

*М. И. Бобкова*

**СОЗДАНИЕ И ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ  
ГЕН-АКТИВИРОВАННОГО ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА,  
НЕСУЩЕГО ГЕН VEGF ЧЕЛОВЕКА**

*Научный руководитель канд. биол. наук, доц. Мезен Н. И.*

*Кафедра биологии*

*Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск*

**Резюме.** ГАКГ (ген-активированный костный графт) с плазмидной конструкцией, имеющей в своём составе ген VEGF-A165 человека, обладает ангиогенной активностью, обеспечивающей остеоиндуктивное действие.

**Ключевые слова:** ген-активированный костный графт, ген VEGF-A165, ангиогенез, остеогенез.

**Resume.** GABG (gene-activated bone graft) with plasmid DNA encoding VEGF-A165 possesses angiogenic activity providing osteoinductive properties.

**Keywords:** gene-activated bone graft, gene VEGF-A165, angiogenesis, osteogenesis.

**Актуальность.** Osteoplastic materials are highly demanded in practice of traumatology and orthopedics, surgical stomatology and maxillofacial surgery; Effective treatment of patients, who need reconstructive operations; Treatment of bone defects, which are a result of inflammatory diseases, trauma, congenital anomalies of development and deformation of bones.

**Цель исследования:** создание ген-активированного костного графта (ГАКГ) из носителя на основе коллагена и гидроксиапатита и плазмидной конструкцией, имеющей в своём составе ген VEGF-A165 человека, а также оценка его биологического действия *in vitro* и *in vivo*.

**Исследования проводились:** В Институте Стволовых Клеток Человека, Москва; Московском государственном медико-стоматологическом университете им. А.И. Евдокимова; Санкт-Петербургском государственном медицинском университете им. И.П. Павлова.

**Материал и методы.** Согласно литературным данным исследования проводили в два этапа:

**In vitro:** Нацеленный на создание прототипа ГАКГ и оценку его специфической активности на культурах клеток.

**In vivo:** Направленный на определение биологического действия разработанного ГАКГ в модели замещения костных дефектов критических размеров.

Васкулярный эндотелиальный ростовой фактор (VEGF) - основной индуктор ангиогенеза. VEGF продуцируется клетками, находящимися в тесной близости к эндотелиальным клеткам,

такими как миокард во время активного ангиогенеза капилляров, во время развития и неонатального роста. VEGF осуществляет свои эффекты через рецепторы эндотелиальных клеток, такие как VEGFR-1 VEGFR-2. Экспрессия VEGF регулируется гипоксией, он индуцирует плеiotропные реакции, позволяющие эндотелиальным клетками пролиферировать, мигрировать, собираться в трубки и формировать связанную сеть (морфоген), выживать и усиливать свою проницаемость. В настоящее время известны семь членов семейства VEGF, обозначаемых буквами от А до F. Однако наиболее изученными из них являются первые четыре. Из общего гена VEGF-А образуются четыре изоформы, различающиеся количеством включенных аминокислотных остатков: VEGF(121), VEGF(165), VEGF(189), VEGF(206). Изоформы обладают сходной биологической активностью, но различаются по аффинности к гепарину. Реализуют свою активность при взаимодействии с рецепторами VEGFR-1, VEGFR-2. VEGF-А обладает активностью ростового фактора клеток сосудистого эндотелия с плеiotропными функциями: усиление миграции, пролиферация, образование трубчатых структур клетки.

**Исследование in vitro.** В анализируемой работе создавали ГАКГ(ген-активированный костный графт), состоящий из носителя и ДНК-плазмид с геном, кодирующим ключевой остеиндуцирующий фактор VEGF. Матрикс-носители выбирали из ряда групп ординарных остеопластических материалов, разрешенных для клинического применения и не обладающих биологической активностью: аллогенные деминерализованные костные матриксы, синтетические  $\beta$ -трикальцийфосфаты, композитные материалы на основе коллагена и гидроксиапатита, ксеногенные костные матриксы и ряд других. VEGF выделяли из звездчатых фолликулярных клеток и из ряда клеточных линий, был идентифицирован ряд структурных гомологов и образующихся в результате альтернативного сплайсинга форм VEGF. Различные формы VEGF связываются как высокоаффинные лиганды с семейством рецепторов VEGF (VEGFR). VEGFR представляют собой тирозинкиназные рецепторы, многие из которых являются важными регуляторами ангиогенеза (рисунок 1).

