

*И. В. Саматошенков*

## СТИМУЛИРОВАНИЕ АНГИОГЕНЕЗА СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ КРЫСЫ ПУТЕМ ПРЯМОГО И КЛЕТОЧНО-ОПОСРЕДОВАННОГО ВВЕДЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ГЕНА АНГИОГЕНИНА

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — проф. Ю. А. Чельшев), ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава РФ

**Цель** — оценить эффективность реваскуляризации икроножной мышцы крысы в условиях прямой и опосредованной мононуклеарными клетками крови пуповины человека (МККП) доставки в область ишемии рекомбинантного гена ангиогенина (Ang) человека при помощи аденовирусного вектора 5-го серотипа (Ad5).

**Материал и методы.** Исследования проведены на 30 крысах линии Wistar. Через 14 сут после иссечения фрагмента бедренной артерии животным инъецировали в ишемизированную икроножную мышцу генетическую конструкцию (группа Ad5-Ang, n=15). Крысам другой группы (МККП+Ad5-Ang, n=15) в тот же срок трансген доставляли в мышцу при помощи МККП. В группе контроля животным (n=15) вводили в мышцу 0,9% NaCl в тех же условиях. Через 14 и 28 сут в области ишемии оценивали отношение капилляры/мышечные волокна, количество мышечных волокон и количество мышечных волокон с центральным расположением ядер (МЦЯ). Капилляры идентифицировали по локализации эндотелиальных клеток, выявляемых при помощи иммуногистохимической реакции с антителами против CD31.

**Результаты.** На 14-е сутки после введения МККП+Ad5-Ang показатель отношения количества капилляров к количеству мышечных волокон в области ишемии увеличивается на 57% ( $p<0,05$ ). На 28-е сутки в группе МККП+Ad5-Ang и в группе Ad5-Ang значимые различия по данному показателю при сравнении с контрольной группой не выявлены. Количество мышечных волокон на 14-е сутки в группе Ad5-Ang не изменяется, а в группе МККП+Ad5-Ang — уменьшается на 58,4% ( $p<0,05$ ). К 28-м суткам этот показатель в группе МККП+Ad5-Ang уменьшается на 95,9% ( $p<0,05$ ), а в группе Ad5-Ang — на 197,8% ( $p<0,05$ ). Количество МЦЯ существенно увеличивается в обеих экспериментальных группах с применением генетических конструкций на 14-е сутки.

**Выводы.** Введение рекомбинантного гена Ang в область ишемии скелетной мышцы или его доставка в эту область при помощи мононуклеарных клеток крови пуповины стимулирует ангиогенез и постшемическую регенерацию мышечных волокон.

**Ключевые слова:** скелетная мышца, ишемия, ангиогенез, ангиогенин, мононуклеарные клетки крови пуповины, аденовирусный вектор

Введение. Согласно популяционным исследованиям, распространенность хронической ишемии нижних конечностей (ХИНК) достигает 10% [15]. С начала XXI в. отмечен рост количества пациентов с этой патологией более чем на 23% [13]. В настоящее время задача по поиску способов эффективного лечения пациентов с облитерирующими заболеваниями артерий, приводящих к ХИНК, остается актуальной проблемой ангиологии и сосудистой хирургии, прежде всего, в связи с высокой распространенностью данной патологии, трудностями и длительностью лечения, его высокой стоимостью, а также степенью инвалидизации данной категории пациентов.

В 1993 г. M.Nöckel предложил стимулировать ангиогенез в ишемизированной ткани при помощи ангиогенных факторов, например, сосу-

дистого эндотелиального фактора роста (VEGF) [14]. Более 15 лет проводятся экспериментальные и клинические исследования с применением генетических конструкций для лечения ХИНК. В этом направлении активно изучают гены VEGF, факторов роста фибробластов (FGF), трансформирующего фактора роста- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), тромбоцитарного фактора роста (PDGF) и фактора роста гепатоцитов (HGF). Эффекты генотерапевтических конструкций изучали на различных экспериментальных моделях: ишемии задних конечности у крыс и кроликов, острой и хронической ишемии миокарда у собак и мини-свиней. Показано, что введение генов факторов роста стимулировало развитие новых коллатералей и капилляров [9, 11, 12, 17].

