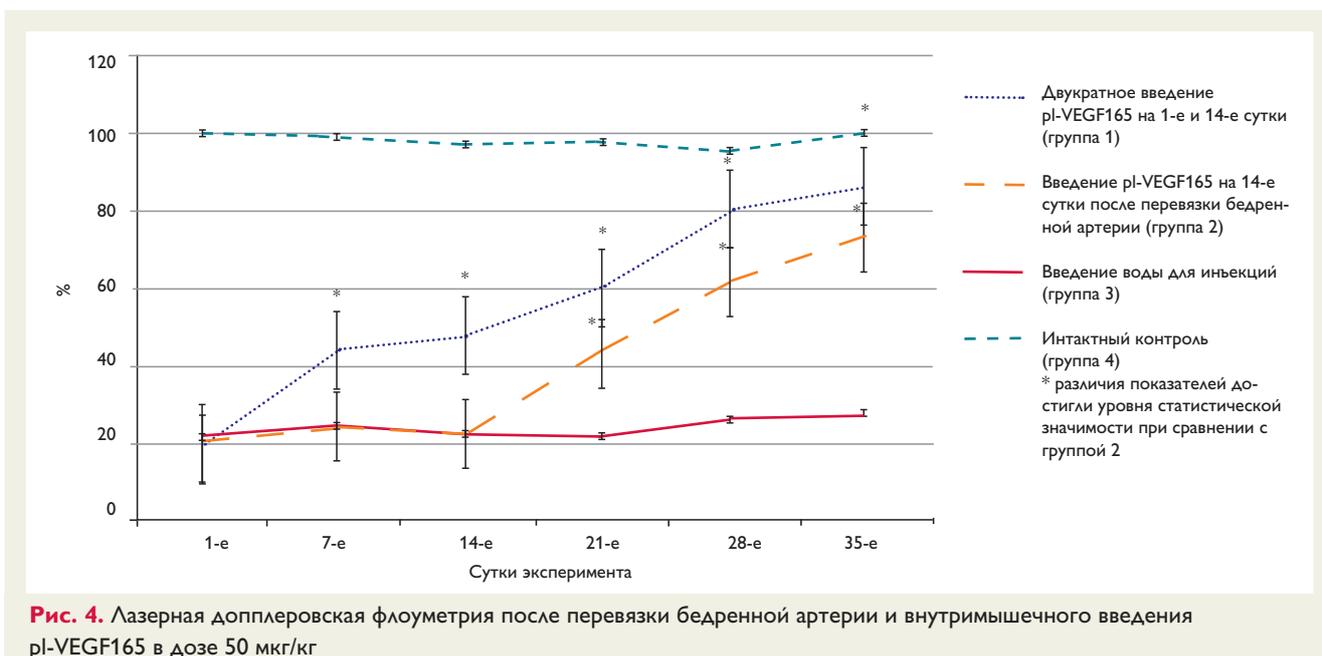
При применении электропорации уровень pl-VEGF165 в первые сутки достоверно более чем в 3 раза превосходил аналогичный показатель без использования этого метода и составил  $50,19 \pm 13,952$  пг/мг. Влияние физического вектора обеспечивало сохране-

ние концентрации фрагментов pl-VEGF165 в области ее введения через 3 и 7 суток на уровне  $24,04 \pm 5,253$  и  $16,16 \pm 8,003$  пг/мг соответственно (рис. 1).

