

На правах рукописи

ЖУРАВЛЕВА МАРГАРИТА НИКОЛАЕВНА

**ВЛИЯНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ДВУХКАССЕТНОЙ ПЛАЗМИДНОЙ КОНСТРУКЦИИ,
НЕСУЩЕЙ ГЕНЫ *VEGF165A* И *BMP2*, НА ПРОЦЕССЫ ОСТЕОГЕНЕЗА *IN VITRO* И *IN
VIVO***

03.03.04 - Клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань 2019

Работа выполнена на кафедре генетики, а также на базе научно-образовательного центра фармацевтики ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Научный руководитель:

кандидат медицинских наук, директор по науке ПАО «Институт стволовых клеток человека»
Деев Роман Вадимович

Научный консультант:

доктор биологических наук, профессор,
главный научный сотрудник Института фундаментальной
медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский
(Приволжский) федеральный университет»
Ризванов Альберт Анатольевич

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор, директор Института
экспериментальной медицины и биотехнологии
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Самарский государственный медицинский университет»
Волова Лариса Теодоровна

доктор медицинских наук, старший научный сотрудник
Лаборатории соединительной ткани Федерального
государственного бюджетного учреждения "Национальный
медицинский исследовательский центр травматологии и
ортопедии имени Н.Н. Приорова" Министерства
здравоохранения Российской Федерации
Волков Алексей Вадимович

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение
науки «Институт теоретической и экспериментальной
биофизики» Российской академии наук

Защита диссертации состоится «29» января 2020 г. в 13:00 на заседании диссертационного совета КФУ 03.06 при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420055, г. Казань, ул. Карла Маркса, д. 76, в зале заседания ученого совета.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при Казанском (Приволжском) федеральном университете.

Автореферат разослан « » 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.А. Аникина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В физиологических условиях костная ткань обладает хорошим регенеративным потенциалом, однако при нарушении процесса восстановления ее возникает вторичный костный дефект, который может существовать годами. Замедленная консолидация осложняет до 10 % переломов костей (Morshed, 2014) и до 28% переломов в случае наличия сопутствующих хронических заболеваний (Perlman et al., 1999). Длительно существующие костные дефекты развиваются при остеохондропатиях (Ахтямов И.Ф., 2014), остеонекрозах различной этиологии (Muirphey et al., 2014). Проблему для лечения представляют протяженные дефекты длинных трубчатых костей и обширные дефекты костей черепа.

Широкое распространение в лечении протяженных костных дефектов получила костная пластика. Наилучшими свойствами остеоинтеграции, по мнению хирургов, обладают кровоснабжаемые аутотрансплантаты, однако взятие ткани из донорского участка травматично и ограниченно длиной питающей ножки (Кузанов А.И., 2005). Аваскулярные аутотрансплантаты обладают длительными сроками остеоинтеграции, часто секвестрируются. Кадаверные децеллюляризированные трансплантаты замещаются костной тканью только путем резорбции с последующей перестройкой. Скорость этих процессов низкая, поэтому целесообразно использование трансплантатов небольшого размера. Использование ксеногенных тканей ограничено их высокой реактогенностью в ряде случаев (Sun et al., 2015).

В случае нарушения консолидации, больших дефектов костной ткани и трофических нарушений стандартное лечение часто оказывается малоэффективным, что сопровождается длительной потерей трудоспособности пациента, вплоть до инвалидности, вызывающей существенный экономический и социальный ущерб (Kanakaris et al., 2007). В связи с вышеобозначенным актуальна разработка методов улучшения и ускорения процессов регенерации костной ткани. Перспективным направлением является применение натуральных и синтетических остеопластических материалов, обладающих остеокондуктивными свойствами, которые заполняют собой костный дефект, обладают необходимой формой и механическими свойствами, соответствующими потерянной костной ткани (Иванов С. Ю., 2013; Панкратов А.С., 2018). Однако их применение ограничено размером костного дефекта, так как низкая васкуляризация центральных областей имплантата замедляет процесс его ремоделирования и замещения аутокостью (Kang et al., 2014).

Один из подходов к индукции репаративных процессов в клеточном окружении – внесение факторов роста в место повреждения (Казакова В.С., 2015). Согласно литературным данным наиболее эффективны в качестве индукторов регенерации костной ткани являются два белка – BMP2 (bone morphogenetic protein 2, костный морфогенетический белок) и VEGF165 (vascular endothelial growth factor 165, фактор роста эндотелия сосудов 165) (Rivera et al., 2013; Beamer et al., 2010). BMP2, являясь дифференцировочным фактором, вызывающим дифференцировку клеток-предшественниц в хондрогенном и остеогенном направлениях, участвует как в энхондральном (при образовании трубчатых костей), так и в интрамемброзном (при формировании плоских костей, например, черепа) процессах формирования кости (Sheikh et al., 2015; Чеканов А.В., 2012). VEGF стимулирует ангиогенез, оказывает пролиферативный и антиапоптотический эффект, является хемоаттрактантом для эндотелиальных и гладкомышечных клеток. Рост сосудов, за который отвечает VEGF, является инициирующим фактором остеогенеза при энхондральном остеогенезе (Neufeld et al., 1999).

Репаративная регенерация костной ткани является длительным процессом, а действие вводимых белковых факторов *in situ* недолговечно вследствие их деградации в месте повреждения протеолитическими ферментами, поэтому возник вопрос об экспрессии этих белков непосредственно клетками костного дефекта и окружающих его тканей. В связи с тесной взаимосвязью процессов ангиогенеза и остеогенеза в ходе репарации костной ткани, целесообразным является применению генной терапии с использованием *bmp2* и *vegf165a* совместно в составе единого генотерапевтического средства. Безопасным методом осуществления генного трансфера является применение плДНК, которая не иммуногенна и не интегрируется в геном клетки-хозяина (Nayerossadat et al., 2012). Таким образом, разработка и применение генетической конструкции на основе плДНК, ко-экспрессирующей гены *bmp2* и

vegf165a представляется актуальной. Объединение подходов по имплантации остеопластических материалов и введению генотерапевтических препаратов плДНК, ко-экспрессирующей кДНК генов *bmp2* и *vegf165a*, с получением так называемых матриксов, совмещенных с ДНК (МСД), обладающих как остеокондуктивным, так и остеоиндуктивным эффектом, позволит не только восполнить значительное количество костной ткани веществом с заданной микроархитектурой и механическими свойствами, но и дополнительно стимулировать остеогенез за счет привлечения и дифференцировки остеобластов и васкуляризации имплантата.

Таким образом, совместное воздействие белковых факторов VEGF165 и BMP2, синтезируемых клетками при трансфекции плазмидной конструкцией, несущей гены этих белковых факторов, на процессы остео- и ангиогенеза *in vitro* и репаративного остеогенеза *in vivo* представляет фундаментальный и практический интерес. Недостаток способов эффективной доставки плазмидной ДНК в клетки-мишени *in vivo* является основной причиной, ограничивающей применение генетических конструкций в генной терапии и биомедицине для стимуляции регенерации. В этой связи возможность использования МСД, выполняющих одновременно остеокондуктивную и остеоиндуктивную функцию, в качестве нового терапевтического инструмента, представляет несомненный практический интерес.

Цель работы — оценка индукции репаративного остеогенеза при применении кодон-оптимизированной плазмидной генетической конструкции, несущей кДНК генов *vegf165a* и *bmp2* в составе матриксов, совмещенных с ДНК.

В рамках цели диссертационного исследования были поставлены следующие задачи:

1. Разработать экспрессионные плазмидные конструкции, кодирующие комбинации кДНК генов *vegf165A* и *bmp2*, а именно pBud-Kan-VEGF165A-BMP2, pBud-Kan-VEGF165A-eGFP, pBud-Kan-eGFP-BMP2, для индукции остеогенеза.

2. Провести анализ процессов остеогенеза и ангиогенеза *in vitro* под влиянием рекомбинантных белков, синтезируемых под действием предложенных плазмидных конструкций.

3. Получить остеопластические матриксы, совмещенные с плазмидной конструкцией pBud-Kan-*coVEGF165A*-*coBMP2* и оценить их цитотоксический эффект на культуры остеопрогениторных клеток *in vitro*.

4. Оценить процессы репаративного гистогенеза *in vivo* в модели гетеротопической имплантации матриксов, совмещенных с ДНК, в межмышечные пространства бедра крысы.

5. Оценить процессы репаративного остеогенеза *in vivo* в модели ортотопической имплантации матриксов, совмещенных с ДНК, в область дефекта бедренной кости крысы.

Научная новизна. В результате работы впервые создана плазмидная конструкция pBud-Kan-*coVEGF165A*-*coBMP2*, ко-экспрессирующая одновременно и независимо гены *vegf165a* и *bmp2*, оказывающие проангиогенное и проостеогенное действие. Полученная конструкция содержит кодон-оптимизированные последовательности кДНК генов *vegf165a* и *bmp2*, что способствует более активной экспрессии этих факторов в клетках. Впервые получены МСД на основе pBud-Kan-*coVEGF165A*-*coBMP2* и коммерчески доступных остеопластических материалов, исследована их ДНК-связывающая способность. Показано, что модификация материалов плДНК не оказывает токсического эффекта на клетки потенциального реципиентного ложа. Впервые остеопластические материалы, совмещенные с pBud-Kan-*coVEGF165*-*coBMP2*, были трансплантированы животным в гетеротопическое и ортотопическое положение и продемонстрирована их безопасность и эффективность в отношении индукции регенерационного остеогенеза длинных трубчатых костей. Имплантация МСД способствует более быстрому формированию костного регенерата по сравнению с обычными материалами. МСД способствует усилинию васкуляризации и длительному поддержанию усиленной васкуляризации в области имплантации.

Научно-практическая ценность работы. Настоящая работа расширяет знания о воздействии плДНК, несущей кДНК генов *vegf165* и *bmp2* на процессы ангио- и остеогенеза *in vitro* и *in vivo*. Полученная pBud-Kan-*coVEGF165*-*coBMP2* может быть использована при

патологических процессах, сопровождающихся остеогенной недостаточностью, и нарушением местного и системного кровоснабжения. Используемые в работе методические подходы позволяют вводить pBud-Kan-coVEGF165A-coBMP2 в область повреждения кости в составе МСД, что обеспечивает как остеокондуктивный, так и остеоиндуктивный эффект. Способность ДНК выдерживать высушивание позволяет использовать такие МСД в качестве готовой лекарственной формы, удобной в клиническом применении.

Положения выносимые на защиту

1. Рекомбинантные белки VEGF165 и BMP2, синтезируемые клетками после их трансфекции двухкассетной генетической конструкцией pBud-Kan-coVEGF165-coBMP2, совместно оказывают более выраженное индуцирующее действие в отношении процессов остеогенной дифференцировки в культурах клеток *in vitro*, по сравнению с воздействием отдельных рекомбинантных белков VEGF165 или BMP2.

2. Остеопластические материалы на основе коллагена и гидроксиапатита совмещенные с плДНК pBud-Kan-coVEGF165-coBMP2, при их имплантации в область костного дефекта способствуют привлечению и дифференцировке остеобластов за счет BMP2 и ангиогенезу за счет VEGF165A, что способствует более быстрому формированию костной ткани в составе регенерата, лучшей васкуляризации и более длительному ее поддержанию в области имплантации по сравнению с действием ординарных остеопластических материалов.

Апробация работы

Материалы диссертации представлены на следующих всероссийских и международных симпозиумах, конгрессах и конференциях: Международная конференция «Трансляционная медицина 2016», Казань, 13-16 октября 2016; Международная биологическая школа-конференция БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 21-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых, Москва, 17-21 апреля 2017; Актуальные вопросы фундаментальной, экспериментальной и клинической морфологии: Всероссийская конференция молодых специалистов, Рязань, 6 октября 2017; III Национальный конгресс по регенеративной медицине, Москва, 15-18 ноября 2017; VII Всероссийский симпозиум с международным участием Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии, Астрахань, 27-28 апреля 2017; Пироговский форум с международным участием «Хирургия повреждений, критические состояния. Спаси и сохрани», 25-26 мая 2017; XXV конгресс ESGCT в сотрудничестве с Немецким обществом генной терапии, Берлин, 17-20 октября 2017; Всероссийская научно-практическая конференция «Современные методы диагностики и лечения заболеваний и повреждений опорно-двигательного аппарата», Казань, 22-23 ноября 2018.

Публикация результатов исследования

По материалам диссертации опубликовано 6 статей в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях, в том числе, в трех, рекомендованных ВАК для защиты кандидатских диссертаций, и в пяти, входящих в SCOPUS, и 9 тезисов докладов на международных и всероссийских конференциях и конгрессах.

