

УДК 615.076.9

doi: 10.26907/2542-064X.2020.3.361-380

СОЗДАНИЕ ВИДОСПЕЦИФИЧНОГО ГЕННОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ДЕФЕКТОВ КОЖИ СОБАК

Е.Ю. Закирова¹, А.М. Аймалетдинов¹, Н.М. Александрова¹, И.М. Ганиев¹,
С.А. Софронова¹, А.Н. Валеева², Е.Е. Гаранина¹, А.А. Ризванов¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

²Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана,
г. Казань, 420074, Россия

Аннотация

Генная терапия является актуальной для ветеринарной медицины. Современная ветеринарная медицина нуждается в видоспецифичных лекарствах. Эти препараты помогают избежать аллергической реакции на чужеродные белки и других проблем с иммунитетом реципиента. Мы создали видоспецифичные генно-инженерные плазмидные конструкции на основе плазмидной ДНК pBUDK-clVECF164-clFGF2, кодирующие гены фактора роста эндотелия сосудов и фактора роста фибробластов собак, которые потенциально могут быть использованы при лечении собак с повреждениями кожи, мышц, связок. Исследования этой конструкции *in vitro* показали ее влияние на стимуляцию ангиогенеза в мезенхимальных стволовых клетках. *In vivo* исследования pBUDK-clVECF164-clFGF2 продемонстрировали стимуляцию регенерации кожи у крыс, собак и не влияли на общее состояние животных. Мы не наблюдали каких-либо осложнений в организме животных после введения плазмиды в кожу. Это лечение представляет собой важный шаг вперед в области ветеринарной медицины.

Ключевые слова: видоспецифичная генная терапия, фактор роста эндотелия сосудов, фактор роста фибробластов, собака, повреждения кожи

Введение

Кожа – самый крупный орган у млекопитающих: ее вес составляет порядка 10% от общей массы тела. В ветеринарной практике нередко приходится сталкиваться с проблемой замещения больших дефектов кожных покровов у собак и кошек, связанных с травмами, ожогами или инфекционными поражениями, в том числе и при удалении опухолей мягких тканей [1, 2].

Сегодня методы лечения кожных ран в медицине классифицируются как рутинные и регенеративные. Регенеративная терапия ран кожи – это новая и быстро развивающаяся область биомедицинских исследований, которая направлена на содействие заживлению ран и восстановление поврежденных клеток и пораженных тканей кожи без образования рубцов или на значительное уменьшение их площади. Регенеративная терапия предполагает использование различных технологических подходов, таких как применение белковых факторов роста, генная терапия, лечение стволовыми клетками, тканевая инженерия и перепрограммирование клеток [3]. Среди многих факторов роста, которые способствуют процессу

заживления, наиболее важными положительными регуляторами ангиогенеза являются фактор роста эндотелия сосудов (VEGF-A) и FGF-2 (или bFGF) [4]. Основной проблемой регенеративной терапии тканей является эффективная доставка биологически активных веществ в место повреждения. В настоящее время генная терапия является привлекательным подходом для стимулирования биосинтеза *in situ* факторов роста, модулирующих естественное заживление и избегающих иммуногенности. Она дает возможность улучшить регенерацию и восстановление поврежденной ткани на молекулярном уровне [5, 6].

В ветеринарии эти методы терапии находятся в зачаточном состоянии, и требуется проведение исследований для их оптимизации и клинического применения. Цель настоящего исследования – оценить терапевтическую эффективность и безопасность генной терапии плазмидной ДНК, содержащей видоспецифичные кодирующие последовательности белков VEGF164 и FGF2, при лечении дефектов кожи у собак. Видоспецифичность для собаки генно-инженерных конструкции позволит минимизировать нежелательные иммунологические реакции, которые могут быть связаны с различием в строении белков животных и человека.

1. Материалы и методы

1.1. Создание видоспецифичной плазмидной конструкции. Для создания конструкции использовали экспрессионный вектор pBudCE4.1 (Invitrogen, США). Кодонную оптимизацию состава генов *veg164* и *fgf2* проводили с использованием алгоритма OptimumGene. В качестве матрицы для кодонной оптимизации брали нуклеотидные последовательности мРНК генов *veg164* (GenBank: NM_001110502) и *fgf2* (Genbank: XM_003432481.3) собаки. Синтез *de novo* нуклеотидной последовательности кодон оптимизированных последовательностей кДНК *veg164* и *fgf2* и клонирование кДНК в плазмидный вектор осуществлены компанией GenScript (США). В результате были получены плазмидные конструкции pBud-clVEGF-clFGF2 (от лат. *Canis lupus*, сокр. Cl, собака). Генетические конструкции pBud-VEGF-FGF2 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. Основные элементы конструкции отражены в табл. 1.