В эксперименте на модели ишемии конечности крысы показано, что плазмиды с геном Ang

### Сведения об авторе:

Саматошенков Игорь Валерьевич (e-mail: [mr.samatoshenkov@mail.ru](mailto:mr.samatoshenkov@mail.ru)), кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии, ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 420012, г. Казань, ул. Бутлерова, 49

обладают выраженным стимулирующим влиянием на ангиогенез [3]. В другом исследовании показано усиление перфузии в ишемизированной скелетной мышце крысы на 30 % от исходного уровня при внутримышечном введении плазмидного вектора с геном Ang [1]. Таким образом, введение генетических конструкций, полученных методом генной инженерии, в ткани, испытывающие ишемию, обеспечивает длительный синтез ростовых факторов, что в результате ведет к развитию выраженного коллатерального русла и, следовательно, к увеличению перфузии ткани и снижению степени ишемии.

В экспериментальных и клинических условиях показано стимулирующее влияние ангиогенина (Ang) на ангиогенез в ишемизированной скелетной мышце, что проявляется в усилении перфузии ишемизированной ткани и увеличении количества капилляров [2, 3, 5]. В эксперименте на хориоаллантоисной оболочке куриных эмбрионов и модели ишемии конечности крысы показано, что плазмиды с геном Ang обладают ангиогенной активностью. В исследованиях на пациентах показано уменьшение выраженности ишемии конечности, что подтверждено данными доплерографической флуориметрии и тестирования двигательной функции на беговой дорожке [3]. Изучены эффекты введения плазмид с генами VEGF и Ang, а также вирусных векторных конструкций CEL0-Ang, Ad5-Ang, Ad5-(Ang+VEGF) при введении их в ишемизированные нижние конечности у пациентов [2]. При использовании этих генетических конструкций было выявлено увеличение расстояния безболевого ходьбы, улучшение перфузии мышцы, уменьшение времени восстановления исходных показателей кровотока и повышение качества жизни. Введение генетических конструкций приводило к развитию системной воспалительной реакции, однако в случае использования аденовирусных векторов ее выраженность была минимальной [2]. При внутримышечном введении плазмидного вектора со встроенными ангиогенными генами достигается эффективное стимулирование ангиогенеза в ишемизированных конечностях [7].

Для проведения клеточно-опосредованной терапии наиболее перспективными на сегодняшний день представляются мононуклеарные клетки крови пуповины (МККП). Основанием для их применения являются пригодность как для алло-, так и для аутотрансплантации у человека, низкая иммуногенность, доступность, простота получения и хранения. В крови пуповины присутствуют стволовые клетки, являющиеся источником многочисленных ростовых и трофических

факторов и способные давать начало специализированным клеткам разных тканей и стимулировать ангиогенез [16].

Процедура введения МККП малоинвазивна и, согласно многочисленным экспериментальным данным, эффективна [10, 15].

Цель данного исследования — оценить эффективность реваскуляризации ишемизированной скелетной мышцы крысы при введении в область ишемии рекомбинантного гена Ang, а также при его доставке с помощью МККП.

Материал и методы. Исследования были проведены на 45 крысах линии Wistar (обоих полов массой 180–250 г). Все вмешательства соответствовали правилам, утвержденным локальным этическим комитетом Казанского медицинского университета (выписка из протокола заседания № 2 ЛЭК КГМУ от 20.02.2018 г.). Все крысы получали стандартный лабораторный корм и имели доступ к воде и пище. Животных наркотизировали внутрибрюшинной инъекцией раствора хлоралгидрата (80 мг/мл, 0,4 мл на 100 г, Sigma, США). Ишемию задней конечности создавали путем наложения на бедренную артерию диаметром 1 мм двух лигатур из проленовой нерассасывающейся нити Ethicon (4/0) на расстоянии 3 мм между лигатурами. Участок между лигатурами рассекали, проводили визуальный контроль гемостаза. Рану ушивали наглухо рассасывающимся шовным материалом Vicril Ethicon (3/0). После операции животные получали инъекцию 1 мл разведенного в физиологическом растворе цефтриаксона (Борисовский завод медицинских препаратов, Беларусь) в мышцу бедра на контралатеральной конечности. В экспериментах использовали аденовирусный вектор 5-го типа с встроенной экспрессионной конструкцией, несущей ген Ang (Ad5-Ang). В качестве носителей гена использовали МККП.