Структура и объем диссертационной работы

Материалы диссертационной работы изложены на 179 страницах машинописного текста. Работа содержит 40 рисунков и 8 таблиц. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследований, обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы. Библиография включает 223 источника.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. В работе использованы следующие клеточные культуры: культура клеток эмбриональной линии почки человека, содержащая Т-антителен вируса SV40 HEK293FT; культура мультипотентных мезенхимных стромальных клеток костного мозга (ММСК-КМ) человека; культура ММСК-КМ крысы; остеобласты крысы. Исследование воздействия МСД на процессы репаративного остеогенеза проведено на самцах лабораторных крыс линии Wistar.

Создание генетических конструкций. Для создания конструкции pBudKan-coVEGF165A-coBMP2 (далее pVB) использовали ранее описанный модифицированный (Ризванов А.А., 2014) экспрессионный вектор pBudCE4.1 (Invitrogen, Catalog #V532-20, США), в котором последовательность гена устойчивости к зеоцину и его промотор заменены на последовательность гена устойчивости к канамицину. Кодонную оптимизацию состава генов *vegf165a* и *bmp2* проводили с использованием алгоритма OptimumGene (GenScript, США). В качестве матрицы для кодонной оптимизации брали нуклеотидные последовательности мРНК генов *vegf165a* (GeneBank # AF486837.1) и *bmp2* (GeneBank # KC294426.1). Синтез de novo нуклеотидной последовательности кодон оптимизированных последовательностей кДНК *vegf165a* и *bmp2* и их клонирование в модифицированный плазмидный вектор pBud4.1CE осуществлено компанией GenScript (США). Так же с помощью описанных методов были разработаны контрольные плазмидные конструкции pBudKan-coVEGF165A-EGFP (далее pVG) и pBudKan-EGFP-coBMP2 (далее pBG).

Подтверждение наличия целевых генов в составе pBudKan-coVEGF165A-coBMP2. Для рестрикционного анализа расщепление плазмидных векторов по специфическим сайтам проводили с использованием рестриктаз *SacI* и *EcoRI* (LifeTechnologies), согласно инструкциям фирмы-производителя. Разделение фрагментов ДНК проводили в ходе гель-электрофореза в 1,5% агарозном геле при напряжении 8 В/см. Детектирование ДНК осуществляли с помощью системы визуализации Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ System (BioRad, США). Определение состава нуклеотидных последовательностей кДНК генов *bmp2* и *vegf165a* в составе плДНК pVB проводили методом секвенирования в компании GenScript (США) в соответствии с предоставленным техническим заданием.

Исследование экспрессии рекомбинантных белков VEGF165A и BMP2 *in vitro*. Функциональную активность генетических конструкций подтверждали анализом экспрессии трансгенов *vegf165a* и *bmp2* после трансфекции клеток HEK293FT (Invitrogen), ММСК-КМ человека и крысы и остеобластов крысы генетической конструкцией pVB с использованием трансфекционного агента Lipofectamine 3000 (LifeTechnologies), согласно рекомендациям производителя. Для оценки экспрессии трансгенов в трансфицированных культурах клеток проводили флуоресцентное иммуноцитохимическое окрашивание с помощью специфических антител к BMP2 и VEGF через 48 часов после трансфекции либо иммуноблоттинг по системе Laemmli в денатурирующих условиях (SDS-PAGE). Количественно экспрессию белков VEGF165A и BMP2 в супернатантах клеток HEK293FT, трансфицированных pVB, оценивали в динамике каждые 24 часа на протяжении 10 дней культивирования методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Остеогенная дифференцировка ММСК-КМ и остеобластов крысы. ММСК-КМ человека и крысы и остеобlastы крысы культивировали на среде, кондиционированной клетками HEK293FT, трансфицированными pBudKan-coVEGF165A-coBMP2, либо pBudKan-EGFP-coBMP2, либо pBudKan-EGFP-coVEGF165A (далее супернатанты pVB, pBG и pVG, соответственно), в течение 2 недель. Полученные культуры использовали для определения активности щелочной фосфатазы (ЩФ) и минерализации. Для качественного определения минерализации, являющейся признаком остеогенной дифференцировки, использовали реакцию von Kossa с 2% раствором нитрата серебра в dH₂O на ярком свету (60-100 Вт). Для количественной оценки минерализации окрашивали культуры 2% раствором ализаринового красного (pH 4,2) в течение 10 мин., с последующей экстракцией связавшегося с кальцием красителя 10% уксусной кислотой и определяли оптическую плотность элюента на при длине волны 405 нм. Активность ЩФ в пересчете на общий белок определяли с помощью реакции с п-нитрофенилфосфатом, измеряли оптическую плотность образцов при длине волны 405 нм.

Формирование клетками капилляраподобных структур на матриксе Matrigel. Влияние pVB на ангиогенез *in vitro* по сравнению с pBG и pVG оценивали методом формирования капилляраподобных структур на матриксе Matrigel со сниженной концентрацией факторов роста клетками ММСК-КМ человека и крысы, культивируемыми на среде, кондиционированной клетками HEK293FT, трансфицированными вышеуказанными плДНК. Формирование капилляраподобных структур оценивали после 16 часов инкубации с помощью фазово-контрастной и флуоресцентной микроскопии. Подсчитывали число сформировавшихся узлов ветвления.

Создание остеопластического материала, совмещенного с ДНК (МСД). Для *in vivo* экспериментов в качестве способа доставки плДНК pVB использовали МСД, полученные в соответствии с модифицированным протоколом патента А.А. Исаева и соавт. (2014 г) (Исаев А.А., 2014; Бозо И.Я., 2017). Исследовали синтетические (коллаген+ГА (ЗАО «НПО Полистом», Россия), трикальций фосфат (ТКФ) (ООО «БиоНова», Россия), октакальций фосфат (ОКФ) (ООО «БиоНова», Россия), ГА (ЗАО «НПО Полистом», Россия)) и натуральные (лиофилизированная трупная губчатая костная ткань человека (ООО «ЛиоСелл», Россия)) материалы. Материалы инкубировали с 500 мкл 0,5 М натрий-фосфатного буфера с pH 7,4 24 часа при 37°C при покачивании 200 об./мин. Буфер удаляли, отмывали 500 мкл 10 mM натрий-фосфатного буфера с pH 7,4 4 раза по 10 мин. при 37°C при покачивании 200 об./мин. Высушивали 24 часа в ламинарном боксе. Добавляли pVB, растворенную в 10 mM натрий-фосфатном буфере с pH 7,4 с концентрацией 1000 мкг/мкл и инкубировали 24 часа при 37°C при покачивании 200 об./мин. Удаляли избыток раствора плДНК и повторяли высушивание. Элюировали несвязавшуюся с материалами плДНК с помощью 500 мкл 5 mM натрий-фосфатного буфера с pH 7,4 4 раза по 10 мин. при 37°C при покачивании 200 об./мин. Высушивали материалы 24 часа в ламинарном боксе, после чего использовали для дальнейших *in vitro* и *in vivo* экспериментов. При необходимости материалы хранили при +4°C. Емкость материалов для плДНК рассчитывали по формуле: Емкость матрикса (мкг плДНК/г матрикса) = [объем добавленной плДНК (мл) × концентрацию плДНК (нг/мкл) – концентрация плДНК в элюенте (нг/мкл) * масса элюента (г)] / масса матрикса (г).

Эксперименты in vivo. Эксперименты выполнены на половозрелых самцах крыс линии Wistar в возрасте 4-5 месяцев. Проведение исследований было одобрено Локальным этическим комитетом ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) Федеральный Университет» (Протокол №3 от 23.03.2017 г.). Животные содержались согласно общепринятым лабораторным правилам, со стандартным суточным режимом и свободным доступом к воде и пище. Анестезия осуществлялась посредством внутрибрюшинного введения 6,4% раствора хлоралгидрата из расчёта 400 мг/кг массы. В послеоперационный период с целью профилактики инфекционных осложнений осуществляли внутримышечное введение Цефтриаксона в дозировке 50 мг/кг массы тела 1 раз в сутки на протяжении 5 дней.

Гетеротопическая (внутримышечная) имплантация остеопластических материалов. Для оценки биологической совместимости и безопасности созданных МСД их имплантировали животным в гетеротопическую позицию – внутримышечно. Животных наркотизировали как описано выше, депилировали кожу в области бедра и обрабатывали операционное поле 70% раствором этилового спирта. Кожу и поверхностную фасцию рассекали по боковой поверхности бедра продольно бедренной кости. В задней группе мышц бедра формировали карман, в который укладывали МСД (экспериментальная группа), либо исходный остеопластический материал (контрольная группа). Эксперимент проведен в четырех повторениях. Масса имплантированного Коллаген+ГА составила $1,5 \pm 0,3$ мг, ОКФ - $10 \pm 1,5$ мг, Коллаген+ГА + pVB - $1,5 \pm 0,2$ мг с содержанием плДНК $11,4 \pm 1,5$ мкг, ОКФ + pVB - 10 ± 1 мг с содержанием плДНК $31 \pm 3,1$ мкг. Мышечный карман и кожную рану ушивали, кожные покровы обрабатывали 2% спиртовым раствором бриллиантового зеленого. Через 60 сут. животных выводили из эксперимента.

Оценка влияния остеопластических материалов, совмещенных с ДНК, на процессы регенерации костной ткани. Животных наркотизировали и обрабатывали операционное поле как описано выше. Кожу и поверхностную фасцию рассекали по боковой поверхности бедра в проекции бедренной кости, тупо сепарировали мышцы передней и задней групп бедра для доступа к бедренной кости. Диафиз отделяли от мягких тканей и надкостницы. На передней поверхности бедра с помощью нейлоновых хомутов и хирургической проволоки закрепляли индивидуально

разработанную пластину из медицинской стали размером $25 \times 5 \times 1$ мм. В области средней трети диафиза бедренной кости выпиливали фрагмент кости длиной 3 мм. В область дефекта имплантировали остеопластический материал Коллаген+ГА или ОКФ, либо МСД Коллаген+ГА или ОКФ объемом около 30 мм³. Масса имплантированного Коллаген+ГА составила 5 ± 1 мг, ОКФ - $54,7 \pm 2,1$ мг, Коллаген+ГА + pVB - 5 ± 1 с содержанием плДНК 38 ± 8 мкг, ОКФ + pVB - $51,5 \pm 0,8$ мг с содержанием плДНК $160 \pm 2,5$ мкг. Эксперимент проведен в восьми повторениях для каждой экспериментальной группы. Для фиксации имплантатов в области дефекта использовали фибриновый клей Тиссукол (Baxter, США). Ткани ушивали послойно, как описано выше, кожные покровы обрабатывали 2% спиртовым раствором бриллиантового зеленого. Животных выводили из эксперимента через 30 и 60 сут. после операции.

Оценка эффективности трансфекции клеток реципиентного ложа методом ПЦР-РВ. Эффективность трансфекции клеток гетеро- и ортотопического реципиентного ложа оценивали через 7 суток после имплантации нативных остеопластических материалов и МСД. Эксперимент проведен в трех повторениях. Для этого животным проводили анестезию как описано выше, извлекали имплантаты и прилежащие к ним ткани реципиентного ложа, выделяли из них мРНК Тризолом, синтезировали кДНК, определяли уровень экспрессии кодон-оптимизированных *vegf165a* и *bmp2* методом ПЦР-РВ, согласно протоколу Taq Man 2Step в режиме: 95 °C – 30 сек. (калибровка), 95 °C – 3 мин. (предварительный нагрев), далее 45 циклов: 95 °C – 15 сек и 55 °C – 30 сек. Использовали праймеры и зонды: coVEGF-TM-F gCggAgAAAaGCAAAgATCCg; coVEGF-TM-R CCTCggCTTgTCACATCTgC; coVEGF-Probe [FAM]AgCTgCCTCgCCTTgCAACgCgA [BH1]; со BMP2-TM-F CATCgTgCAgACCCTggTgA; со BMP2-TM-R AgCCTTCCACCAACCACATgTCC; соBMP2- Probe [FAM]TCCCAAggCCTgCTgCgTgCCTAC[A]BH1.