Табл. 1

Основные элементы плазмидной конструкции pBUDK-clVEGF164-clFGF2

№	Основные элементы конструкции	Пар нуклеотидов
1	Промотор CMV	11–627
2	Последовательности Козак	695–698 и 4439–4442
3	Сайты Gateway attBI и attBII	670–694 и 1888–1911
4	Ген <i>fgf2</i>	699–1887
5	Ген устойчивости к канамицину	2189–3231
6	Промотор EF1- α	3247–4414
7	Сайты рестрикции HindIII и XbaI	4433–4438 и 5016–5021
8	Ген <i>veg164</i>	4443–5015

Структуру pBUDK-clVEGF164-clFGF2 оценивали с помощью рестрикционного анализа методом SacI-EcoRI и электрофорезом в 0.8%-ном агарозном геле.

1.2. Подтверждение строения плазмидной конструкции pBUDK-clVEGF164-clFGF2. Структуру pBUDK-clVEGF164-clFGF2 оценивали с помощью рестрикционного анализа методом SacI-EcoRI и электрофорезом в 0.8%-ном агарозном геле. Секвенирование рекомбинантной плазмиды, определение стерильности и наличия токсинов было проведено компанией GenScript, США.

1.3. Функциональная активность плазмидной конструкции pBUDK-clVEGF164-clFGF2. Функциональную активность генетической конструкции pBUDK-clVEGF164-clFGF2 подтверждали анализом экспрессии трансгенов *vegfl64* и *fgf2 in vitro* после трансфекции мезенхимальных стволовых клеток собаки (МСК). МСК собаки выделяли по описанной ранее методике [7]. Трансфекцию МСК проводили с помощью трансфецирующего реагента TurboFect™ Transfection Reagent (Thermo Scientific™, США) согласно инструкции производителя. Анализ экспрессии проводили с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Результат оценивали через 24 и 48 ч. ПЦР-РВ проводили на амплификаторе C1000 с оптическим блоком CFX96 (BioRad). Дизайн праймеров был осуществлен с использованием программного пакета Clon Manager 9.0 (США), и проверен на гомологию с помощью анализа последовательностей Blast (Национальный центр биотехнологической информации). Нами были использованы следующие последовательности праймеров и зондов:

canV164-TM-F: 5'-CTCTACCTCCACCATGCCAA-3';

canV164-TM-R: 5'-TCTCAATGGGACGGCAGTAG-3';

canV164-TM-pr: (5'-FAM) –CCCAGGCTGCGCCTATGGCA-(BHQ-1).

canFGF-2-TM-F: 5'-ACCGGTCAAGGAAATACTCCA-3';

canFGF-2-TM-R: 5'-TTTCTGCCCAGGTCCTGTTT-3';

canFGF-2-TM-pr: (5'-FAM)-TGCCCAGTTCGTTTCAGTGCCACA-(BHQ-2).

Для оценки общей специфичности реакции параллельно использовался отрицательный контроль без матрицы и положительный контроль (интактные МСК). Все реакции были проведены в трех повторностях. Уровень экспрессии гена определяли с помощью $2^{-\Delta\Delta Ct}$ метода [8]. Полученные данные представлены как RQ (relative quantity).

1.4. Биологическая активность плазмидной конструкции pBUDK-clVEGF164-clFGF2 in vitro. Формирование трансфицированными МСК собаки капиллярноподобных структур на матриксе Matrigel™ и их оценивание проводили по методике, описанной ранее [9].

1.5. Биологическая активность плазмидной конструкции pBUDK-clVEGF164-clFGF2 in vivo. Эффективность генетической конструкции проверяли на белых крысах линии Wistar. Для исследования животные были разделены на две группы (опытная и контрольная) по 10 голов в каждой. Моделирование повреждения кожи крысам проводили под ингаляционным изофлурановым наркозом (Лабораторное Каризоо, С.А., Испания). В межлопаточной области спины выбривали шерсть, кожу обеззараживали 70%-ным спиртом и вырезали квадратный лоскут площадью 4 см². Контрольным животным по периметру полученной раны подкожно вводили 300 мкл 0.9%-ного NaCl, опытным животным вводили плазмиду pBUDK-clVEGF164-clFGF2 в концентрации 1 мг/мл 0.9%-ного

NaCl в том же объеме. Для определения эффективности терапии проводили измерение площади поврежденного участка через 7, 14, 21, 28 дней после введения препарата. Планиметрические исследования проводились при помощи программы ImageJ. В начале эксперимента и на 3-е, 7-е, 14-е, 21-е сутки после введения проводили забор крови из хвостовой вены.