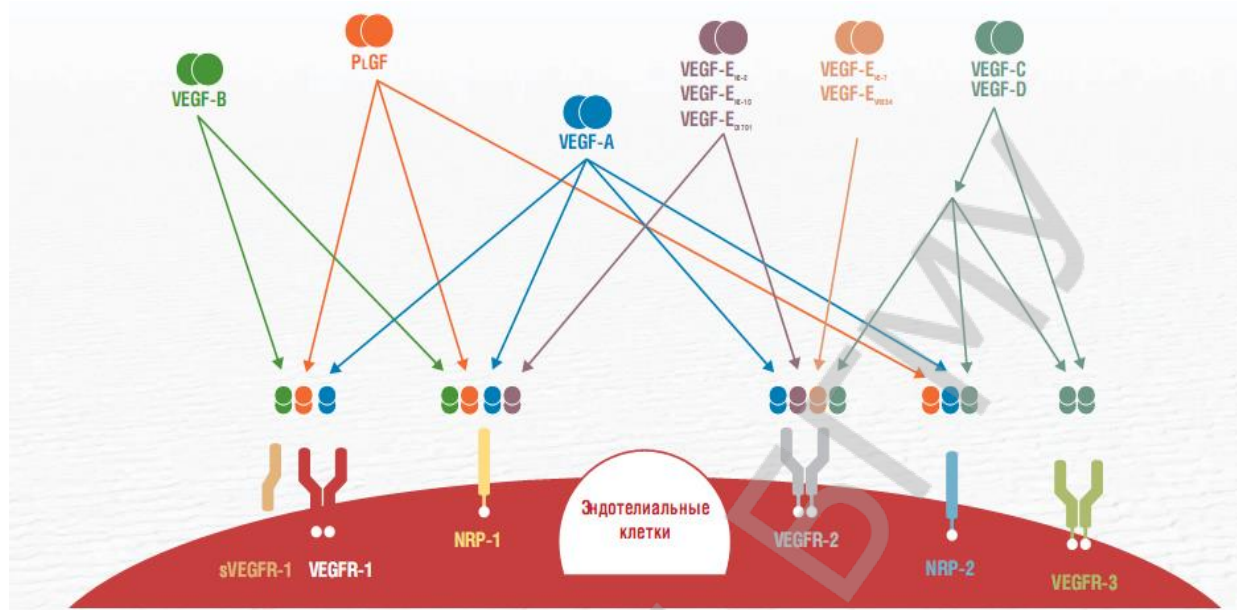


Рисунок 1 – Связывание лигандов семейства VEGF с рецепторами.

Согласно литературным данным обработку материалов и совмещение с генными конструкциями плазмидными ДНК с геном VEGF-A165 выполняли по специальной методике: последовательная отмывка матриксов 0,5М (в течение 10 ч) и 10 мМ (4 раза по 10 мин) растворами фосфатного буфера при постоянном перемешивании и температуре 37° С с последующим высушиванием. Инкубирование с раствором плазмидных ДНК (концентрация 1 мкг/мкл) в течение 10 ч при постоянном перемешивании и температуре 37° С, промывание материалов и высушивание. Определение уровня плазмидных ДНК производили с помощью флуоресцентной фотометрии после элюирования нуклеиновых кислот 0,5М раствором фосфатного буфера. Из полученных ГАКГ для последующих исследований отбирают один вариант, матрикс-носитель которого обладает наибольшей емкостью для генных конструкций. Фрагменты полученного ГАКГ массой 10 мг (содержание pVEGF-A165 – 1,7 мкг) были ко-инкубированы с культурами мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток количеством  $2 \cdot 10^5$  Кл. На 1,3,5 сутки забирали пробы культуральной среды и с помощью иммуноферментного анализа определяли концентрацию VEGF. В качестве контроля служили культуры клеток с продукцией только эндогенного VEGF- без ко-инкубирования с какими-либо материалами.

**Исследование in vivo** выполняли на кроликах породы Шиншилла (n=10), массой 2-2,5 кг. Для создания ген-активированного костного графта, подлежащего исследованию in vivo, использовали двухкассетные плазмидные ДНК, содержащие под одним промотором помимо VEGF-a165, еще и ген, кодирующий зеленый флуоресцирующий белок (GFP), что было обусловлено необходимостью детекции экспрессии плазмид in vivo. С помощью белка работу гена стала видимой. Проникая в клетки-мишени, ген VEGF начинал продуцировать белок — сосудистый

эндотелиальный фактор роста. Казалось бы, как белок кровеносных сосудов помогает росту костной ткани? Но исследование показало, что он стимулировал рост сосудов — ангиогенез, а он, в свою очередь, оказывался критическим условием для регенерации кости. Использовалась проверенная генная конструкция, поскольку именно она работает в уже зарегистрированном препарате «Неоваскулген» для лечения ишемии нижних конечностей. В качестве модели критического костного дефекта использовался стандартный протокол- краниальные дефекты(диаметр 10 мм) теменных костей. После премедикации и антисептической обработкой операционного поля под инфльтрационным обезболиванием и седацией производился линейный разрез (2-2,5 см) мягких тканей в проекции сагиттального шва от бугра затылочной кости кпереди. Каждому животному с помощью боров (обратный конус 1,0 мм) выполняли двусторонние симметричные дефекты теменных костей без повреждения твердой мозговой оболочки. В дефект правой теменной кости вносили ГАКГ(экспериментальная группа №1), а в дефект левой-соответствующий носитель без плазмидной ДНК(контрольная группа №2).В группе №3 дефекты оставляли без имплантации каких-либо материалов. Операционная рана ушивалась послойно узловыми швами(Vicryl 5/0, 4/0), сведение краев рассеченной надкостницы обеспечивало фиксацию материалов в пределах костных дефектов.