Морфологическое исследование внутримышечных имплантатов и костных регенераторов. Животных наркотизировали, выделяли внутримышечные имплантаты либо бедренные кости, образцы фиксировали в 10% забуференном в PBS формалине 2 сут., декальцинировали в СофтиДек (Биовитрум, Россия) и заливали в парафин. Изготавливали парафиновые срезы толщиной 6 мкм на микротоме НМ 355S (Thermo Scientific, США). Для дачи общей морфологической характеристики, определения лейкоцитарной инфильтрации, применяли окрашивание гематоксилином и эозином. Для оценки наличия и площади остеогенных элементов применяли окрашивание по Вейгерту Ван Гизону. Иммуногистохимическое исследование проводили пероксидазным методом с помощью набора Novolink (Novocastra, Великобритания) в соответствии с рекомендациями производителя. Использовали первичные антитела против эндотелия крыс (Biolegend, 205001) в рабочем разведении 1:100. Подсчитывали процент от общей площади дефекта, занимаемый соединительной, хрящевой, костной тканями и остаточными элементами имплантируемых матриксов в области костного регенерата, количество сосудов всех диаметров в пересчете на площадь выбранной области костного регенерата. Гистоморфометрический анализ проводили с помощью программного обеспечения Aperio ImageScope (Leica, Германия) и ImageJ (National Institutes of Health, США).

Статистическая обработка результатов и программное обеспечение

Создание праймеров проводили с использованием пакета программ PrimerSelect (DNA Star, США) (Plasterer, 1997). Для графического представления карты созданной плазмидной конструкции использовали он-лайн приложение PlasMapper V.2. Статистическую обработку и анализ полученные в ходе работ результатов и проводили с помощью программ Microsoft Excel 2017 и STATISTICA Base (Dell, США). Статистическая достоверность разницы для *in vitro* исследований определялась с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с тестом Тьюки, графические данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка средней величины. Для *in vivo* исследований достоверность разницы определялась с помощью критерия Манна-Уитни, графические данные представлены как медиана и четыре квартиля. Данные считались достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Создание генетических конструкций

Стандартными молекулярно-генетическими методами была получена генетическая конструкция pBud-Kan-coVEGF165A-coBMP2, ко-экспрессирующая гены *bmp2* и *vegf165a* (рисунок 1). Аналогичным образом были разработаны контрольные плазмидные конструкции pBudKan-coVEGF165A-EGFP и pBudKan-EGFP-coBMP2 как описано выше для pBud-Kan-coVEGF165A-coBMP2.

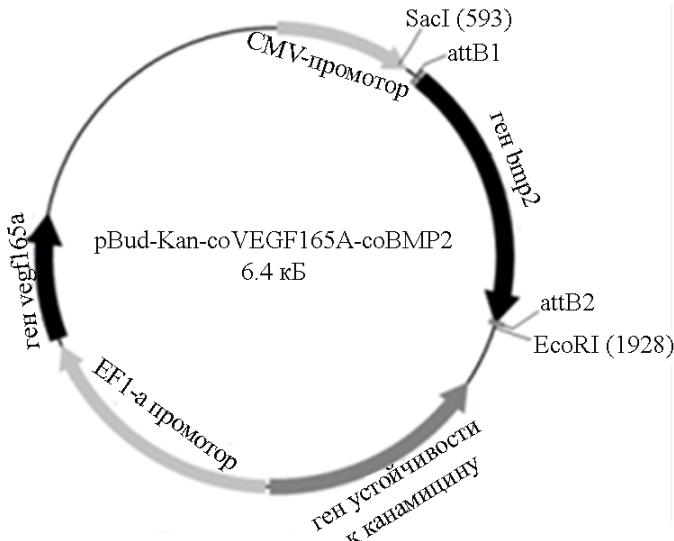


Рисунок 1. Карта-схема плДНК pBudKan-coVEGF165A-coBMP2. Открытые рамки считывания обозначены стрелками (для генов VEGF165A (573 п.н.) и BMP2 (1188 п.н.) – черные).

Подтверждение наличия целевых генов выполнено с помощью рестрикционного анализа – показано наличие целевых вставок (рисунок 2). Состав нуклеотидной последовательности кодон-оптимизированных последовательностей кДНК генов *bmp2* и *vegf165a* и pVB подтвержден методом секвенирования, проведенным в компании GenScript (США) в соответствии с предоставленным техническим заданием.

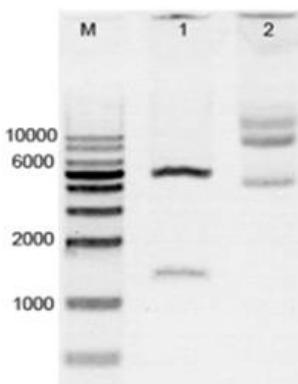


Рисунок 2. Электрофореграмма продуктов плДНК pBud-Kan-VEGF165A-BMP2 и продуктов ее расщепления рестриктазами EcoRI и SacI. M – маркер ДНК (KB Ladder); 1 – продукты расщепления; 2 – нерасщепленная плДНК (сверху вниз: линейная, циркулярная и суперскрученная формы)

Анализ экспрессии трансгенов клетками HEK 293 FT, ММСК костного мозга крысы, человека, остеобластами крысы, трансфицированными плДНК pBud-Kan-VEGF165A-BMP2

Синтез белков VEGF165A и BMP2 в клетках HEK 293 FT, ММСК костного мозга крысы, человека, остеобластов крысы, трансфицированных pVB, подтвердили методом флуоресцентной

иммуноцитохимии - наблюдалось положительное окрашивание антителами к VEGF и BMP2 (рисунки 3, 4). При иммуноблоттинге показано наличие на мемbrane полос, соответствующих массам белков BMP2 (18кДа) и VEGF165A (21 кДа) (рисунок 5, 6), что подтверждает их синтез в трансфицированных клетках.

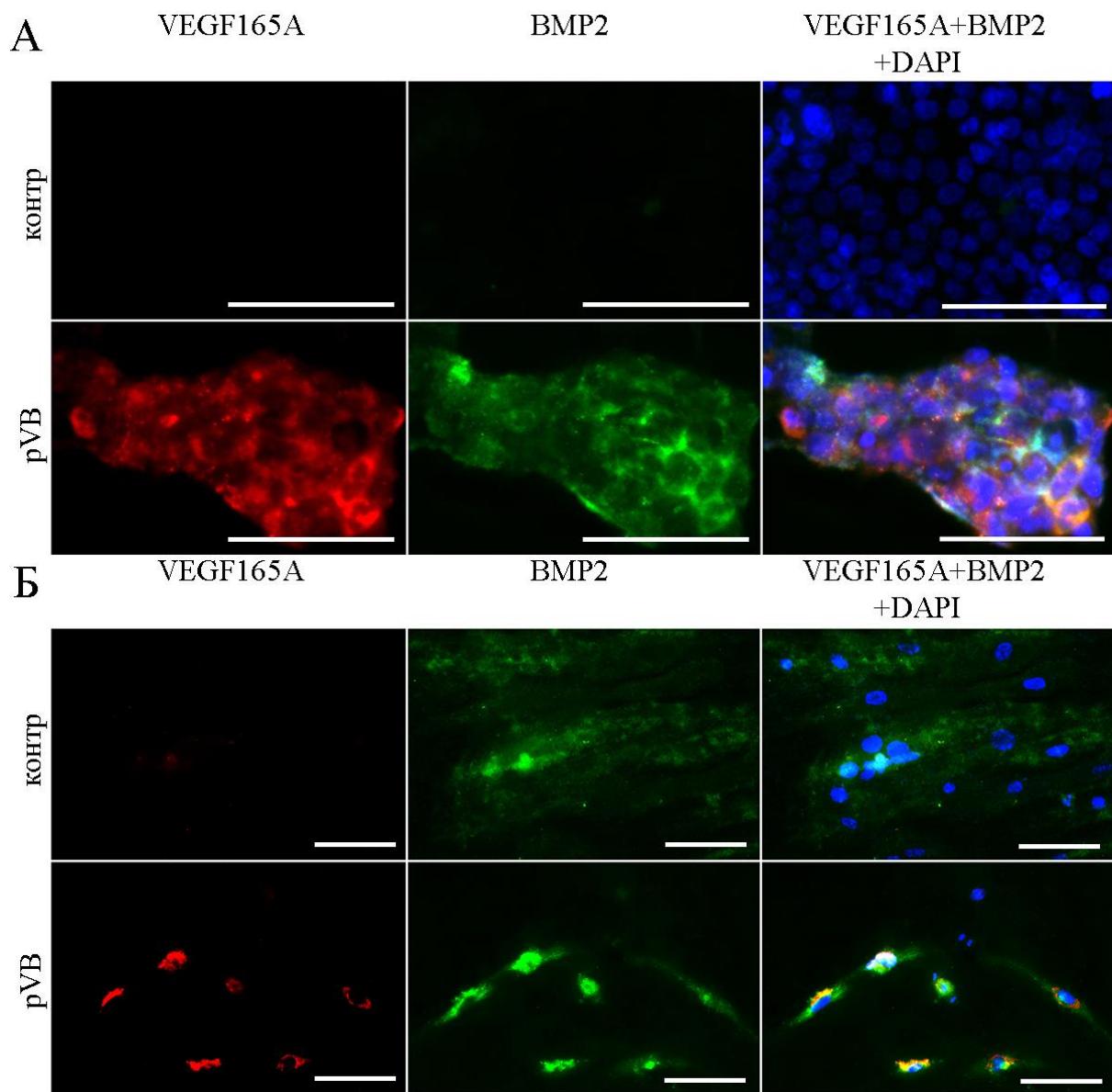


Рисунок 3. Клетки HEK 293 FT (А), MMCK-KM человека 3 пассажа (Б): окрашивание антителами к VEGF (красный) и BMP2 (зеленый) через 48 часов после трансфекции pBudKan-coVEGF165A-коBMP. Ядра окрашены DAPI (синий). pVB – клетки, трансфицированные pBudKan-coVEGF165A-коBMP; контр – нетрансфицированный контроль. Масштабный отрезок - 100 мкм

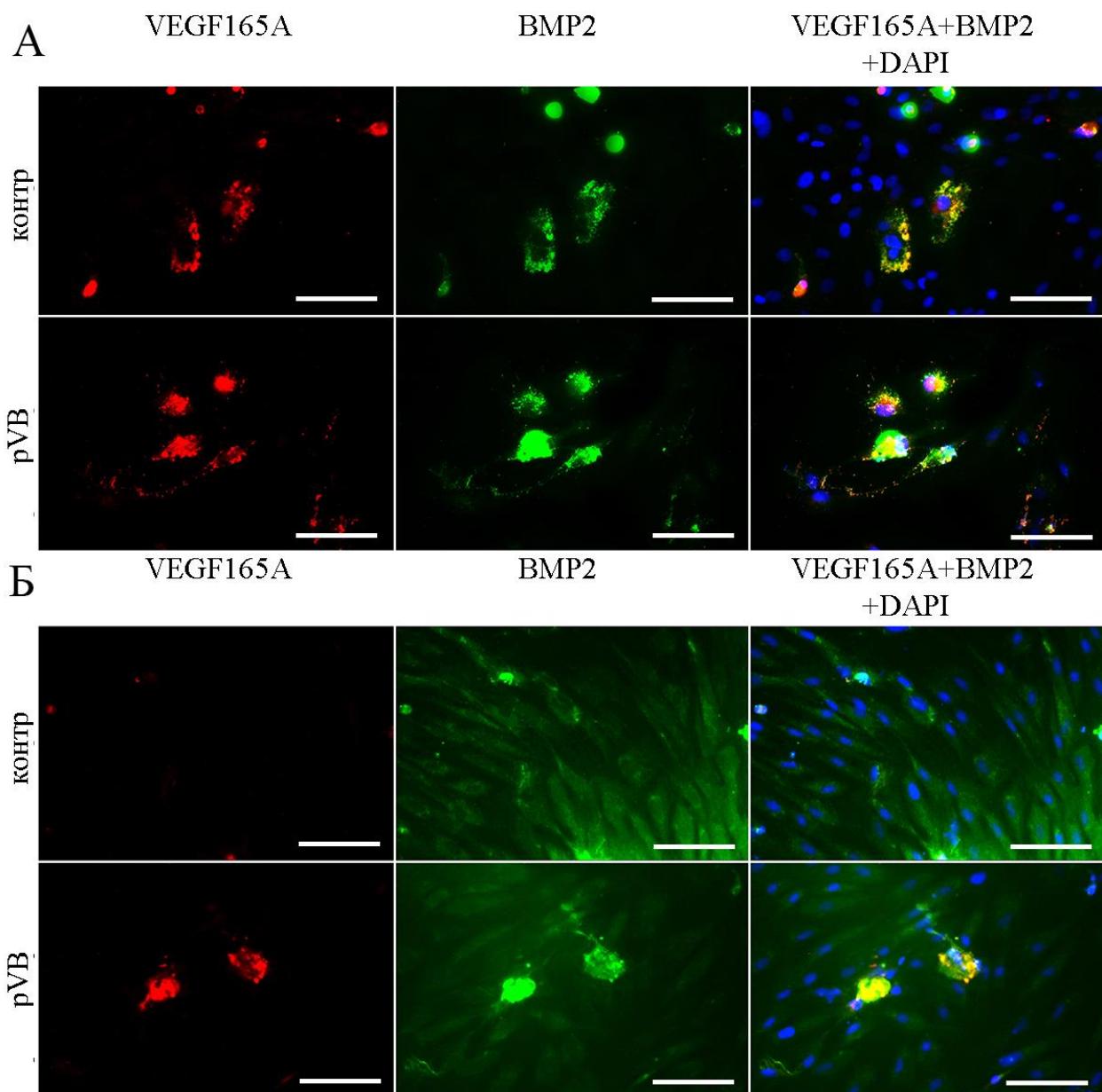


Рисунок 4. MMCK-KM крысы 3 пассажа (А), остеобласти крысы 1 пассажа (Б): окрашивание антителами к VEGF (красный) и BMP2 (зеленый) через 48 часов после трансфекции pBudKan-coVEGF165A-coBMP. Ядра окрашены DAPI (синий). pVB – клетки, трансфицированные pBudKan-coVEGF165A-coBMP; контр – нетрансфицированный контроль. Масштабный отрезок – 100 мкм