Для определения возможного влияния локального введения плазмидного препарата на общее состояние животных изучали гематологические показатели цельной крови. Анализ проводили при помощи гематологического анализатора Abacus Junior 5. Для оценки функционального состояния иммунной системы и регуляции защитных реакций организма в сыворотке крови исследовали цитокиновый профиль. Оценку проводили по технологии xMapLuminex. Анализ проводили с использованием набора MILLIPLEX MAP Rat Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (Merck Millipore, Германия) согласно протоколу производителя. Собранные данные обрабатывали с использованием контрольного программного обеспечения BioPlex Manager v.6.1 и аналитического программного обеспечения MasterPlex QT (MiraiBio, США).

На 21-е, 28-е сутки у части крыс ($n = 5$) из каждой группы проводили забор кожи на гистологическое исследование. С целью проведения гистологических и морфометрических исследований тканей вырезали фрагмент пораженной кожи как по центру, так и по периферии на расстоянии 0.5 см, размером 2×2 см толщиной 5 мм вместе с подкожной жировой клетчаткой. Для фиксации тканей кожи использовали 10%-ный забуференный формалин. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм получали с помощью микротомы LeicaCM 1900 UV (Leica Microsystems GmbH, Германия). Окрашивание срезов производили гематоксилином и эозином, цифровые гистотопограммы получали при помощи сканера гистологических препаратов Aperio CS2 (Leica, Германия) и исследовались при помощи программы Image Scope (Leica, Германия). Иммуногистохимическое окрашивание антителами к CD34 (sc 51540, Santa Cruz Biotechnology, Inc., США) проводили в рабочем разведении 1:100. Ядра клеток докрашивались DAPI (Santa Cruz Biotechnology, Inc., США). Визуализация осуществлялась на конфокальном сканирующем микроскопе LSM 780 (Carl Zeiss, Германия).

Терапевтическую эффективность плазмиды pBUDK-clVEGF164-clFGF2 оценивали на двух собаках, имеющих раны кожного покрова различной этиологии, примерно одинаковые по площади и находящиеся в межлопаточной области. Все животные находились в условиях домашнего содержания. У хозяев было взято письменное информированное согласие на проведение экспериментальной работы. Одной собаке (№ 1) вводили плазмиду, для другой (№ 2) использовали консервативный метод лечения. Возраст собак 1.5 и 4 года, средняя живая масса – 25 ± 3 кг, некастрированные кобели.

Лечение ран собак начиналось с первичной хирургической обработки. Сначала проводили туалет раны. Шерстный покров вокруг раны выстригали, выбривали, рану санировали 3%-ным раствором пероксида водорода, а края обрабатывали 5%-ным раствором спиртового йода. Далее, скальпелем с лезвием № 24 иссекали края раны, которые имели непосредственный контакт с ранищим предметом, а раневую полость скарифицировали. Манипуляции у всех животных были проведены под потенцированным местным обезболиванием, для которого использовали

внутримышечное введение 2%-ного раствора препарата Xyla (Interchemie werken "De Adelaar" B.V, Нидерланды) в дозировке 0.15 мл/кг и инфльтрацию области раны 2%-ным раствором новокаина (Татхимфармпрепараты, Россия).

В первую фазу раневого процесса рану орошали 3%-ным H_2O_2 , размягчали и удаляли корочки засохшего экссудата, наносили мазь Левосин (АО НИЖФАРМ, Россия) в полость раны и по ее краям 2 раза в день. Лечение было одинаковым для обеих собак на протяжении первой фазы раневого процесса. Далее собаке № 1 при наступлении фазы дегидратации внутривожно ввели раствор плазмидной ДНК рBUDK-clVEGF164-clFGF2. Объем вводимого препарата составлял 1.0 мл в концентрации 1 мг/мл 0.9%-ного NaCl. Внутривожное введение препарата производилось равномерно по всему периметру раны. В дальнейшем мазь Левосин не применялась для лечения этой собаки. Во вторую и третью фазы раневого процесса у собаки № 2 продолжали применять мазь Левосин.

Общие клинические исследования включали в себя учет общего состояния животного, пульсометрию, подсчет количества дыхательных движений, термометрию, контроль аппетита и проводились ежедневно с первого дня до конца эксперимента в каждой группе. Планиметрические исследования включали в себя измерение площади раны в динамике по методике, описанной выше.

