

УДК 616-005.3; 616-08-035

<https://doi.org/10.24884/1682-6655-2025-24-3-66-75>

А. Р. ХАСАНОВ¹, К. П. ГОЛОВКО¹, Е. К. ГАВРИЛОВ¹,
А. В. КОСУЛИН², А. С. БУНТОВСКАЯ¹, Е. И. КОРЕШОВА¹,
Р. И. ГЛУШАКОВ¹

Регулирование ангиогенеза при ранении артерий конечности (экспериментальное исследование)

¹ Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова»

194044, Россия, Санкт-Петербург, улица Академика Лебедева, д. 6, лит. Ж

² Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет

194100, Россия, Санкт-Петербург, улица Литовская, 2

E-mail: gavrilo_v_evgeny@mail.ru

Статья поступила в редакцию 16.04.25 г.; принята к печати 13.06.25 г.

Резюме

Введение. В современном вооруженном конфликте в структуре боевой хирургической патологии повреждения конечностей имеют высокий удельный вес. При этом повреждения артерий конечности часто сопровождаются массивным наружным кровотечением и/или острой ишемией, что является одной из основных причин летального исхода. Представляется перспективным применение адъювантной лечебной стимуляции ангиогенеза при боевой сосудистой патологии. **Цель.** Исследовать влияние и динамику регуляции ангиогенеза и определить роль VEGF в патогенезе повреждений артерий конечности на экспериментальной модели острой ишемии задней конечности (ОИЗК) у лабораторных животных. **Материалы и методы.** Выполнены отработка экспериментальной модели острой ишемии задней конечности (ОИЗК), динамическое наблюдение и оценка влияния лекарственно индуцированного ангиогенеза и системного введения антиангиогенных антител у лабораторных животных (кролики-самцы породы Белый Великан) одной партии массой 3673 ± 113 г. ($n=36$). **Результаты.** В группе Ia (лекарственно индуцированный ангиогенез) отмечается длительная положительная динамика выживаемости до 24 суток экспериментального исследования в отличие от остальных 3 групп. Данные выживаемости в группе Ia имеют корреляционную связь с количественным определением VEGF в сыворотке крови, которая к 30-м суткам составляет $87,08 \pm 2,44$ пг/мл ($p < 0,001$). К 30-м суткам экспериментального исследования уровень перфузии тканей после лигирования бедренной артерии составил $81,75 \pm 4,2$ % ($p < 0,05$). **Выводы.** Генные и клеточные технологии могут стать одним из важнейших методов восстановления перфузии в ишемизированных тканях за счет формирования и роста микрососудистой сети, что впоследствии существенно снизит количество выполняемых ампутаций и улучшит конечный результат лечения при данной патологии. Полученные результаты свидетельствуют об эффективности адъювантной стимуляции ангиогенеза, что также отразилось на выживаемости лабораторных животных.

Ключевые слова: ранение артерий конечностей; острая ишемия конечности; повреждения сосудов конечностей; ангиогенез; vascular endothelial growth factor (VEGF), выживаемость

Для цитирования: Хасанов А. Р., Головки К. П., Гаврилов Е. К., Косулин А. В., Бунтовская А. С., Корешова Е. И., Глушаков Р. И. Регулирование ангиогенеза при ранении артерий конечности (экспериментальное исследование). Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2025;24(3):66–75. <https://doi.org/10.24884/1682-6655-2025-24-3-66-75>.

UDC 616-005.3; 616-08-035

<https://doi.org/10.24884/1682-6655-2025-24-3-66-75>

A. R. KHASANOV¹, K. P. GOLOVKO¹, E. K. GAVRILOV¹,
A. V. KOSULIN², A. S. BUNTOVSKAYA¹, E. I. KORESHOVA¹,
R. I. GLUSHAKOV¹

Regulation of Angiogenesis in Limb Arterial Injury (Experimental Investigation)

¹ Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia

6, Academica Lebedeva str., Saint Petersburg, Russia, 194044

² Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, Saint Petersburg, Russia

2, Litovskaya str., Saint Petersburg, Russia, 194100

E-mail: gavrilo_v_evgeny@mail.ru

Received 16.04.25; accepted 13.06.25

Summary

Introduction. In the modern armed conflict, limb injuries have a high proportion in the structure of combat surgical pathology. In this case, injuries to the arteries of the limbs are often accompanied by massive external bleeding and/or acute ischemia, which

is one of the main causes of death. The use of adjuvant therapeutic stimulation of angiogenesis in combat vascular pathology seems promising. **Objective.** To investigate the influence and dynamics of angiogenesis regulation and determine the role of VEGF in the pathogenesis of limb artery injuries in an experimental model of acute hind limb ischemia (AHLI) in laboratory animals. **Materials and methods.** An experimental model of acute hind limb ischemia (AHLI) was developed, dynamic observation and evaluation of the effect of drug-induced angiogenesis and systemic administration of antiangiogenic antibodies in laboratory animals (male White Giant rabbits) of one batch weighing 3673 ± 113 g ($n=36$). **Results.** In Group Ia (drug-induced angiogenesis), there was a long-term positive survival rate of up to 24 days of the experimental study, in contrast to the other 3 groups. The survival data in Group Ia correlates with the quantitative determination of VEGF in blood serum, which by day 30 is 87.08 ± 2.44 pg/ml ($p<0.001$). By 30 day of the experimental study, the level of tissue perfusion after ligation of the femoral artery was $81.75 \pm 4.2\%$ ($p<0.05$). **Conclusions.** Gene and cellular technologies can become one of the most important methods for restoring perfusion in ischemic tissues due to the formation and growth of the microvascular network, which subsequently significantly reduces the number of amputations performed and improves the final result of treatment for this pathology. The results obtained indicate the effectiveness of adjuvant stimulation of angiogenesis, which also affected the survival of laboratory animals.

Keywords: limb arterial injury, acute limb ischemia, limb vascular injury, angiogenesis, vascular endothelial growth factor (VEGF), survival rate

For citation. Khasanov A. R., Golovko K. P., Gavrilov E. K., Kosulin A. V., Buntovskaya A. S., Koreshova E. I., Glushakov R. I. Regulation of Angiogenesis in Limb Arterial Injury (Experimental Investigation). *Regional hemodynamics and microcirculation*. 2025;24(3):66–75. <https://doi.org/10.24884/1682-6655-2025-24-3-66-75>.

Введение

В мире ишемия нижних конечностей диагностирована у 200 млн человек [1]. Актуальной и важной проблемой современной реконструктивной сосудистой хирургии остается восстановление трофики в тканях, которые подверглись острой и/или длительной ишемии. Для этих целей используется широкий спектр хирургических методов лечения, современных средств консервативной терапии, физиотерапевтическое лечение и др. Применение генных технологий рассматривается учеными как одно из перспективных направлений в лечении пациентов с заболеваниями артерий нижних конечностей [2, 3]. Доклинические исследования генной терапии отмечают образование и рост новых сосудов в экспериментальном исследовании на лабораторных животных [4–7].