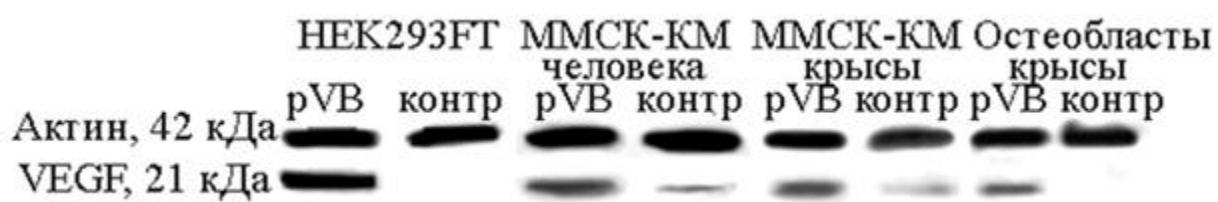


Рисунок 5. Иммуноблоттинг генетически модифицированных и нативных клеток HEK293FT, MMCK-KM человека и крысы, остеобластов крысы. Окрашивание антителами к актину (42 кДа) и VEGF (21 кДа). pVB – клетки, трансфицированные pBudKan-coVEGF165A-coBMP; контр – нетрансфицированные клетки



Рисунок 6. Иммуно blotting генетически модифицированных и нативных клеток HEK293FT, MMCK-KM человека и крысы, остеобластов крысы. Окрашивание антителами к актину (42 кДа) и BMP2 (18 кДа). pVB – клетки, трансфицированные pBudKan-coVEGF165A-коBMP; контр – нетрансфицированные клетки

Эффективность трансфекции pBG с помощью реагента Lipofectamine 3000, оцененная методом проточной цитофлуориметрии, составила $96\pm2\%$ для HEK293FT (1-кратная трансфекция), MMCK-KM человека $21\pm2\%$, крысы $49\pm4\%$, остеобластов крысы $31\pm2\%$ (двукратная трансфекция).

Максимальный уровень синтеза VEGF в супернатантах клеток HEK 293FT, трансфицированных pVB агентом Turbofect, оцененный методом ИФА, - $13880,30\pm1416,68$ пг/мл через 24 часа после трансфекции. Максимальный уровень синтеза BMP2 был также отмечен через 24 часа после трансфекции - $17280,97\pm1817,32$ пг/мл. Далее, в течение 10 сут. культивирования наблюдалось постепенное снижение синтеза рекомбинантных белков, с фазой плато на 2-5 сут. для VEGF на уровне около 9000 пг/мл и 4-5 сут. для BMP2 на уровне около 7000 пг/мл. На 10 сут. синтез VEGF составил $361,14\pm76,77$ пг/мл, BMP2 - $82,04\pm74,06$ пг/мл.

Анализ влияния среды, кондиционированной клетками HEK293FT, трансфицированными плДНК pBud-Kan-VEGF165A-BMP2, на остеогенную дифференцировку MMCK костного мозга и остеобластов крысы

Через 14 дней культивирования реакция по von Kossa и окрашивание ализариновым красным выявили кальциевые депозиты в культурах MMCK костного мозга человека и крысы и остеобластов крысы, культивируемых на среде, кондиционированной супернатантами pVB, pVG и pBG и среде для остеогенной дифференцировки (положительный контроль, Диф. на рисунке), в то время как в культурах, инкубировавшихся в контрольной среде (отрицательный контроль, Контр. на рисунке), таковых не наблюдалось (рисунок 7). Таким образом, культивирование клеток-предшественниц в среде, кондиционированной клетками HEK293FT, трансфицированными pVB, способствует образованию кристаллов фосфатов кальция в синтезируемом *in vitro* межклеточном матриксе, что в свою очередь свидетельствует о влиянии рекомбинантных факторов в супернатантах на остеогенную дифференцировку исследованных клеток. При количественной оценке остеогенной дифференцировки методом экстракции ализаринового красного показали, что среды, кондиционированные супернатантами pVG и pBG стимулировали процесс остеогенной дифференцировки, однако среда, кондиционированная клетками HEK293FT, трансфицированными pVB стимулировала накопление кальция в культурах клеток достоверно лучше ($p\leq0,05$) (рисунок 8).

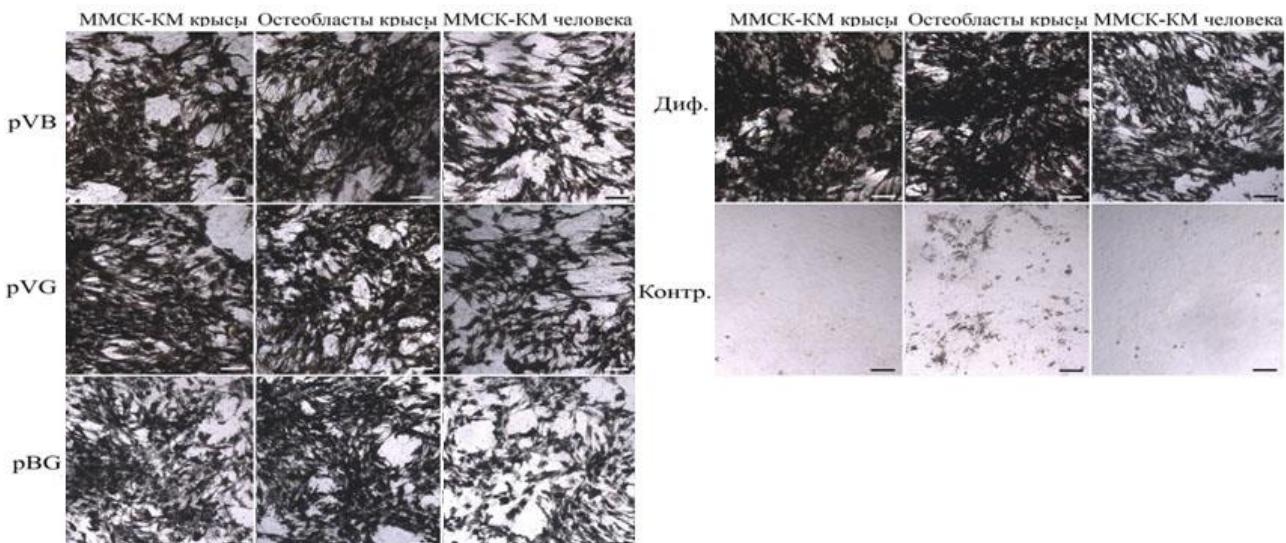


Рисунок 7. ММСК-КМ крысы и человека, остеобласти крысы, 14 дней остеогенной дифференцировки. Культивирование на среде, кондиционированной супернатантом с клеток HEK293FT, трансфицированных pBud-Kan-coVEGF165-коBMP2 (pVB), pBud-Kan-coVEGF165-EGFP (pVG), pBud-Kan- EGFP-коBMP2 (pBG), на среде аMEM (Контр), дифференцировочной среде (Диф.). Окрашивание по методу von Kossa. Световая микроскопия. Масштабный отрезок 100 мкм.

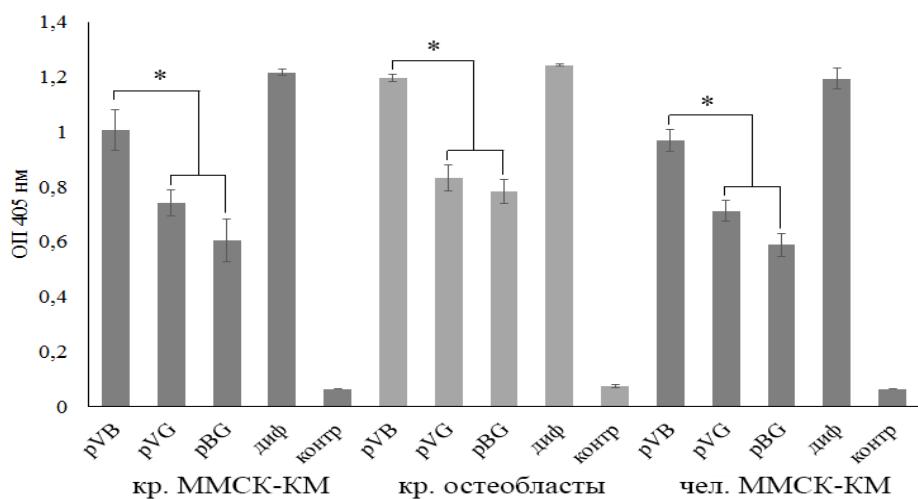


Рисунок 8. Экстракция ализаринового красного из культур клеток ММСК-КМ крысы и человека, остеобластов крысы после 14 сут. остеогенной дифференцировки. Культивирование на среде, кондиционированной супернатантом с клеток HEK293FT, трансфицированных плДНК pBud-Kan-coVEGF165A-коBMP2 (pVB), плДНК pBud-Kan-coVEGF165A-EGFP (pVG), плДНК pBud-Kan-EGFP-коBMP2 (pBG), на среде аMEM (Контр), дифференцировочной среде (диф.). Среднее значение \pm ошибка. * $p \leq 0,05$

На 7 сут. активность ЩФ в культурах, культивированных на среде, кондиционированной супернатантом pVB, достоверно выше, чем в культурах, культивированных на среде, кондиционированной супернатантом pVG ($p < 0,05$). На 10 сут. активность ЩФ в культурах, культивированных на среде, кондиционированной супернатантом pVB, достоверно ниже, чем в культурах, культивированных на среде, кондиционированной супернатантом pBG и pVG ($p < 0,05$). При культивировании ММСК-КМ крысы и человека и остеобластов крысы с супернатантами pVB, активность ЩФ в супернатантах культур достоверно возрастает по сравнению с супернатантами с культурами, культивируемыми на контрольной питательной среде. Активность ЩФ повышалась в

период 3-10 дня культивирования и снижалась к 14 дню. В культурах ММСК-КМ крысы и человека, культивированных на среде, кондиционированной супернатантами pVB, максимальная активность ЩФ наблюдалась на 7 сут., она была выше, чем в культурах, культивированных на среде, кондиционированной супернатантами pVG ($p<0,05$) и достоверно не отличалась от таковой для клеток, культивированных на среде, кондиционированной супернатантами pBG. В культурах ММСК-КМ крысы и человека, культивированных на среде, кондиционированной супернатантом pVB, падение активности ЩФ наступало раньше (к 10 дню), нежели в культурах, культивированных на среде, кондиционированной клетками HEK293FT, трансфицированными pBG и pVG ($p<0,05$). В культурах остеобластов крыс, культивированных на среде, кондиционированной супернатантами pVB, активность ЩФ на протяжении периода наблюдения достоверно не отличалась от активности ЩФ клеток, культивируемых на среде, кондиционированной клетками HEK293FT, трансфицированными плДНК pBG и pVG.

Анализ способности ММСК-КМ крысы и человека к формированию капилляраподобных структур под действием среды, кондиционированной супернатантом с культурой клеток HEK293T, трансфицированными плДНК pBud-Kan-coVEGF165A-coBMP2

ММСК-КМ крысы и человека формируют капилляраподобные структуры под действием среды, кондиционированной супернатантом pVB с концентрацией VEGF 10 нг/мл (определен ИФА). Число узлов ветвления капилляраподобных структур при культивировании на среде, кондиционированной супернатантом pVB, было в 1,89 раза (для ММСК-КМ крысы) и в 3,63 раза (для ММСК-КМ человека) выше, чем для тех же культур, культивируемых на контрольной среде (Контр на рисунке 9), не содержащей факторов VEGF165A или BMP2. Таким образом, рекомбинантные белки, синтезируемые клетками после их трансфекции pVB, обладают проангиогенным эффектом. При культивировании клеток на среде, кондиционированной супернатантами с клеток HEK293T, трансфицированными pVG и pBG так же наблюдали их повышенную по сравнению с контролем способность к формированию капилляраподобных структур – в 2,2 раза для ММСК-КМ крысы и в 3,82 и в 3,85 раз соответственно для ММСК-КМ человека.

