

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГЕН-АКТИВИРОВАННЫХ ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ ИЗ ОКТАКАЛЬЦИЕВОГО ФОСФАТА И ПЛАЗМИДНЫХ ДНК, НЕСУЩИХ ГЕНЫ *VEGF* И *SDF*: ЧАСТЬ 2 – IN VIVO

И.Я. Бозо^{1,2,3,4}, С.И. Рожков⁵, В.С. Комлев^{4,6}, Г.А. Воложин⁵, И.И. Еремин⁷, И.В. Смирнов^{4,6}, О.В. Савва⁸, А.А. Исаев¹, В.К. Попов⁴, А.Ю. Дробышев⁵, Р.В. Деев^{1,2,4,8}

¹ ПАО «Институт стволовых клеток человека», Москва, Россия

² ООО «Гистографт», Москва, Россия

³ Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия

⁴ Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва, Россия

⁵ Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия

⁶ Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН, Москва, Россия

⁷ Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии РАН, Москва, Россия

⁸ Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Рязань, Россия

Biological activity comparative evaluation of the gene-activated bone substitutes made of octacalcium phosphate and plasmid DNA carrying *VEGF* and *SDF* genes: part 2 – in vivo

I.Y. Bozo^{1,2,3,4}, S.I. Rozhkov⁵, V.S. Komlev^{4,6}, G.A. Volozhin⁵, I.I. Eremmin⁷, I.V. Smirnov^{4,6}, O.V. Savva⁸, A.A. Isaev¹, V.K. Popov⁴, A.Y. Drobyshev⁵, R.V. Deev^{1,2,4,8}

¹ PJSC "Human Stem Cells Institute", Moscow, Russia

² "Histograft" Co. Ltd., Moscow, Russia

³ A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center of the FMBA of Russia, Moscow, Russia

⁴ Federal Research Center "Crystallography and photonics" RAS, Moscow, Russia

⁵ A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia

⁶ A.A. Baykov Institute of Metallurgy and Material Science of the RAS, Moscow, Russia

⁷ Research Institute of General Pathology and Pathophysiology of the RAS, Moscow, Russia

⁸ I.P. Pavlov Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia

Остеопластические материалы, обладающие остеиндуктивными свойствами и (или) остеогенностью остро востребованы в клинической практике для лечения пациентов с патологией костей скелета. К таким изделиям относятся ген-активированные остеопластические материалы, состоящие из матрикса-носителя и генных конструкций. В данном исследовании мы изготовили два прототипа таких изделий в виде гранул на основе октакальциевого фосфата (ОКФ) и двух вариантов плазмидных ДНК – однокассетной системы с геном, кодирующим сосудистый эндотелиальный фактор роста A-165 (*VEGFA*-165, pl-*VEGFA*), и двухкассетной – с двумя терапевтическими генами, кодирующими *VEGFA*-165 и фактор стромальных клеток 1 α (pl-*VEGFA*-*SDF*). Материалы были имплантированы кроликам в сквозные дефекты теменных костей диаметром 10 мм, в качестве контроля служили гранулы ОКФ без плазмидной ДНК. Оба варианта ген-активированных материалов показали выраженную остеиндукцию, обеспечивая формирование костного регенерата с ранних сроков наблюдения в центральной зоне костных дефектов с восстановлением целостности теменных костей к 90 сут. после операции. При этом на сроке в 30 сут. уровень костного регенерата в случае изделия с pl-*VEGFA*-*SDF* был статистически значимо выше, чем при имплантации материала с pl-*VEGFA*, тогда как через 60 сут., наоборот, большее значение показателя определялось в изделии с pl-*VEGFA*. Таким образом, разработанные ген-активированные материалы оказали выраженное остеиндуктивное действие, динамика и особенности которого отличались в связи с различиями в биологическом действии факторов роста, кодируемых генными конструкциями.

Ключевые слова: ген-активированный остеопластический материал, октакальциевый фосфат, плазмидная ДНК, сосудистый эндотелиальный фактор роста, фактор стромальных клеток-1 α .

e-mail: Bozo.ilya@gmail.com

Bone substitutes with osteoinductive and (or) osteogenic capacities are highly needed in clinical practice for treatment of patients with skeletal bone pathology. Gene-activated bone substitutes consisting of a scaffold and gene constructs belong to such materials. In this study, we made two prototypes of gene-activated bone substitutes based on octacalcium phosphate (OCP) granules and two variants of plasmid DNA – the system delivering single gene encoding vascular endothelial growth factor A-165 (*VEGFA*-165, pl-*VEGFA*) and the other plasmid carrying simultaneously *VEGFA* and gene of stromal-derived factor 1 α (pl-*VEGFA*-*SDF*). All the materials were implanted to rabbits into the full-thickness parietal bone defects with diameter 10 mm, OCP without plasmid DNA we used as a control. Both gene-activated materials showed pronounced osteoinduction providing new bone formation in the central part of the defects and complete parietal bone repair by 90 days after surgery. In addition, we found newly formed bone level to be higher in pl-*VEGFA*-*SDF* group comparing with pl-*VEGFA* ($p < 0.05$), while there were the opposite results at 60 days' time point ($p < 0.05$). Thus, gene-activated bone substitutes we developed had osteoinductive effect, dynamic and features of which were different and depended on biological action of the factors delivered by transgenes.

Keywords: gene-activated bone substitute, octacalcium phosphate, plasmid DNA, vascular endothelial growth factor, stromal derived factor-1 α .

Введение

Острая потребность клинической практики в эффективных остеопластических материалах, способных оптимизировать репаративную регенерацию костной ткани даже в условиях «остеогенной недостаточности», побуждает исследователей продолжать активные разработки в данной отрасли. Консолидация накопленных знаний о регуляции репаративного остеогенеза с современными концепциями биоматериаловедения и реконструктивно-восстановительного лечения пациентов с патологией костей скелета привели к созданию «активированных» остеопластических материалов, отличающихся наличием в своем составе биологически активных компонентов: клеток, факторов роста (белков) или «предшественников» факторов роста — генных конструкций (нуклеиновых кислот) [1].