Через 14 сут после операции крыс разделили на 3 группы. Животным 1-й группы (n=15) однократно вводили 60 мкл Ad5-Ang в 4 точки дистальной части икроножной мышцы, по 15 мкл в каждую точку, с общим количеством вирусных частиц  $2 \times 10^{10}$  (группа Ad5-Ang). Животным 2-й группы (n=15) однократно вводили  $2 \times 10^6$  МККП, трансдуцированные Ad5-Ang, в 4 точки дистальной части икроножной мышцы по 15 мкл в каждую точку (группа МККП+Ad5-Ang). Животным 3-й группы (n=15) инъецировали физиологический раствор в объеме 60 мкл на одно животное в те же точки (группа контроля).

Через 14 и 28 сут после введения генетической конструкции животных наркотизировали и транскардиально перфузировали 4% раствором параформальдегида (4 °C). Икроножную мышцу забирали и обрабатывали по стандартной методике для последующего иммуногистохимического анализа. Икроножную мышцу забирали и заливали в парафин по стандартной методике. Изготавливали поперечные срезы мышц толщиной 5 мкм и использовали их для гистохимического и иммуногистохимического анализа.

Для морфометрического анализа мышечных волокон и подсчета центрально-ядерных волокон применяли окрашивание поперечных срезов гематоксилином. Для определения васкуляризации проводили иммуногистохимическую реакцию с антителами против CD31 (ab182981, abcam) эндотелия сосудов, для визуализации использовали вторичные антитела ослы к IgG кролика, конъюгированные с флюорохромом

