

Бозо И. Я.^{1,2}, Дробышев А. Ю.¹, Хадисов М. Б.³,
Исаев А. А.², Деев Р. В.^{2,4}

ОСОБЕННОСТИ РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГИСТОГЕНЕЗА, ИНДУЦИРОВАННОГО ПЛАЗМИДНОЙ ДНК С ГЕНОМ СОСУДИСТОГО ЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА

¹*Кафедра челюстно-лицевой хирургии*

(заведующий — заслуженный врач РФ, проф. А. Ю. Дробышев)

*Московского государственного медико-стоматологического университета,
Москва, bozo.ilya@gmail.com*

²*Институт стволовых клеток человека (генеральный директор — А. А. Исаев), Москва;*

³*Первый московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова
(ректор — член-корр. РАМН, проф. П. В. Глыбочко), Москва;*

⁴*Кафедра гистологии с курсом эмбриологии (заведующая — проф. И. А. Одинцова)
Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург*

Генная индукция репаративной регенерации тканей является одним из перспективных подходов для оптимизации течения восстановительных процессов. Данное направление основано на применении с коррегирующей целью генов, кодирующих ключевые факторы локальной регуляции биологических процессов [3]. Доставка генов в клетки-мишени обеспечивается вирусными или невирусными векторами. Генные конструкции с терапевтическими генами поступают в клетки восстанавливающихся тканей в результате использования специальных способов введения. Они экспрессируются определенное время (в зависимости от вида вектора), в течение которого трансфицированные клетки работают как своего рода «биореакторы» терапевтического белка, продуцируя его различное время [2]. Таким образом, генный индуктор, действуя в рамках естественных гистогенетических процессов, увеличивает влияние определенных факторов, что проявляется оптимизацией репаративной регенерации тканей.

В зависимости от вида ткани генная индукция и (или) оптимизация репаративной регенерации может быть реализована в различных технологических вариантах. В частности, для восполнения костных дефектов прямой генный трансфер менее эффективен, чем введение генных конструкций в составе биорезорбируемых матриц, т. е. в виде *ген-активированного костного графта*. В этом случае носитель обеспечит остеокондукцию, а генные конструкции — остеоиндуктивное действие [4, 5]. Известно, что необходимым элементом репаративного процесса, в особенности — в костной ране, является наличие полноценно функционирующих и оксигенирующих зону регенерации кровеносных сосудов. Рабочая гипотеза состояла в том, что локальное увеличение концентрации VEGF в костном дефекте должно привести к повышению активности ангиогенеза.

Цель исследования — выявить особенности репаративного остеогистогенеза в условиях генной индукции плазмидной ДНК с геном сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF).

Материал и методы. *Ген-активированные костные графты.* В качестве носителей генных конструкций использовали различные остеопластические материалы

(композитный материал из коллагена и гидроксиапатита, депротеинизированный ксеногенный костный матрикс, октакальциевый фосфат); генная конструкция – последовательность ДНК, кодирующая VEGF165. Для подтверждения экспрессии генных конструкций *in vivo* в ряде случаев для создания ген-активированных костных графтов применяли «двухкассетную» плазмидную ДНК, дополнительно содержащую ген зеленого флуоресцентного белка (GFP) (предоставлена для работы М. А. Лагарьковой).

Эксперимент in vivo. Для оценки особенностей генной индукции репаративного остеогистогенеза с применением разработанных ген-активированных костных графтов была использована стандартизированная модель: билатеральные симметричные дефекты (диаметром 10 мм) теменных костей кроликов.

После премедикации под местным обезболиванием (Sol. Articaini – 1,7 мл) с внутримышечной седацией (Sol. Zoletili 100–0,5 мл) выполнялся разрез кожи и подлежащих мягких тканей длиной 2 см над сагитальным швом. Надкостница и кожно-мышечные лоскуты отслаивались к периферии, до височных костей. Обнажались теменные кости. Трепаном с внешним диаметром 10 мм с применением микромотора выполнялись сквозные дефекты обеих теменных костей без повреждения твердой мозговой оболочки. В дефекты правых теменных костей имплантировали ген-активированные костные графты (экспериментальные группы 1–3), в дефекты левых – соответствующие носители без плазмидной ДНК (контрольные группы 1–3) (рис. 1). Мягкие ткани ушивались послойно узловыми швами. Сшивание надкостничных лоскутов обеспечивало фиксацию имплантированных материалов в пределах костных дефектов.

Животных выводили из эксперимента через 15–120 сут после операции. Крыши черепов фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина.