Все три технологических подхода в создании активированных материалов для регенеративной медицины имеют длительную историю развития, насчитывающую более 30 лет, однако к настоящему времени только тканеинженерные изделия и материалы с факторами роста имеют прецеденты внедрения в рутинную клиническую практику [1]. Ген-активированные материалы, создание которых связано с успехами столь сложной и неоднозначно воспринимаемой обществом отрасли как генная терапия, и в России, и за рубежом находятся, главным образом, на стадиях экспериментальных исследований. Однако именно данная группа изделий имеет наибольший терапевтический потенциал, обусловленный спецификой механизма действия [2].

Ген-активированные материалы состоят из двух компонентов: матрикса-носителя и биологически активных нуклеиновых кислот, несущих гены терапевтических факторов роста, уровень экспрессии которых необходимо увеличить в зоне восстановления тканей. Применительно к костной пластике, в составе таких изделий исследуются генные конструкции, кодирующие основные остеоиндуцирующие факторы: костные морфогенетические белки (BMP), инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-1), сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) и др. При этом последний стимулирует регенерацию костной ткани, главным образом, через индукцию ангиогенеза [3, 4].

Внедрение на территории Российской Федерации и Украины геннотерапевтического лекарственного препарата «Неоваскулген» (Институт стволовых клеток человека, Россия), обладающего ангиогенной активностью [5, 6], сформировало важные условия для разработки ген-активированных материалов, содержащих активное вещество указанного препарата — плазмидную ДНК, несущую ген *VEGFA* [4]. Однако, понимая значимость привлечения клеток-предшественниц остеобластического дифферона в зону костного дефекта для оптимизации репаративного остеогенеза, мы разработали второй вариант генной конструкции — двухкассетную плазмидную ДНК, несущую сразу два терапевтических гена: *VEGFA* и последовательность, кодирующую фактор стромальных клеток-1 α (*SDF-1 α*).

Для сравнительных исследований биологического действия ген-активированных материалов *in vitro* и *in vivo* мы использовали единый вариант матрикса-носителя — октакальциевый фосфат (ОКФ). В исследованиях *in vitro* на культурах мультипотент-

ных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) костного мозга человека было показано, что оба варианта ген-активированных материалов и их компоненты не обладали цитотоксическими эффектами, незначительно снижали скорость удвоения клеточных культур; при этом ген-активированный материал с двухкассетной плазмидной ДНК на 24,3% в большей степени снижал пролиферативную активность ММСК, чем ген-активированный материал с плазмидной ДНК, несущей только один ген — *VEGFA*. Существенной разницы в уровне экспрессии трансгена *VEGFA* и белка VEGF-A165 выявлено не было [7].

Целью данной части экспериментального исследования стала сравнительная оценка биологического действия ген-активированных материалов, содержащих идентичный матрикс-носитель на основе ОКФ, и один из двух вариантов генных конструкций: плазмидную ДНК с геном *VEGFA* или двухкассетную плазмидную ДНК с генами *VEGFA* и *SDF*, — в ортотопических условиях *in vivo*.

Материал и методы

Дизайн исследования

Исследование было выполнено на кроликах-самцах породы Шиншилла ($n = 24$), массой 2,0–2,5 кг с соблюдением международных правил гуманного обращения с лабораторными животными [8]. Каждому животному выполнялись два одинаковых симметричных полнослойных дефекта обеих теменных костей, диаметром по 10 мм, которые являются «критическими» для кроликов, так как естественный восстановительный процесс, без каких-либо оптимизирующих влияний не завершается полной консолидацией. В дефекты правых теменных костей имплантировали ген-активированные остеопластические материалы ОКФ/pl-*VEGFA* (экспериментальная группа 1) или ОКФ/pl-*VEGFA-SDF* (экспериментальная группа 2), а в дефекты левых теменных костей — ОКФ без плазмидной ДНК (контрольная группа). Результаты оценивали на сроках 30, 60, 90 сут. с использованием конусно-лучевой компьютерной томографии (КТ) и гистологических методов исследования.

Ген-активированные остеопластические материалы

Ген-активированные остеопластические материалы были изготовлены из носителя на основе ОКФ (в виде гранул диаметром 500–1000 мкм с пористостью до 70%) и двух вариантов плазмидных ДНК — однокассетной системы с геном, кодирующим VEGFA-165 (pl-*VEGFA*), и двухкассетной — с двумя терапевтическими генами, кодирующими VEGFA-165 и *SDF-1 α* (pl-*VEGFA-SDF*), под разными цитомегаловирусными промоторами.

Синтез ОКФ осуществлялся по ранее описанной технологии [9]. Для получения pl-VEGF165 использовали лекарственный препарат «Неоваскулген», предоставленный ПАО «Институт Стволовых Клеток Человека». pl-*VEGFA-SDF* была синтезирована компанией GenScript (CША) согласно мастер-файлу, разработанному Казанским (приволжским) федеральным университетом по заказу ООО «НекстГен» [10].

Совмещение матрикса-носителя на основе ОКФ и каждого из вариантов генных конструкций осуществляли согласно ранее разработанному оригинальному лабораторному протоколу [4, 11] с получением двух вариантов ген-активированных остеопластических материалов: ОКФ/pl-VEGFA и ОКФ/pl-VEGFA-SDF, содержащих по 100 мкг биологически активных нуклеиновых кислот в 1 г матрикса-носителя.

