

ВЛИЯНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ПЛАЗМИДНЫХ КОНСТРУКЦИЙ, КОДИРУЮЩИХ КОМБИНАЦИИ ГЕНОВ *VEGF* И *BMP2* СОБАКИ И ЛОШАДИ, НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК *IN VITRO*

М.Н. Журавлева¹, Е.Ю. Закирова¹, Р.Ф. Масгутов^{1,2}, В.В. Валиуллин³, Р.В. Деев^{1,4}, А.А. Ризванов¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² Республиканская клиническая больница МЗ Республики Татарстан, Казань, Россия

³ Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

⁴ Институт стволовых клеток человека, Москва, Россия

Effect of recombinant plasmid constructs encoding combinations of dog and horse *vegf* and *bmp2* cDNAs on mesenchymal stromal cell differentiation *in vitro*

M.N. Zhuravleva¹, E.Y. Zakirova¹, R.F. Masgutov^{1,2}, V.V. Valiullin³, R.V. Deev^{1,4}, A.A. Rizvanov¹

¹ Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

² Republican Clinical Hospital, Kazan, Russia

³ Kazan State Medical University, Kazan, Russia

⁴ Human Stem Cells Institute, Moscow, Russia

Генная терапия — одно из наиболее перспективных направлений в современной регенеративной медицине, однако на данный момент не зарегистрировано ни одного геннотерапевтического препарата для ветеринарной практики. Нами созданы видоспецифичные генно-инженерные конструкции на основе плазмидной ДНК, кодирующие гены сосудистого эндотелиального фактора роста и костного морфогенетического белка 2 собаки и лошади, которые потенциально могут быть использованы для лечения травм и заболеваний опорно-двигательного аппарата домашних животных. *In vitro* исследования данных конструкций показали их эффективность в индукции остеогенной и хондрогенной дифференцировки мезенхимных стромальных клеток, а также индукции ангиогенеза.

Ключевые слова: плазмиды, костный морфогенетический белок 2, BMP2, сосудистый эндотелиальный фактор роста, VEGF, мезенхимные стромальные клетки, остеогенная дифференцировка, хондрогенная дифференцировка, ангиогенез.

Введение

Генная терапия — одно из наиболее перспективных направлений в регенеративной медицине и ветеринарии [1]. На данный момент официально зарегистрировано 4 геннотерапевтических препарата для лечения заболеваний человека: Gendicine и Oncorine, Glybera и отечественный препарат Неоваскулген. Вышеперечисленные препараты зарекомендовали себя как эффективные, безопасные и уникальные в своем роде геннотерапевтические препараты для лечения онкологических, метаболических и ишемических заболеваний [2–4].

Несмотря на большое количество доклинических исследований геннотерапевтических препаратов на животных, подавляющее большинство работ направлено на тестирование препаратов, предназначенных для лечения людей, а животные служат лишь для моделирования заболеваний человека. Важно отметить, что для достижения максимального результата при минимальных побочных эффектах необходимо использование видоспецифичных препаратов. Это связано с различием в строении белков животных и человека и не позволяет использовать ранее апробированные и успешно применяющиеся для лечения человека препараты в области ветеринарной медици-

Gene therapy is one of the most promising fields in modern regenerative medicine, though today there is no approved veterinary gene therapy drugs on the market. We have created species-specific gene-engineering plasmid constructs based on plasmid DNA encoding genes of dog and horse vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein 2, which can be potentially used in treatment of domestic animals traumas and locomotor system disorders. *In vitro* studies of these constructs have shown their effect on stimulation of osteogenic, chondrogenic differentiation and angiogenesis in mesenchymal stem cells *in vitro*.

Keywords: plasmids, bone morphogenetic protein 2, BMP2, vascular endothelial growth factor, VEGF, mesenchymal stem cells, osteogenesis differentiation, chondrogenic differentiation, angiogenesis.

ны [5]. В связи с этим в настоящее время нет зарегистрированных геннотерапевтических препаратов, специально предназначенных для ветеринарии [6].

По статистике различные травмы домашних животных составляют более 12% обращений в ветеринарные клиники. Среди собак наиболее частой причиной травм является выгуливание животных вблизи автодорог, что связано, прежде всего, с ростом дорожной сети. Растет продолжительность жизни домашних животных, более распространенными становятся редкие породы, что приводит и к росту хронических дегенеративных заболеваний опорно-двигательного аппарата, свойственных некоторым породам. В последние годы активно развивается спортивная ветеринарная медицина, в том числе связанная с развитием различных видов спорта (скачки, собачьи бега, различные конкурсы и выставки). У скаковой лошади при тренировочном процессе риск травмы составляет не менее 1% ежемесячно [7]. В статистике общей заболеваемости скаковых лошадей заболевания опорно-двигательного аппарата составляют до 50%, а переломы — до 20%. В случае перелома менее 40% животных способны вернуться к соревновательному процессу, а более 10% погибают в результате травмы или вынужденной эвтаназии [8].