На 15-е сутки после внутримышечного введения с применением электропорации содержание pl-VEGF165 более чем в 2,5 раза превышало показатели, соответствующие изолированному внутримышечному введе-



**Рис. 3.** Концентрации VEGF в плазме крови на фоне двукратного внутримышечного введения pl-VEGF165 в дозе 0,515 мг/кг

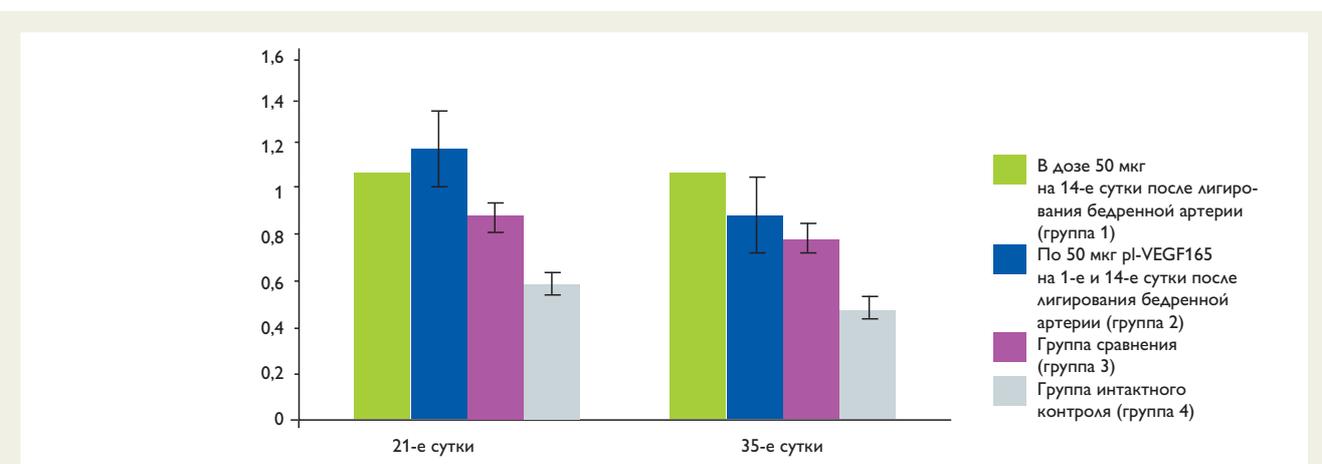


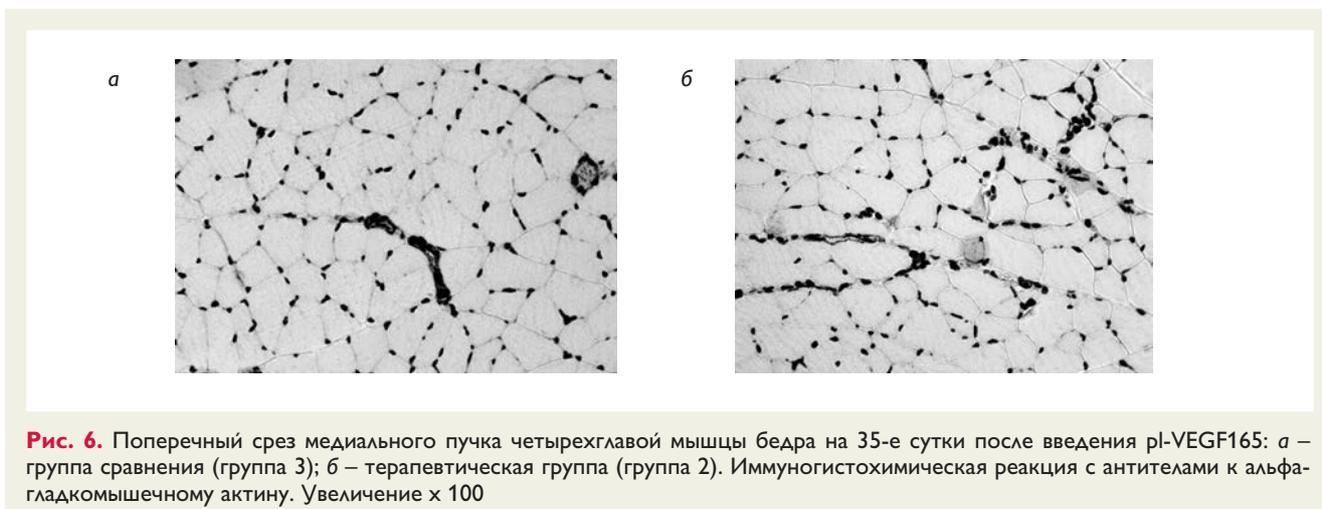
нию. При изучении кинетики pl-VEGF165 на поздних сроках (28–42-е сутки) ее фрагменты в месте введения (большеберцовая мышца) не обнаружили.