Имплантация материалов

После премедикации (Sol. Atropini Sulfatis 0,04 мг/кг, Sol. Cephazolini 25 мг/кг внутримышечно) и седации (Sol. Zoletili 100 30 мг/кг внутримышечно), асептической обработки операционного поля под инфильтрационным обезболиванием (Sol. Ultracaini 1,7 мл) производился линейный разрез (длиной 2–2,5 см) мягких тканей в проекции сагиттального шва от бугра затылочной кости кпереди. Поверхность теменных костей обнажалась распатором. Каждому животному с помощью трепана (наружный диаметр 10 мм) формировались костные дефекты до твердой мозговой оболочки, без ее повреждения. Костные дефекты заполнялись исследуемыми материалами. Операционная рана ушивалась послойно узловыми швами Vicryl 5/0 (надкостница, апоневроз), Monosyn 5/0 (кожа). Сведение краев рассеченной надкостницы узловыми швами обеспечивало надежную фиксацию имплантированных материалов в пределах костных дефектов.

Животные находились на ежедневном динамическом наблюдении. Послеоперационную рану непосредственно после хирургического вмешательства и в дальнейшем в течение первых 7 сут. послеоперационного периода обрабатывали спиртовым раствором бриллиантового зеленого.

Животных выводили из эксперимента передозировкой препарата «Золетил 100», извлекали крышки черепов, фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина в герметично закрывающихся пластиковых банках.

Конусно-лучевая компьютерная томография

Конусно-лучевую КТ материалов выполняли в течение первых 3 сут. после фиксации на компьютерном томографе GE LightSpeed VCT 64. Исследования каждого материала выполняли отдельно, не извлекая его из банки с фиксирующим раствором, при одинаковых режимах и параметрах сканирования: voxel size 0,08 mm, 80kV 2 mA.

Анализ томограмм проводился стандартными инструментами в программном обеспечении Planmeca Romexis viewer (Planmeca Oy, Финляндия). При оценке полученных изображений на томограммах в аксиальной проекции с толщиной среза, равной толщине теменных костей, определяли плотность регенерата (в единицах Хаунсфилда, HU) с использованием инструмента ROI (region of interest) округлой формы, подбирая диаметр круга в 10 мм (площадь 78,54 мм²) и точно позиционируя его в границах ранее выполненных костных дефектов.

Позицию экспериментальной и контрольной стороны определяли по 3D-реконструкции крышки черепа. Из трех полученных значений плотности регенерата в области костного дефекта (на трех уровнях в аксиальной проекции) рассчитывали показатели для статистического анализа.

Гистологическое и гистоморфометрическое исследование

Фиксированные в течение 7 дней в 10% растворе нейтрального формалина материалы промывали в проточной воде в течение 60 мин., после чего помещали в декальцинирующий раствор Биоптек-R (Bio-optica, Италия), проверяя металлической иглой степень деминерализации в периферических областях каждые 20 мин. После декальцинации крыша черепа разделялась на две половины по сагиттальному шву. Затем одним движением проводился разрез во фронтальной плоскости через середину ранее выполненного костного дефекта. Для последующего гистологического анализа использовалась дистальная (затылочная) половина теменной кости с регенератом. Остальная часть костной ткани со стороны затылочной кости отсекалась. Сторона для последующего изготовления препаратов маркировалась краской. Каждый костный фрагмент помещался в отдельную емкость с 10% раствором нейтрального формалина.

Проводку материалов, заключение в парафиновые блоки и изготовление гистологических препаратов осуществляли по стандартной методике [12]. Выполнялась окраска срезов гематоксилином и эозином, а также по Маллори и Голднеру. Для определения количества сосудов в регенерате выполняли иммуногистохимическую реакцию с мышиными моноклональными антителами к α -SMA (Abcam, США). Все изготовленные препараты сканировали с помощью Mirax scanner (Carl Zeiss, Германия), цифровые изображения анализировали на различных увеличениях.

В качестве основных гистоморфометрических критериев использовали среднее количество сосудов в 10 случайных полях зрения при увеличении $\times 100$ и долю костного регенерата в общей площади ранее выполненного костного дефекта.

Для количественной оценки костного регенерата загружали изображение — гистотопограмму среза теменной кости с областью ранее выполненного костного дефекта — в компьютерную программу Adobe Photoshop CS 6 (Adobe, США). Затем линиями очерчивали вертикальные границы ранее выполненного костного дефекта, а горизонтальными — проекции надкостницы и твердой мозговой оболочки. Дополнительно, область костного дефекта разделялась на четыре равные части по 2,5 мм каждая, точность расстановки (разметки) обеспечивалась применением измерительных инструментов в программе «Pannoramic Viewer» (3DHISTECH, США). Две внутренние зоны обозначались как одна центральная, две краевые — как одна периферическая (рис. 1).

Используя стандартные инструменты программы Adobe Photoshop CS 6 (Adobe, США) выполняли кадрирование гистотопограммы по ранее очерченным границам с получением трех отдельных изображений: центральная зона и 2 краевых, в сумме образующих периферическую. Затем на полученных изображениях выполняли заливку костного регенерата черным цветом для упрощения дальнейшей обработки. Кадрированные изображения с размеченной черным цветом костной тканью подвергали сегментации в программе «ImageJ» (National Institutes of Health, США) с определением количества пикселей выделенной области с применением статистического модуля. Определив общее количество пикселей в зоне гистотопограммы вычисляли долю костного регенерата (%) в общей площади костного дефекта.