На данный момент наблюдается недостаток адекватных, эффективных и безопасных методов лечения травм и заболеваний опорно-двигательного аппарата животных, способных привести к долгосрочному положительному результату.

Плазмиды — небольшие экстрахромосомные кольцевые двуцепочечные молекулы ДНК, широко используемые как векторы для доставки рекомбинантной ДНК [9]. По сравнению с другими векторами доставки терапевтических генов они могут нести относительно большие вставки трансгенной информации, обладают стабильностью, не интегрируются в геном клетки-хозяина и не иммуногенны [10]. Они давно стали распространенным объектом биотехнологии, на их основе разрабатывают различные генотерапевтические препараты. Так, в России разработан генно-терапевтический препарат Неоваскулген (Институт Стволовых Клеток Человека, Россия), разрешенный для клинического применения [11]. В разрабатываемых схемах генной терапии, находящихся на разных стадиях клинических испытаний, на долю плазмидных векторов приходится 18% [12].

У человека VEGF165 — преобладающий член семейства белков сосудистых эндотелиальных факторов роста (Vascular endothelial growth factor, VEGF), секретируется различными клетками для стимуляции васкулогенеза и ангиогенеза. Гомологичный ген *vegfl64* у собаки располагается на 12 хромосоме и содержит 15 947 пар нуклеотидов, у лошади — на 20 хромосоме и содержит 13 410 пар нуклеотидов. VEGF способствует пролиферации и миграции эндотелиоцитов, стимулируя ангиогенез, а также привлекает предшественников эндотелиоцитов из костного мозга, стимулирует деятельность перицитов и «стабилизирует» формирующиеся сосуды. VEGF также является хемоаттрактантом для гладкомышечных клеток, моноцитов, макрофагов и полиморфноядерных лейкоцитов, участвующих в процессе заживления раны. VEGF повышает проницаемость сосудистой стенки в месте травмы, что усиливает формирование грануляционной ткани [13].

Костные морфогенетические белки (Bone morphogenetic protein, BMP) — это группа белков из надсемейства трансформирующего фактора роста бета, одна из основных групп морфогенетических сигнальных белков, организующих построение тканей в организме. Эти белки играют большую роль в процессах индукции костеобразования, поддержания кости и ее регенерации. BMP участвуют как в энхондральном, так и в мембранозном процессах формирования кости. В зависимости от их концентрации BMP могут действовать как хемоаттрактанты, привлекая различные типы клеток, митогенные или дифференцировочные факторы, вызывающие дифференцировку стволовых и прогениторных клеток в хондрогенном и остеогенном направлениях [14].

BMP2 — белок массой 26 кДа, состоящий из 114 аминокислотных остатков, представляющий собой дисульфид-связанный гомодимер, который индуцирует развитие хряща и кости и играет ключевую роль в дифференцировке остеобластов. Ген *bmp2* у собаки располагается на 24 хромосоме и содержит 10 860 пар нуклеотидов, у лошади — на 22 хромосоме и содержит 8744 пар нуклеотидов.

Имеются многочисленные сообщения о применении белков BMP 2, 4, 6, 7, 8, 9. Чаще всего используется BMP2, именно с его участием проводится ряд клинических исследований. Так, W.F. McKay (2007),

отметил положительный эффект применения костнопластического материала INFUSE®, представляющего собой, помимо металлоконструкции для стабилизации поврежденного позвоночного столба, абсорбирующую коллагеновую губку в комбинации с рекомбинантным белком BMP2 [15].

A.W. Baltzer (2000) сообщает о положительных результатах применения генетической конструкции Ad-BMP2 (на основе аденовирусного вектора). Показано повышение уровня активности щелочной фосфатазы в культурах стромальных клеток костного мозга мыши. Было показано восполнение костной тканью протяженного дефекта бедренной кости кролика с длительным сохранением экспрессии трансгена в области костных фрагментов — до 6 нед. и в области окружающих мягких тканей — до 4 нед. [16].

Согласно V. Beamer (2010), одним из важных аспектов регенерации кости при ее повреждении является рост сосудов, на который положительное влияние оказывает VEGF. В исследованиях на животных с экспериментальными переломами было показано, что комбинированное применение очищенных рекомбинантных белков VEGF и BMP оказывало лучший эффект на процесс заживления кости по сравнению с одним только BMP [17].

Идея совместного применения генной терапии *vegfl* и *bmp* прослеживается в работах J. Seamon (2013), в которых был показан положительный эффект воздействия аденовирусной конструкции, несущей гены *vegfl* и *bmp6* на процессы остеогенеза как в культуре клеток, так и *in vivo* [18]. M. Kaipel (2012) показал, что именно BMP2 способствует консолидации перелома в модели длительно несрастающегося перелома у крыс [19]. Показано, что BMP приводит к остеогенной и хондрогенной дифференцировке ММСК, вновь образованные клетки начинают синтезировать VEGF, создавая условия для васкуляризации образующейся костной ткани [20].