При оценке концентрации фрагментов pl-VEGF165 в плазме крови на первые сутки наличие плазмидной ДНК выявили только в 50% проб, взятых только после первого введения генной конструкции. Средняя концентрация составила  $1,009 \pm 0,0927$  пг/мл при изолированном внутримышечном введении и  $0,783 \pm 0,1017$  пг/мл с использованием электропорации при отсутствии идентификации ее фрагментов в группе контроля (рис. 2).

В результате проведения иммуноферментного анализа у животных интактной группы концентрация человеческого VEGF165 в плазме крови животных составила  $2713,3 \pm 47,48$  пг/мл. На фоне введения pl-VEGF165 отсутствовало достоверное системное увеличение концентрации VEGF165 вне зависимости от применяемого способа введения (рис. 3).

Таким образом, на первом этапе выполнили косвенную оценку распределения pl-VEGF165 за счет определения концентрации ее фрагментов при помощи полимеразной цепной реакции и оценку потенциального





**Рис. 6.** Поперечный срез медиального пучка четырехглавой мышцы бедра на 35-е сутки после введения pl-VEGF165: а – группа сравнения (группа 3); б – терапевтическая группа (группа 2). Иммуногистохимическая реакция с антителами к альфа-гладкомышечному актину. Увеличение  $\times 100$

системного эффекта путем измерения концентрации VEGF в плазме крови. На втором этапе исследовали специфическую эффективность pl-VEGF165 в модели ишемии нижней конечности. За время его проведения выбыли два животных: одно погибло во время наркоза, другое из группы 4 погибло через 8 суток после перевязки бедренной артерии.

*Оценка ангиогенного эффекта pl-VEGF165 в эксперименте.* По данным лазерной доплеровской флоуметрии на следующие сутки после перевязки бедренной артерии у всех животных определяли выраженное снижение перфузии мягких тканей. Однако введение pl-VEGF165 сопровождалось достоверным улучшением показателей ЛДФ у животных обеих терапевтических групп относительно группы сравнения (рис. 4). При этом у животных группы 2 достоверное увеличение показателей наблюдали уже на 7-е сутки. В группе 1 динамика восстановления параметров ЛДФ характеризовалась достоверным улучшением показателей начиная с 21-х суток после перевязки бедренной артерии и на 7-е сутки после применения pl-VEGF165. На 35-е сутки показатели ЛДФ терапевтических групп 1 и 2 соответственно составляли  $86 \pm 9$  и  $73 \pm 6\%$  относительно нормы.

Применение селективной окраски эндотелиальных клеток при иммуногистохимической реакции с антителами к CD34 направлено на определение количества капилляров и составляющих их эндотелиальных клеток на единицу площади поперечного среза четырехглавой мышцы как критерия эффективности ангиогенного эффекта генной конструкции, выражающегося в увеличении количества сосудов микроциркуляторного русла.