На 70-й день после полного закрытия раны у собаки № 2 была взята кожа на гистологический анализ у обеих собак. Взятие образца кожи проводили под местной анестезией. Образцы кожи окрашивали гематоксилин-эозином.

Этическое разрешение. Настоящее исследование было одобрено локальным этическим комитетом Казанского федерального университета (протокол № 3 от 5 мая 2015 г.).

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием методов первичного статистического анализа, результаты которого представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое значение по выборке, m – стандартное отклонение. Вторичная статистическая обработка данных проводилась с помощью непараметрического критерия Вилькоксона – Манна – Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости $p \leq 0.05$.

2. Результаты

2.1. Тестирование *in vitro*. Генетическая конструкция рBUDK-clVEGF164-clFGF2, несущая комбинацию генов факторов *veg164* и *fgf2*, видоспецифичных для собаки, была получена стандартными молекулярно-генетическими методами. Карта плазмиды представлена на рис. 1, а.

Электрофорез, проведенный в 0.8%-ном агарозном геле, подтверждает, что нами была получена требуемая ДНК-конструкция (рис. 1, б). На приведенной фотографии видно, что после рестрикции наибольший фрагмент идет примерно на уровне 5000 п. о., что доказывает соответствие молекулярной массе созданной генетической плазмидной ДНК-конструкции. На основании результатов электрофореза в агарозном геле видно, что полученный стерильный лекарственный препарат содержит $\geq 95\%$ пДНК в суперскрученной форме. Содержание эндотоксина составляет ≤ 0.03 EU/мг.

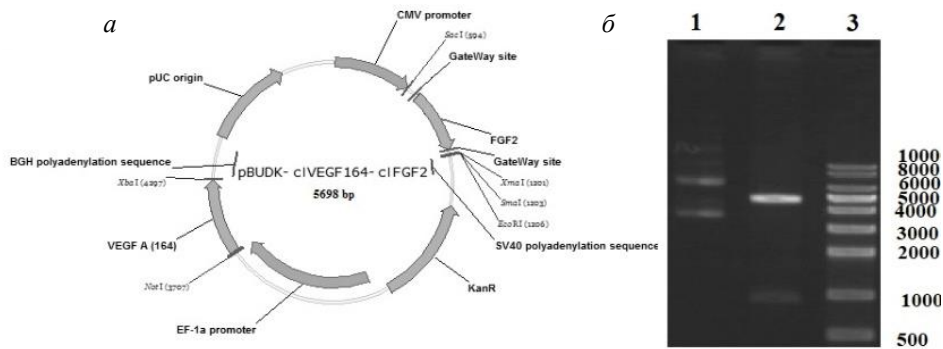


Рис. 1. а) Физическая карта плазмидной ДНК pBUDK-clVEGF164-clFGF2; б) электрофорез плазмидной ДНК в 0.8%-ном агарозном геле: 1 – препарат плазмидной ДНК pBUDK-clVEGF164-clFGF2 (верхний бэнд – кольцевая релаксированная форма, нижний бэнд – суперспирализованная форма); 2 – плазмидная ДНК после рестрикции SacI и MluI, 3 – ДНК маркер ThermoScientific (количество пар оснований цепи ДНК, соответствующее каждому бэнду маркера, указано справа от каждого бэнда)

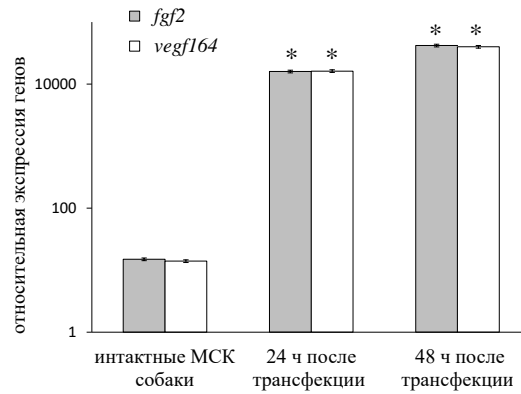


Рис. 2. Относительный уровень экспрессии *fgf2* и *vegf164* в МСК собаки после трансфекции плазмидой pBUDK-clVEGF164-clFGF2. Примечание: * $p \leq 0.005$ по сравнению с интактными МСК ($n = 3$)

2.2. Биологическая активность *in vitro*. После проведенной трансфекции плазмидной ДНК pBUDK-clVEGF164-clFGF2 МСК собаки ПЦР-РВ-анализ экспрессии генов *fgf2* и *vegf164* показал увеличение экспрессии мРНК генов *vegf164* и *fgf2* через 24 ч в 1000 раз для МСК, трансфицированных плазмидой pBUDK-clVEGF164-clFGF2, а через 48 ч – в 3000 раз по сравнению с нативными МСК (рис. 2).