Применение рекомбинантных белков в качестве терапевтических агентов ограничено их быстрой биодеградацией в тканях, что существенно ограничивает их клиническое применение, поэтому перспективным представляется доставка в область поврежденного генетических конструкций, которые способствуют длительной экспрессии целевых генов.

Материал и методы

Создание генетических конструкций

Для создания конструкции использовали экспрессионный вектор pBudCE4.1 (Invitrogen, США). Кодонную оптимизацию состава генов *vegfl64* и *bmp2* проводили с использованием алгоритма OptimumGene. В качестве матрицы для кодонной оптимизации брали нуклеотидные последовательности мРНК генов *vegfl64* собаки (GenBank: NM_001110502), лошади (GenBank: NM_001081821) и *bmp2* собаки (GenBank: XM_534351) и лошади (GenBank: XM_001493895). Синтез *de novo* нуклеотидной последовательности кодон оптимизированных последовательностей кДНК *vegfl64* и *bmp2* и клонирование кДНК в плазмидный вектор осуществлен компанией GenScript (США). В результате были получены плазмидные конструкции pBud-clVEGF-clBMP2 (от лат. *Canis lupus*, сокр. Cl, собака) и pBud-ecVEGF-ecBMP2 (от лат. *Equus caballus*, сокр. Ec, лошадь).

Генетические конструкции pBud-VEGF-BMP2 были трансформированы в бактериальные клетки

Escherichia coli One Shot Top 10 (Invitrogen, США). Для выделения плазмидной ДНК был использован метод щелочного лизиса с использованием наборов для очистки плазмидной ДНК QIA Filter Plasmid Midiprep Kit (QIAGEN, Германия), согласно рекомендациям фирмы производителя.

Выделение и иммунофенотипирование ММСК

Образцы жировой ткани человека получены от здоровых доноров в ходе плановой липосакции, проведенной с добровольного информированного согласия пациента. Полученный образец ткани доставляли в культуральную лабораторию, где из ткани выделяли стромально-сосудистую фракцию по стандартной методике как описано ранее [21, 22]. Жировую ткань тщательно механически гомогенизировали и инкубировали при 37°C 60 мин. в шейкер-инкубаторе при 180 об./мин. с раствором коллагеназы краба (Биолот, РФ) в DPBS с конечной концентрацией коллагеназы 0,2%. Полученный гомогенат центрифугировали 5 мин. при 500 g, клеточный осадок промывали DPBS методом центрифугирования. Полученные клетки стромально-сосудистой фракции культивировали в питательной среде α MEM (ПанЭко, РФ) с добавлением 10% сыворотки плодов коров (FBS, ПанЭко, РФ), 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2mM L-глутамин (ПанЭко, РФ).

Для подтверждения принадлежности полученных клеток к ММСК, проводили проточную цитофлуориметрию на приборе FACS Aria III (BD, США) с использованием набора антител Stemflow™ hMSC Analysis Kit (BD, США), содержащего коктейль антител, положительно окрашивающих ММСК (CD73, CD90, CD105) и не окрашивающих ММСК (CD11b, CD19, CD34, CD45, HLA-DR), согласно инструкции фирмы производителя.

Генетическая модификация клеток и анализ экспрессии трансгенов

Трансфекцию клеток HEK293 и ММСК проводили с помощью трансфицирующего реагента Lipofectamine 3000 (Life Technologies, США), согласно инструкции производителя.

Для оценки экспрессии трансгенов в трансфицированных культурах клеток HEK293 через 48 ч. после трансфекции применяли иммунофлуоресцентный метод с использованием специфических антител к белкам VEGF (SC-507) и BMP2/4 (SC-6267) (SantaCruz, США) и вторичных антител, конъюгированных с флуорохромами Alexa 488 и 555 (Invitrogen, США) в соответствии с инструкциями фирм-производителей. Для окрашивания ядер использовали 4, 6-диамидино-2-фенилиндол (англ. 4, 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI). Результаты оценивали с помощью конфокального флуоресцентного сканирующего микроскопа LSM 780 (Carl Zeiss, Германия).

Иммуноблоттинг проводили по системе Laemmli в денатурирующих условиях (SDS-PAGE) через 48 ч. после трансфекции. Использовали антитела кролика к BMP-2/4 (sc-9003), и антитела кролика к VEGF (sc-152) (SantaCruz, США) в разведении 1:250 и вторичные антитела к IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена, в разведении 1:2000. Визуализацию иммунного преципитата проводили с помощью хемилюминисцентного субстрата Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, США).