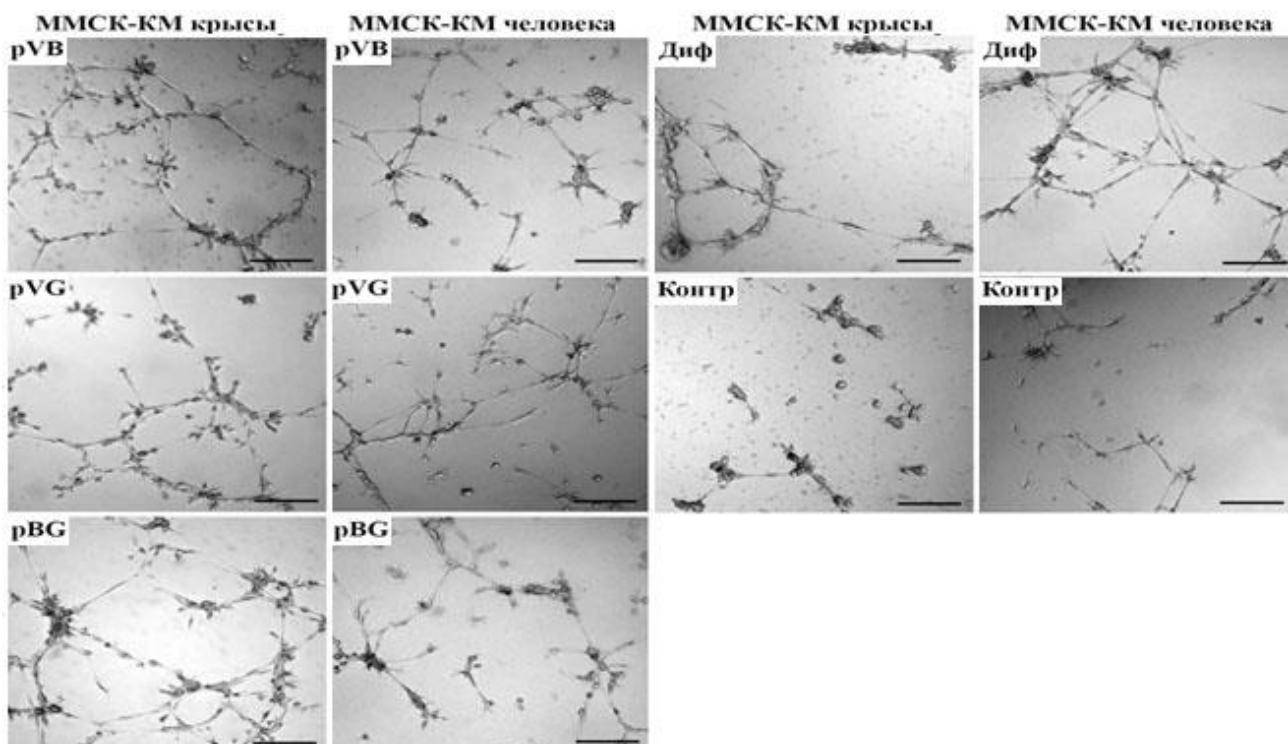


Рисунок 9. Капилляраподобные структуры, формируемые ММСК-КМ крысы и человека на матригеле. Культивирование на среде, кондиционированной супернатантом с клеток HEK293FT, трансфицированными pBud-Kan-coVEGF165A-coBMP2 (pVB), плДНК pBud-Kan-coVEGF165A-EGFP (pVG), плДНК pBud-Kan-EGFP-coBMP2 (pBG), на среде аMEM (Контр), дифференцировочной среде (Диф). Световая микроскопия. Масштабный отрезок – 100 мкм

Создание остеопластических материалов, совмещенных с ДНК и определение их плДНК-связывающей способности

Разработаны МСД на основе синтетических и натуральных остеопластических материалов и проведена оценка их связывающей способности по отношению к pVB (Таблица 1). Наибольшей емкостью для плДНК в пересчете на массу матрикса обладает Коллаген+ГА - $6127,51 \pm 511,23$ мкг/г, а в пересчете на объем – ОКФ - $2499,65 \pm 147,61$ мкг/см³, в связи с чем их использовали для исследований *in vivo*.

Таблица 1

Емкость остеопластических материалов для плДНК pBudKan-коVEGF165A-коBMP2.

Матрикс	Сорбированная плДНК/ масса образца, нг/мг*	Сорбированная пл ДНК/ объем образца, мкг/см ³ *
ТКФ	$985,76 \pm 123,64$	$1248,83 \pm 156,63$
ГА	$2481,84 \pm 398,70$	$1158,52 \pm 186,11$
ОКФ	$3106,36 \pm 183,44$	$2499,65 \pm 147,61$
Коллаген+ГА	$6127,51 \pm 511,23$	$704,36 \pm 58,77$
Лиофилизированная кость	$670,50 \pm 62,23$	$310,73 \pm 28,84$

*Среднее значение \pm стандартная ошибка среднего.

Оценка экспрессии кодон-оптимизированных генов vegf165a и bmp2 в клетках гетеро- и ортотопического ложа

Для оценки экспрессии кодон-оптимизированных генов *vegf165a* и *bmp2* клетках реципиента после имплантации МСД на основе коллагена и ГА и ОКФ, совмещенных с pVB, МСД имплантировали в внутримышечно в ткани бедра и в область костного дефекта средней трети диафиза бедренной кости крысы. Образцы МСД, интегрированных с тканями реципиента и прилежащих тканей извлекли на 7е сутки после имплантации. Методом ПЦР-РВ показали, что относительная экспрессия мРНК кодон-оптимизированного гена *vegf165a* во внутримышечных имплантатах МСД Коллаген+ГА в $1,98 \pm 0,015$ раз и в МСД ОКФ в $8,6 \pm 0,008$ раз выше, чем в интактной мышце. Относительная экспрессия мРНК кодон-оптимизированного гена *vegf165a* в области костного регенерата бедренной кости в имплантатах МСД Коллаген+ГА в $2,04 \pm 0,005$ раз и в МСК ОКФ в $13,01 \pm 0,005$ раз выше, чем в интактном костном регенерате. Относительная экспрессия мРНК кодон-оптимизированного гена *bmp2* во внутримышечных имплантатах МСД Коллаген+ГА в $2,19 \pm 0,005$ раз и в МСК ОКФ в $7,05 \pm 0,008$ раз выше, чем в интактной мышце. Относительная экспрессия мРНК кодон-оптимизированного гена *bmp2* в области костного регенерата бедренной кости в имплантатах МСД Коллаген+ГА в $2,49 \pm 0,005$ раз и в МСК ОКФ в $15,13 \pm 0,006$ раз выше, чем в интактном костном регенерате.

Гетеротопическая (внутримышечная) имплантация остеопластических материалов

Для оценки биологической совместимости и безопасности созданных МСД их имплантировали животным в гетеротопическую позицию – внутримышечно в карман, образованный в бицепсе бедра, через 60 сут. материал был подвергнут гистологическому исследованию. При окрашивании по Вейгерту-ван Гизону имплантаты Коллаген+ГА и МСД Коллаген+ГА представлены коллагеновыми волокнами, ОКФ и ГАКТ ОКФ представлены малоизмененными гранулами исходного вещества. Во всех случаях имплантанты покрыты тонкой соединительнотканной капсулой. Признаков гетеротопического остеогенеза в области имплантатов не было выявлено ни в одной группе. Признаков воспалительной лейкоцитарной инфильтрации не выявили (рисунки 10, 11). Гранулы ОКФ и ГА окружены ГМКИТ.

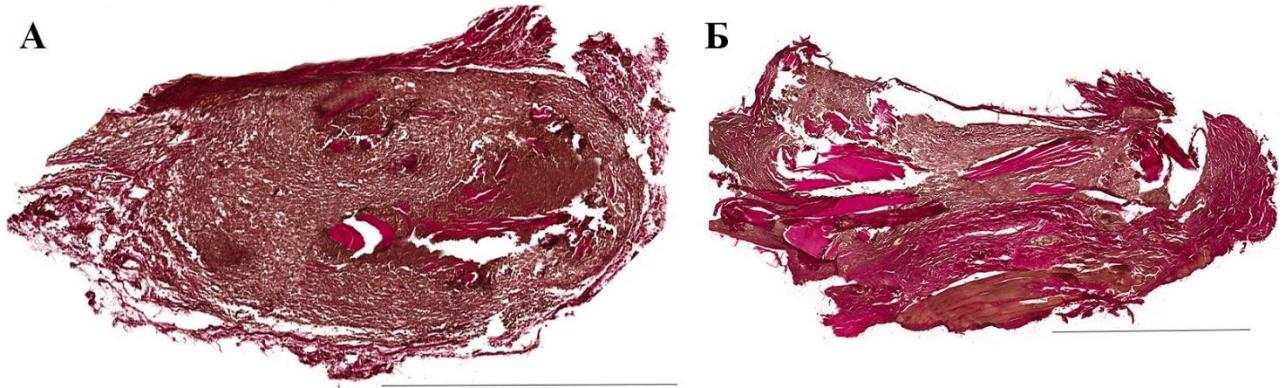


Рисунок 10. Внутримышечные имплантаты через 60 сут. после операции. А – Коллаген+ГА. Б – МСД Коллаген+ГА. Окрашивание по Вейгерту-Ван Гизону. Масштабный отрезок 1000 мкм

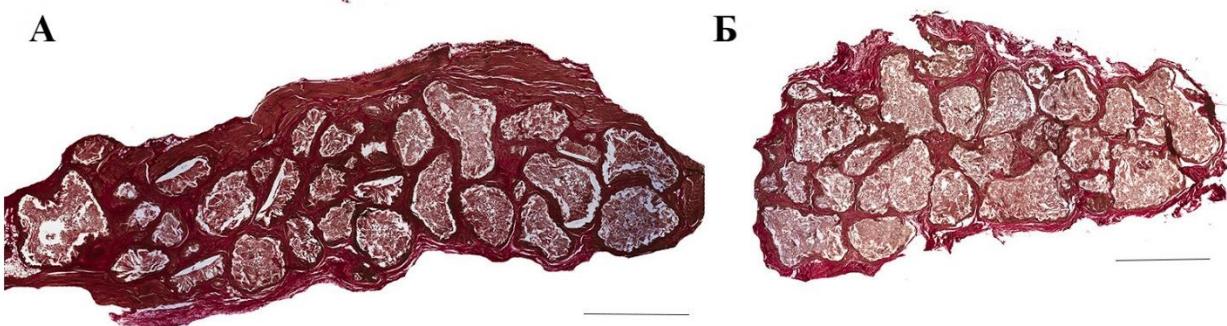


Рисунок 11. Внутримышечные имплантаты через 60 сут. после операции. А – ОКФ. Б – МСД ОКФ. Окрашивание по Вейгерту-Ван Гизону. Масштабный отрезок 1000 мкм

Оценка влияния остеопластических материалов, совмещенных с ДНК, на процессы регенерации костной ткани (ортотопическая имплантация)

Гистологическое исследование области дефекта диафиза бедренной кости во всех группах не выявило нарушений процесса заживления кости, консолидация костных отломков во всех случаях происходила по типу вторичного костного сращения. Костный регенерат состоял из волокнистой соединительной ткани, соединяющей костные отломки, хрящевой ткани, балок ретикулофиброзной кости и остатков имплантата (рисунки 12, 13). Через 30 сут. после имплантации костный регенерат преимущественно из рыхлой неоформленной соединительной ткани и хрящевой ткани, края костных отломков практически не изменены. После имплантации МСД Коллаген+ГА на 30 сут. суммарный объем хрящевой и костной ткани в составе костного регенерата превосходит таковой по сравнению с последствиями имплантации нативного Коллаген+ГА - 43,8% (от 37,6% до 54,9%) по сравнению с 11,5% (от 6,3% до 25,2%) (рисунок 16).