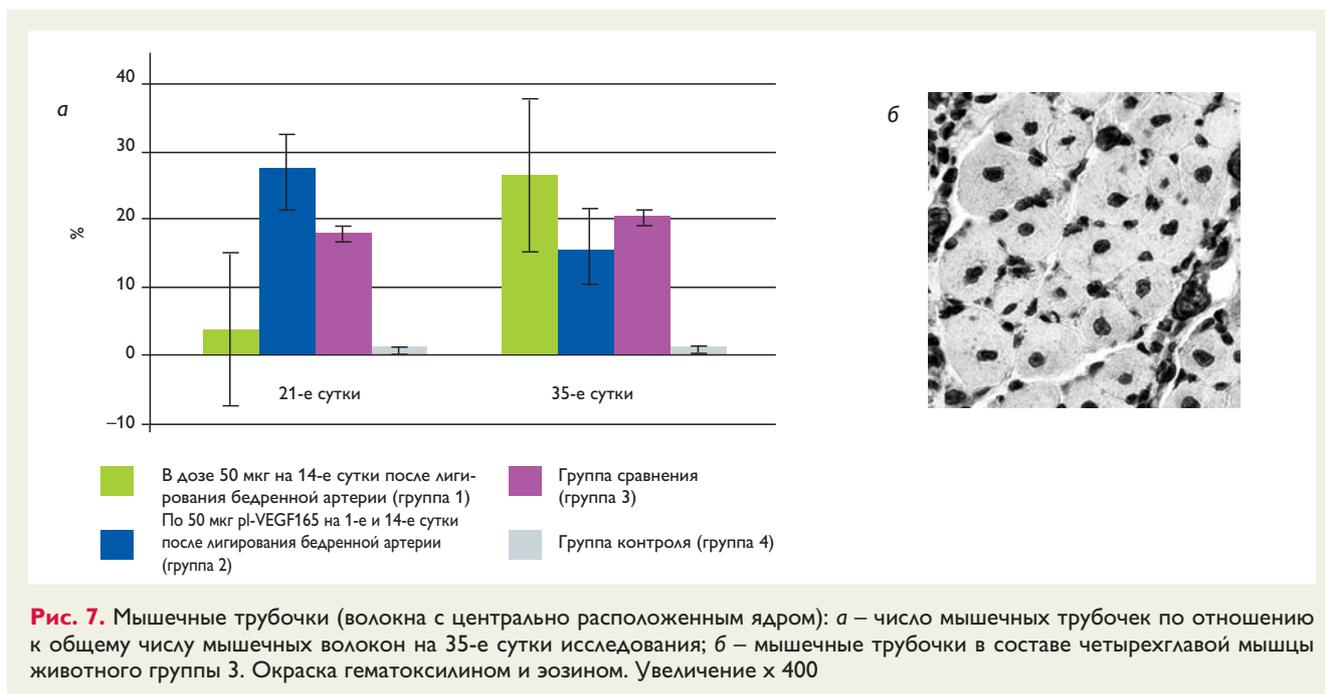
Введение pl-VEGF165 сопровождалось увеличением числа эндотелиальных клеток относительно животных

группы 3, однако различия показателей не достигли уровня статистической значимости на 21-е и 35-е сутки (рис. 5).

Ангиогенный эффект pl-VEGF165 также оценивали при помощи иммуногистохимической реакции с антителами к гладкомышечному альфа-актину за счет селективной окраски гладкомышечных клеток в составе стенки сосудов. При введении плазмидной конструкции в обеих терапевтических группах наблюдали тенденцию к увеличению их плотности (рис. 6), однако различия показателей не достигли статистической значимости за срок, отведенный для эксперимента.

При изучении образцов четырехглавой мышцы бедра, окрашенных гематоксилином и эозином, полученных после выведения на 35-е сутки, ни в одной группе животных не обнаружили признаков некроза, воспаления или увеличения количества соединительной ткани. В качестве критерия оценки репаративной регенерации скелетной мышечной ткани, последовавшей за нарушением магистрального кровотока, оценивали количество мышечных трубочек с центрально расположенными ядрами на единицу площади. В образцах, полученных на 35-е сутки (группы с введением pl-VEGF165), наблюдали большее количество мышечных трубочек с центрально расположенным ядром, хотя различия показателей не достигли уровня статистической значимости (рис. 7).

При изучении образцов скелетной мышцы, окрашенных Sirius Red/Fast Green (Chondrex, Inc.), оценивали признаки атрофии и выраженности фиброза четырехглавой мышцы вследствие резкого снижения магистрального кровотока. Для оценки выраженности атрофии рассчитывали средний диаметр мышечных



трубочек на единицу площади ( $\text{мкм}^2$ ). Ни у одного животного не выявили признаков гиперплазии соединительной ткани. При сравнении показателей среднего диаметра мышечных трубочек не обнаружили статистически значимой разницы между группами.

