**Создание генно-инженерных плазмидных конструкций белков Ang-1 и VEGF165 и *in vivo* оценка их биологического потенциала**

***Попичева Е.А., Саченко А.Б., Щур В.В., Филипович Т.А., Маньковская С.В., Янцевич А.В.***

*Аспирант, 2 год обучения*

*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

*E-mail: ekaterinapopicheva@mail.ru*

Хроническая ишемия нижних конечностей (ХИНК) является одной из наиболее распространенных и серьезных патологий сердечно-сосудистой системы человека. Одним из методов лечения ХИНК является терапевтический ангиогенез, основанный на введении в ишемизированные ткани генетических конструкций, содержащих гены факторов роста, а также стволовых или прогениторных клеток [1].

Оптимизированные гены для экспрессии белков Ang-1 и VEGF165 в клетках человека синтезировали *de novo* из 65-звенных олигонуклеотидов используя полимеразную цепную сборку. Синтетические гены лигировали в экспрессионный вектор pcDNA 3.1(-) по сайтам рестрикции NheI и HindIII. Плазмиды с генами трансформировали в компетентные клетки DH5α и культивировали в ТБ среде. Выросшие клетки с кольцевой ДНК подвергали щелочному лизису с последующем удалением клеточного дербиса фильтрацией и концентрированием ультрафильтрацией. Сконцентрированный ретентант с плазмидной ДНК обрабатывали детергентом для удаления эндотоксина. Стерилизацию препарата проводили фильтрацией через 0,2 нм полиэфирсульфоновый (PES) фильтр.

Оценку восстановления функций ишемизированных задних конечностей *in vivo* проводили на крысах Wistar (n=40) обоего пола, возрастом 8 месяцев. Введение исследуемой субстанции и апирогенного физиологического раствора (АФР) осуществляли внутримышечно в заднюю лапу животного в дозе 100 мкг/жив на 28-е сутки после моделирования ХИНК. Наблюдение за развитием ХИНК проводили путем мониторинга порога ноцицептивной реакции (ПНР, тест «Рандалла-Селитто») и изменения паттернов походки.

Внутримышечное введение крысам раствора плазмидной ДНК pcDNA\_Ang-1 сопровождалось слабым антиноцицептивным эффектом к 42-м суткам, что подтверждается достоверным повышением значений порога ноцицептивной реакции. Изменений площади и интенсивности отпечатка ипсилатеральной конечности не зафиксировано.

Внутримышечное введение раствора плазмидной ДНК pcDNA\_VEGF165 обладает выраженным стимулирующим действием к увеличению количества капилляров в ишемизированной, что приводит к протекторному плейотропному антиноцицептивному эффекту на 28-е и 42-е сутки после терапии с достоверным повышением значений порога ноцицептивной реакции, площади и интенсивности отпечатка оперированной конечности.

Таким образом, в эксперименте *in vivo* установлен положительный сочетанный (ангиогенный и антиноцицептивный) эффект применения генно-инженерной плазмидной конструкции рсDNA\_VEGF165 в условиях моделированной ишемии мышц конечности.

**Литература**

1. DNA vaccines approach: from concepts to applications /V.B. Pereira [et al.] // World J. Vac. 2014. Vol. 4. P. 50-71.