На 60 сут. возрастает содержание костной ткани в составе костного регенерата, а также появляются костные разрастания в области костных отломков во всех группах (рисунок 14-16). При этом достоверной разницы между МСД и нативными материалами не выявлено (рисунок 16). Воскуляризация области дефекта через 30 сут. после имплантации МСД Коллаген+ГА в 2 раза (по медиане) выше по сравнению с незаполненным дефектом (рисунок 20А), а на 60 сут. – в 7 раз (по медиане) (рисунок 17). Имплантация ОКФ и МСД ОКФ не оказала стимулирующего влияния на воскуло- и остеогистогенез в области дефекта у использованной модели (рисунки 13, 15, 16, 17).

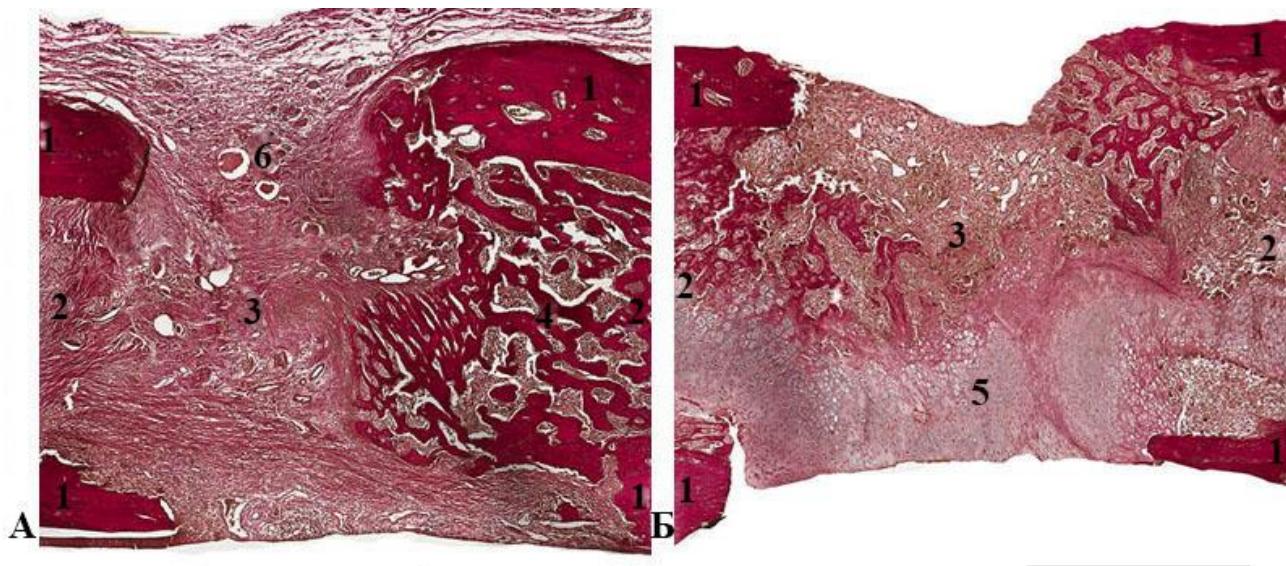


Рисунок 12. Область костного дефекта средней трети диафиза бедренной кости крысы через 30 сут. после формирования дефекта. А – имплантация Коллаген+ГА. Б – имплантация МСД Коллаген+ГА. 1 - костное вещество диафиза; 2 - костномозговой канал; 3 - зона дефекта; 4 - эндостальный костный регенерат; 5 - гипертрофированная хрящевая ткань; 6 - гранулы ГА. Окрашивание по Вейгерту-Ван Гизону. Масштабный отрезок 1000 мкм.

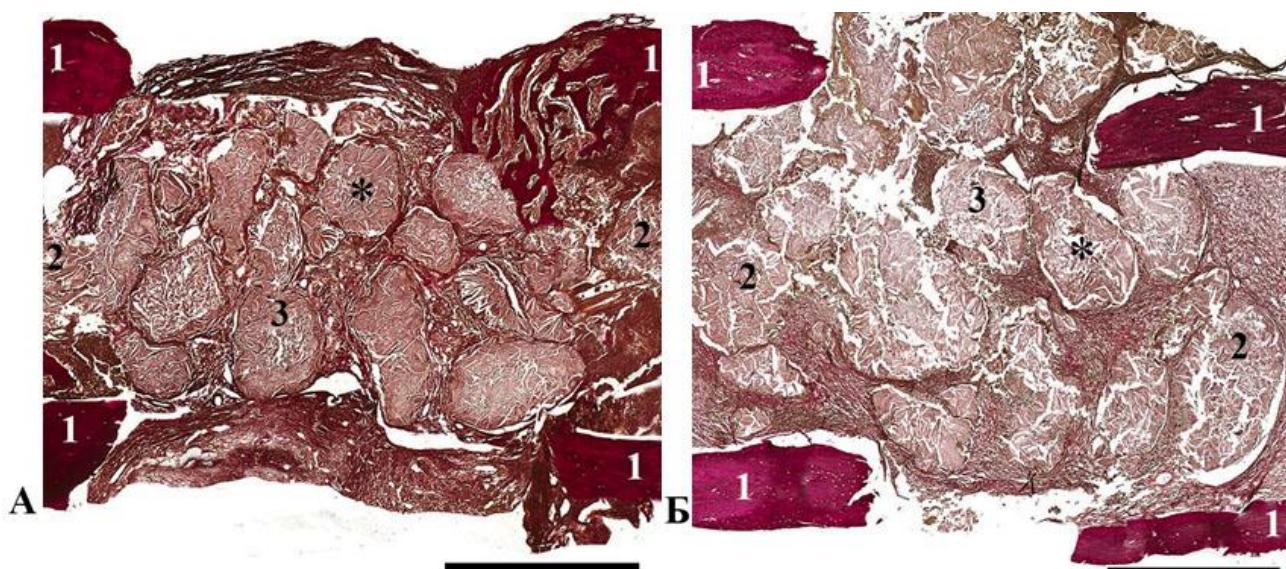


Рисунок 13. Область костного дефекта средней трети диафиза бедренной кости крысы через 30 сут. после формирования дефекта. А – имплантация ОКФ. Б – имплантация МСД ОКФ. 1 - костное вещество диафиза; 2 - костномозговой канал; 3 - зона дефекта; * - гранулы ОКФ. Окрашивание по Вейгерту-Ван Гизону. Масштабный отрезок 1000 мкм

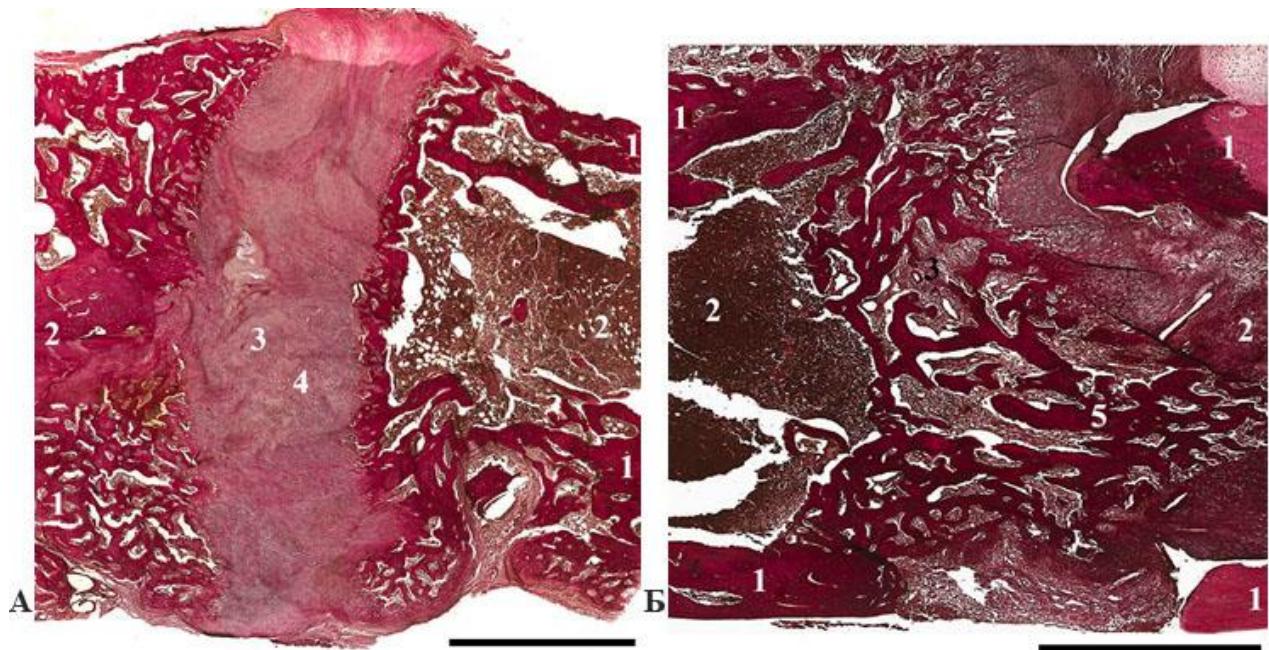


Рисунок 14. Область костного дефекта средней трети диафиза бедренной кости крысы через 60 сут. после формирования дефекта. А – имплантация Коллаген+ГА. Б – имплантация МСД Коллаген+ГА. 1 - костное вещество диафиза; 2 - костномозговой канал; 3 - зона дефекта; 4 - гипертрофированная хрящевая ткань; 5 - ретикулофиброзная костная ткань. Окрашивание по Вейгерту-Ван Гизону. Масштабный отрезок 1000 мкм

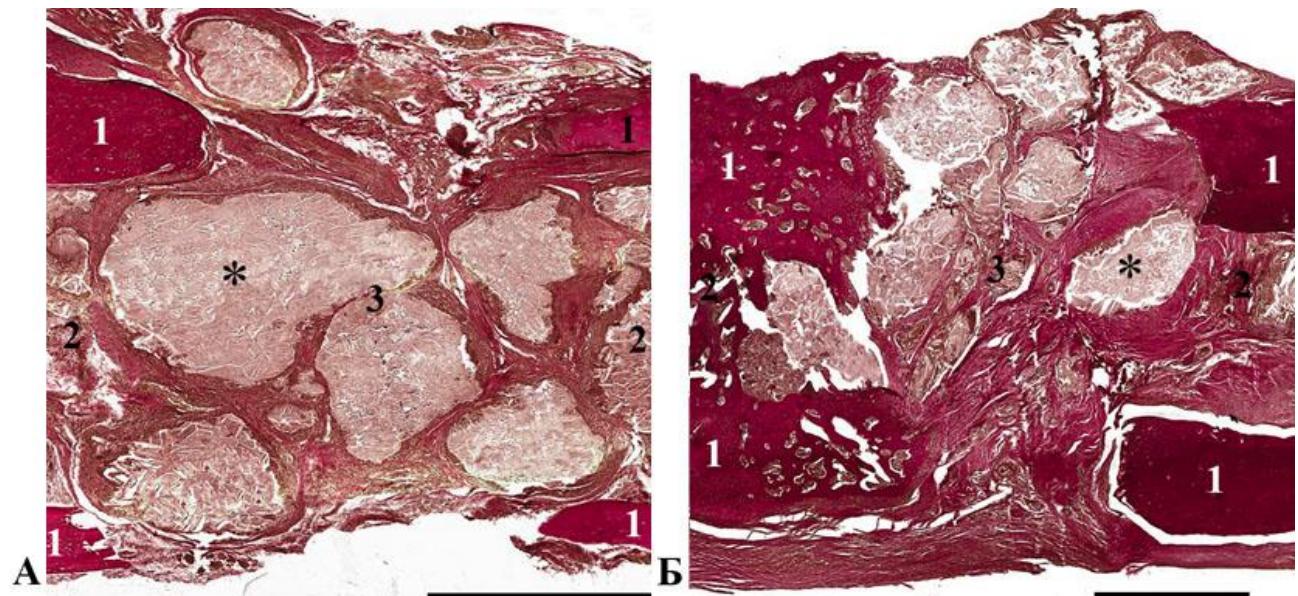


Рисунок 15. Область костного дефекта средней трети диафиза бедренной кости крысы через 60 сут. после формирования дефекта. А – имплантация ОКФ. Б – имплантация МСД ОКФ. 1 - костное вещество диафиза; 2 - костномозговой канал; 3 - зона дефекта; * - гранулы ОКФ. Окрашивание по Вейгерту-Ван Гизону. Масштабный отрезок 1000 мкм.