Уровень пролиферации скелетной мышечной ткани оценивали подсчетом количества ядер, окрашенных антителами к Ki67 (рис. 8). Проллиферация в четырехглавой мышце наблюдали во всех группах лишь в течение первой недели после перевязки бедренной артерии, что выражалось достоверным увеличением количества ядер, окрашенных с антителами к Ki67, однако различия показателей не достигли уровня статистической достоверности. В образцах, полученных на 21-е и 35-е сутки, признаки пролиферации отсутствовали у животных всех групп.

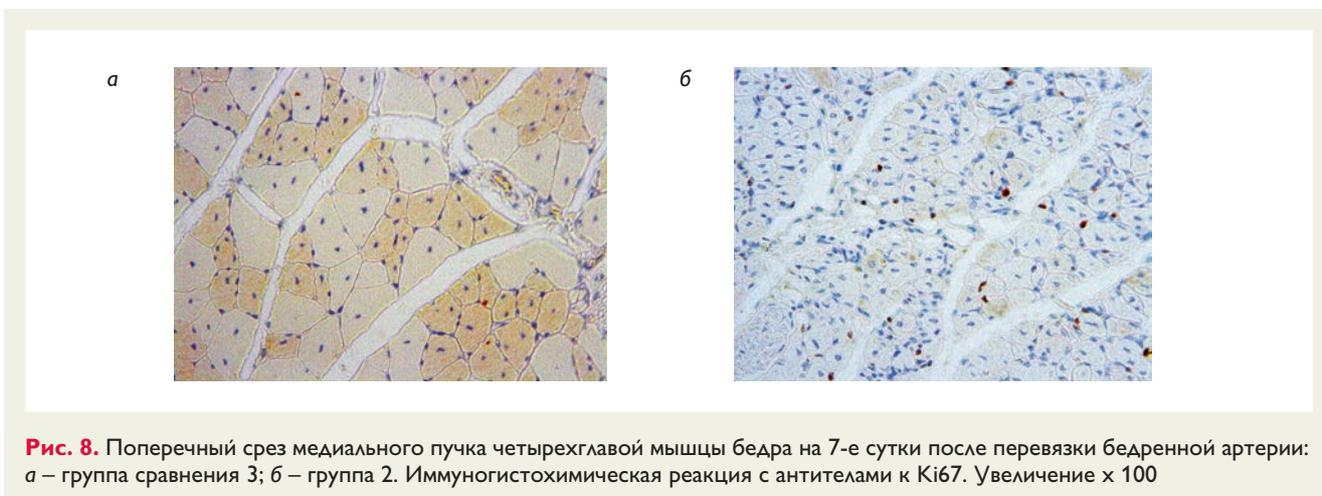
## Обсуждение

Несмотря на накопленный опыт применения генотерапевтических препаратов, сохраняется настороженность относительно их безопасности [4]. Это обусловлено тем, что ангиогенные факторы роста и увеличение эндогенного синтеза, который лежит в основе гипертрофированной индукции роста и развития сосудов микроциркуляторного русла, теоретически могут являться звеньями патогенеза ряда заболеваний. Несмотря на то что по результатам рандомизированных исследований

не выявили увеличения частоты развития онкологических заболеваний или прогрессирования осложнений сахарного диабета на фоне применения ангиогенной терапии, предпочтение отдается генотерапевтическим конструкциям, ангиогенный эффект которых может быть реализован локально, непосредственно в ишемизированных тканях [5]. Одним из основных требований, предъявляемым к генотерапевтическим ангиогенным конструкциям, является отсутствие системного действия. Использование генотерапевтических конструкций на базе плазмиды более предпочтительно, что обусловлено их меньшей устойчивостью в кровеносном русле.