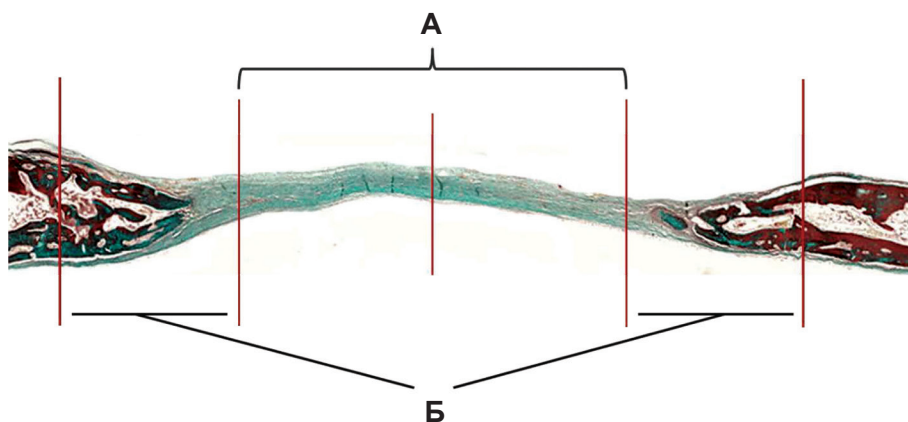


Рис. 1. Схема разметки гистотопограммы на зоны для гистоморфометрического анализа:
А — центральная зона (5 мм);
Б — периферическая зона (2 отрезка по 2,5 мм)

Статистический анализ

Вначале для статистического анализа полученных данных (плотность регенерата в костных дефектах, количество сосудов в 10 случайных полях зрения, доля костного регенерата в дефектах теменных костей) были использованы описательные методы: определение среднего значения (M), медианы (Me), среднего квадратического отклонения (σ), стандартной ошибки среднего значения (m), межквартильного размаха (IQR), нижнего (LQ) и верхнего квартилей (UQ). Затем было выполнено определение соответствия распределения выявленных количественных параметров в каждой группе закону нормального распределения с помощью критерия Шапиро — Уилка для выбора критериев для дальнейшего анализа.

Учитывая непараметрическое распределение количественных признаков для одновременного сравнения более двух независимых групп был использован непараметрический критерий Краскелла — Уоллиса, а для выявления различий между двумя независимыми группами по-отдельности — U -критерий Манна — Уитни с поправкой Бонферрони. Для сравнения количественных параметров на разных сроках в пределах одной экспериментальной серии (зависимые группы) применяли критерий Вилкоксона. Во всех случаях уровень статистической значимости различий был принят за $p < 0,05$.

Результаты

В ходе исследования ни одно из лабораторных животных не погибло до срока выведения. В процессе ежедневного динамического наблюдения не было выявлено ни одного случая значимого изменения поведенческих реакций и аппетита. Послеоперационные раны у всех животных зажили первичным натяжением. Ни в одном случае не было зафиксировано каких-либо побочных явлений общего или местного характера. Снятие швов было запланировано на 10–14 сут., однако во всех случаях к данному сроку швы удалялись самопроизвольно.

Активность ангиогенеза

С использованием иммуногистохимической реакции с антителами к α -SMA и последующей гистоморфометрией было выявлено, что в случае обоих вариантов ген-активированных материалов наибольшее количество сосудов определялось на ранних сроках наблюдения — 30 сут., а различия с контролем были статистически значимы (рис. 2).

Затем в экспериментальных группах количество сосудов снижалось, а в контроле увеличивалось, в связи с чем показатели выравнивались на среднем сроке наблюдения (в случае ОКФ/pl-VEGFA количество было меньшим, чем в контроле), а через 90 сут. после операции количество сосудов в случае ОКФ без плазмидной ДНК было статистически значимо выше, чем при имплантации ген-активированных материалов. При этом статистически значимых различий между ОКФ/pl-VEGFA и ОКФ/pl-VEGFA-SDF выявлено не было (рис. 2).

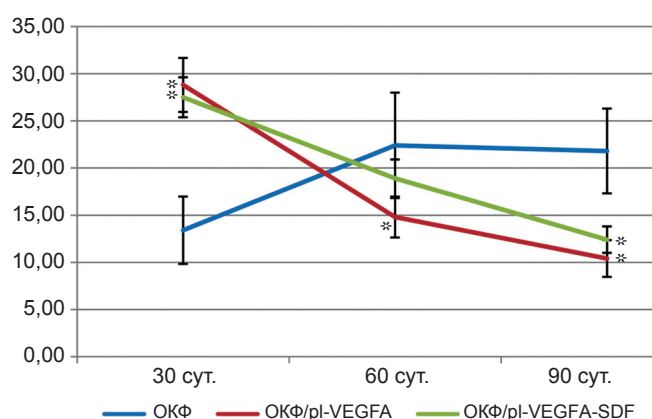


Рис. 2. Динамика изменения среднего количества сосудов в стандартизированном поле зрения.
* — различия при сравнении с матриксом-носителем без генных конструкций статистически значимы, $p < 0,05$

Активность остеогенеза

Рентгенологический анализ. Толщина теменных костей кроликов оказалась равной $1,2 \pm 0,2$ мм. В этой связи при определении средней плотности тканей с использованием инструмента ROI толщина среза в аксиальной плоскости задавалась в 1,2 мм. При качественном анализе данных конусно-лучевой КТ было выявлено, что через 30 сут. во всех группах границы костных дефектов четко прослеживались на всем протяжении, зоны дефектов были заполнены гетероморфными тканями с многочисленными рентгенконтрастными гранулами материалов, а в последующие сроки — границы дефектов становились менее четкими. При сравнительной оценке средней плотности тканей не было выявлено статистически значимых различий между тремя группами на каждом из сроков наблюдения. Кроме того, как в эспе-

риментальных, так и в контрольной группах определялось снижение средней плотности регенерата в динамике (рис. 3).