За 16 ч инкубирования клеточных культур на Матригеле в отрицательном контроле образовалось 25 ± 5 узлов ветвления, в положительном контроле – 41 ± 4 узлов ветвления, а в лунках с трансфицированными МСК – 48 ± 3 , что достоверно больше значений, полученных в отрицательном контроле ($p \leq 0.05\%$).

2.3. Биологическая активность *in vivo*. Наблюдение на протяжении 28 сут показало, что внутрикожное введение крысам плазмиды pBUDK-clVEGF164-clFGF2 не оказывало негативного воздействия на их общее состояние. Животные были умеренно активны, проявляли интерес к корму и воде.

Табл. 2

Показатели общего анализа крови крыс ($M \pm m$)

Показатели		Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	Лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	Гранулоциты, %	Гемоглобин, г/л	Эритроциты, $\times 10^{12}/\text{л}$	Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$
Норма		2–19	2–14	30–65	140–180	5–10	430–1000
Исходное значение		17 ± 4	11 ± 3	32 ± 8	155 ± 11	8 ± 0.5	419 ± 79
Контрольная группа	7 сут	21 ± 4	14 ± 2	40 ± 10	166 ± 14	9 ± 0.9	506 ± 82
	14 сут	21 ± 6	17 ± 6	34 ± 8	137 ± 8	7 ± 0.6	420 ± 100
	21 сут	7 ± 2	13 ± 3	51 ± 8	$146 \pm 0,3$	8 ± 0.1	353 ± 11
Опытная группа	7 сут	6 ± 2	4 ± 1	38 ± 8	130 ± 7	6 ± 1.3	415 ± 25
	14 сут	21 ± 5	16 ± 5	34 ± 4	146 ± 13	8 ± 0.7	596 ± 57
	21 сут	9 ± 5	6 ± 2	30 ± 2	185 ± 32	10 ± 1.3	428 ± 83

У животных опытной группы отмечали уменьшение площади раны через 7 дней после введения плазмиды на 30%, что достоверно больше по сравнению с раной контрольной группы. У животных контрольной группы через 7 сут после введения физиологического раствора площадь раны уменьшилась на 10%, на 14-е сутки – на 75%, через 21 день площадь – на 90%. Полное закрытие ран произошло на 24–28-й день наблюдения. При анализе данных общего анализа крови достоверных изменений зафиксировано не было в обеих группах животных. Показатели общего анализа крови крыс приведены в табл. 2.

При исследовании цитокинового профиля выявлено увеличение содержания факталькина у опытных животных на 7-е сутки в 4.5 раза, на 14-е сутки достоверных изменений зафиксировано не было. При исследовании данного показателя в сыворотке контрольных крыс значимых изменений не выявлено. При исследовании VEGF изменения начали проявляться в обеих группах на 7-е сутки. Данный показатель в контрольной группе увеличился в 2.5 раза, в опытной – в 4.4 раза. На 14-е сутки его значение увеличилось в контрольной группе в 4.1 раза, в опытной – в 2.1 раза. При исследовании лептина было выявлено увеличение его содержания в сыворотке крови. Данный показатель увеличился на 3-и сутки в контрольной группе на 61.7%, в опытной – на 85%. На 7-е сутки в контрольной группе увеличение составило 50.5%, в опытной группе показатель увеличился в 3.24 раза. На 14-е и 21-е сутки достоверных изменений выявлено не было. Изменения содержания цитокинов в периферической крови крыс отражено в табл. 3.

Анализ данных гистологических препаратов говорит о том, что на 21-е сутки эксперимента у животных контрольной группы периферическая часть препарата была представлена нормальным эпителием (рис. 3, а). На границе между раной и кожей наблюдалось постепенное уменьшение слоев эпителия с переходом в соединительную ткань с умеренной васкуляризацией (рис. 3, б). На препарате из центральной части раны определяется соединительная ткань с умеренной васкуляризацией и тонкой краевой эпителизацией (рис. 3, в).