При местном введении фрагменты pl-VEGF165 по данным полимеразной цепной реакции определялись у большинства животных лишь в первые сутки после введения. Использование электропорации достоверно увеличивало количество плазмидной ДНК в области ее внутримышечного введения по сравнению с внутримышечным введением без электропорации, что подтверждает гипотезу увеличения эффективности трансфекции при использовании физических методов [6]. Иными словами, значительная часть препарата остается в тканях и клетках, а не выходит в циркуляцию.

Изучение концентрации фрагментов pl-VEGF165 в плазме крови показало, что в кровоток попадает незначительное количество генной конструкции (или ее



**Рис. 8.** Поперечный срез медиального пучка четырехглавой мышцы бедра на 7-е сутки после перевязки бедренной артерии: а – группа сравнения 3; б – группа 2. Иммуногистохимическая реакция с антителами к Ki67. Увеличение  $\times 100$

фрагментов), при этом в кровеносном русле плазида разрушается к исходу первых суток, что доказано в результате полимеразной цепной реакции. По данным литературы, период полужизни плазмидных конструкций зачастую не превышает нескольких часов после внутримышечной инъекции или внутривенного введения [7]. Таким образом, увеличение локальной концентрации в месте введения не сопровождалось значимым увеличением концентрации pl-VEGF165 в плазме крови и продолжительности ее циркуляции в кровеносном русле, что также подтверждает низкую устойчивость генной конструкции за пределами места введения.

В результате иммуноферментного анализа показано наличие фактора роста сосудов у крыс (по структуре схожего с человеческим). При этом введение pl-VEGF165 не сопровождалось достоверным подъемом концентрации VEGF165 в плазме крови в течение первых суток после инъекции, что свидетельствует об отсутствии системного действия препарата. Таким образом, системный эффект препарата, выражающийся в возможности индукции роста сосудов в тканях, отдаленных от места введения, отсутствует.

Введение генной конструкции сопровождалось достоверным улучшением перфузии, по данным ЛДФ, у животных с моделью хронической ишемии нижних конечностей. При этом улучшение показателей кровообращения достоверно соотносилось по времени с введением pl-VEGF165, что показано в группе 2. Результаты инструментальных исследований существенно дополняла патогистологическая картина образцов скелетной мышечной ткани конечности на стороне перевязки. Введение pl-VEGF165 сопровождалось увеличением количества сосудов микроциркуляторного русла

и более выраженной регенерацией поперечно-полосатой мышечной ткани четырехглавой мышцы бедра. Однако для достижения статистической значимости выявленных тенденций целесообразно увеличить срок наблюдения за животными и их количество. Таким образом, полученные данные позволили предположить связь восстановления перфузии тканей нижней конечности с индукцией ангиогенеза.

Отсутствие системного действия препарата в сочетании с увеличением количества сосудов микроциркуляторного русла и восстановлением перфузии в месте введения позволяет рассматривать pl-VEGF165 как локальный индуктор ангиогенеза. Следовательно, терапевтический эффект pl-VEGF165 достигается за счет экспрессии целевого гена непосредственно в тканях в области введения, и генная конструкция не оказывает системного действия ввиду ее быстрой деградации в кровеносном русле. Отсутствие статистической достоверности в большинстве гистологических и иммуногистохимических методах исследования может являться следствием высоких потенциалов к репаративной регенерации у лабораторных животных (в отличие от человека с длительно протекающим заболеванием), не позволяющих идентифицировать достоверного различия показателей выбранных критериев оценки ангиогенного эффекта pl-VEGF165. Но по одному из основных критериев оценки – количеству капилляров, окрашенных с антителами к CD34, – в терапевтических группах наблюдали положительную тенденцию, сопровождающуюся достоверным улучшением перфузии.