#### **Результаты и их обсуждения.**

В исследуемой работе с помощью флуоресцентной спектрофотометрии были установлены средние концентрации плазмидной ДНК, сорбируемые различными остеопластическими материалами; для создания ГАКГ был выбран композитный материал на основе коллагена и гидроксиапатита, обладающих наибольшей ёмкостью для нуклеиновых кислот. Через 30 дней в группе с имплантацией ГАКГ наблюдался выраженный регенерат из ретикуло-фиброзной костной ткани, исходящей как из костных опилов, так и из гранул материала. При имплантации носителя без плазмидной ДНК (группа №2) определялся лишь периферический костный регенерат умеренного объема, а фрагменты введенного материала были все также окружены реактивно измененной рыхлой волокнистой соединительной тканью без признаков репаративного остеогенеза. В группе №3-гистологическая картина оставалась практически без изменений. На 30 сутки определялся большой объём костного регенерата при использовании ГАКГ. При этом, источником репаративного остеогенеза являлись не только теменные кости, но фрагменты ГАКГ (даже из центральной части дефекта), большинство из которых были окружены новообразованной костной тканью. В контроле остеоиндуктивного материала не наблюдалось.

**Таблица 1.** Ёмкость различных остеопластических материалов для генных конструкций.

Перечень исследованных носителей	«Ёмкость» для нуклеиновых кислот, нг/мг (M±m)
β-трикальцийфосфат	52,1±1,3
Композитный материал на основе коллагена и гидроксиапатита	170,6±3,5
Аллогенный деминерализованный костный матрикс	69,7±1,8
Ксеногенный депротеинизированный костный матрикс	116,4±2,9
Прочие	до 50

**Выводы.** Был разработан первый прототип ГАКГ (ген-активированный костный графт) и на его примере показана выполнимость концепции локальной генной индукции репаративного процесса. рlVEGF-A165 при введении на носителе в область костного дефекта сохранили биологическую активность и реализовали специфический механизм действия, проявившийся в конечном итоге в остеиндукции.

*M. I. Bobkova*

## CONSTRUCTION AND BIOLOGICAL EFFECT EVALUATION OF GENE-ACTIVATED OSTEOPLASTIC MATERIAL WITH HUMAN VEGF GENE

*Tutor PhD, Associate professor N.I. Mezen*  
*Department of biology*  
*Belarusian State Medical University, Minsk*

### Литература

1. Козлов В.А. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, том VIII, №3, 2013.
2. Гололобов В.Г., Дулаев А.К., Деев Р.В. Морфофункциональная организация, реактивность и регенерация костной ткани. СПб: 2006; 47с.
3. Deev R.V. New approach for development of osteoplastic materials/ R.V. Deev, A.Y. Drobyshev, I.Y. Bozo, D.V. Galetsky, O.V. Korolev, E.S. Philonenko, S.L. Kisekev, A.A. Isaev – Bioceramics and Cells for Reinforcement of Bone, 2012 p.32.
4. Швальб П.Г. Эффективность и безопасность применения препарата «Неоваскулген» в комплексной терапии пациентов с хронической ишемией нижних конечностей/ П.Г. Швальб, А.В. Гавриленко, и др.—2011 83-89 с.
5. Geiger F. Vascular endothelial growth factor gene-activated matrix (VEGF165-GAM) enhances osteogenesis and angiogenesis in large segmental bone defects/ Geiger F., Bertram H., Berger I. et al. J Bone Miner. Res. 20(11): 2028–2035.
6. Дробышев А.Ю. Применение дистракционного метода у больных при дефектах и атрофии альвеолярной части нижней челюсти/ А.Ю. Дробышев – Москва. 2007; 62 с.
7. Кулаков Л.А., Хирургическая стоматология и челюстно-лицевая хирургия. Национальное руководство/ Л.А. Кулаков, Т.Г. Робустова, Л.И. Неробеев, и др. – Москва «ГЭОТАР-Медиа»; 2010

70-я Международная научно-практическая конференция студентов и молодых учёных  
"Актуальные проблемы современной медицины и фармации - 2016"

---

8. Повещенко А.Ф., Коненков В.И. Механизмы и факторы ангиогенеза/ А.Ф. Повещенко, В.И. Коненков // Успехи физиол.наук.–2010. –Т.41, №2.–Р. 68-89.
9. Дробышев А.Ю. Клинико-экспериментальное обоснование применения биокомпозиционных материалов при костно-восстановительных операциях на челюстях [Текст]: автореф. дис. ... д-р мед. наук/ А.Ю. Дробышев -- Москва: МГМСУ, 1999.