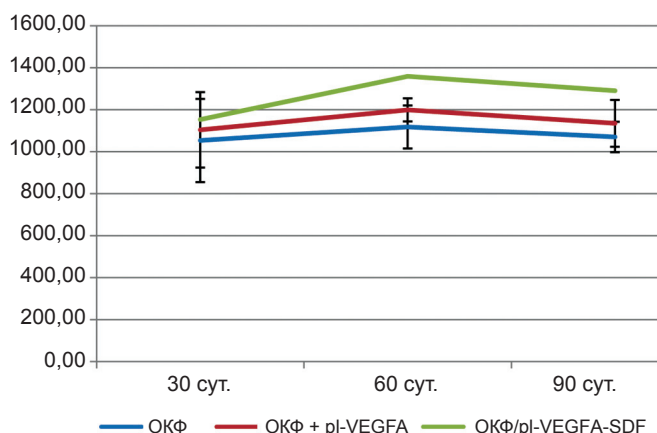


Рис. 3. Изменение средней плотности регенерата (в HU) в костных дефектах после имплантации исследуемых материалов

Гистологический анализ. Через 30 сут. во всех группах наблюдался рост ретикулофиброзной костной ткани со стороны опилов теменной кости к центру, первые признаки ремоделирования ее участков в пластинчатую костную ткань с формированием остеонов. Существенных различий при качественной оценке гистологической картины в периферических зонах костных дефектов между экспериментальными и контрольной группой выявлено не было. Гранулы материалов, расположенные периферически, непосредственно контактировали с костной тканью, исходящей из опилов теменных костей, без формирования соединительнотканной прослойки, или капсулы. Периферический костный регенерат окружал «приграничные» гранулы материалов, формируя своеобразные «мостики» от одной гранулы к другой. Центральные зоны костных дефектов во всех случаях были выполнены волокнистой соединительной тканью. Однако только в случае ОКФ/pl-VEGFA и ОКФ/pl-VEGFA-SDF центрально расположенные фрагменты материалов были окружены вновь образованной ретикулофиброзной костной тканью (рис. 4).

Во всех группах фрагменты материалов, особенно те, которые не были окружены костным регенератом, подвергались активной биорезорбции гигантскими многоядерными клетками инородных тел (рис. 5).

На сроке 60 сут. разница между экспериментальными и контрольной группами стала наиболее значительной за счет интенсивного формирования костной ткани в центральной зоне дефекта под действием ген-активированных остеопластических материалов. В периферической зоне во всех группах происходило ремоделирование вновь образованной ретикулофиброзной костной ткани в пластинчатую. В случае ген-активированных материалов особенностью стало также наличие красного костного мозга между трабекулами регенерата, происходящего из опилов теменных костей. В ряде полей зрения «ниши» костного мозга были ограничены гранулами ген-активированного материала, непосредственно контактирующими с клетками стромы. В контрольной группе такого явления не наблюдалось.

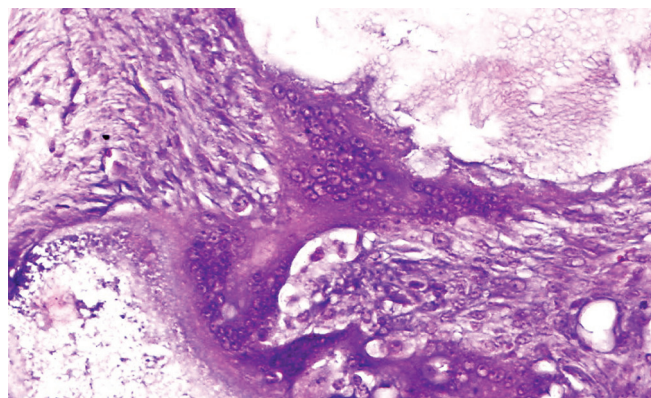


Рис. 5. Гигантские многоядерные клетки инородных тел, осуществляющие биорезорбцию гранул ген-активированного материала «ОКФ + pl-VEGFA». Окраска: гематоксили и эозин. Ув.×400

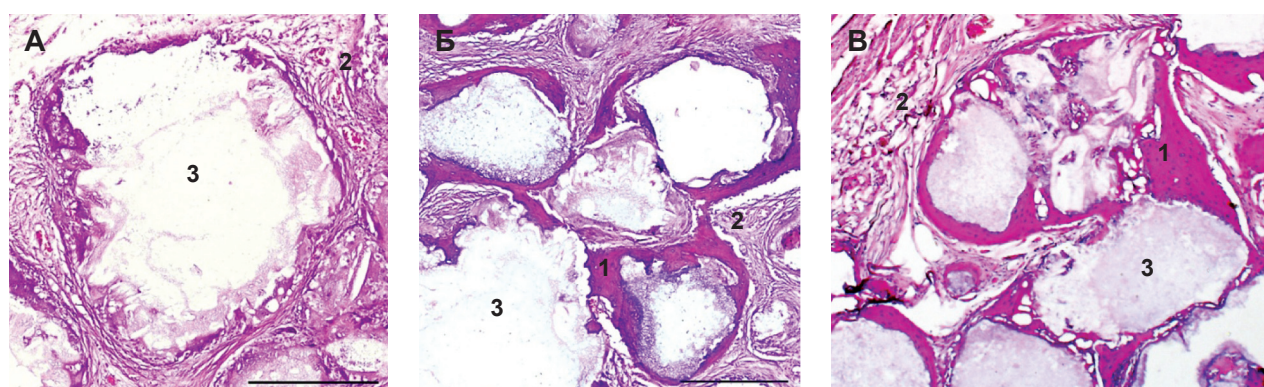


Рис. 4. Центральные зоны костных дефектов, 30 сут. после имплантации материалов: А — матрикса-носителя ОКФ; Б — ОКФ/pl-VEGFA; В — ОКФ/pl-VEGFA-SDF; 1 — вновь образованная ретикулофиброзная костная ткань; 2 — реактивно измененная волокнистая соединительная ткань; 3 — фрагменты имплантированных материалов. Окраска: гематоксилин и эозин. Масштабный отрезок — 250 мкм

Через 90 сут. после имплантации ген-активированных остеопластических материалов участки вновь образованной ретикулофиброзной и пластинчатой костной ткани определялись на всем протяжении ранее выполненного костного дефекта — наблюдалось практически полное восстановление целостности теменной кости. Трабекулы костного регенерата с инкрустированными в них фрагментами материалов формировали единую, связанную структуру. В связи с активным формированием костного регенерата гранулы ген-активированных остеопластических материалов приобретали изрезанные, фестончатые контуры. Участки вновь образованной костной ткани в непосредственном контакте с гранулами материала характеризовались пластинчатым строением, с наличием интратрабекулярных остеонов, тогда как более удаленные от гранул участки костного регенерата сохраняли признаки ретикулофиброзной костной ткани. Остеокласты и гигантские многоядерные клетки инородных тел, резорбирующие фрагменты материала, выявлялись в меньшем количестве, чем на предыдущих сроках наблюдения. В контрольной группе, участки вновь образованной костной ткани также определялись на всем протяжении дефекта.