Значимость проблемы стимулирования ангиогенеза при ранениях артерий конечности заключается в необходимости разработки альтернативных методов адьювантного лечения в области медицины. С учетом растущего интереса к возможности сохранного лечения и улучшения исходов хирургических манипуляций на поврежденных артериях конечностей исследование в данной области является первоочередным.

Эндотелиальный фактор роста сосудов (vascular endothelial growth factor – VEGF) играет ключевую роль в патофизиологии развития новых коллатералей в условиях повреждения тканей и гипоксии [8, 9]. VEGF представляет собой сигнальный белок, синтезируемый эндотелиальными клетками сосудов в ответ на гипоксию и травматизацию сосудистой стенки. Также VEGF является одним из многих, но тем не менее одним из важных, факторов для подавления воспаления, реализуемым в восстановлении костной ткани путем индуцирования изоформы VEGF-A [10]. Регенерация в ране обусловлена взаимодействием рецептора VEGFR1 с моноцитами (макрофагиальная линия), результатом которого является сигнализация для миграции и последующей продукции цито-/хемокинов. Линия взаимодействия VEGFR1-моноциты регулирует воспалительные реакции в ране [10].

Проведенное экспериментальное исследование на биологических объектах, где использовалась смесь

пДНК с генами VEGF с ангиопоэтином-1, bFGF, урокиназным активатором плазминогена (uPA), стромальным фактором-1 (SDF) или HGF, достоверно усиливает ангиогенез и уменьшает некротизированную зону в скелетных мышцах. Также определена большая эффективность при комбинированном использовании по сравнению с применением каждого фактора по отдельности [11]. Результаты локального применения генно-инженерной конструкции VEGF у 194 лабораторных животных демонстрируют действенность терапевтического эффекта стимуляции ангиогенеза [12]. По данным зарубежных авторов, клиническое исследование у 14 пациентов, в лечении которых применяли бицистронную плазмиду, сочетающую в себе VEGF и HGF, демонстрирует достоверное увеличение проангиогенных факторов в пораженных тканях и улучшает клиническую картину при хронической ишемии нижних конечностей (ХИНК), осложненной сахарным диабетом [13]. Использование микрофлюидного чипа для оценки ангиогенных свойств различных изоформ VEGF (VEGF121, VEGF165, VEGF189 и т. д.), в том числе по длине и количеству сосудистых ростков, продемонстрировало, что изоформа VEGF165 обладает наибольшей способностью индуцировать рост сосудистых ростков в сравнении с другими изоформами [14].

Исследование механизма и исходов применения стимуляции ангиогенеза в ишемизированных тканях в результате повреждения артерий конечностей послужит толчком к развитию новых методов, способствующих ускоренному восстановлению кровоснабжения в ишемизированных тканях, снижению риска инвалидизации и улучшению исходов лечения повреждений и травм мирного и военного времени.

Цель – исследовать влияние и динамику регуляции ангиогенеза и определить роль VEGF в патогенезе повреждений артерий конечности на экспериментальной модели острой ишемии задней конечности (ОИЗК) у лабораторных животных.

Материалы и методы исследования

Общий дизайн экспериментального исследования. Экспериментальное исследование одобрено независимым этическим комитетом при федераль-

Характеристика исследуемых групп лабораторных животных

Table 1

Characteristics of the studied groups of laboratory animals

№ группы	Название группы	Количество лабораторных животных	ОИЗК	Введение	
				про- VEGF	анти- VEGF
Ia	Лекарственно индуцированный ангиогенез (после моделирования ОИЗК)	10	+	+	–
Ib	Лекарственно индуцированный ангиогенез (до моделирования ОИЗК)	10	+	+	–
II	Системное введение антиангиогенных антител	10	+	–	+
III	Группа сравнения	6	+	–	–

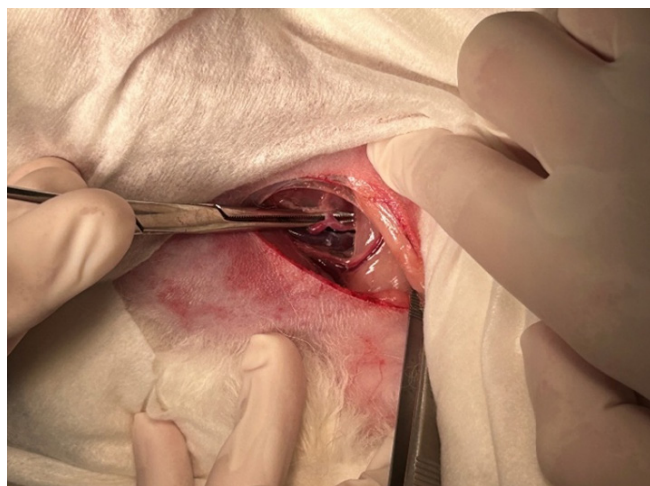


Рис. 1. Хирургический доступ к бедренной артерии у лабораторного животного

Fig. 1. Surgical access to the femoral artery in a laboratory animal

ном государственном бюджетном военном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, протокол № 286 от 19.12.2023 г.

Выполнены отработка экспериментальной модели острой ишемии задней конечности (ОИЗК), динамическое наблюдение и оценка влияния лекарственно индуцированного ангиогенеза и системного введения антиангиогенных антител у лабораторных животных. Эксперимент проводили на кроликах-самцах (порода Белый Великан) одной партии массой 3673 ± 113 г. ($n=36$), полученных из ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» (Рапполово, Ленинградская область, РФ).

Эксперименты с участием лабораторных животных проводились в специализированной экспериментальной операционной для выполнения хирургических вмешательств на лабораторных животных, где имелось необходимое материально-техническое обеспечение и подготовленный квалифицированный персонал. Накануне проведения экспериментальных исследований персонал инструктировался по порядку методики проведения исследований, регистрации полученных результатов, а также по мерам техники безопасности.

Содержание животных, формирование опытных групп и рандомизация. Лабораторные животные ($n=36$) содержались в стандартных условиях вивария в одноместных индивидуальных клетках. Исследования проводили в режиме виварного содержания животных при оптимальной температуре окружающей среды в проветриваемых помещениях с наличием приточно-вытяжной системой, исключающих возникновение сквозняков. Каждое лабораторное животное имело доступ к воде и пище *ad libitum*. После получения из питомника лабораторных животных содержали в условиях карантина, длительность которого составила 14 суток. В период карантина проводили динамический осмотр каждого животного (поведение и общее состояние) дважды в день (в утренние и вечерние часы). Лабораторные животные с подозрением на любое заболевание и/или имеющие изменения в поведении исключались из исследования в течение карантина.