Количественно экспрессию белка VEGF в супернатантах клеток HEK293, трансфицированных pBud-clVEGF-clBMP2 и pBud-ecVEGF-ecBMP2, через 24 ч. после трансфекции оценивали иммуноферментным анализом с помощью набора VEGF-ИФА-БЕСТ А-8784 (Вектор, РФ), согласно инструкции производителя.

Остеогенная дифференцировка ММСК

Для оценки влияния биосинтеза рекомбинантных белков VEGF и BMP2, синтезирующихся после трансфекции, на процессы дифференцировки клеток в остеогенном направлении ММСК трансфицировали пДНК pBud-clVEGF164-clBMP2, pBud-ecVEGF164-ecBMP2 и pEGFPN2. Клетки, трансфицированные pEGFPN2 и культивируемые в среде α MEM служили отрицательным контролем, клетки, трансфицированные pEGFPN2 и культивируемые в среде для остеогенной дифференцировки StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit (Life Technologies, США) служили положительным контролем. Культивировали клетки в течение 3 нед., смену питательных сред проводили раз в три дня. Для определения минерализации, являющейся признаком остеогенной дифференцировки, использовали реакцию von Kossa с 2% нитратом серебра, придающим минеральным отложениям серо-коричневый цвет. Активность щелочной фосфатазы (ЩФ) в клеточных лизатах (лизирующий буфер 20 mM трис-HCl, 100 mM NaCl, 1mM EDTA, dH₂O до 100 мл, 0,5% тритон X-100, pH = 8, 0) определяли колориметрически с помощью субстрата паранитрофенилфосфата (п-НФФ), оптическую плотность определяли при длине волны 400 нм на спектрометре TECAN Infinite 200 Pro (TECAN, Швейцария). Ферментативную активность вычисляли в пересчете на концентрацию общего белка в мкг/мкг.

Хондрогенная дифференцировка трансфицированных ММСК

Для хондрогенной дифференцировки использовали технику микро-осадочных культур, для чего предварительно трансфицированные ММСК высевали по 150 000 в 5-мл центрифужных пробирках, центрифугировали 5 мин. 500 g и далее культивировали в состоянии осадка. Клетки, трансфицированные пДНК pBud-clVEGF164-clBMP2, pBud-ecVEGF164-ecBMP2, культивировали на полной среде α MEM. Клетки, трансфицированные pEGFPN2 и культивируемые в среде α MEM служили отрицательным контролем, клетки, трансфицированные pEGFPN2 и культивируемые в среде для хондрогенной дифференцировки StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit (Life Technologies, США) служили положительным контролем. Культивировали клетки в CO₂-инкубаторе при 37°C в увлажненной атмосфере в течение 3 нед., смену питательных сред проводили раз в три дня, не повреждая осадка. Полученные культуры использовали для количественного определения содержания гликозаминогликанов с помощью диметилметиленового синего (DMMB, Sigma). Для этого образцы механически гомогенизировали, инкубировали с раствором ферментов (50 мкг/мл папаина, 5mM цистеина, 10 mM EDTA, DPBS, pH 7, 4) 16 ч. при 60°C, центрифугировали 5 мин. 1500 g, супернатанты использовали для дальнейшего окрашивания DMMB. Результаты анализировали на

микропланшетном ридере TECAN Infinite 200Pro (TECAN, Швейцария) при длине волны 525 нм. Содержание гликозаминогликанов в образцах пересчитывали на общее содержание ДНК, определяемое с помощью DAPI.

Формирование трансфицированными клетками капилляроподобных структур на матриксе Matrigel™

Ангиогенез *in vitro* в культурах ММСК, трансфицированных плДНК *pBud-clVEGF164-clBMP2* и *pBud-ecVEGF164-ecBMP2* оценивали методом формирования клетками капилляроподобных структур на матриксе Matrigel™ со сниженной концентрацией факторов роста (Cat. # 356231, Vecton Dickinson, США).

Вносили 50 мкл матрикса в лунку 96-луночного планшета, планшет инкубировали в течение 30 мин. при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂ для полимеризации матрикса, далее на матрикс высевали по 10 000 ММСК на лунку. Эксперимент выполнен в трипликатах. В качестве отрицательного контроля на формирование капилляроподобных структур использовали *pEGFPN2*-трансфицированные ММСК и среду *aMEM* с добавлением 2% FBS (контрольная, обедненная среда). В качестве положительного контроля использовали ту же среду с добавлением 10 нг/мл рекомбинантного VEGF (дифференцировочная, обогащенная среда) и *pEGFPN2*-трансфицированные ММСК. Трансфицированные *pBud-clVEGF164-clBMP2* и *pBud-ecVEGF164-ecBMP2* клетки инкубировали в обедненной среде. Планшет инкубировали при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Формирование капилляроподобных структур оценивали после 16 ч. инкубации с помощью фазово-контрастной и флуоресцентной микроскопии. Подсчитывали число сформировавшихся узлов ветвления.