Ни на одном из сроков наблюдения существенных различий при качественной оценке данных гистологического исследования между материалами ОКФ/*pl-VEGFA* и ОКФ/*pl-VEGFA-SDF* выявлено не было.

Гистоморфометрический анализ. На раннем сроке наблюдения в экспериментальных группах объем костного регенерата как в периферической, так и в центральной зонах был статистически значимо большим, чем в случае ОКФ без плазмидной ДНК. При этом показатель в случае ОКФ/*pl-VEGFA-SDF* был также статистически значимо выше, чем в группе ОКФ/*pl-VEGFA* (рис. 6).

Через 60 сут. после операции показатели в периферической зоне во всех группах выравнивались, тогда как разница в объеме костного регенерата в центральной зоне между экспериментальными и контрольной группами становилась наиболее значительной. При сравнении ген-активированных материалов наблюдалась противоположная выявленной на предыдущем сроке наблюдения разница:

показатель в группе ОКФ/*pl-VEGFA* был статистически значимо выше, чем в случае ОКФ/*pl-VEGFA-SDF* (рис. 6).

На крайнем сроке наблюдения различия между ОКФ, ОКФ/*pl-VEGFA* и ОКФ/*pl-VEGFA-SDF* не были статистически значимы, хотя в абсолютных значениях показатель был наибольшим в случаях ген-активированных материалов, особенно ОКФ/*pl-VEGFA-SDF* (рис. 6).

Обсуждение

Специфическое действие ген-активированных материалов обусловлено терапевтическим белком, продукция которого увеличивается за счет генной конструкции, входящей в их состав [1, 2, 13, 14]. В этой связи, выбор трансгена является определяющим в разработке этой группы изделий. Согласно проведенному анализу материалов опубликованных научных исследований, большинство разработчиков используют генные конструкции, кодирующие «прямые» остеиндуцирующие факторы [13, 14], главной точкой приложения регуляторных влияний которых являются уже имеющиеся в зоне костного дефекта клеточные элементы остеобластического дифферона. На наш взгляд, ген-активированные остеопластические материалы с таким механизмом воздействия на репаративную регенерацию костной ткани не могут быть эффективны в случаях протяженных (объемных) костных дефектов, остеогенная недостаточность которых обусловлена утраченным пулом камбиальных клеток. Более широким спектром эффективности могут обладать изделия, усиливающие ранние стадии репаративного остеогенеза, вспомогательные процессы, обеспечивающие его реализацию — ангиогенез и миграция камбиальных клеток в зону дефекта.

Вновь образующаяся сосудистая сеть не только увеличивает обеспечение метаболически активного регенерата кислородом, необходимым в том числе для остеогенной дифференцировки костных клеток-предшественниц, но и доставляет в область репаративного остеогенеза малодифференцированные остеогенные клетки-предшественницы, мигрирующие как из состава сформированного

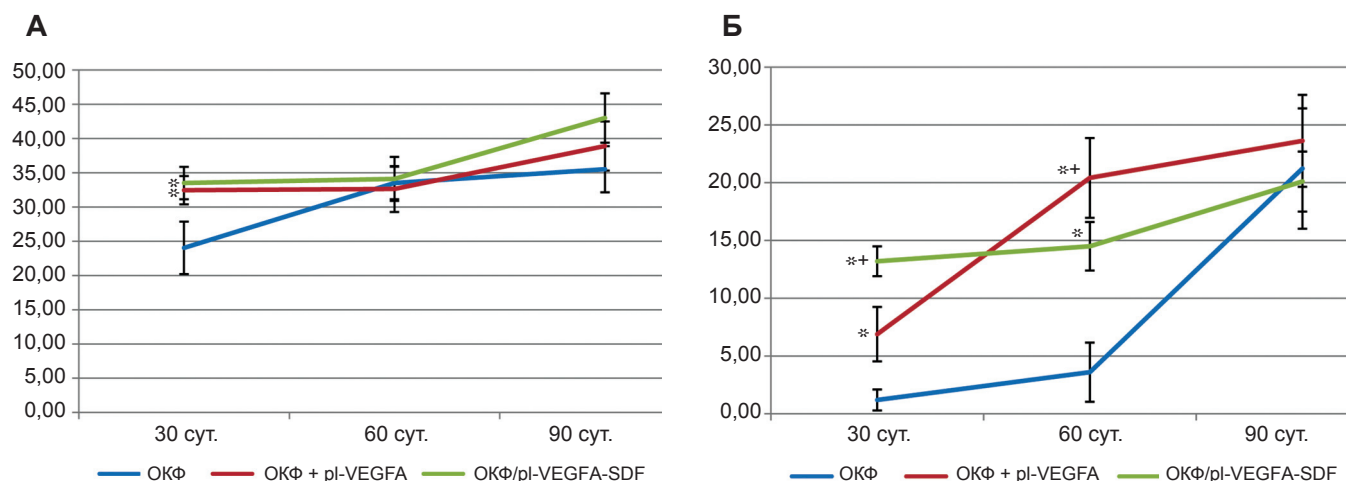


Рис. 6. Динамика доли костного регенерата в общей площади периферической (А) и центральной (Б) зон костного дефекта.