Лабораторные животные после окончания карантина были разделены с конкурентным набором при помощи генератора случайных чисел на 3 равные группы, после чего оставшиеся невключенные кролики-самцы составили группу сравнения (табл. 1). Всем животным воспроизведена модель ОИЗК с различными режимами введения про- и антиангиогенных препаратов.

Для оптимизации и стандартизации экспериментальное исследование было разделено на этапы:

- 1-й этап – подготовительный;
- 2-й этап – моделирование ОИЗК на лабораторных животных;
- 3-й этап – лекарственное индуцирование/ингибирование ангиогенеза на модели ОИЗК;
- 4-й этап – определение и анализ VEGF в крови;
- 5-й этап – исследование и оценка микроциркуляции ОИЗК с учетом индуцирования/ингибирования ангиогенеза;
- 6-й этап – оценка выживаемости лабораторных животных.

Подготовительный этап. Животных не кормили за сутки до эксперимента. В день моделирования ОИЗК, перед транспортировкой из вивария в экспериментальную операционную для индукции анестезии внутримышечно введено 5 мг/кг Золазепам

Фармакологические субстанции, используемые в исследовании

Table 2

Pharmacological substances used in the study

Наименование субстанции	Торговое название	Фирма-производитель (страна)	Способ применения
Дезоксирибонуклеиновая кислота плазмидная [сверхскрученная кольцевая двуцепочечная] (Deoxyribonucleic acid plasmid [supercoiled annular double-stranded]) pCMV VEGF165 – 1,2 мг	Неоваскулген® (Neovascugen)	АО «НекстГен» (РФ)	Группа Ia – 1,2 мг pCMV VEGF165 в 4 мл 0,9 % раствора NaCl, локальное в/м дробное введение посредством множественных вколов в пораженный сегмент конечности Группа Ib – 1,2 мг pCMV VEGF165 в 4 мл 0,9 % раствора NaCl, локальное в/м дробное введение посредством множественных вколов в пораженный сегмент конечности
Бевацизумаб (Bevacizumab) – 25 мг	Аверга® БИОКАД (Avegra® BIOCAD)	БИОКАД, АО (РФ)	5 мг/кг массы тела лабораторного животного, в/в капельно в 0,9 % растворе NaCl

(Zoletil®100, Франция). Животное укладывалось на операционный стол в положении «на спине» с разведенными в стороны передними и задними конечностями. Выполнялось распыление Лидокаина гидрохлорид (Intubeze) в ротовую полость. После экспозиции в течение 2–3 минут выполнялась визуализация трахеи и голосовой щели при помощи ларингоскопа ветеринарного с размером клинка 0–1. Подконтрольно вводилась эндотрахеальная трубка, предварительно смазанная тонким слоем водорастворимого лубриканта с лидокаином Луан (Luan, Италия). Контроль дыхания осуществлялся при помощи фонендоскопа по мере продвижения трубки. Полученный конденсат на стенках эндотрахеальной трубки и шум дыхания на выдохе служили критерием правильной постановки, после чего выполнена фиксация при помощи бинта и подключение к контуру искусственного дыхания. Применялась ингаляционная анестезия Изофлюраном, введение в наркоз осуществлялось с концентрацией 2–3 %, а поддержание анестезии – 1–2 % в 100 % кислороде через эндотрахеальную трубку (наркозно-дыхательный аппарат Chirana VENAR TS, Словакия). Мониторинг и динамический контроль жизненных показателей осуществлялись при помощи прикроватного монитора пациента (Comen STAR 8000 C, Китай). По окончании подготовительного этапа производились подготовка операционного поля и ограничение одноразовым стерильным хирургическим бельем, переход к следующему этапу.

Моделирование ОИЗК на лабораторных животных. Моделирование ОИЗК реализовано путем хирургического доступа – послойное выделение сосудисто-нервного пучка (СНП) и перевязка магистрального сосуда (бедренная артерия – БА). Доступ к БА осуществлялся с медиальной поверхности задней конечности лабораторного животного в паховой области по проекции БА (рис. 1). Разрез кожи выполнялся лапчатым скальпелем согласно анатомической линии для исключения риска возникновения расхождений

краев раны. После послойного доступа к СНП задней конечности бережно выделена БА проксимально от места ее бифуркации (на глубокую и поверхностную БА) из состава СНП, наложена лигатура (VICRYL Plus 3–0, ETCHICON®, США) дистально и проксимально, выполнено пересечение БА между лигатурами. Далее выполнен контроль гемостаза, укрытие СНП мышечной массой с последующим их ушиванием, выход из раны. Кожа ушита внутрикожным швом (VICRYL Plus 3–0, ETCHICON®, США) по Chassaignac-Halsted для профилактики риска травматизации послеоперационной раны лабораторным животным. Область послеоперационной раны обработана 1 % раствором Повидон-йода (Бетадин, ЭГИС, Венгрия), наложен антисептический пластырь.

После моделирования ОИЗК лабораторные животные всех групп получали ежедневную обработку послеоперационной раны 1 % раствором Повидон-йода (Бетадин, ЭГИС, Венгрия) со сменой асептического пластыря до 10-х суток. Также кролики-самцы получали инъекции противомикробных препаратов (Бициллин в дозе 60000 ЕД/1 кг массы, 1 раз в 2 дня) для профилактики послеоперационных бактериальных осложнений.

Применение про-/антиангиогенных факторов. В экспериментальном исследовании применялись препараты кольцевой плазмидной ДНК в двух режимах введения и антитела к VEGF. Группы Ia и Ib получали высокоочищенную сверхскрученную форму плазмиды pCMV-VEGF165, кодирующий эндотелиальный фактор роста сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF) под контролем промотора (управляющего участка ДНК) после и до моделирования ОИЗК соответственно. Группа II получала рекомбинантные гуманизированные моноклональные антитела (РГМА), которые избирательно связываются и нейтрализуют биологическую активность VEGF после моделирования ОИЗК. Группе III (контрольная) выполнялось моделирование ОИЗК и плацебо-введение 0,9 % раствора NaCl в объеме 10 мл. У всех

лабораторных животных после моделирования ОИЗК выполнялось стандартизированное лечение послеоперационной раны согласно современным протоколам при данной нозологии. Применяемые фармакологические субстанции представлены в табл. 2.

Определение и оценка про-/антиангиогенных факторов в плазме крови. На 5-е, 10-е, 20-е и 30-е сутки производился забор крови путем транскутанной пункции мышц задней конечности в условиях общего наркоза (Zoletil®100, 2 мл/кг массы тела) в вакуумные шприц-пробирки системы Monovette (Sarstedt AG&Co., Германия) в объеме 6,0 мл. Полученная кровь подвергалась центрифугированию в течение 420 секунд (7 минут) с заданным ускорением 240 g. Обогащенная тромбоцитами плазма крови транспортировалась в следующую пробирку и подвергалась повторному центрифугированию в течение 900 секунд (15 минут) с заданным ускорением 1200 g. Полученная плазма крови с обедненными тромбоцитами транспортировалась в эппендорф и подверглась заморозке (–22 °C). Длительность криоконсервации составила не более 60 суток.