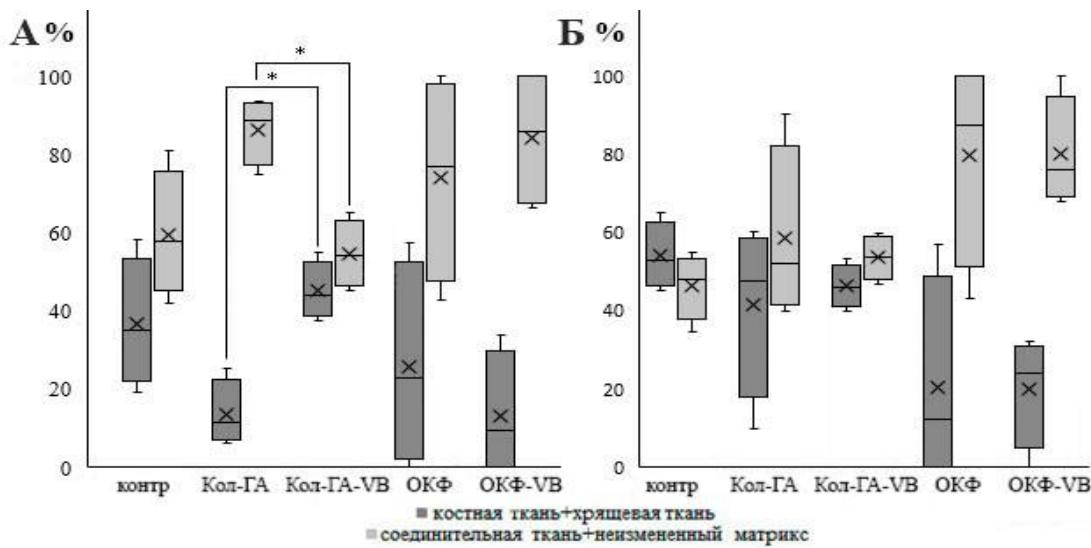


Рисунок 16. Объемные доли тканей в области костного дефекта через 30 сут. (А) и 60 сут. (Б) после его формирования. Контр – дефект без имплантата; Кол-ГА – имплантация Коллаген+ГА; Кол-ГА-VB – имплантация МСД Коллаген+ГА; ОКФ – имплантация ОКФ; ОКФ-VB – имплантация МСД ОКФ. * - $p<0,05$

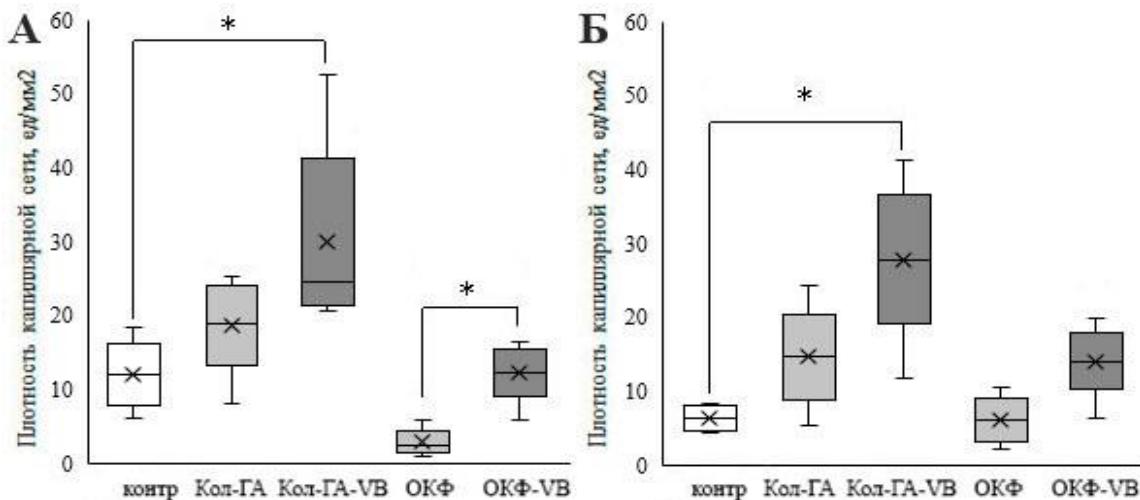


Рисунок 17. Васкуляризация тканей области костного дефекта через 30 сут. (А) и 60 сут. (Б) после его формирования. Контр – дефект без имплантата; Кол-ГА – имплантация Коллаген+ГА; Кол-ГА-VB – имплантация МСД Коллаген+ГА; ОКФ – имплантация ОКФ; ОКФ-VB – имплантация МСД ОКФ. * - $p<0,05$

Как после имплантации нативных Коллаген+ГА и ОКФ, так и после имплантации МСД на их основе, гранулы ГА и ОКФ подвергались биорезорбции гигантскими многоядерными клетками инородных тел (ГМКИТ). При этом на сроке 30 сут. гранулы ОКФ не изменены, окружены волокнами соединительной ткани, ГМКИТ отсутствовали. На сроке 60 сут. периферическая зона гранул ОКФ частично резорбирована, окружена ГМКИТ. Резорбция ГА в составе Коллаген+ГА происходила быстрее: на сроке 30 сут. гранулы ГА окружены ГМКИТ, наблюдается частичная резорбция гранул ГА, на сроке 60 сут. гранулы ГА в области сформированного костного регенерата не были обнаружены (рисунок 18).

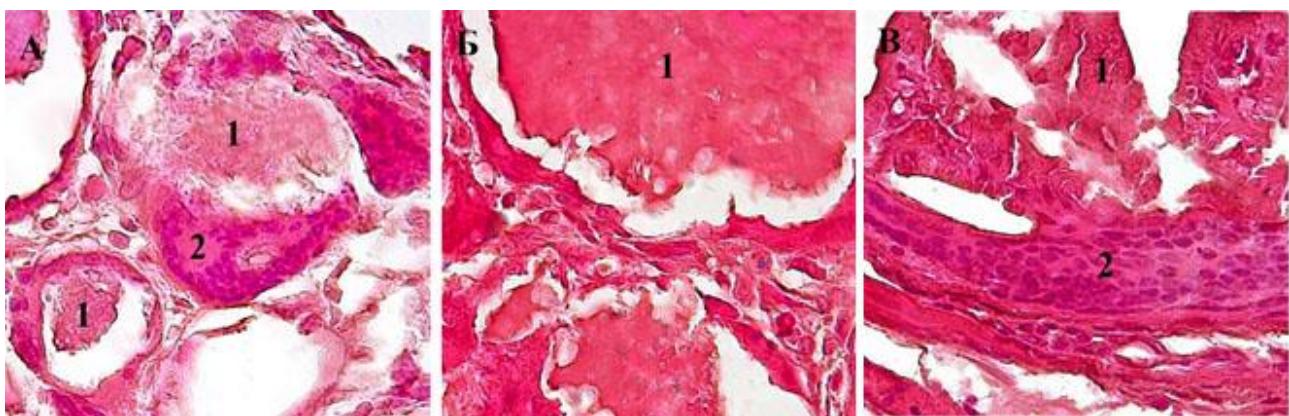


Рисунок 18. Гранулы остеопластических материалов, имплантированных в область костного дефекта. А – ГА через 30 сут. после имплантации. Б – ОКФ через 30 сут. после имплантации. В – ОКФ через 60 сут. после имплантации. 1 – гранулы остеопластических материалов; 2 – гигантские многоядерные клетки инородных тел. Окрашивание гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 630$

Протяженные и длительно существующие костные дефекты представляют серьезную проблему в травматологии и ортопедии. Регенерация костной ткани при ее повреждении может быть нарушена за счет системных (пожилой возраст, диабет, анемия, атеросклероз) и местных факторов (тип перелома, размер дефекта, особенности кровоснабжения, наличие инфекции). Однако все эти факторы в конечном итоге нарушают процесс регенерации на молекулярном и клеточном уровне, повреждая сложный и хорошо скоординированный процесс взаимодействия клеток, цитокинов и ростовых факторов (Ding et al., 2018).

Разработанная плазмидная конструкция pBud-Kan-coVEGF165A-coBMP2, несущая комбинацию генов *vegf165a* и *bmp2*, обладает высокой эффективностью за счет комбинации двух генов с проостеогенным и проангиогенным эффектом в двухпромоторной системе, обеспечивающей одновременную и независимую экспрессию двух генов из одной плазмиды, что позволяет снизить вариабельность экспрессии каждого гена в клетке (Kim K-J. Et al., 2004), что является ее преимуществом по сравнению с применением комбинации нескольких терапевтических плазмид. Так же разработанная плДНК обладает высоким профилем биобезопасности в связи с использованием плазмидного вектора и включения в его состав гена устойчивости к канамицину под прокариотическим промотором (Ризванов А.А., 2014), благодаря чему ее структура соответствует рекомендациям FDA для клинических исследований (Zhou et al., 2005).

Несмотря на то, что как VEGF, так и BMP2 синтезируются нативными нетрансфицированными ММСК-КМ человека и крысы и остеобластами крысы, являющимися клетками потенциального реципиентного ложа, после трансфекции указанных клеток pVB синтез данных рекомбинантных белков существенно возрастает. Максимальная концентрация VEGF и BMP2 в культурах была отмечена через 24 часа после трансфекции, далее наблюдалось постепенное снижение их концентрации, с сохранением экспрессии до 10 сут. При этом промотор EF-1a показал свое преимущество перед промотором CMV, обеспечивая более длительное и стабильное поддержание высокой концентрации белка в среде.

Питательные среды, кондиционированные супернатантами pVB, pBG и pVG способствуют остеогенной дифференцировке в культурах клеток ММСК-КМ человека, крыс, остеобластов крыс, при этом среда, кондиционированная клетками HEK293FT, трансфицированными pVB стимулирует накопление кальция в культурах клеток достоверно лучше, а также способствовала более быстрому окончанию дифференцировки остеопрогениторных клеток и более раннему началу минерализации. Показано, что VEGF165A стимулирует процессы остеогенеза за счет непосредственного влияния на остеопрогениторные клетки. Показали, что ММСК-КМ крысы и человека формировали капилляроподобные структуры под воздействием сред, кондиционированных супернатантами pVB, pBG и pVG. Проангиогенный эффект BMP2 подтверждает критическую необходимость адекватного роста сосудов для процессов остеогенеза.

Таким образом, в разработанной плазмидной конструкции pVB, содержится кДНК сразу двух факторов, обеспечивающих остео- и ангиогенез в костном регенерате.

Плазмидная ДНК на данный момент рассматривается как наиболее безопасное средство доставки генетического материала в генной терапии, однако обеспечить адекватную эффективность трансфекции клеток *in vivo* достаточно сложно, особенно это касается костной ткани. В связи с этим в эксперименте были применены так называемые МСД, представляющие собой имплантаты из остеокондуктивных материалов, специально разработанных для заполнения костных дефектов и обеспечивающих остеокондуктивный эффект, совмещенные с разработанной плДНК pVB, обеспечивающей остеоиндуктивный эффект. Показано, что различные остеопластические материалы обладают различной емкостью для плДНК при совмещении их использованным способом. Показали, что наибольшей емкостью для плДНК в пересчете на массу матрикса обладает Коллаген+ГА, а в пересчете на объем – ОКФ. При имплантации МСД происходит локальный перенос терапевтической плазмиды в составе преципитата в клетки реципиентного ложа, механизм которого подобен кальций-фосфатной трансфекции (Исаев А.А, 2014). Повышение относительной экспрессии мРНК кодон-оптимизированных генов *vegf165a* и *bmp2* в клетках гетеро- и ортотопического ложа после имплантации МСД подтверждено ПЦР-РВ.

При гетеротопической имплантации МСД не было выявлено воспаления или гетеротопического остеогенеза, происходила естественная биодеградация гранул ГА, что говорит об их биологической совместимости и безопасности.

Оценили влияние МСД на регенеративный остеогенез у крыс в модели дефекта диафиза бедренной кости протяженностью 3 мм. Имплантация МСД Коллаген+ГА способствует более быстрой инициации процессов регенеративного остеогенеза, что может способствовать улучшению исходов остеопластики у некоторых групп пациентов. На поздних сроках стимулирующий эффект нивелируется, вероятно, как за счет снижения экспрессии плДНК в клетках реципиентного ложа, так и за счет продолжающегося развития естественных процессов регенеративного остеогенеза. Имплантация МСД Коллаген+ГА способствует повышению васкуляризации в области реципиентного ложа, причем сформированные сосуды длительно питают костный регенерат, поддерживая ее жизнеспособность, что особенно важно при нарушениях кровоснабжения тканей. Более высокая плотность сосудистой сети, формирующаяся под воздействием разработанных МСД, оказывает положительное воздействие на остеорегенерацию, обеспечивая удаление тканевого детрита, ремоделирование и поддержание гомеостаза вновь сформированной кости. Медленное проникновение сосудов реципиентного ложа в крупные искусственные трансплантаты костной ткани, являющееся основным ограничивающим фактором в разработке современных стратегий тканевой инженерии костной ткани (Saran et al., 2014), нивелируется при использовании разработанной МСД, за счет содержащихся в ней кДНК проангиогенных факторов. Коллаген+ГА продемонстрировал хорошую интеграцию с тканями реципиентного ложа: на 60 сут. гранулы ГА были резорбированы, введенный матрикс достоверно не был отличим от тканей реципиента.