Результаты и обсуждение

Генетические конструкции *pBud-clVEGF164-clBMP2* и *pBud-ecVEGF164-ecBMP2* получены стандартными молекулярно-генетическими методами [23]. Экспрессию *vegfl64* и *bmp2* в клетках HEK 293, трансфицированных плДНК *pBud-clVEGF164-clBMP2* и *pBud-ecVEGF164-ecBMP2*, подтвердили методом флуоресцентной иммуноцитохимии — наблюдалось положительное окрашивание антителами к VEGF и BMP2 (рис. 1).

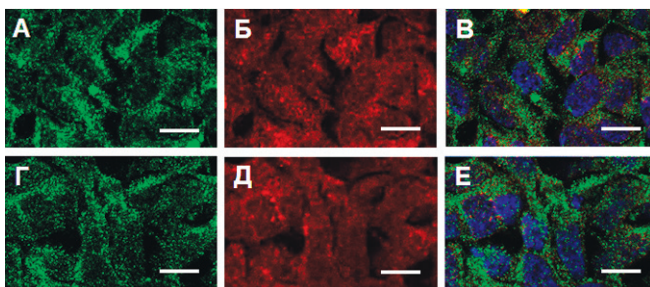


Рис. 1. Экспрессия VEGF164 и BMP2 в клетках линии HEK293 через 48 ч. после трансфекции: А–В – HEK 293, трансфицированные *pBud-clVEGF-clBMP2*; А – BMP2, Б – VEGF164, В – результат совмещения А и Б; Г–Е – HEK 293, трансфицированные *pBud-ecVEGF-ecBMP2*; Г – BMP2, Д – VEGF164, Е – результат совмещения Г и Д. Докраска ядер – DAPI. Маркер – 10 мкм

При иммуноблоттинге показано наличие на мембране полос, соответствующих массам белков BMP2 (18 кДа) и VEGF164 (21 кДа) (рис. 2), что подтверждает их синтез в клетках HEK 293, трансфицированных плДНК. При иммуноферментном анализе экспрессия VEGF клетками HEK293, трансфицированными *pBud-clVEGF-clBMP2*, составила 6252 ± 160 пг/мл, трансфицированными *pBud-ecVEGF-ecBMP2*, – 222 ± 43 пг/мл, в контрольном образце – 26 ± 5 пг/мл. Таким образом, подтверждена функциональная активность плДНК. Низкие значения уровня экспрессии VEGF лошади по всей видимости связаны с тем, что используемый набор ИФА разработан для количественной оценки уровня VEGF человека и используемые антитела обладают низкой аффинностью к VEGF лошади. В то же время, высокие значения уровня экспрессии VEGF собаки указывают на высокую аффинность используемых в наборе антител, что делает набор применимым для количественной оценки уровня VEGF собаки.

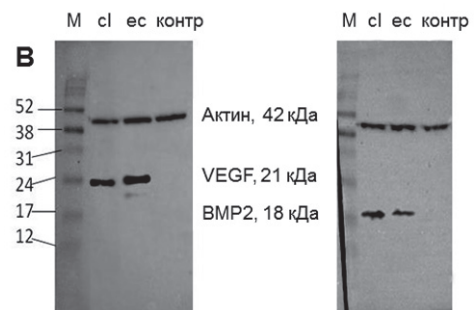


Рис. 2. Экспрессия белков VEGF164 и BMP2 методом иммуноблоттинга в генетически модифицированных клетках HEK293: электрофорез в 12% SDS-PAGE геле по системе Лаэмли. Антитела к актину (42 кДа), VEGF (21 кДа) и BMP2 (18 кДа). М – маркер GE LifeSciences RPN756E, cl – клетки HEK293, трансфицированные плДНК *pBud-clVEGF-BMP2*, ec – клетки HEK293, трансфицированные *pBud-ecVEGF-BMP2*. Контроль – нетрансфицированные клетки

ММСК человека получены по стандартной методике методом инкубации гомогенизата подкожной жировой ткани с коллагеназой краба. Принадлежность полученных клеток к ММСК подтверждали методом проточной цитофлуориметрии – более 97% полученных клеток экспрессируют маркеры, характерные для ММСК (CD73 – 99,9%, CD 90 – 99,7%, CD105 – 97,2%) и не экспрессируют маркеры CD11b, CD19, CD34, CD45, HLA-DR, не свойственные ММСК (данные не представлены). Таким образом, согласно литературным данным [24], полученные клетки соответствовали мезенхимным стромальным клеткам.