Для исследования влияния ангиогенных факторов в патогенезе травмы артерий конечности у лабораторных животных на протяжении эксперимента в динамике исследовали уровень сывороточного VEGF с использованием метода Rabbit ELISA (иммуноферментного анализа, ИФА) с помощью реактивов фирмы Cloud-Clone Corporation (США) согласно инструкции фирмы-производителя. Определение выполнялось на многофункциональном планшетном анализаторе Victor X5 (PerkinElmer Inc., Хьюстон, США). Значение абсорбации считывалось при 450 нм на планшетном ИФА-ридере.

Исследование и оценка микроциркуляции ОИЗК с учетом индуцирования/ингибирования ангиогенеза. Исследование и оценка перфузии мягких тканей проводились с применением метода лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) бесконтактным способом (PeriScan PIM II, Швейцария) на 5-е, 10-е, 20-е и 30-е сутки с момента моделирования ОИЗК. Критерием сравнения микроциркуляции являлась контралатеральная задняя конечность лабораторного животного.

Для оценки местной и общей реакции мягких тканей конечности на ОИЗК у лабораторных животных проводилось динамическое наблюдение. Местная реакция оценивалась по следующим критериям: состояние операционной раны, цвет кожных покровов конечности, степень отека конечности (соотношение длины окружности поврежденной конечности к контралатеральной на уровне послеоперационной раны), нарушение функции конечности. Общая реакция оценивалась по следующим критериям: внешний вид (состояние волосяного покрова, состояние кожных покровов), поведение животного (двигательная активность, функциональная активность конечности, прием пищи и воды), ректальная температура.

Оценка выживаемости лабораторных животных. В ходе экспериментального исследования, проводимого в течение 30 суток, проводились регистрация, анализ и последующая оценка выживаемости лабораторных животных с учетом применения лекар-

ственно-индуцированного ангиогенеза и системного введения антиангиогенных антител к VEGF.

Статистическая обработка. Методы описательной статистики включали общепринятые методы с учетом статистики малых групп: среднее значение с оценкой стандартной ошибки среднего (SE) и стандартного отклонения (SD), медиану признака с определением верхнего и нижнего квартилей (25 % и 75 % перцентиля). При этом определялся вариант распределения признака в группе: нормальное и отличное от нормального. Распределение признака в группах определяли на основании метода Т. У. Андерсона и Д. А. Дарлинга. С учетом особенностей распределения признака группы в каждом эксперименте количественные показатели сравнивали по средним значениям (t-критерию Стьюдента) или медианным (U-критерий Манна–Уитни). Выживаемость лабораторных животных рассчитывали по методу Е. Л. Каплана и П. Мейера с определением средних и медианных значений выживаемости. Стандартную ошибку выживаемости лабораторных животных определяли путем использования формулы Гринвуда, а анализ кривых выживаемости, в зависимости от типа кривых, выполняли по тесту Манта–Хансена (Log-ranktest) или тесту Бреслоу–Вилкоксона. Критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы (об отсутствии значимых различий или факторных влияний) принимали равным 0,05. При $p < 0,05$ различия между выборками считали достоверными.

Результаты исследования и их обсуждение

Во всех группах успешно выполнено моделирование ОИЗК, все лабораторные животные благополучно перенесли применяемый метод анестезии, а бережный уход за животными обеспечивал благоприятный фон для существования. Лабораторные животные всех групп при помощи переносок доставлены в условия вивария, где каждый помещен в индивидуальную клетку. Для предупреждения перетасовки выполнена маркировка животных в каждой группе цифровыми значениями (группа Ia – № 1–10, группа Ib – № 1–10, группа II – № 1–10, группа III – № 1–6), а для различия биологических объектов между группами выполнена дополнительная маркировка чернилами (неинвазивный метод: группа Ia – красный, группа Ib – зеленый, группа II – фиолетовый, группа III – синий) на внутренней поверхности ушной раковины. Дополнительно выполнена маркировка клеток по цифровым значениям внутри группы и цветовым выделением между группами.

В ходе экспериментального исследования проводились динамический контроль и осмотр лабораторных животных, важным элементом которых является оценка выживаемости.

В группе Ia отмечается длительная положительная динамика выживаемости до 24 суток экспериментального исследования. На 25-е сутки экспериментального исследования лабораторное животное № 1 вышло из экспериментального исследования (летальный исход), что также произошло и на 28-е сутки с лабораторным животным № 4 данной группы. Таким образом, на 30-е сутки эксперимента выжи-

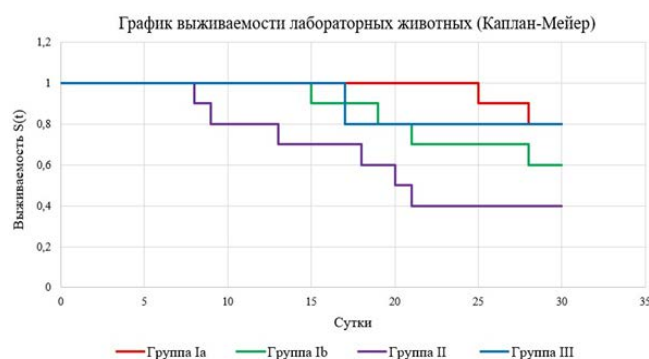


Рис. 2. Данные выживаемости лабораторных животных, представленные в виде кривых Каплана–Мейера

Fig. 2. Survival data for laboratory animals presented as Kaplan–Meier curves

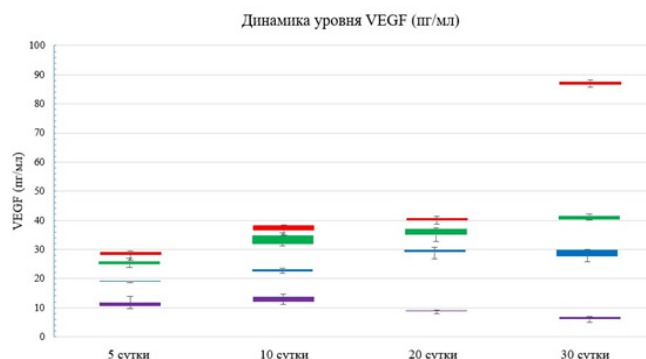


Рис. 3. Концентрация VEGF в крови у лабораторных животных после моделирования ОИЗК

Fig. 3. VEGF concentration in the blood of laboratory animals after modeling of acute hind limb ischemia (AHLI)

Таблица 3

Уровни VEGF в течение эксперимента

Table 3

VEGF levels during the investigation

Уровень VEGF (пг/мл)		Сутки эксперимента			
Группа лабораторных животных		5-е	10-е	20-е	30-е
Ia	среднее	28,52±3,16	37,23±3,64	40,26±2,61	87,08±2,44
	медиана	28,86	37,48	40,26	87,1
Ib	среднее	25,2±3,35	33,05±4,53	35,57±4,82	40,77±2,01
	медиана	25,40	32,43	35,8	40,6
II	среднее	11,37±4,94	13,16±4,69	8,99±1,16	6,6±0,99
	медиана	11,15	14,44	9,08	6,55
III	среднее	19,26±0,53	23,11±1,76	29,48±4,18	28,87±4,24
	медиана	19,29	23,29	29,55	29,5

ваемость среди 10 кроликов-самцов составила 80 % (n=8), средняя продолжительность жизни составила 29,3±1,12 суток (медиана – 30 суток).