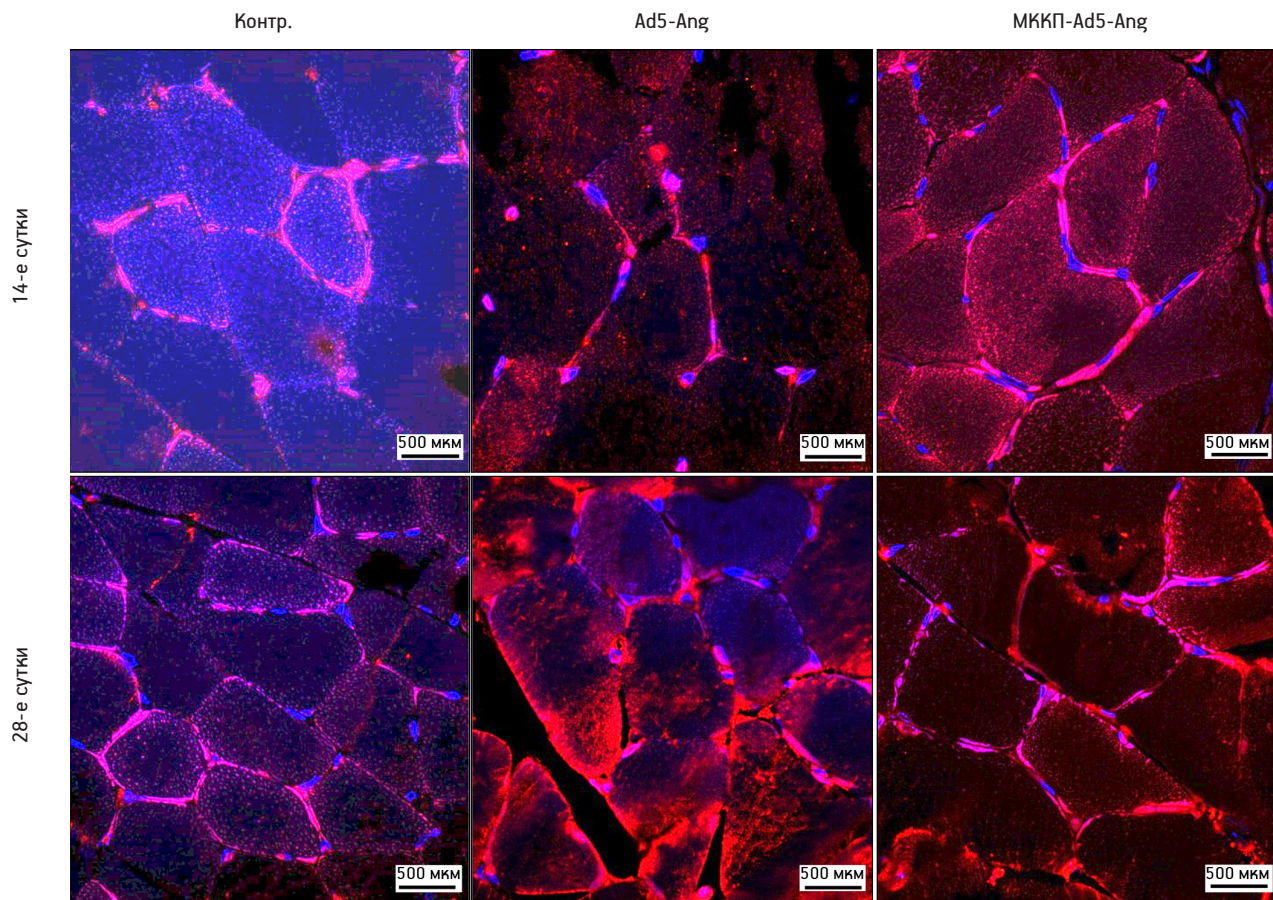


Рис. 1. Иммунофлюоресцентная реакция с антителами к CD31 на 14-е и 28-е сутки после введения в область ишемии скелетной мышцы крысы Ad5-Ang и МККП+Ad5-Ang.

Ядра окрашены DAPI (синий)

Alexa Fluor 555 (Invitrogen, A-31572). Ядра окрашивали DAPI. Флюоресцентные изображения получены с помощью лазерного конфокального микроскопа LSM 700 (Carl Zeiss, Germany) при ув. 630. Световые изображения оцифровывали с использованием сканера Aregio CS2. Морфометрический анализ проводили с помощью программного обеспечения Image Score. Подсчет количества кровеносных сосудов и мышечных волокон с центральным расположением ядер (МЦЯ) осуществляли в области ишемии и на расстоянии в пределах 500 мкм от области введения генной или генно-клеточной конструкции (рис. 1).

Интенсивность кровотока регистрировали аппаратом для измерения микроциркуляторного русла Easy LDI (England). Для контроля наступления ишемии производили замеры, выраженные в перфузионных единицах (ару) в конечности до операции, на следующий день и 5-е сутки после операции. В ишемизированной конечности крысы после создания ишемии зарегистрировано стойкое снижение кровотока на 45% на следующий день и 5-е сутки. Кровоток в прооперированной конечности уменьшился с  $123 \pm 0,8$  до  $56 \pm 0,5$  ару. В последующем значения кровотока сохранялись в пределах  $62 \pm 1,3$  ару до введения генетических конструкций.

Усиление ангиогенеза оценивали как плотность распределения мышечных волокон, капилляров и соотношение количества капилляров/мышечные волокна. Значимость различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента при  $p < 0,05$ .

**Результаты исследования.** На 14-е сутки в группе МККП+Ad5-Ang с клеточно-опосредованной доставкой трансгена показатель отношения количества капилляров к количеству мышечных волокон увеличивается по сравнению с таковым в контрольной группе [ $1,77 \pm 0,31$  (контроль) против  $2,78 \pm 0,23$  (МККП+Ad5-Ang),  $p < 0,05$ ].

На 28-е сутки после введения генетических конструкций в группе МККП+Ad5-Ang этот показатель также превышает его значение в контроле, но различия не были значимыми [ $2,08 \pm 0,42$  (контроль) против  $2,52 \pm 0,38$  (МККП+Ad5-Ang),  $p > 0,05$ ]. В этот же срок значимые различия между контрольной и Ad5-Ang группами не обнаружены [ $2,08 \pm 0,42$  (контроль) против  $1,55 \pm 0,60$  (Ad5-Ang),  $p > 0,05$ ].