Результаты исследования соотносятся с данными научной литературы. Терапевтические конструкции с генами ангиогенных факторов роста можно использо-

вать с целью коррекции ишемии при различных нозологиях. Применение плазмидной конструкции с геном аденомедулина в модели ишемии нижней конечности у кроликов продемонстрировало достоверное увеличение коллатералей и показателей магистрального кровотока [8]. В другом исследовании введение в периинфарктную зону стенки левого желудочка плазмидной конструкции с геном тромбоцитарного фактора роста обеспечило уменьшение объема некротизированной ткани, что коррелировало с менее выраженным апоптозом кардиомиоцитов и увеличением количества сосудов микроциркуляторного русла на поперечном срезе [9]. У животных с экспериментальной диабетической кардиомиопатией на фоне стрептозоцин-индуцированного сахарного диабета выявили, что снижение экспрессии и эндогенного синтеза VEGF в тканях миокарда является одним из основных звеньев патогенеза снижения сократительной функции левого желудочка. Введение pl-VEGF165 обеспечило сохранение функциональных показателей, что коррелировало с увеличением плотности капиллярной сети, снижением интенсивности апоптоза эндотелиальных клеток и кардиомиоцитов, а также увеличением концентрации предшественников эндотелиальных клеток в периферической крови [10]. Еще одним потенциальным результатом адресной цитокиновой терапии является активация локальных стволовых клеток, которые помимо эффекта васкуляризации могут привести к продуктивному кардиомиогенезу в области повреждения миокарда. Так, у животных с экспериментальной ишемией миокарда, создаваемой путем перевязки левой огибающей артерии, эндокардиальное введение pl-VEGF165 индуцирует митоз кардиомиоцитов, что выражалось достоверным увеличением количества ядер в состоянии митоза при иммуногистохимическом окрашивании с антителами к Ki67 и MCM5, сопровождаемым достоверным улучшением функции левого желудочка [11].

Таким образом, ангиогенный эффект в ишемизированных тканях при применении генных конструкций реализуется посредством нескольких не до конца изученных механизмов. Однако результативность подхода, доказанная в доклинических и клинических исследованиях, в сочетании с отсутствием системного действия и возможностью достижения терапевтического эффекта локально в месте введения позволяет рассматривать его как безопасный инструмент в комплексном лечении заболеваний, ведущим фактором патогенеза которых является ишемия.

*Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (При-*

*волжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров. Теоретическая часть работы поддержана грантом Российского научного фонда (№14-15-00916).*