В группе Ib среди 10 биологических объектов выход из экспериментального исследования состоялся на 15-е (№ 1), 19-е (№ 10), 21-е (№ 5), 28-е (№ 6) сутки. Следовательно, выживаемость в данной группе среди 10 кроликов-самцов составила 60 % (n=6), а средняя продолжительность жизни – 26,3±4,47 суток (медиана – 30 суток).

В группе II, в отличие от групп Ia и Ib, определяется отрицательная динамика выживаемости и составляет 40 % (n=4) среди 10 кроликов-самцов. Выход из экспериментального исследования биологических объектов состоялся на 8-е (№ 3), 9-е (№ 10), 13-е (№ 4), 18-е (№ 5), 20-е (№ 9) и 21-е (№ 2) сутки, средняя продолжительность жизни равнялась 20,9±7,3 суток (медиана – 20,5 суток).

В III группе наблюдается удовлетворительная динамика выживаемости – 66,7 % (n=4). Из 6 кроликов-самцов выход из экспериментального исследования состоялся у двух, на 17-е (№ 2) и 29-е (№ 5) сутки, средняя продолжительность жизни – 27,7±3,5 суток (медиана – 30 суток). Результаты выживаемости лабораторных животных представлены на рис. 2.

Авторы приходят к выводу, что наиболее благоприятный исход, а соответственно, удельный вес выживаемости – в группе Ia, которой после моделирования ОИЗК выполнено локальное введение высокоочищенной сверхскрученной формы плазмиды pCMV-VEGF165. Данные выживаемости имеют корреляционную связь с количественным определением VEGF в сыворотке крови, которая к 30-м суткам составляет 87,08±2,44 пг/мл (p<0,001). Наиболее неблагоприятный исход по критерию выживаемости Каплана–Мейера наблюдался в группе II, в которой применялось системное введение РГМА к VEGF. Данные выживаемости коррелируют с количественным определением VEGF в сыворотке крови, которая к 30-м суткам составила 6,6±0,99 пг/мл (p<0,001).

Проведенный корреляционный анализ демонстрирует взаимосвязь между выживаемостью и концентрацией VEGF в крови у лабораторных животных и может свидетельствовать о влиянии лекарственно индуцированного/ингибированного ангиогенеза на динамику выживаемости.

Второй приоритетной задачей в экспериментальном исследовании является оценка концентрации VEGF в сыворотке крови у лабораторных животных после моделирования ОИЗК с учетом применения

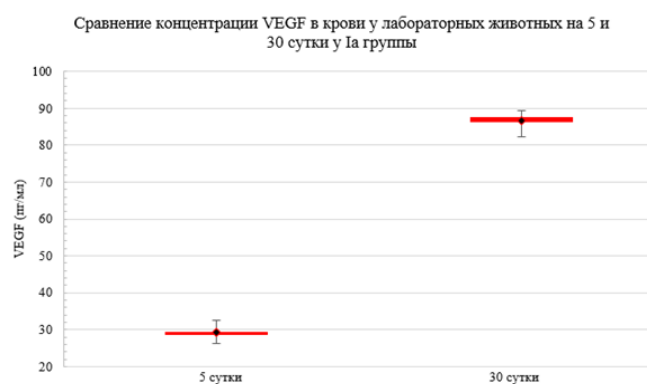


Рис. 4. Динамика VEGF в группе Ia
Fig. 4. VEGF dynamics in Group Ia

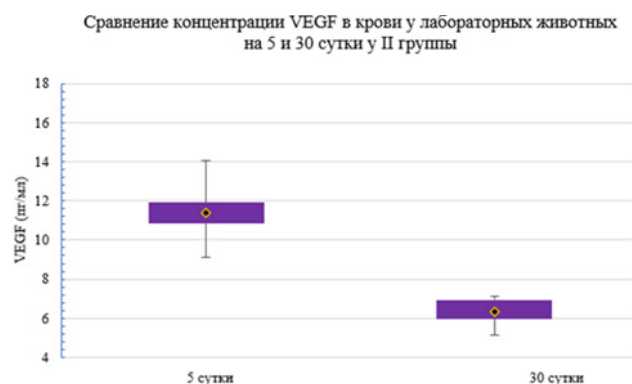


Рис. 5. Динамика VEGF в группе II
Fig. 5. VEGF dynamics in Group II

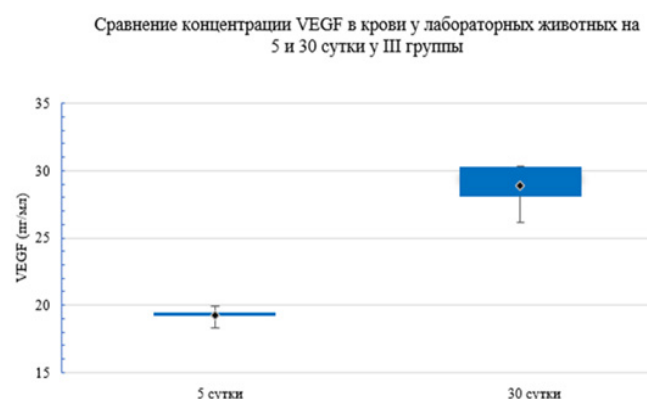


Рис. 6. Динамика VEGF в группе III
Fig. 6. VEGF dynamics in Group III

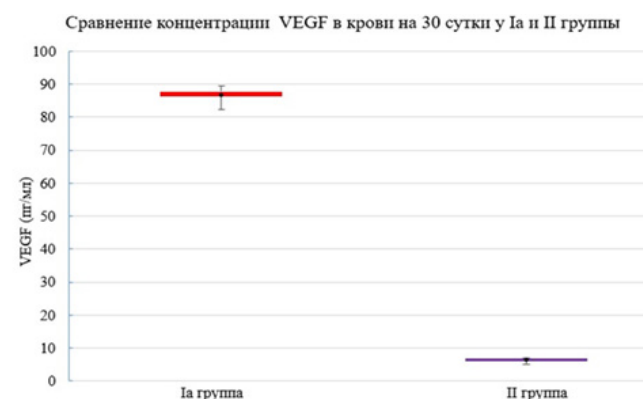


Рис. 7. Динамика VEGF в группах Ia и II
Fig. 7. VEGF dynamics in Groups Ia and II