Количество мышечных волокон на 14-е сутки в исследуемой области в группе Ad5-Ang не изменяется [ $553 \pm 39,3$  (контроль) против  $623,43 \pm 109,39$  (Ad5-Ang),  $p > 0,05$ ], в то время как в группе МККП+Ad5-Ang уменьшается [ $553,31 \pm 79,74$  (контроль) против  $349,52 \pm 29,80$  (МККП+Ad5-Ang),  $p < 0,05$ ]. К 28-м суткам этот показатель

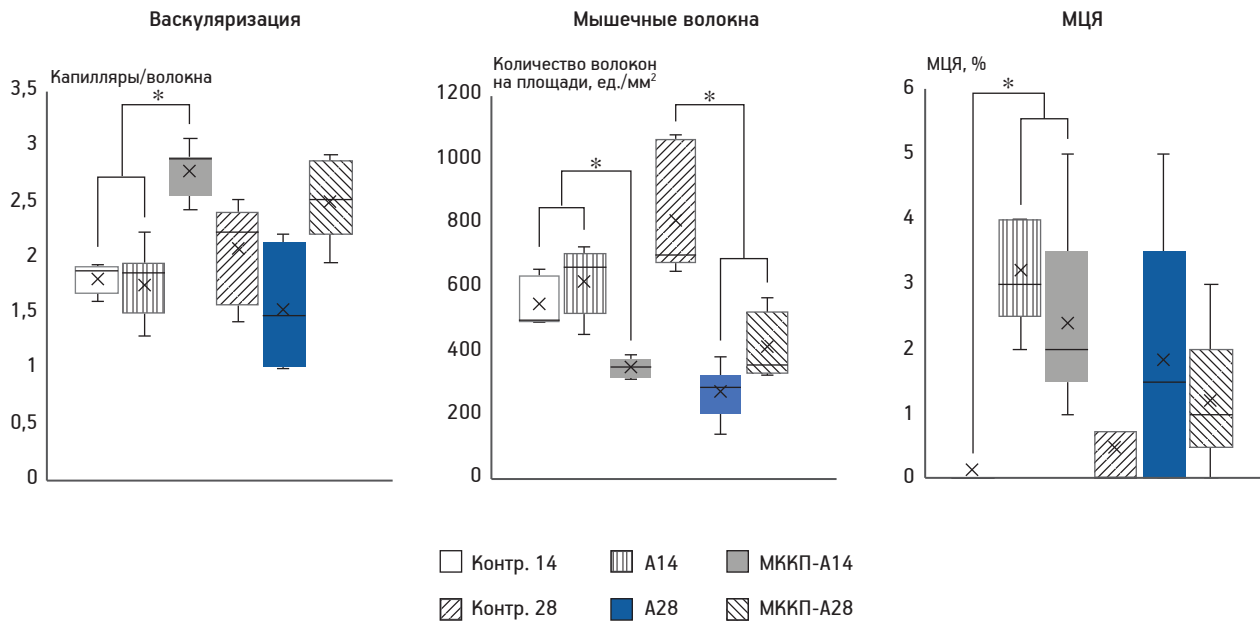


Рис. 2. Оценка васкуляризации, количества типичных и центральноядерных мышечных волокон на 14-е и 28-е сутки.

Контр. 14 — группа контроля на 14-е сутки; A14 — группа Ad5-Ang на 14-е сутки; МККП-A14 — группа МККП+Ad5-Ang на 14-е сутки; Контр. 28 — группа контроля на 28-е сутки; A28 — группа Ad5-Ang на 28-е сутки; МККП-A28 — группа МККП+Ad5-Ang на 28-е сутки. Звездочки — значимые различия при  $p < 0,05$

в группе МККП+Ad5-Ang также меньше такового в контрольной группе [ $813,48 \pm 200,71$  (контроль) против  $415,52 \pm 106,15$  (МККП+Ad5-Ang),  $p < 0,05$ ]. Он также уменьшается в группе Ad5-Ang [ $813,48 \pm 200,71$  (контроль) против и  $273,34 \pm 82,09$  (Ad5-Ang),  $p < 0,05$ ].

Количество МЦА к 14-м суткам существенно увеличивается в обеих экспериментальных группах с применением генетических конструкций, но между этими группами различия не обнаружены [ $0,125 \pm 0,35$  (контроль) против  $3,2 \pm 0,84$  (Ad5-Ang),  $p < 0,05$ ] и [ $0,125 \pm 0,35$  (контроль) против  $2,4 \pm 1,52$  (МККП+Ad5-Ang),  $p < 0,05$ ]. Они не обнаружены и при сравнении по этому показателю любой пары групп, включая контрольную, на сроке 28 сут (рис. 2).