Реакция von Kossa выявила наличие минеральных отложений в культурах ММСК, трансфицированных плДНК *pBud-clVEGF164-clBMP2* и *pBud-ecVEGF164-ecBMP2* (рис. 3А, В), так же как и в культурах ММСК, подвергнутых остеогенной дифференцировке с помощью специальной питательной среды (рис. 3Б). В то же время, в культурах, инкубированных в контрольной среде, минеральных отложений в реакции von Kossa не наблюдалось (рис. 3Г). Таким образом, ММСК, трансфицированные разработанными плДНК, способны к остеогенной дифференци-

ровке *in vitro* без внесения в среду дополнительных индуцирующих факторов. При колориметрическом определении активности щелочной фосфатазы с помощью п-НФФ было показано, что активность ЩФ в культурах ММСК, трансфицированных разработанными плДНК выше, чем в контроле (рис. 4А, табл.). Из-

вестно, что белки VEGF и BMP2 оказывают синергичный положительный эффект на процессы остеогенеза *in vitro*. Так, описывается синергичное действие белков BMP6 и VEGF 165 при трансфекции линии остеопрогениторных клеток мыши D1, плДНК, несущей оба гена, по сравнению с моногенными плДНК [25].

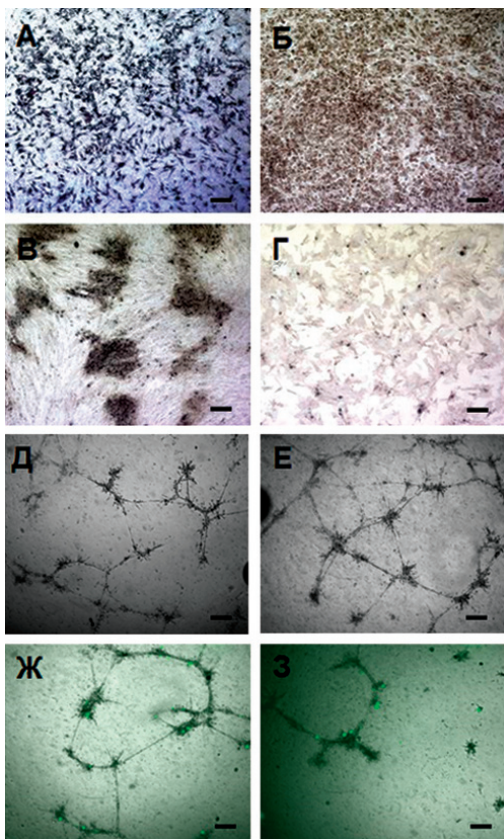


Рис. 3. Результат индукции направленной дифференцировки: А–Г – гистохимическая реакция по von Kossa; А – трансфекция *pBud-clVEGF-clBMP*; Б – нетрансфицированные ММСК, среда для остеогенной дифференцировки; В – трансфекция *pBud-ecVEGF-ecBMP*; Г – нетрансфицированные ММСК, среда *aMEM*; Е–З: капиллярноподобные структуры, формируемые ММСК в *Matrigel™*; Д – ММСК, трансфицированные *pBud-clVEGF164-BMP2*; Е – ММСК, трансфицированные *pBud-ecVEGF164-BMP2*; Ж – ММСК, трансфицированные *p-EGFP-N2*, культивируемые в обогащенной среде; З – ММСК, трансфицированные *p-EGFP-N2*, культивируемые в обедненной среде. Маркер – 100 мкм

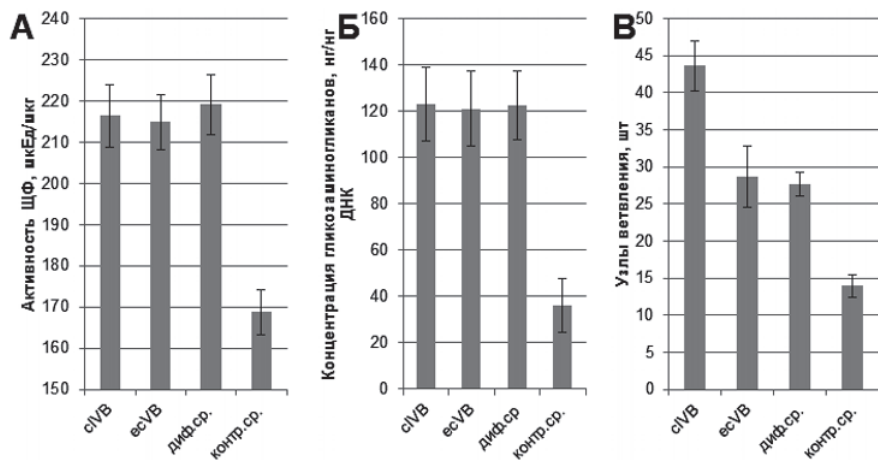


Рис. 4. Биохимическая активность клеток: А – активность щелочной фосфатазы в трансфицированных культурах; Б – гликозаминогликаны в трансфицированных культурах; В – формирование трубчатых структур трансфицированных ММСК. Обозначения: cIVB – ММСК, трансфицированные *pBud-clVEGF164-BMP2*, ecVB – ММСК, трансфицированные *pBud-ecVEGF164-BMP2*