Табл. 3

Изменения содержания цитокинов в периферической крови крыс ($M \pm m$)

Цитокины	Фракталкин, пг	VEGF, пг	ФНО- α , пг	Лептин, пг
Исходное значение	66 \pm 6	73 \pm 6	0.2 \pm 0.0	13767 \pm 1475
Контрольная группа	3 сут	47 \pm 8	117 \pm 13	0.2 \pm 0.0
	7 сут	74 \pm 8	182 \pm 6*	0.2 \pm 0.0
	14 сут	33 \pm 8	300 \pm 43*	0.2 \pm 0.0
	21 сут	54 \pm 7	46 \pm 6	0.2 \pm 0.0
Опытная группа	3 сут	99 \pm 4	122 \pm 5	0.2 \pm 0.0
	7 сут	300 \pm 40*	323 \pm 35*	0.23 \pm 0.0
	14 сут	57 \pm 8	155 \pm 27*	0.2 \pm 0.0
	21 сут	67 \pm 6	78 \pm 4	0.2 \pm 0.0
				22258 \pm 1784*
				20713 \pm 967*
				15326 \pm 1358
				13729 \pm 895
				25472 \pm 2143*
				44660 \pm 5768*
				16741 \pm 948
				14148 \pm 1269

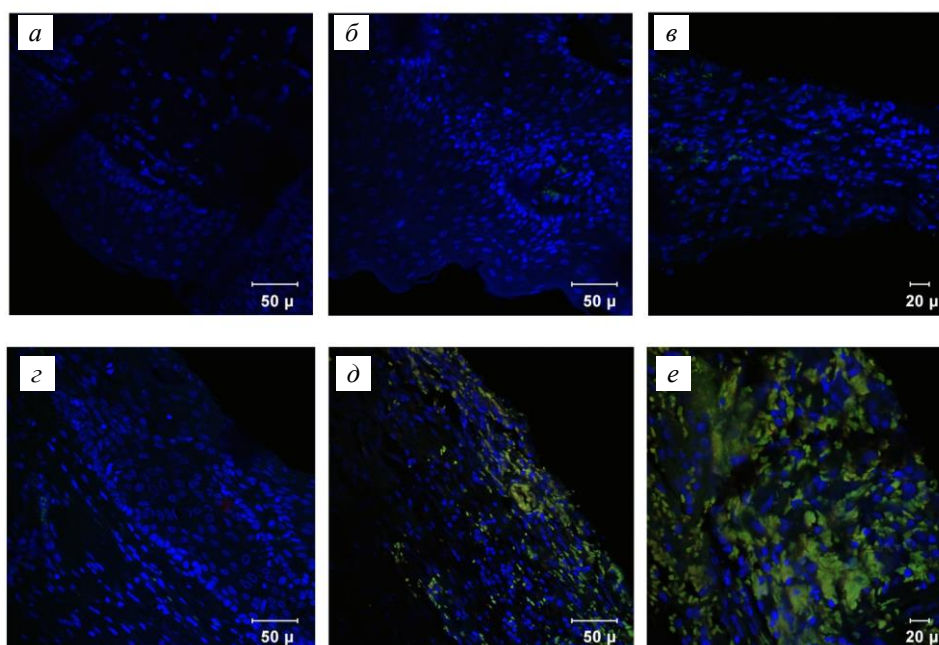
Примечание: * $p \leq 0.005$ по сравнению с исходным значением.

Рис. 3. Гистологические препараты кожи крыс из контрольной группы (а, б, в) и опытной группы (г, д, е) окрашенные на CD34 (зеленый цвет), синим цветом окрашены ядра клеток (DAPI)

В опытной группе периферическая часть препарата представлена нормальным эпителием (рис. 3, г). Граница между неповрежденной кожей и раной представлена богато васкуляризированной соединительной тканью (рис. 3, д). Центральная часть представлена богато васкуляризованными грануляциями без эпителия (рис. 3, е).

На 28-е сутки эксперимента в контрольной группе при окрашивании гематоксилином и эозином гистологических срезов кожи крыс в зоне полного заживления раны наблюдается полная эпителизация. Многослойный плоский ороговевающий эпителий расположен ровным пластом, без врастаний в подлежащую ткань. Все слои эпителия четко визуализируются. На всех препаратах выявлено

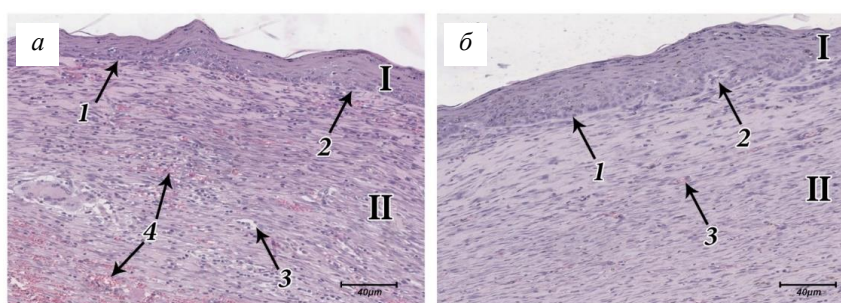


Рис. 4. Гистологические срезы кожи крысы в зоне полного заживления раны на 28-е сутки после ранения, окрашивание гематоксилином и эозином: а) контрольная группа; б) опытная группа. Примечание: I – эпидермис; II – собственно дерма; 1 – базальный слой эпидермиса; 2 – сосочковый слой дермы; 3 – сосуды микроциркуляторного русла кожи; 4 – диapedез эритроцитов