Обсуждение полученных данных. Доставка рекомбинантного гена Ang человека в область ишемии конечности крысы приводит к увеличению отношения количества капилляров к количеству мышечных волокон в этой области, что указывает на проявление ангиогенных свойств Ang в данной экспериментальной модели. Эти результаты нашего исследования соотносятся с данными литературы. Согласно этим данным, введение в экспериментальных и клинических условиях рекомбинантного гена Ang при помощи аденовирусного вектора Ad5 оказывает выраженное стимулирующее влияние на ангиогенез в ишемизированной скелетной мышце, что проявляется в усилении перфузии ишемизированной скелет-

ной мышцы и увеличении количества капилляров [2, 3]. Однако в этих исследованиях генетические конструкции с Ang вводили в комбинации с выполнением оперативных вмешательств на артериях нижних конечностей. Ввиду этого объективная оценка причины улучшения у пациентов с ХИНК представляется затруднительной.

Прямая генная терапия имеет ряд определенных недостатков — невысокая эффективность трансфекции, отсутствие способов прекращения избыточного синтеза ангиогенного фактора трансфицированными клетками реципиента, возможный иммунный ответ организма на белок, синтезируемый в организме с помощью вирусного вектора [4]. Альтернативным направлением является доставка генетического материала на клеточных носителях (клеточно-опосредованная доставка). Предложено использовать различные клетки (костного мозга, жировой ткани, пуповинной крови и др.). Во многих работах отмечается значительный положительный опыт применения данных технологий [4, 6].

Уменьшение количества мышечных волокон под действием трансгена может свидетельствовать об ускорении их обновления новыми волокнами в результате интенсификации обменных процессов вследствие усиления перфузии в области ишемии. Этот эффект наблюдается на всех сроках наблюдений, т.е. проявляется в течение длительного периода и является достаточно устойчивым. Об усилении постишемической регенерации мышечной ткани свидетельству-

ет увеличение количества МЦЯ под действием Ang. Стимулирование репаративного миогенеза под влиянием Ang может быть результатом прямого действия фактора на миогенные клетки-предшественницы или следствием усиления перфузии и активации обменных процессов в области ишемического повреждения.

На 14-е сутки в группе МККП+Ad5-Ang показано значимое увеличение показателя отношения количества капилляров к количеству мышечных волокон. На 28-е сутки в группе МККП+Ad5-Ang и группе Ad5-Ang значимые различия по данному показателю при сравнении с контрольной группой не зарегистрированы. Количество мышечных волокон на 14-е сутки в группе Ad5-Ang не изменяется, а в группе МККП+Ad5-Ang — уменьшается. Количество МЦЯ существенно увеличивается в обеих экспериментальных группах с применением генетических конструкций на 14-е сутки.

При сравнении двух экспериментальных подходов доставка гена Ang при помощи МККП по сравнению с прямым введением гена Ang оказалась более эффективной по критерию отношения количества капилляров к количеству мышечных волокон. Но при прямом введении гена Ang по сравнению с клеточно-опосредованной доставкой этого гена лучшие результаты получены по критерию увеличения количества МЦЯ. Эти результаты указывают на перспективность сочетанного применения двух апробированных в этой работе способов доставки гена Ang в область ишемии с целью преодоления ее последствий.

**Заключение.** Таким образом, доставка рекомбинантного гена Ang при помощи МККП стимулирует постишемический ангиогенез и регенерацию в скелетной мышце.