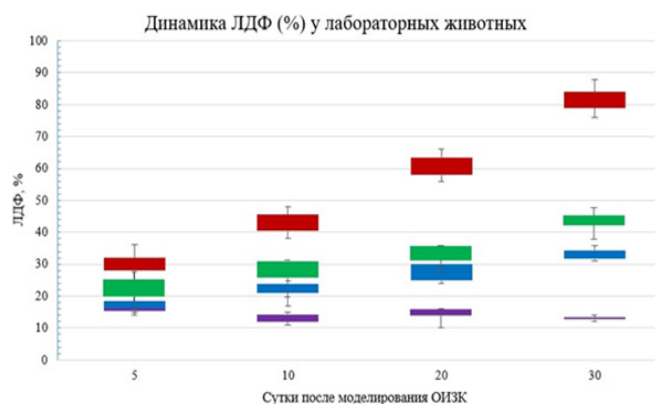


Рис. 8. Динамика ЛДФ (%) у лабораторных животных. Цветовая маркировка: группа Ia – красный, группа Ib – зеленый, группа II – фиолетовый, группа III – синий

Fig. 8. LDF dynamics (%) in laboratory animals. Color coding: Group Ia – red, Group Ib – green, Group II – purple, Group III – blue

стимуляторов и ингибиторов VEGF. Полученные данные продемонстрированы на рис. 3.

Определение концентрации VEGF в крови реализовано с помощью ИФА с применением метода ELISA. Данные представлены в табл. 3. Для показателности определено среднее со стандартным отклонением значений и медиана.

Анализ полученных данных у биологических объектов демонстрирует значимые различия концентрации VEGF в плазме крови в динамике с учетом индуцирования/ингибирования ангиогенеза ($p < 0,001$).

В группе Ia уровень VEGF в плазме крови постепенно нарастал по мере восстановления функциональной активности задней конечности с лигированной БА. К 30-м суткам экспериментального исследования уровень VEGF в крови был достоверно выше, чем у контрольной группы и составил $87,08 \pm 2,44$ пг/мл ($p < 0,001$) (рис. 4). Причина повышения концентрации VEGF в крови, возможно, объясняется тем, что моделирование ОИЗК запустило механизм естественного ангиогенеза, который был дополнительно индуцирован применением рCMV-VEGF165. Синергия привела к росту концентрации VEGF в плазме крови, что также отразилось на восстановлении функциональной возможности конечности (потепление конечности, постепенный рост шерсти, реакция на болевую чувствительность, восстановление подвижности конечности) и поведении лабораторного животного.

Динамика уровня VEGF в плазме крови у лабораторных животных группы Ib также статистически отличалась от контрольной группы и к 30-м суткам составила $40,77 \pm 2,01$ пг/мл ($p < 0,001$). Однако введение рCMV-VEGF165 до моделирования ОИЗК не привело к существенному росту концентрации VEGF в крови. Фрагменты рCMV VEGF165 при локальном введении определяются лишь на первые сутки, так как после попадания в кровеносное русло плазмида полностью разрушается к исходу первых суток. Авторы полагают, что индуцирование ангиогенеза до моделирования ОИЗК имеет ограниченный эффект в виду отсутствия первоначальных стимулов (повреждение сосудистой стенки, гипоксия) для про-

Отношение рисков при сравнении показателей выживаемости между группами

Table 4

Risk ratio comparing survival rates between groups

Группа		Ia	Ib	II	III
		pCMV VEGF165	pCMV VEGF165	РГМА	К
Ia	pCMV VEGF165	–	–	–	–
Ib	pCMV VEGF165	–	–	0,136 (0,0337–0,648)*	0,467 (0,101–2,057)
II	РГМА	–	6,873 (1,543–30,608)*	–	3,148 (0,73–13,59)
III	К	–	2,18 (0,474–9,92)	0,329 (0,073–1,371)	–

Примечание: данные представлены в виде ОР с границами 95 % ДИ; * – $p < 0,05$.

растания новой коллатеральной сосудистой сети в эндотелиальных клетках, находящихся в состоянии «покоя».

Эффектом, отличным от группы Ia, определяется сниженная концентрация VEGF в плазме крови у лабораторных животных группы II, которым после моделирования ОИЗК были введены РГМА. К 5-м суткам устанавливается снижение уровня VEGF в плазме крови и составляет $11,37 \pm 4,94$ пг/мл, а к 10-м суткам определяется незначительное повышение – $13,16 \pm 4,69$ пг/мл. С 20-е по 30-е сутки уровень VEGF в группе II составляет $8,99 \pm 1,16$ пг/мл и $6,6 \pm 0,99$ пг/мл соответственно (рис. 5). Причины прироста и последующего снижения уровня VEGF в рамках нашего исследования остаются непонятными.

В группе III после моделирования ОИЗК производилось плацебо-введение 0,9 % раствора NaCl аналогичным методом, как в группе Ia. К 5-м суткам концентрация VEGF в плазме крови составила $19,26 \pm 0,53$ пг/мл. На 10-е и 20-е сутки концентрация VEGF в плазме крови повышалась и составила $23,11 \pm 1,76$ пг/мл и $29,48 \pm 4,18$ пг/мл соответственно. К 30-м суткам данный показатель незначительно снизился и составил $28,87 \pm 4,24$ пг/мл (рис. 6).

Для оценки значимости отличий уровня концентрации VEGF в крови были проведены анализ, оценка и статистическая обработка полученных результатов. Полученные данные свидетельствуют о значимости различий между группой Ia и группой II лабораторных животных на 30-е сутки экспериментального исследования (рис. 7).

Выполнено динамическое измерение уровня микроциркуляции при помощи метода ЛДФ (%). Зарегистрированные данные демонстрируют различия в динамике микроциркуляции у всех групп. В группе Ia определяется наибольший прирост уровня микроциркуляции в ишемизированной конечности с $30,1 \pm 3,48$ % до $81,75 \pm 4,2$ % на 5-е и 30-е сутки соответственно. Отрицательная динамика определяется в группе II, где уровень микроциркуляции на 5-е сутки составил $16,1 \pm 1,29$ %, а на 30-е сутки – $13 \pm 0,82$ %.