Таблица. Биохимическая характеристика культур клеток (M±m)

Показатель	cIVB	ecVB	Диф. ср.	Контр. ср.
Активность щелочной фосфатазы, мкЕд/мкг	216,38±7,66	214,91±6,77	219,17±7,26	168,73±5,40
Содержание гликозаминогликанов, нг/нгДНК	122,95±15,96	121,13±16,07	122,53±14,82	36,13±11,73
Число узлов ветвления, шт	43,67±3,38	28,67±4,10	27,67±1,67	14,00±1,53

Окрашивание DMMB позволило количественно оценить влияние экспрессии рекомбинантных белков в культурах, трансфицированных плДНК, на процессы синтеза сульфатированных гликозаминогликанов (ГАГ) в микро-осадочных культурах ММСК. Показали, что в культурах, трансфицированных плДНК рBud-cVEGF164-BMP2, рBud-ecVEGF164-BMP2 синтез ГАГ был существенно выше по сравнению с контролем ($p < 0,05$) (рис. 4Б, табл.). Если негативное влияние васкуляризации на гиалиновый хрящ достоверно известно, то литературные данные относительно влияния VEGF на процессы хондрогенеза *in vitro* несколько противоречивы. Так, в экспериментах M. Yin (2001) VEGF не оказывал какого-либо воздействия на *in vitro* хондрогенез, однако оказывал негативное влияние на хондрогенез при развитии конечностей в экспериментах на эмбрионах [26]. В то же время, согласно S. Kubo (2009) блокирование VEGF в культурах мышечных стволовых клеток стимулировало хондрогенез [27].

ММСК, трансфицированные созданными плДНК рBud-cVEGF164-BMP2 и рBud ecVEGF164-BMP2 (см. рис. 3 Д–3, 4В, табл. 1), обладают более высокой способностью к формированию капиллярноподобной сети на матриксе Matrigel™ по сравнению с клетками, трансфицированными контрольной плазмидой рEGFP-N2 ($p < 0,05$). VEGF является известным стимулятором ангиогенеза, так же недавно было показано, что BMP2 усиливает васкуляризацию при росте опухолей и усиливает ангиогенез при подкожном введении Matrigel™ с рекомбинантным BMP2 [28].

Эффективность плДНК рBud-cVEGF164-cBMP2 ранее была исследована нами на клиническом примере лечения разрыва передней крестообразной связки коленного сустава у собаки породы лабрадор. Целостность связки была восстановлена путем подшивания ее к месту отрыва в ходе открытого опера-

тивного вмешательства, после чего 500 мкг плазмидной ДНК, несущей видоспецифичные для собаки гены VEGF и BMP2, было введено непосредственно в связку. Через 1, 5 мес. после операции наблюдали полное клиническое восстановление функции коленного сустава [29].

Таким образом, разработанные плазмидные конструкции рBud-cVEGF164-cBMP2 и рBud-ecVEGF164-ecBMP2 оказывают положительный эффект на процессы остеогенной и хондрогенной дифференцировки ММСК, а также способствуют ангиогенезу при исследовании *in vitro*. Полученные данные позволяют судить о перспективности применения вышеуказанных генноинженерных конструкций в качестве лекарственных препаратов при лечении травм и заболеваний опорно-двигательного аппарата домашних животных, связанных, прежде всего, с массивными, длительно не консолидирующимися повреждениями и нарушением локальной трофики.