**Автор сообщает об отсутствии в статье конфликта интересов.**

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бочков Н.П., Константинов Б.А., Гавриленко А.В. Генно-инженерные технологии в лечении хронической ишемии нижних конечностей // Вестник РАМН. 2006. № 9–10. С. 6–11 [Bochkov N.P., Konstantinov B.A., Gavrilenko A.V. Genetic engineering technologies in the treatment of chronic lower limb ischemia // Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk. 2006. № 9–10. P. 6–11. In Russ.].
2. Воронов Д.А., Бочков Н.П., Гавриленко А.В. Изучение возможности применения генно-терапевтических методов для лечения пациентов с ишемией нижних конечностей // Вестник РАМН. 2006. № 9–10. С. 6–11 [Voronov D.A., Bochkov N.P., Gavrilenko A.V. Study of the possibility of using gene therapy methods for the treatment of patients with lower limb ischemia // Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk. 2006. № 9–10. P. 6–11. In Russ.].
3. Константинов Б.А., Бочков Н.П., Гавриленко А.В. Экспериментальные и клинические результаты использования генно-инженерных конструкций с геном ангиогенина в лечении хронической ишемии нижних конечностей // Медицинская генетика. 2005. Т. 4, № 7. С. 327–331 [Konstantinov B.A., Bochkov N.P., Gavrilenko A.V. Experimental and clinical results of the use of genetically engineered structures with the angiogenin gene in the treatment of chronic lower limb ischemia // Meditsinskaya genetika. 2005. Vol. 4, № 7. P. 327–331. In Russ.].
4. Лебедев С.В., Карасев А.В., Кунгурцев В.В., Лохонина А.В., Клейменова Е.Б. Клеточная терапия критической ишемии нижних конечностей (проблемы и перспективы) // Вестник Российской академии медицинских наук. 2013. № 3. С. 33–44 [Lebedev S.V., Karasev A.V., Kungurcev V.V., Lohonina A.V., Klejmenova E.B. Cell therapy of critical lower limb ischemia: problems and prospects // Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk. 2013. № 3. P. 33–44. In Russ.].
5. Патент РФ № 2197263. Способ лечения ран и язвенных дефектов / И.А. Рогов, В.Г. Цуман, А.Е. Машков, Г.В. Плаксина, Д.А. Пыхтеев, Р.Я. Киримов, А.М. Шалыгина, Н.А. Тихомирова, Г.С. Комолова. Заявка от 16.05.2001 г. Опубл. в БИ. 2003 [RF patent № 2197263. Method of treatment of wounds and ulcers / I.A. Rogov, V.G. Czuman, A.E. Mashkov, G.V. Plaksina, D.A. Pikhteev, R.Ya. Kirimov, A.M. Shaligina, N.A. Tikhomirova, G.S. Komolova. Zaiavka ot 16.05.2001, opublikovano 27.01.2003. In Russ.].
6. Плотников М.В., Максимов А.В. Лечение заболеваний периферических артерий с использованием прогениторных клеток // Практическая медицина 2014. Т. 2, № 4. С. 118–122 [Plotnikov M.V., Maksimov A.V. Treatment of peripheral arterial diseases using progenitor cells // Prakticheskaya meditsina. 2014. Vol. 2, № 4. P. 118–122. In Russ.]. doi: 616.13–004.6–08
7. Талицкий К.А., Булкина О.С., Арефьева Т.И., Воробьева О.Н., Левицкий И.В., Федорович А.А., Макаревич П.И., Парфенова Е.В., Карпов Ю.А. Эффективность терапевтического ангиогенеза у больных с хронической ишемией нижних конечностей // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2011. Т. VI, № 3. С. 89–98 [Talickij K.A., Bulkina O.S., Aref'eva T.I., Vorob'eva O.N., Levickij I.V., Fedorovich A.A., Makarevich P.I., Parfenova E.V., Karpov Yu.A. Efficiency of therapeutic angiogenesis in patients with chronic lower limb ischemia // Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya. 2011. Vol. VI, № 3. P. 89–98. In Russ.].
8. Belch J., Hiatt W.R., Baumgartner I. Effect of fibroblast growth factor FGF on amputation and death: a randomised placebo-controlled trial of gene therapy in critical limb ischaemia // Lancet. 2011. Vol. 377, № 9781. P. 1929–1937.
9. Carmeliet P., Collen D. Transgenic mouse models in angiogenesis and cardiovascular disease // J. Pathol. 2000. Vol. 190, № 3. P. 387–405. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(200002)190:3<387
10. Chen F., Tan Z., Dong C.Y., Chen X., Guo S.F. Adeno-associated virus vectors simultaneously encoding VEGF and angiopoietin-1 enhances neovascularization in ischemic rabbit hindlimbs // Acta Pharmacol. Sin. 2007. Vol. 28. P. 493–502.
11. Chen H., Hung H., Shyu K., Wang B., Sheu J., Liang Y., Chang C., Kuan P. Combined cord blood stem cells and gene therapy enhances angiogenesis and improves cardiac performance in mouse after acute myocardial infarction // Eur. J. Clin. Invest. 2005. Vol. 35, № 11. P. 677–686.