* — различия при сравнении с матриксом-носителем без генных конструкций статистически значимы, $p < 0,05$;

+ — различия при сравнении с ОКФ/*pl-VEGFA* и ОКФ/*pl-VEGFA-SDF* статистически значимы, $p < 0,05$

периваскулярного микроокружения [15], так и с кровотоком из системных источников (костный мозг) [16]. Оба механизма, взятые вместе, определяют индуцирующее влияние ангиогенеза на репаративную регенерацию костной ткани.

В этой связи, добавление в структуру плазмидной ДНК гена *SDF* было нацелено на увеличение активности эффекта, связанного с привлечением в зону костного дефекта камбиальных клеток.

Оба варианта плазмидной ДНК в составе ген-активированных материалов приводили, в целом, к сопоставимому повышению мРНК гена *VEGFA* и белка VEGF-A165 *in vitro* [7]. В этой связи, наличие ангиогенного эффекта и сходная динамика изменения количества сосудов в экспериментальных группах *in vivo* без существенных различий между ОКФ/*pl-VEGFA* и ОКФ/*pl-VEGFA-SDF* подтвердили полученные ранее данные и стали логичным дополнением последовательности ожидаемого биологического действия.

Усиленный ген-активированными материалами ангиогенез за счет вышеуказанных механизмов обеспечивал остеоиндукцию, проявившуюся в формировании костного регенерата уже на сроке 30 сут. в центральной зоне костного дефекта. Такое действие ген-активированных материалов, доставляющих ген *VEGFA*, было показано и ранее [3, 4]. Характерным для ген-активированных материалов взаимоотношением индуцированных ангио- и остеогенеза стала обратно пропорциональная зависимость, в соответствии с которой в ранние сроки восстановительного процесса количество вновь образованных сосудов было наибольшим при наименьшем объеме костного регенерата, а в поздние сроки, наоборот, уровень сосудов был наименьшим при большем объеме вновь образованной костной ткани. При этом ОКФ без плазмидной ДНК характеризовался иным влиянием на указанные процессы: постепенное увеличение числа сосудов сопровождалось замедлением репаративного остеогенеза.

Важно, что при сравнении влияния разработанных ген-активированных материалов на репаративный остеогенез были выявлены некоторые различия, вероятно, обусловленные особенностями биологического действия. Так, объем вновь образованной костной ткани в центральной зоне дефекта на сроке в 30 сут. в случае ОКФ/*pl-VEGFA-SDF* был статистически значимо выше, чем в группе с ОКФ/*pl-VEGFA*, тогда как через 60 сут. после операции, наоборот, показатель ген-активированного материала ОКФ/*pl-VEGFA* достоверно превышал значение в группе ОКФ/*pl-VEGFA-SDF*. Чтобы понять причины выявленных различий необходимо более глубоко проанализировать биологические эффекты VEGF и SDF-1 α .

Помимо опосредованного через ангиогенез влияния, VEGF оказывает и прямое стимулирующее действие на клетки остеобластического дифферона, которые не только продуцируют VEGF [17], но и экспрессируют его рецепторы 1 и 2 типов как в эмбриогенезе [18], так и в постнатальном периоде развития [19]. Показано, что под воздействием VEGF пролиферация камбиальных клеток костной ткани значительно увеличивается (до 70%), а также активируется миграция остеогенных клеток по градиенту концентрации VEGF [20, 21]. Помимо канонического, или рецепторного, механизма действия VEGF на малодифференцированные клетки остеобластического дифферона, опубликованы данные о «интракринном» механизме, посредством которого прогенитор-

ные клетки, коммитированные в остеобластическом направлении, синтезируют VEGF не только «на экспорт», но и для обеспечения собственной дифференцировки в остеобластическом направлении [22, 23].

В то же время, SDF-1 α реализует свое стимулирующее действие на миграцию камбиальных клеток в том числе через активацию транскрипционного фактора NF- κ B и характеризующегося, в свою очередь, широким спектром действия за счет повышения экспрессии любого из более чем 200 целевых генов, кодирующих белки, вовлеченные в регуляцию пролиферации, дифференцировки и миграции клеток [24, 25]. При этом NF- κ B, в целом, ингибирует остеогенез через подавление дифференцировки камбиальных клеток остеобластической линии. В этой связи, SDF-1 способен оказывать двойное действие: с одной стороны, индуцировать хоуминг малодифференцированных клеток, в том числе ММСК, к целевой зоне [26], а с другой — ингибировать их дифференцировку в остеобластическом направлении.

Таким образом, выявленная на сроке 30 сут. разница между экспериментальными группами в объеме костного регенерата в центральной зоне дефекта может быть обусловлена более интенсивным привлечением в целевую область малодифференцированных клеток-предшественниц — потенциальных акцепторов регуляторных влияний повышенного парциального давления кислорода и белка VEGF-A165. Однако пролонгация эффекта SDF-1 α могла стать причиной снижения активности дифференцировки камбиальных клеток в остеобластическом направлении, что привело к формированию костного регенерата меньшего объема в случае ОКФ/*pl-VEGFA-SDF* по сравнению с ОКФ/*pl-VEGFA*, лишенного такого эффекта со стороны SDF-1 α .

Представленная теория о причинах выявленных различий во влиянии разработанных ген-активированных материалов на репаративный остеогенез в первые 2 мес. после имплантации требует дальнейших исследований. В случае подтверждения обоснованным являлось бы использование нескольких фракций генных конструкций, несущих гены *VEGFA* и *SDF*, с разными сроками высвобождения из состава ген-активированного материала: *pl-VEGFA-SDF* (или *pl-VEGFA* + *pl-SDF*) до срока в 1 мес., а *pl-VEGFA* без *pl-SDF* в последующие сроки после имплантации.