наличие трех слоев кожи: эпидермис, дерма и гиподерма. Дериватов кожи нет. Базальный слой эпидермиса прерывист и представлен не полностью сформированным рядом различных по форме клеток. Сосочковый слой дермы слабо выражен. В ретикулярном слое дермы видны рыхло расположенные утолщенные продольные коллагеновые волокна. Грануляционная ткань характеризуется хаотично расположенными коллагеновыми волокнами и сосудами. Сосуды дермы и прилегающих тканей расширены, с выраженным полнокровием. Выражен диapedез эритроцитов (рис. 4, а).

В опытной группе отмечается также полная эпителизация. Многослойный плоский ороговевающий эпителий расположен ровным пластом, без врастаний в подлежащую ткань. Все слои эпителия четко визуализировались. На всех полученных срезах выявлено наличие трех слоев кожи: эпидермис, дерма и гиподерма. Дериваты кожи отсутствуют. Базальный слой эпидермиса, в отличие от контрольной группы, представлен свойственным ему непрерывным рядом палисадообразных цилиндрических клеток с крупными овальными ядрами и имеет общую непрерывную границу с дермой. Сосуды микроциркуляторного русла единичные, имеют небольшие размеры, расположены в подсосочковой области дермы. Некоторые из них полнокровные кровеносные сосуды, а часть сосудов имеет щелевидный просвет, сдавленный рубцово-измененной дермой. Согласно этим наблюдениям, кожный покров у крыс опытной группы находится на более позднем этапе репарации по сравнению с контрольной группой (рис. 4, б).

При исследовании терапевтической эффективности генетическая конструкция *pBUDK-clVEGF164-clFGF2* при лечении кожных ран у собак на протяжении всего наблюдения негативных изменений выявлено не было. Показатели температуры тела, пульса и частоты дыхательных движений находились в пределах физиологической нормы для данного вида животных.

На 7-й день после ранения из полости ран выделялся гнойный экссудат в незначительном объеме. Края раны были отечны, гиперемированы. Раневой процесс находился в первой фазе гидратации и сопровождался биологическим очищением на фоне гнойной экссудации.

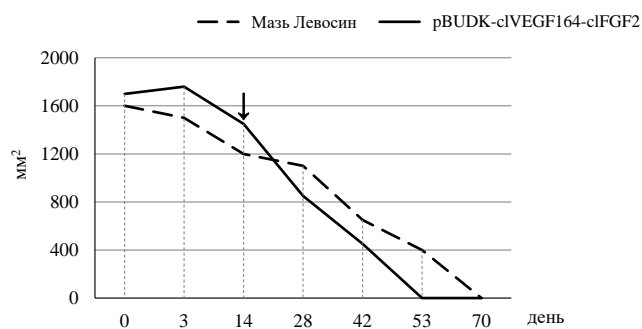


Рис. 5. Динамика изменения площади кожных ран у собак. Примечание: стрелкой указан день внутрикожного введения плазмидной ДНК pBUDK-clVEGF164-clFGF2 собаке № 1

Через 14 дней после начала консервативного лечения местная клиническая картина характеризовалась тем, что раневая полость очистилась и заполнилась мелкозернистой грануляционной тканью ярко-розового цвета. Гнойной экссудации не наблюдалось. Отмечалось уменьшение отечности и гиперемии краев раны. Раневой процесс перешел во вторую фазу дегидратации и сопровождался ростом грануляционной ткани. В этот период собаке № 1 внутрикожно ввели генный препарат.

На 21-й день у собаки № 1 наблюдали активную краевую эпителизацию. У животного № 2 краевая эпителизация была выражена в меньшей степени. Это говорит о том, раневой процесс перешел в свою заключительную фазу – рубцевания и эпителизации.

На 28-й день после ранения местный раневой процесс по-прежнему находился в заключительной фазе рубцевания и эпителизации.