Исследование данных методом ЛДФ выполнялось, как и измерение концентрации VEGF в плазме крови, на 5-е, 10-е, 20-е, 30-е сутки с момента моделирования ОИЗК. По данным измерений на 5-е сутки определяется существенное снижение перфузии в

области оперированной конечности. У группы Ia наблюдается достоверное увеличение перфузии тканей и к 30-м суткам составляет $81,75 \pm 4,2$ % ($p < 0,05$) от контрлатеральной задней конечности (рис. 8). В группах Ib и III не определяются существенные отличия, которые составляют $43,66 \pm 3,44$ % и $33,25 \pm 2,21$ % соответственно. Системное введение антиангиогенных антител в динамике не только не позволило восстановиться перфузии ишемизированных тканей задней конечности, но и снизило показатели перфузии в динамике, что составило $16,1 \pm 1,28$ % и $13 \pm 0,82$ % к 5-м и 30-м суткам соответственно относительно контрлатеральной конечности. Полученные данные ЛДФ при сопоставлении с определением концентрации VEGF в плазме крови и выживаемостью биологических объектов дают основания заключить об эффективности применяемой методики лечебной стимуляции ангиогенеза и перспективности данного подхода при лечении ОИЗК в результате травматизации магистрального сосуда (БА).

Заключение

Проведенное исследование возможностей регулирования ангиогенеза в рамках эксперимента по моделированию ОИЗК на биологических объектах (кролики-самцы породы Белый Великан) демонстрирует значимость VEGF в процессе восстановления перфузии мягких тканей, функциональной активности конечности и выживаемости. Применение pCMV-VEGF165 после моделирования ОИЗК сопровождалось увеличением концентрации VEGF и последующим приростом перфузии мягких тканей, а также отразилось на выживаемости лабораторных животных в сравнении с другими экспериментальными группами. Результаты проведенного исследования также сопоставимы с открытыми источниками литературы [15, 16], где демонстрируется уменьшение зоны ишемии мягких тканей. Напротив, ингибирование ангиогенеза в области поврежденного магистрального сосуда конечности негативно отражается на компенсаторных возможностях поврежденного сегмента задней конечности, сохранности конечности, выживаемости биологических объектов. На сегодняшний день есть теоретические и практические научные знания о механизмах ангиогенеза при хронической ишемии нижних конечностей, однако более

пристального внимания требуют механизмы роста коллатеральной сети кровообращения при повреждении магистральных сосудов и опосредованной этим острой ишемии мягкотканых структур. Более детальное и углубленное исследование механизмов ангиогенеза в ране позволят расширить арсенал адъювантной терапии при патологиях конечностей, где ведущим звеном патогенеза является ишемия мягких тканей в результате повреждения артериальных сосудов. Полученные данные, по мнению авторов, в перспективе могут быть успешно внедрены в клиническую практику и с высокой долей эффективности дополнить хирургические и консервативные методы лечения при повреждении артерий конечностей у раненых и пострадавших. Сопоставление концентрации VEGF (пг/мл) в сыворотке крови и ЛДФ (%) дистальной части пораженной конечности в перспективе может стать одним из маркеров для прогнозирования исхода лечения пораженной конечности, а также теоретически, в сопоставлении с общими данными, послужить показанием к лекарственной стимуляции ангиогенеза. Генные и клеточные технологии могут стать одним из важнейших методов восстановления перфузии в ишемизированных тканях за счет формирования и роста микрососудистой сети, что впоследствии существенно снизит количество выполняемых ампутаций и улучшит конечный результат лечения при данной патологии.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. / The authors declare that they have no conflict of interest.

Соответствие принципам этики / Compliance with ethical standards

Проведенное исследование соответствует этическим принципам, установленным Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 г. и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006 г.), стандартам Хельсинкской декларации; одобрено независимым этическим комитетом при федеральном государственном бюджетном военном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, протокол № 286 от 19.12.2023 г. Опыты с использованием животных проводились в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных, введенными в действие Приказом Министра здравоохранения СССР № 755 от 12.08.1977 г., Правилами проведения научных исследований с использованием экспериментальных животных (распоряжение Президиума АН СССР № 120002496 от 02.04.1980 г.), Правилами проведения качественных клинических испытаний в Российской Федерации (утвержденными Минздравом РФ, 29.12.1998), а также Рекомендациями комитетам по этике, проводящим экспертизу биометрических исследований (ВОЗ, 2000). / This re-

search complies with the ethical principles established by the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (adopted in Strasbourg on March 18, 1986 and confirmed in Strasbourg on June 15, 2006), the standards of the Declaration of Helsinki and approved by the independent Ethics Committee at the S. M. Kirov Military Medical Academy, Protocol № 286 dated December 19, 2023. Experiments involving animals were conducted in accordance with the Rules for Conducting Works Involving Experimental Animals, implemented by Order of the Minister of Health of the USSR № 755 dated August 12, 1977, Rules for Conducting Scientific Research Using Experimental Animals (Decree of the Presidium of the USSR Academy of Sciences № 120002496 dated April 02, 1980), Rules for Conducting Qualitative Clinical Trials in the Russian Federation (approved by the Ministry of Health of the Russian Federation, December 29, 1998), as well as Operational Guidelines for Ethics Committees that Review Biomedical Research (WHO, 2000).

Литература / References

1. Клинков Р. Р., Ерошкин И. А., Васильев Д. Ю., Москаленко В. А. Лечение критической ишемии нижних конечностей – современные тенденции. (Обзор литературы) // *Диагностическая и интервенционная радиология*. 2022. Т. 16, №2. С. 46–53. [Klinkov RR, Eroshkin IA, Vasil'ev DYU, Moskalenko VA. Treatment of critical lower limb ischemia - current trends (literature review). *Diagnostic and Interventional Radiology*. 2022;16(2);6-53. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.25512/DIR.2022.16.2.05>.
2. Gupta R, Tongers J, Losordo DW. Human studies of angiogenic gene therapy. *Circulation Research*. 2009;105(8):724-736. <https://doi.org/10.1161/circresaha.109.200386>.
3. Макаревич П. И., Шевелев А. Я., Рыбалкин И. Н., и др. Новые плазмидные конструкции, предназначенные для терапевтического ангиогенеза и несущие гены ангиогенных факторов роста – VEGF, HGF и ангиопоэтина-1 // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2010. Т. 5, №1. С. 47–52. [Makarevich PI, Shevelev AY, Rybalkin IN, et al. Novel plasmid constructs with angiogenic growth factors genes human VEGF, HGF and angiopoietin-1 for therapeutic angiogenesis. *Cell Transplantation and Tissue Engineering*. 2010;5(1):47-52. (In Russ.)].
4. Shyu KG., Chang H, Wang BW, Kuan P. Intramuscular vascular endothelial growth factor gene therapy in patients with chronic critical leg ischemia. *The American Journal of Medicine*. 2003;114(2):85-92. [https://doi.org/10.1016/s0002-9343\(02\)01392-x](https://doi.org/10.1016/s0002-9343(02)01392-x).
5. Birk DM, Barbato J, Mureebe L, Chaer RA. Current insights on the biology and clinical aspects of VEGF regulation. *Vascular and Endovascular Surgery*. 2008; 42(6):517-530. <https://doi.org/10.1177/1538574408322755>.
6. Grochot-Przeczek A, Dulak J, Jozkowicz A. Therapeutic angiogenesis for revascularization in peripheral artery disease. *Gene*. 2013;525(2):220–228. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.03.097>.
7. Pan T, Wei Z, Fang Y, Dong Z, Fu W. Therapeutic efficacy of CD34(+) cell-involved mononuclear cell therapy for non-option critical limb ischemia: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Vascular Medicine*. 2018;23(3):219-231. <https://doi.org/10.1177/1358863x17752556>.
8. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and

pathological roles in various diseases. *Journal of Biochemistry*. 2013;153(1):13-19. <https://doi.org/1093/jb/mvs136>.