В проведенном исследовании имплантация ОКФ и МСД ОКФ не оказала стимулирующего влияния на васкуло- и остеогенез в области костного дефекта у использованной модели. Сложно с уверенностью назвать причину негативных результатов применения ОКФ в нашем исследовании. Известно, что ОКФ, в зависимости от условий его синтеза, демонстрирует вариации в размерах и формах кристаллов, в стехиометрии и молярных отношениях Ca/P, причем различные варианты обладают различными свойствами остеокондуктивности (Suzuki et al., 2013). Можно предположить, что различные формы ОКФ обладают некоторым видовым отличием в воздействии на костную ткань. Скорость биорезорбции выбранного ОКФ оказалась слишком продолжительной по отношению к скорости остеорегенерации у крысы. Так же вероятно использованный размер гранул (около 150-500 мкм), который оптимален для использования в зубочелюстной практике при лечении людей, оказался слишком велик по отношению к размерам бедренной кости крысы, и играл роль скорее инородного тела, своеобразного механического барьера, нежели остеокондуктивного материала. Таким образом, полученные негативные результаты можно объяснить неоптимальным выбором лабораторных животных, модели костного дефекта (трубчатая кость), неоптимальной модификацией ОКФ для данного вида животных. Вероятно, исследование воздействия МСД ОКФ на более крупных животных будет более презентативно.

Исходя из данных, полученных в ходе исследования, на основании состава и свойств разработанных МСД, данных литературы и клинического опыта, можно предложить показания к рациональному клиническому применению МСД. BMP2, синтезируемый клетками реципиентного ложа под воздействием МСД, способствует ранней индукции остеогенеза и устраняет возрастную остеогенную недостаточность. С возрастом снижается васкуляризация костного регенерата (Lu et al., 2008) и способность ММСК стимулировать ангиогенез (Ефименко А.Ю., 2011). Усиление васкуляризации при восстановлении переломов у пожилых с помощью МСД может обеспечить уникальные терапевтические возможности у данной категории пациентов. Разработанные МСД, при использовании для заполнения костной полости при остеонекрозах, механически замещают собой недостающую ткань, а VEGF оказывает существенный эффект на патогенез развития остеонекрозов (Zhou et al., 2015).

ВЫВОДЫ

1. Разработанные двухкассетные экспрессионные плазмидные конструкции pBud-Kan-*coVEGF165A-коBMP2*, pBud-Kan-*VEGF165A-eGFP*, pBud-Kan-*eGFP-BMP2*, содержащие гены факторов *vegf165a* и *bmp2* трансфицируют в эксперименте *in vitro* различные клетки, что ведет к синтезу факторов VEGF165A и BMP2.
2. Под воздействием факторов VEGF165A и BMP2, синтезируемых клетками, трансфицированными предложенными плазмидными конструкциями, происходят процессы направленной остеогенной дифференцировки остеопрогениторных клеток, что проявляется синтезом и накоплением минерального матрикса *in vitro*, причем оптическая плотность экстрактированного кальций-связывающего красителя в 1,5 раза выше при совместном воздействии факторов VEGF165A и BMP2.
3. Остеопластические матриксы, совмещенные плазмидной конструкцией pBud-Kan-*coVEGF165A-коBMP2* не оказывают цитотоксического эффекта в отношении мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека и крысы, а также остеобластов костей черепа крысы *in vitro*, что проявляется сохранением их физиологической активности митохондриальных дегидрогеназ.
4. Репаративный гистогенез в области внутримышечной имплантации матриксов, совмещенных с ДНК, выражался в гигантоклеточной реакции и постепенной резорбции материалов с замещением волокнистой соединительной тканью без гетеротопического остеогенеза.
5. Репаративный остеогенез в области диафизарного дефекта бедренной кости после имплантации матриксов, совмещенных с pBud-Kan-*coVEGF165A-коBMP2*, протекает по типу энхондрального остеогенеза, причем после имплантации матриксов на основе коллагена и гидроксиапатита, совмещенных с плДНК, объем хрящевой и костной ткани на сроке 30 суток после операции в три раза превышает таковой по сравнению с неактивированными матриксами, а количество сосудов регенерата в 2,66 (через 30 суток) и 4,19 (через 60 суток) выше, чем в незаполненном дефекте, вследствие чего и их применение обеспечивает лучшую консолидацию костных отломков в использованной модели.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Научные статьи

1. **Zhuravleva, M.N.** Recombinant plasmid DNA construct encoding combination of *vegf165* and *bmp2* cDNAs stimulates osteogenesis and angiogenesis *in vitro* / M.N. Zhuravleva, M.R. Khaliullin, R.F. Masgutov, R.V. Deev, A.A. Rizvanov // BioNanoScience - 2017. – Vol. 7(2). – P. 288-293.
2. **Zhuravleva, M.N.** Comparative analysis of the effect of gene-activated grafts carrying a pBud-*VEGF165a-BMP2* plasmid on bone regeneration in a rat femur defect model / M.N. Zhuravleva, M.R. Khaliullin, R.F. Masgutov, I.Y. Bozo, A.A. Rizvanov, R.V. Deev // BioNanoScience - 2019. - DOI 10.1007/s12668-019-00673-5.
3. **Журавлева, М.Н.** Влияние рекомбинантных плазмидных конструкций, кодирующих комбинации генов *vegf* и *bmp2* собаки и лошади, на дифференцировку мезенхимальных

- стромальных клеток *in vitro* / М.Н. Журавлева, Е.Ю. Закирова, Р.Ф. Масгутов, В.В. Валиуллин, Р.В. Деев, А.А. Ризванов // Гены и Клетки - 2015. – Vol.10(3). – Р. 42-48.
4. **Катина, М.Н.** Выделение, культивирование и дифференцировка мультипотентных мезенхимных стромальных клеток из жировой ткани крыс *Rattus Norvegicus* и хомяков *Mesocricetus Auratus* / М.Н. Катина, Р.Ф. Гайфуллина, З.Г. Хаятова, Ч.Ч. Эмене, А.А. Ризванов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия – 2012. Т 7(3). – С. 82-87.
 5. Бозо, И.Я. Ген-активированный остеопластический материал на основе октакальциевого фосфата, допированный ионами магния / И.Я. Бозо, Р.В. Деев, **М.Н. Журавлева**, В.С. Комлев, В.К. Попов, И.В. Смирнов, А.Ю. Федотов // Материаловедение - 2017. – Vol. 5. – Р. 33-37.
 6. Masgutov, R. F. Use of gene-activated demineralized bone allograft in the therapy of ulnar pseudarthrosis. Case report / R.F. Masgutov, **M.N. Zhuravleva**, G.A. Masgutova, A.A. Rizvanov, M. Chekunov, O. Teplov, R. Salikhov, D. Galimov, Y. Plakseichuk // BioNanoScience. - 2017. - Vol. 7(1). – 194-198.

Тезисы докладов

1. Масгутов, Р.Ф. Клиническое применение прямой генной терапии при замедленной консолидации переломов и псевдоартрозах трубчатых костей у человека / Р.Ф. Масгутов, М.А. Чекунов, Р.З. Салихов, О.В. Теплов, Ю.А. Плаксейчук, Д.Х. Галимов, Ю.С. Теплова, Г.А. Масгутова, **М.Н. Журавлева**, А.А. Ризванов // Материалы III Национального конгресса по регенеративной медицине. - Гены & клетки. - Том XII. - № 3, 2017. - С. 259-260.
2. Халиуллин, М.Р. Генетическая активация остеозамещающих материалов потенцирует регенерацию кости *in vivo* / М.Р. Халиуллин, **М.Н. Журавлева**, Р.Ф. Масгутов, А.А. Ризванов, Р.В. Деев // Материалы III Национального конгресса по регенеративной медицине. - Гены и клетки. - Том XII. - № 3, 2017. - С. 252-253.
3. Халиуллин, М.Р. Влияние ген-активированных остеопластических материалов на регенеративный остеогенез / М.Р. Халиуллин, **М.Н. Журавлева**, Р.Ф. Масгутов, А.А. Ризванов, Р.В. Деев // Сборник работ I съезда травматологов-ортопедов Центрального федерального округа под редакцией профессора Очкуренко А.А. - 2017. – С. 300-301.
4. **Журавлева, М.Н.** Рекомбинантная плазмидная днк, кодирующая комбинацию vegf165 и bmp2 стимулирует остео- и ангиогенез *in vitro* / М.Н. Журавлева, М.Р. Халиуллин, Р.Ф. Масгутов, Р.В. Деев, А.А. Ризванов // Сборник тезисов международной конференции Трансляционная медицина 2016 – 2016. - С. 42.
5. Халиуллин, М.Р. Влияние рекомбинантной плазмидной конструкции, кодирующей гены VEGF-165 и BMP2, на остеогенез и ангиогенез *in vitro* / М.Р. Халиуллин, **М.Н. Журавлева**, Р.В. Деев, А.А. Ризванов // БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 21-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых – 2017.
6. Халиуллин, М.Р. Ген-активированные костные гraftы и их влияние на репаративный остеогенез / М.Р. Халиуллин, **М.Н. Журавлева**, Р.Ф. Масгутов, А.А. Ризванов, Р.В. Деев // Материалы Всероссийской конференции молодых специалистов Актуальные вопросы фундаментальной, экспериментальной и клинической морфологии 2017 – 2017. - С 93-94.
7. Халиуллин, М.Р. Влияние "двукассетной" плазмидной конструкции, кодирующей гены bmp2 и vegf-165, на индукцию остео- и ангиогенеза *in vitro* и *in vivo* / М.Р. Халиуллин, **М.Н. Журавлева**, И.Я. Бозо, С.И. Рожков, А.В. Комаров, К.В. Ермаков, А.А. Ризванов, Р.В. Деев // Сборник тезисов VII Всероссийского симпозиума с международным участием Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии – 2017. – С.165-167.
8. Масгутов, Р.Ф. Оперативное лечение ложного сустава большеберцовой кости в диафизарно-дистальном сегменте голени с применением ген-активированного деминерализованного костного аллотрансплантата / Р.Ф. Масгутов, М.А. Чекунов, Р.З.

- Салихов, О.В. Теплов, Ю.А. Плаксейчук, Д.Х. Галимов, **М.Н. Журавлева**, А.А. Ризванов // Сборник материалов Пироговского форума. Хирургия повреждений, критические состояния. Спаси и сохрани. – 2017. С. 397.
9. Khaliullin, M. R. Gene activated scaffolds promote reparative osteogenesis in vivo / M. R. Khaliullin, M. N. Zhuravleva, R. F. Masgutov // Human gene therapy. - 2017. – Vol. 28(12). - P. A91-A91.

E-mail автора: k.i.t.t.1807@gmail.com

Отзывы на автореферат просим высылать по адресу: 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18, главное здание Казанского федерального университета, отдел аттестации научно-педагогических кадров, Ученому секретарю Диссертационного совета КФУ.03.06. № 01-03/562 Аникиной Татьяне Андреевне, факс: (843) 238-76-01. E-mail: tania57vg1@rambler.ru.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

BMP2 (Bone Morphogenetic Protein 2) – костный морфогенетический белок 2	Ед – единица
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) — 4',6-диамицино-2-фенилиндол	ИФА - иммуно-ферментный анализ
dH2O – дистиллированная вода	кб — килобаза
eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein) — улучшенный зеленый флуоресцентный белок	кДа – килоДальтон
HEK 293FT (англ. human embryonic kidney 293 cells) – линия эмбриональных клеток почки человека	кДНК – кодирующая ДНК
pVB - pBudKan-coVEGF165A-коBMP2	ММСК-КМ – мультипотентные мезенхимные стволовые клетки из костного мозга
pVG - pBudKan-coVEGF165A-EGFP	мРНК – матричная РНК
pBG - pBudKan-EGFP-коBMP2	об./мин. – оборотов в минуту
VEGF (англ. Vascular Endothelial Growth Factor) - фактор роста эндотелия сосудов	ОКФ - октакальциевый фосфат
ГМКИТ - гигантские многоядерные клетки инородных тел	плДНК – плазмидная ДНК
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота	ПЦР – полимеразная цепная реакция
	РНК – рибонуклеиновая кислота
	соавт. – соавторы
	Т.п.н. – тысяч пар нуклеотидов
	ТКФ – трикальцийфосфат
	ЩФ – щелочная фосфатаза