Благодарности

Работа выполнена в рамках программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета и субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности. Анализы выполнены в лаборатории лазерной конфокальной микроскопии Междисциплинарного центра аналитической микроскопии на приборе LSM 780 компании Carl Zeiss. Работа частично выполнена на оборудовании Междисциплинарного центра коллективного пользования Казанского федерального университета при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (ID RFMEFI59414X0003) и Научно образовательного центра фармацевтики Казанского (Приволжского) федерального университета.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Stoll S.M., Calos M.P. Extrachromosomal plasmid vectors for gene therapy. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2002; 4(IV): 299-305.
2. Bali A., Bali D., Sharma A. An overview of gene therapy in head and neck cancer. *Indian J. Hum. Genet.* 2013; 19(III): 282-90.
3. Ylä-Herttua S. Endgame: glybera finally recommended for approval as the first gene therapy drug in the European union. *Mol. Ther.* 2012; 20(X): 1831-2.
4. Бродский И.Н., Деев Р.В. Место ангиогенной терапии в программе лечения пациентов с критической ишемией нижних конечностей. *Трудный пациент* 2014; VI: 16-8.
5. Chirino A.J., Ary M.L., Marshall S.A., Chirino A.J. Minimizing the immunogenicity of protein therapeutics. *Drug Discov. Today.* 2004; 9(II): 82-90.
6. Argyle D.J. Gene therapy in veterinary medicine. *Vet. Rec.* 1999; 144(XIV): 369-76.
7. Ely E.R., Avella C.S., Price J.S. et al. Descriptive epidemiology of fracture, tendon and suspensory ligament injuries in National Hunt racehorses in training. *Equine Vet. J.* 2009; 41(IV): 372-8.
8. Yates J. Injury and disease in the young thoroughbred racehorse: associations with subsequent racing performance. MSc(R) thesis, University of Glasgow; 2010, <http://theses.gla.ac.uk/2302/1/2010YatesMScR.pdf>
9. Lipps G. Plasmids: current research and future trends. Dorset: Caister Academic Press; 2008.
10. Stoll S.M., Calos M.P. Extrachromosomal plasmid vectors for gene therapy. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2002; 4(IV): 299-305.
11. Швальб П.Г., Гавриленко А.В., Калинин Р.Е. и др. Эффективность и безопасность применения препарата «Неоваскулген» в комплексной терапии пациентов с хронической ишемией нижних конечностей (IIb-III фаза клинических испытаний). *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2011; 4(III): 76-83.
12. Mac Gabhann F., Annex B.H., Popel A.S. Gene therapy from the perspective of systems biology. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2010; 12(V): 570-7.
13. Byrne A.M., Bouchier-Hayes D.J., Harmey J.H. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J. Cell Mol. Med.* 2005; 9(IV): 777-94.
14. Sykaras N., Opperman L.A. Bone morphogenetic proteins (BMPs): how do they function and what can they offer the clinician? *J. Oral Sci.* 2003; 45(II): 57-73.
15. McKay W.F., Peckham S.M., Badura J.M. A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (INFUSE Bone Graft). *Int. Orthop.* 2007; 31(VI): 729-34.
16. Baltzer A.W., Lattermann C., Whalen J.D. et al. Genetic enhancement of fracture repair: healing of an experimental segmental defect by adenoviral transfer of the BMP-2 gene. *Gene Ther.* 2000; 7(IX): 734-9.
17. Beamer B., Hettrich C., Lane J. Vascular endothelial growth factor: an essential component of angiogenesis and fracture healing. *HSS J.* 2010; 6(I): 85-94.
18. Seamon J., Wang X., Cui F. Adenoviral delivery of the VEGF and BMP-6 genes to rat mesenchymal stem cells potentiates osteogenesis. *Bone Marrow Research* 2013; 737580. doi: 10.1155/2013/737580.
19. Kaipel M., Schützenberger S., Schultz A. et al. BMP-2 but not VEGF or PDGF in fibrin matrix supports bone healing in a delayed-union rat model. *Orthop Res.* 2012; 30(X): 1563-9.
20. Kakudo N., Kusumoto K., Wang Y.B. et al. Immunolocalization of vascular endothelial growth factor on intramuscular ectopic osteoinduction by bone morphogenetic protein-2. *Life Sci.* 2006; 79(XX): 1847-55.
21. Bunnell B.A., Flaatt M. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods* 2008; 45(III): 12-5.
22. Катина М.Н., Гайфуллина Р.Ф., Хаятова З.Г. и др. Выделение, культивирование и дифференцировка мультипотентных мезенхимных стромальных клеток из жировой ткани крыс *Rattus norvegicus* и хомяков *Mesocricetus auratus*. *КТИ* 2012; 7(III): 82-8.
23. Ризванов А.А., Журавлева М.Н., Закирова Е.Ю. др. Способ стимуляции репаративного ангио- и остеогенеза в ветеринарии

с помощью генетических конструкций. Заявка на изобретение РФ 201511480064. 20 апреля 2015.

24. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Horwitz Cytotherapy* 2006; 8(IV): 315-7.

25. Cui F., Wang X., Liu X. et al. VEGF and BMP-6 enhance bone formation mediated by cloned mouse osteoprogenitor cells. *Growth Factors* 2010; 28(V): 306-17.

26. Yin M., Pacifici M. Vascular regression is required for mesenchymal condensation and chondrogenesis in the developing limb. *Dev. Dyn.* 2001; 222(III): 522-33.

27. Kubo S., Cooper G.M., Matsumoto T. et al. Blocking vascular endothelial growth factor with soluble Flt-1 improves the chondrogenic potential of mouse skeletal muscle-derived stem cells. *Arthritis Rheum.* 2009; 60(I): 155-65.

28. Langenfeld E.M., Langenfeld J. Bone morphogenetic protein-2 stimulates angiogenesis in developing tumors. *Mol. Cancer Res.* 2004; 2(III): 141-9.

29. Закирова Е.Ю., Васин Н.Н., Катина М.Н. и др. Клинический опыт применения комбинированной генной терапии VEGF и BMP2 в ветеринарии при восстановлении передней крестообразной связки у собаки крупной породы. *Гены и Клетки* 2014; 9(II): 93-5.

Поступила: 20.09.2015