9. Melincovici CS, Bosca AB, Susman S, Marginean M, Mihu C, Istrate M, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Romanian Journal of Morphology & Embryology*. 2018;59(2):455-467. PMID: 30173249.

10. Shibuya M. VEGF-VEGFR System as a Target for Suppressing Inflammation and other Diseases. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*. 2015;15(2):135-144. <https://doi.org/10.2174/1871530315666150316121956>.

11. Slobodkina E, Boldyreva M, Karagayur M, Eremichev R, Alexandrushkina N, Balabanyan V, et al. Therapeutic angiogenesis by a "Dynamic Duo": simultaneous expression of HGF and VEGF165 by novel bicistronic plasmid restores blood flow in ischemic skeletal muscle. *Pharmaceutics*. 2020;12(12):1231. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121231>.

12. Юдин М. А., Плакса И. Л., Мжаванадзе Н. Д., и др. Оценка системного распределения и ангиогенного эффекта pl-VEGF165 в модели ишемии конечностей // Патология кровообращения и кардиохирургия. 2015. Т. 19, №4–2. С. 33–42. [Yudin MA, Plaksa IL, Mzhavanadze ND, et al. Estimation of systemic distribution and angiogenic effect of pl-VEGF165 in the model of limb ischemia. *Circulatory pathology and cardiac surgery*. 2015; 19(4-2):33-42. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.21688/1681-3472-2015-4-2-33-42>.

13. Barc P, Antkiewicz M, Sliwa B, Fraczowska K, Guzinski M, Dawiskiba T, et al. Double VEGF/HGF gene therapy in critical limb ischemia complicated by diabetes mellitus. *Journal of Cardiovascular Translational Research*. 2021 Jun;14(3):409-415. <https://doi.org/10.1007/s12265-020-10066-9>.

14. Liu Y, Li J, Zhou J, Liu X, Li H, Lu Y, et al. Angiogenesis and functional vessel formation induced by interstitial flow and vascular endothelial growth factor using a microfluidic chip. *micromachines* (Basel). 2022 Jan 29;13(2):225. <https://doi.org/10.3390/mi13020225>.

15. Tokunaga N, Nagaya N, Shirai M, Tanaka E, Ishibashi-Ueda H, Harada-Shiba M, et al. Adrenomedullin gene transfer induces therapeutic angiogenesis in a rabbit model of chronic hind limb ischemia: benefits of a novel nonviral vector, gelatin. *Circulation*. 2004;109(4):526-531. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000109700.81266.32>.

16. Laguens R, Cabeza Meckert P, Vera Janavel G, Del Valle H, Lascano E, Negroni J, et al. Entrance in mitosis of adult cardiomyocytes in ischemic pig hearts after plasmid-mediated rhVEGF165 gene transfer. *Gene Ther*. 2002;9(24):1676-1681. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301844>.

Информация об авторах

Хасанов Артур Ришатович – адъюнкт научно-исследовательского отдела (медико-биологических исследований) научно-исследовательского центра, Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия, ORCID: 0009-0003-0763-7194, e-mail: KhasArtRish@yandex.ru.

Головко Константин Петрович – д-р мед. наук, доцент, начальник научно-исследовательского центра, Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: labws@mail.ru, ORCID: 0000-0002-1584-1748.

Гаврилов Евгений Константинович – д-р мед. наук, преподаватель 1-й кафедры (хирургии усовершенствования

врачей), Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: gavrilo_vyevgeny@mail.ru, ORCID: 0000-0002-6653-2320.

Косулин Артем Владимирович – канд. мед. наук, доцент кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии им. профессора Ф. И. Валькера, Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, e-mail: hackenlad@mail.ru, ORCID: 0000-0002-9505-222X.

Бунтовская Александра Сергеевна – врач клинической лабораторной диагностики научно-исследовательской лаборатории (клеточных технологий) научно-исследовательского отдела (медико-биологических исследований) научно-исследовательского центра, Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: Sasha-trandina@rambler.ru, ORCID: 0000-0002-5816-9736.

Корешова Елена Игоревна – врач клинической лабораторной диагностики научно-исследовательской лаборатории (военной хирургии) научно-исследовательского отдела (экспериментальной медицины) научно-исследовательского центра, Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: Koreshova1993@mail.ru, SPIN-код автора: 5310-0605.

Глушаков Руслан Иванович – д-р мед. наук, начальник научно-исследовательского отдела (медико-биологических исследований) научно-исследовательского центра, Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: glushakoffruslan@yandex.ru, ORCID: 0000-0002-0161-5977.

Authors information

Khasanov Artur R. – Adjunct (Military Postgraduate), Research Department (Medical and Biological Research), Research Center, Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia, e-mail: KhasArtRish@yandex.ru, ORCID: 0009-0003-0763-7194.

Golovko Konstantin P. – MD, Associate Professor, Head, Research Center, Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia, e-mail: labws@mail.ru, ORCID: 0000-0002-1584-1748.

Gavrilo Evgenii K. – MD, Lecturer, 1st Surgery Department (Advanced Medical Training), Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia, e-mail: gavrilo_vyevgeny@mail.ru, ORCID: 0000-0002-6653-2320.

Kosulin Artem V. – Candidate (PhD) of Medical Sciences, Associate Professor, F. I. Valer Department of Operative Surgery and Topographic Anatomy, Saint Petersburg, Russia, e-mail: hackenlad@mail.ru, ORCID: 0000-0002-9505-222X.

Buntovskaya Alexandra S. – Clinical Laboratory Diagnostician, Research Laboratory (Cell Technologies), Research Department (Medical and Biological Research), Research Center, Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia, e-mail: Sasha-trandina@rambler.ru, ORCID: 0000-0002-5816-9736.

Koreshova Elena I. – Clinical Laboratory Diagnostician, Research Laboratory (Military Surgery), Research Department (Experimental Medicine), Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia, SPIN-code authors: 5310-0605, e-mail: Koreshova1993@mail.ru.

Glushakov Ruslan I. – MD, Head, Research Department (Medical and Biological Research), Research Center, Saint Petersburg, Russia, e-mail: glushakoffruslan@yandex.ru, ORCID: 0000-0002-0161-5977.