Оценка результатов исследования. Фиксированные в формалине фрагменты костей подвергали компьютерной томографии (КТ). На компьютерных томограммах измеряли плотность регенерата по шкале Хаумсфилда (HU) с использованием электронного инструмента ROI (region of interest). Затем материалы отмывали от формалина и декальцинировали в растворе Biodec-R (BioOptica, Италия). После декальцинации изготавливали гистологические препараты по стандартной методике с окраской гематоксилином и эозином, а также по Массону-Голднеру, по Маллори. Для иммуногистохимического исследования использовали антитела к GFP и α -гладкомышечному актину (α -SMA), экспрессирующемуся лейомиоцитами стенок сосудов. Препараты подвергали гистоморфометрии с определением количества сосудов (артериол, артерий и вен) в регенерате и доли новообразованной костной ткани в общей площади регенерата.

Результаты и обсуждение. В ходе выполнения исследования была подтверждена экспрессия генных конструкций *in vivo*, выявлено большее количество сосудов в регенерате экспериментальных групп и, как следствие, большая плотность по HU и объем костного регенерата [1]. При этом закономерной являлась повышенная плотность регенерата в области костного дефекта на сроке в 15 сут во всех группах за счет имплантированных материалов с резким снижением плотности через 30 сут в экспериментальной и контрольной группах № 1, где в качестве

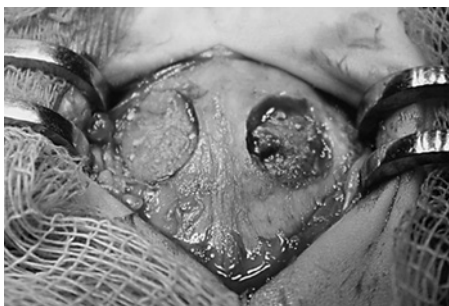


Рис. 1. Симметричные билатеральные дефекты теменных костей кролика непосредственно после имплантации остеопластических материалов

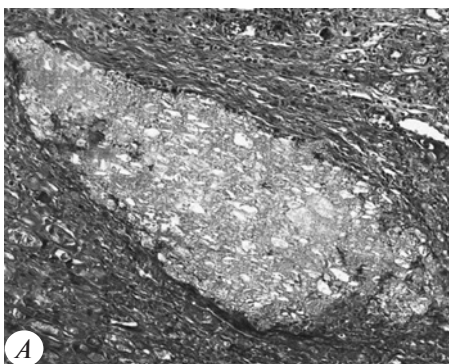


Рис. 3. Фрагменты имплантированных материалов в центральной части костных дефектов: *А* – носитель без плазмидной ДНК (контрольная группа № 1); *Б* – ген-активированный костный графт (p-VEGF, экспериментальная группа № 1). Окр.: по Массону–Голднеру. Ув. 250×

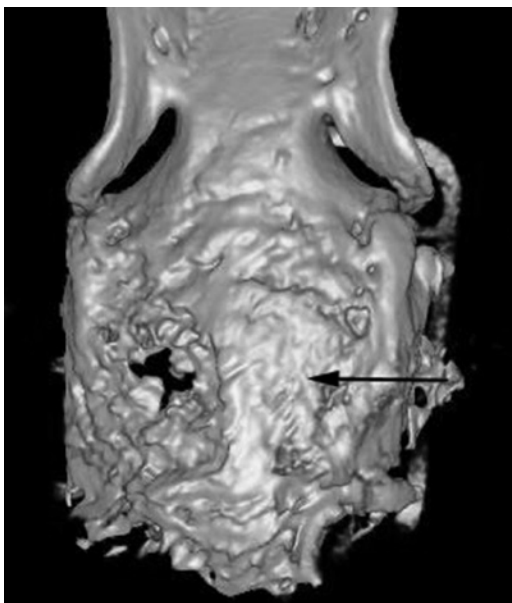


Рис. 2. Крыша черепа кролика через 120 сут после имплантации исследуемых материалов. Стрелкой обозначен дефект правой теменной кости (экспериментальная группа). Мультиспиральная компьютерная томография, трехмерная реконструкция

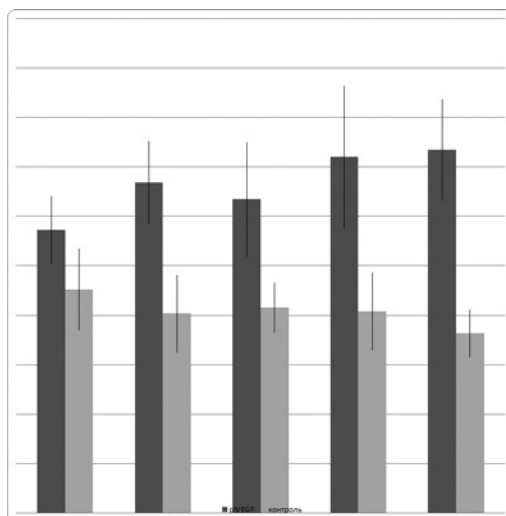


Рис. 4. Доля костного регенерата в костном дефекте (предварительные данные)

носителя использован быстро резорбирующийся композитный материал из коллагена и гидроксиапатита. Существенный прирост денситометрического показателя после 45 сут наблюдался только в группах с генной индукцией восстановительного процесса (табл.) (рис. 2).