Заключение

Разработанные ген-активированные материалы на основе ОКФ и плазмидных ДНК, кодирующих только VEGF-A165 или одновременно VEGF-A165 и SDF-1 α , обладают выраженным остеоиндуктивным действием. В обоих случаях оптимизация репаративного остеогенеза опосредована, главным образом, ангиогенным эффектом биологически активных нуклеиновых кислот, входящих в состав ОКФ/*pl-VEGFA* и ОКФ/*pl-VEGFA-SDF*, однако VEGF-A165 и SDF-1 α в зоне костного дефекта способны оказать синергичный эффект только в ранние сроки реализации восстановительного процесса (до 1 мес.), тогда как в последующем SDF-1 α , вероятно, снижает интенсивность регенерации костной ткани.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 15-13-00108.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Deev R.V., Drobyshev A.Y., Bozo I.Y. et al. Ordinary and activated bone grafts: applied classification and the main features. *Biomed Res Int.* 2015; 2015: 365050.
2. Evans C.H. Gene delivery to bone. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2012; 64(12): 1331-40.
3. Keeney M., van den Beucken J.J., van der Kraan P.M. et al. The ability of a collagen/calcium phosphate scaffold to act as its own vector for gene delivery and to promote bone formation via transfection with VEGF(165). *Biomaterials* 2010; 31(10): 2893-902.
4. Деев Р.В., Дробышев А.Ю., Бозо И.Я. и др. Создание и оценка биологического действия ген-активированного остеопластического материала, несущего ген VEGF человека. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2013; VIII (3): 78-85.
5. Deev R.V., Bozo I.Y., Mzhavanadze N.D. et al. pCMV-veg165 intramuscular gene transfer is an effective method of treatment for patients with chronic lower limb ischemia. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 2015; 20(5): 473-82.
6. Deev R., Plaksa I., Bozo I. et al. Results of an international postmarketing surveillance study of pl-VEGF165 safety and efficacy in 210 patients with peripheral arterial disease. *Am. J. Cardiovasc. Drugs* 2017; 17(3): 235-242.
7. Бозо И.Я., Юрьева К., Дробышев А.Ю. и др. Сравнительная оценка биологической активности ген-активированных остеопластических материалов из октакальциевого фосфата и плазмидных ДНК, несущих гены VEGF и SDF: часть 1 – in vitro. *Гены и Клетки* 2016; XI(4): 34-42.
8. Animal Welfare Act; 2013. <https://www.nal.usda.gov/awic/animal-welfare-act>.
9. Komlev V.S., Barinov S.M., Bozo I.I. et al. Bioceramics composed of octacalcium phosphate demonstrate enhanced biological behavior. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2014; 6(19): 16610-20.
10. Ризванов А.А., Соловьева В.В., Салафутдинов И.И. и др. Кодон-оптимизированные последовательности фармацевтическая композиция для восстановления кровеносных сосудов. Патент РФ №2557385 от 24.06.2015.
11. Исаев А.А., Киселев С.Л., Деев Р.В. и др. Биоконкомпозит для обеспечения восстановительных процессов после повреждения у млекопитающего, способ его получения (варианты) и применения. Патент РФ №2519326 от 14.04.2014.
12. Микроскопическая техника: руководство для врачей и лаборантов, Д.С. Саркисов, Ю.Л. Перов, редакторы. М.: «Медицина», 1996.
13. Feichtinger G.A., Hofmann A.T., Slezak P. et al. Sonoporation increases therapeutic efficacy of inducible and constitutive BMP2/7 in vivo gene delivery. *Hum. Gene Ther. Methods.* 2014; 25(1): 57-71.
14. Betz V.M., Betz O.B., Glatt V. et al. Healing of segmental bone defects by direct percutaneous gene delivery: effect of vector dose. *Hum. Gene Ther.* 2007; 18(10): 907-15.
15. Бозо И.Я., Деев Р.В., Пинаев Г.П. «Фибробласт» – специализированная клетка или функциональное состояние клеток мезенхимного происхождения? *Цитология* 2010; 52(2): 99-109.
16. Kuznetsov S.A., Mankani M.H., Gronthos S. et al. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol.* 2001; 153(5): 1133-40.
17. Neve A., Cantatore F.P., Corrado A. et al. In vitro and in vivo angiogenic activity of osteoarthritic and osteoporotic osteoblasts is modulated by VEGF and vitamin D3 treatment. *Regul Pept.* 2013; 184: 81-4.
18. Marini M., Sarchielli E., Toce M. et al. Expression and localization of VEGF receptors in human fetal skeletal tissues. *Histol Histopathol.* 2012; 27(12): 1579-87.
19. Tombran-Tink J., Barnstable C.J. Osteoblasts and osteoclasts express PEDF, VEGF-A isoforms, and VEGF receptors: possible mediators of angiogenesis and matrix remodeling in the bone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 316(2): 573-9.
20. D'Alimonte I., Nargi E., Mastrangelo F. et al. Vascular endothelial growth factor enhances in vitro proliferation and osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* 2011; 25(1): 57-69.
21. Yang Y.Q., Tan Y.Y., Wong R. et al. The role of vascular endothelial growth factor in ossification. *Int J Oral Sci.* 2012; 4(2): 64-8.
22. Berendsen A.D., Olsen B.R. How vascular endothelial growth factor-A (VEGF) regulates differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Histochem. Cytochem.* 2014; 62(2): 103-8.
23. Liu Y., Berendsen A.D., Jia S. et al. Intracellular VEGF regulates the balance between osteoblast and adipocyte differentiation. *J. Clin. Invest.* 2012; 122(9): 3101-3.
24. Chen X., Hu C., Wang G. et al. Nuclear factor- κ B modulates osteogenesis of periodontal ligament stem cells through competition with β -catenin signaling in inflammatory microenvironments. *Cell Death Dis.* 2013; 4: e510.
25. Niederberger E., Geisslinger G. Proteomics and NF- κ B: an update. *Expert Rev Proteomics.* 2013; 10(2): 189-204.
26. Marquez-Curtis L.A., Janowska-Wieczorek A. Enhancing the migration ability of mesenchymal stromal cells by targeting the SDF-1/CXCR4 axis. *Biomed Res Int.* 2013; 2013: 561098.

Поступила: 14.08.2017