12. Cook K.M., Figg W.D. Angiogenesis inhibitors: current strategies and future prospects // *CA Cancer J. Clin.* 2010. Vol. 60, № 4. P. 222–243. doi: 10.3322/caac.20075
13. Fowkes G., Rudan D., Rudan I., Aboyans V. Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis // *The Lancet.* 2013. Vol. 382. P. 1329–1340.
14. Hockel M., Schlenger K., Doctrow S. Therapeutic Angiogenesis // *Arch. Surg.* 1993. Vol. 128, № 4. P. 423–429.
15. Ikeda Y., Fukuda N., Wada M., Matsumoto T., Satomi A., Yokoyama S., Saito S., Matsumoto K., Kanmatsuse K., Mugishima H. Development of angiogenic cell and gene therapy by transplantation of umbilical cord blood with vascular endothelial growth factor gene // *Hypertens Res.* 2004. Vol. 27, № 2. P. 119–128.
16. Laughlin M. Umbilical cord blood for allogeneic transplantation in children and adults // *Bone Marrow Transplant.* 2001. Vol. 27, № 1. P. 1–6.
17. Makarevich P., Tsokolaeva Z., Shevelev A., Rybalkin I., Shevchenko E., Beloglazova I., Vlasik T., Tkachuk V., Parfyonova Y. Combined transfer of human VEGF165 and HGF genes renders potent angiogenic effect in ischemic skeletal muscle // *PLoS One.* 2012. Vol. 7. P. e38776.

Поступила в редакцию 04.09.2018  
Получена после доработки 21.06.2019

#### STIMULATION OF RAT SKELETAL MUSCLE ANGIOGENESIS BY DIRECT AND CELL-MEDIATED ADMINISTRATION OF RECOMBINANT ANGIOGENIN GENE

*I. V. Samatoshenkov*

**Objective** — to evaluate the effectiveness of revascularization of the rat gastrocnemius muscle following direct and human umbilical cord blood mononuclear cells (MNCs)-mediated deliv-

ery of human recombinant angiogenin (Ang) gene to the ischemic area using adenovirus serotype 5 vector (Ad5).

**Material and methods.** The study was carried out on 30 Wistar rats. Fourteen days after the excision of the femoral artery fragment, the genetic construct was injected into the animals' ischemic gastrocnemius muscle (AD5-Ang group, n=15). In the other group (mccp+Ad5-Ang, n=15), the transgene was delivered to the muscle with the help of MNCs within the same time limit. In the control group (n=15) 0,9% NaCl was injected into the muscle of animals under the same conditions. Fourteen and twenty-eight days after the injection, the ratio of capillaries/muscle fibers, the number of muscle fibers and the number of muscle fibers with a central location of nuclei (MCN) were evaluated in the ischemic area. Capillaries were identified by localization of endothelial cells detected by immunohistochemical reaction with antibodies against CD31.

**Results.** On the 14th day after administration of MNCs+Ad5-Ang, the ratio of capillaries to the number of muscle fibers in the ischemic area increased by 57% ( $p<0,05$ ). On the 28th day in the MNCs+Ad5-Ang group and in the Ad5-Ang group, no significant differences in this indicator were found compared with the control group. The number of muscle fibers on the 14th day in the Ad5-Ang group did not change, and in the MNCs+Ad5-Ang group, it decreased by 58,4% ( $p<0,05$ ). By the 28th day, this indicator in the MNCs+Ad5-Ang group decreased by 95,9% ( $p<0,05$ ), and in the Ad5-Ang group — by 197,8% ( $p<0,05$ ). The number of MCN on the 14th day significantly increased in both experimental groups, in which the genetic constructs were used.

**Conclusion.** The introduction of recombinant ang gene into the area of skeletal muscle ischemia or its delivery to this area with the help of MCNs stimulates angiogenesis and post-ischemic regeneration of muscle fibers.

**Key words:** *skeletal muscle, ischemia, angiogenesis, angiogenin, mononuclear umbilical cord blood cells, adenoviral vector*  
Kazan State Medical University, 49 Butlerova St., Kazan 420012