Таблица

**МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ РЕГЕНЕРАТОВ
В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ И КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППАХ № 1
НА РАЗНЫХ СРОКАХ НАБЛЮДЕНИЯ**

Группа	Сроки наблюдения, сут					
	15	30	45	60	90	120
Денситометрия, НУ (M±σ)						
pl-VEGF	977 ± 542,3	224,5 ± 585,5	639,2 ± 617,2	706,5 ± 585,3	1189 ± 427,9	1219,4 ± 460,7
контроль	997,6 ± 482,4	153,4 ± 792,8	201,6 ± 763,4	595 ± 676,6	693,3 ± 666,1	639,1 ± 631,2
Доля костного регенерата в центральной трети дефекта, %						
pl-VEGF	0,4 ± 0,1 %	13,7 ± 3,7 %	6,3 ± 2,1 %	11,5 ± 3,4 %	15,5 ± 4,8 %	15,7 ± 3,6 %
контроль	0	0,3 ± 0,2 %	0	4,6 ± 0,9 %	1,9 ± 3,3 %	1,6 ± 1,2 %

Примечание: pl-VEGF – группа с плазмидной генной конструкцией в имплантируемом материале.

Была установлена характерная особенность репаративной регенерации костной ткани, индуцированной плазмидной ДНК с геном *vegf*. Оказалось, что уже через 15 сут после операции только в группах с генной индукцией репаративного остеогистогенеза была выявлена ретикулофиброзная костная ткань, окружающая фрагменты ген-активированных остеопластических материалов, локализирующихся в центральной части костного дефекта, выполненного реактивно измененной рыхлой соединительной тканью (РСТ) (рис. 3).

Важно, что аналогичные данные были получены и на других контрольных сроках: 30, 45, 60, 90 сут. При этом в контрольных группах центрально расположенные фрагменты имплантированных материалов (носители без плазмидной ДНК) были окружены только РСТ без признаков остеогистогенеза. Указанная особенность подтверждена количественно: с помощью гистоморфометрии регенерата с определением доли новообразованной костной ткани в периферических и центральной трети костного дефекта (см. табл.). Начиная с 60 сут во всех группах наблюдались признаки ремоделирования новообразованной ретикулофиброзной костной ткани в пластинчатую. Если в контрольных группах активность репаративного процесса, начиная со срока 60 сут, снижалась, то в экспериментальных – образование костной ткани продолжалось до крайней точки наблюдения – 120 сут (рис. 4).

В результате через 120 сут после операции в экспериментальных группах наблюдалась полная консолидация с восстановлением целостности теменных костей, тогда как в экспериментальных группах центральная часть дефекта сохранилась, была заполнена РСТ.

Заключение. Таким образом, плазмидная ДНК с геном *vegf* в составе ген-активированного костного графта обеспечила индукцию репаративного остеогенеза. По всей видимости, терапевтический белок VEGF, пролонгированно секретировавшийся трансфицированными клетками, обеспечил активизацию ангиогенеза – критически значимого остеоиндуцирующего фактора, а также мог оказать прямое влияние на клетки остеобластического дифферона [6], что в совокупности привело к выраженной индукции репаративного остеогенеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. 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. Т. 8. № 3. С. 78–85.
2. Deev R., Drobyshev A., Bozo I. et al. Angiogenic non-viral gene transfer: from ischemia treatment to bone defects repair // J. Tissue Eng. Regen. Med. 2014. Vol. 8. Suppl. 1. P. 64–65.
3. Evans C. H. Gene delivery to bone // Adv. Drug Deliv. Rev. 2012. Vol. 64. № 12. P. 1331–1340.
4. 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. Vol. 25. № 1. P. 57–71.
5. Keeney M., Beucken J. J. van den, Kraan P. M. van der 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. Vol. 31. № 10. P. 2893–2902.
6. Yang Y. Q., Tan Y. Y., Wong R. et al. The role of vascular endothelial growth factor in ossification // Int. J. Oral Sci. 2012. Vol. 4. № 2. P. 64–68.

Боков Д. А.

ИНВОЛЮЦИЯ СУМКИ ФАБРИЦИУСА КАК СТРУКТУРНЫЙ ФАКТОР МОДУЛИРОВАНИЯ ИММУНОРЕСПОНДЕНТНОГО СТАТУСА ЖЕЛЕЗЫ ГАРДЕРА ПТИЦ В ПЕРИОД ПОЛОВОЗРЕЛОСТИ

*Научно-исследовательская лаборатория «Морфогенез и регенерация клеток и тканей»
(заведующий – проф. А. А. Стадников) Оренбургской государственной медицинской
академии, Оренбург, e-mail: cells-tissue.bokov2012@yandex.ru*

Введение. Становление новых регуляторных условий В-иммунитета на различных этапах онтогенеза птиц связано с эффективным диапазоном иммунного гомеостаза, достижение которого потенцируется адаптацией системы сумка Фабрициуса – селезёнка – железа Гардера [1–3, 5–6, 8, 15].