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

## Список литературы:

1. Павлинский С.Л., Шабалкин П.И., Исаев А.А., Деев Р.В. Оценка стоимости-эффективности геннотерапевтического препарата «Неоваскулген» в лечении хронической ишемии нижних конечностей // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. 2014. № 2. С. 54–59.
2. Кунгурцев В.В., Дибиров М.Д., Шиманко А.И. Реконструктивные операции при критической ишемии у лиц пожилого и старческого возраста с бедренно-подколенно-берцовой окклюзией // Ангиология и сосудистая хирургия. 1998. № 2. С. 180.
3. Wiley Gene Therapy Clinical Trials Worldwide [интернет]. Режим доступа: <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>
4. Gupta R., Tongers J., Losordo D.W. Human studies of angiogenic gene therapy // Circ. Res. 2009. Vol. 9. P. 724–36.
5. Douglas L., Tongers J., Losordo D.W. Human Studies of Angiogenic Gene Therapy // Circ. Res. 2009. Vol. 105. № 8. P. 724–736.
6. Houk B.E., Hochhaus G., Hughes J.A. Kinetic modeling of plasmid DNA degradation in rat plasma // AAPS PharmSci. 1999. Vol. 1. № 3. P. 9.
7. Wolff J.A., Dowty M.E., Jiao S., Repetto G., Berg R.K., Ludtke J.J., Williams P., Slaughterback D.B. Expression of naked plasmids by cultured myotubes and entry of plasmids into T tubules and caveolae of mammalian skeletal muscle // J. Cell Sci. 1992. Vol. 103. № 4. P. 1249–1308.
8. Tokunaga N., Nagaya N., Shirai M., Tanaka E., Ishibashi-Ueda H., Harada-Shiba M., Kanda M., Ito T., Shimizu W., Tabata Y., Uematsu M., Nishigami K., Sano S., Kangawa K., Mori H. Adrenomedullin gene transfer induces therapeutic angiogenesis in a rabbit model of chronic hind limb ischemia // Circulation Res. 2004. Vol. 109. P. 526–531.
9. Li W., Tanaka K., Ihaya A., Fujibayashi Y., Takamatsu S., Morioka K., Sasaki M., Uesaka T., Kimura T., Yamada N., Tsuda T., Chiba Y. Gene therapy for chronic myocardial ischemia using platelet-derived endothelial cell growth factor in dogs // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2005. Vol. 288. P. 408–415.
10. Laguens R., Cabeza Meckert P., Vera Janavel G., Del Valle H., Lascano E., Negroni J., Werba P., Cuniberti L., Martínez V., Melo C., Papouchado M., Ojeda R., Criscuolo M., Crottogini A. Entrance in mitosis of adult cardiomyocytes in ischemic pig hearts after plasmid-mediated rhVEGF165 gene transfer // Gene Therapy. 2002. Vol. 9. P. 1676–1681.
11. Yoon Y.S., Uchida S., Masuo O., Cejna M., Park J.S., Gwon H.C., Kirchmair R., Bahlman F., Walter D., Curry C., Hanley A., Isner J.M., Losordo D.W. Progressive attenuation of myocardial vascular endothelial growth factor expression is and recovery of cardiac function in diabetic cardiomyopathy after replenishment of a seminal event in Diabetic Cardiomyopathy: Restoration of Microvascular Homeostasis Local Vascular Endothelial Growth Factor // Circulation. 2005. Vol. 111. P. 2073–2085.

### Estimation of systemic distribution and angiogenic effect of pl-VEGF165 in the model of limb ischemia

Yudin M.A.<sup>1</sup>, Plaksa I.L.<sup>2\*</sup>, Mzhavanadze N.D.<sup>3</sup>, Krakovskii M.A.<sup>2</sup>, Bykov V.N.<sup>1</sup>, Mavlikeev M.O.<sup>4</sup>, Isaev A.A.<sup>2</sup>, Kalinin R.E.<sup>3</sup>, Deev R.V.<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup> S. Kirov Institute of Experimental Medicine of Military Medical Academy, Lit. Zh 6 Lebedev St., 194044 Saint-Petersburg, Russian Federation

<sup>2</sup> Human Stem Cell Institute, 18/1 Olimpiiskii Avenue, 129110 Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup> Academician I. Pavlov Ryazan State Medical University, 9 Vysokovol'tnaya St., 390026 Ryazan, Russian Federation

<sup>4</sup> Kazan (Volga region) Federal University, 18 Kremlevskaya St., 420008 Kazan, Russian Federation

\* Corresponding author. Email: i.plaksa2014@yandex.ru

The group of cardio-vascular diseases accompanied by ischemia is the leading cause of a death in the world. Regarding this issue, creating the novel pharmacy drugs reducing ischemia and integrating them in a routine clinical practice is pivotal. The therapeutic angiogenesis with gene therapy drugs is considered like a prospective approach at this field. The gene constructions included a gene one of the angiogenic growth factors can be used as an instrument for blood flow restoration in ischemic tissues by increasing an amount of microvascular vessels. However, there are some traditional safety precautions and concerns connected with its potential systemic effect which can cause vessels growth on the distance and lead to complications. In this paper pharmacokinetic qualities of gene construction on a base of plasmid with a gene of vascular endothelial growth factor are described. The efficiency of an angiogenic effect was estimated on animal model with chronic ischemia of lower limb.

**Key words:** gene therapy; chronic limb ischemia; vascular endothelial growth factor; VEGF; plasmid; pharmacokinetics

Received 14 October 2015. Accepted 29 November 2015.