У собаки № 2 покрытие раны эпителием и полное заживление ран завершилось к 70-му дню после ранения. Рубец был массивным, плотным, малоподвижным и болезненным. У собаки № 1 полное заживление завершилось к 53-му дню после ранения. Рубец был покрыт эпителием. Он был мягким и эластичным, безболезненным при пальпации, не стягивал кожу. Наблюдался рост единичных волос в области рубца. Результаты измерений в динамике области кожного дефекта отражены на рис. 5.

За весь период наблюдения у собак не происходило значительных изменений частоты сердечных сокращений, частоты дыхательных движений и температуры тела (данные не представлены).

На гистологических препаратах кожи собаки № 2 в зоне полного заживления раны наблюдается гипертрофическая рубцовая ткань и продольное расположение утолщенных коллагеновых волокон. В образце кожи собаки № 1 отмечается нормотрофическая рубцовая ткань с упорядоченным расположением пучков коллагеновых утолщенных волокон, ориентированных параллельно поверхности эпидермиса. Выражена васкуляризация дермы. Базальный слой клеток в обоих случаях лежит на непрерывной базальной мембране и состоит из клеток призматической, грушевидной или треугольной формы. Ядро круглой и овальной формы, четко разграниченное от однородной ацидофильной цитоплазмы. Сосочковый слой эпидермиса не выражен в обоих образцах, что характерно для кожи собаки [10] (рис. 6).

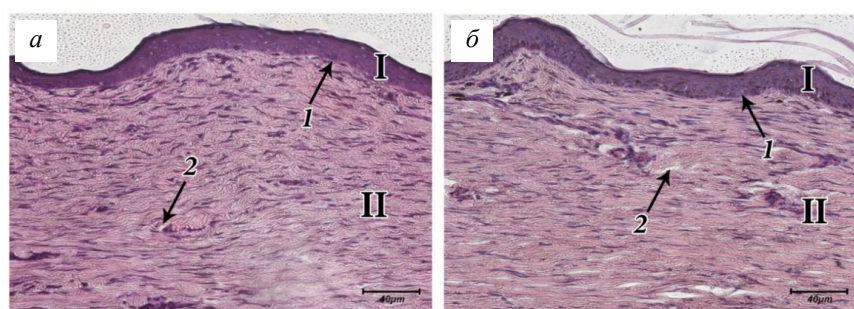


Рис. 6. Гистологические срезы кожи собак в зоне полного заживления раны на 70-е сутки после ранения, окрашивание гематоксилином и эозином: а) собака № 1, б) собака № 2. Примечание: I – эпидермис; II – собственно дерма; 1 – базальный слой эпидермиса; 2 – сосуды микроциркуляторного русла кожи

Толщина эпидермиса у собаки № 2 составила 28 мкм, у собаки № 1 – 23 мкм. По данным ряда авторов, в норме толщина эпидермиса у собак колеблется от 12 до 45 мкм [11]. Следовательно, над рубцом у обоих собак толщина эпидермиса не превышала физиологических значений.

3. Обсуждение

С помощью генно-инженерных методик молекулярного клонирования генных ДНК-конструкций в соответствии с их стандартными протоколами мы получили плазмиду pBUDK-clVEGF164-clFGF2, несущую комбинацию генов факторов *clveg164* и *clfgf2*, видоспецифичных для собаки. С помощью ПЦР-РВ была показана экспрессия генов белков VEGF164 и FGF2 с полученной генетической конструкцией. Увеличение образования капилляроподобных структур говорит о биологической активности белков, синтезирующихся в трансдуцированных pBUDK-clVEGF164-clFGF2 МСК. Созданный нами видоспецифичный генно-терапевтический препарат для стимуляции регенерации поврежденной кожи у собак на основе невирусного плазмидного вектора имеет ключевые преимущества безопасности по сравнению с вирусными векторами из-за их пониженной иммуногенности, отсутствия потенциала для передачи заболевания и низкого риска интеграции в геном хозяина [5]. Для доставки терапевтической плазмиды *in vivo* мы использовали метод гидродинамической трансфекции, который наиболее оптимален для применения в ветеринарной клинике, так как не требует дополнительных навыков от ветеринарного врача, а также закупки оборудования для его осуществления. Применение гидродинамической трансфекции, как метода доставки «голой» плазмидной ДНК в кожу млекопитающих, широко описано в литературе. Сегодня разрабатываются методические подходы, оптимизирующие применение данного метода для получения максимального количества трансфицированных клеток *in vivo* [12].

Выбор видоспецифичных генов, входящих в состав плазмидной конструкции pBUDK-clVEGF164-clFGF2, для стимуляции репаративного ангиогенеза был основан на том, что у собак идентифицированы 4 изоформы VEGF, которые включают растворимые изоформы VEGF120 и VEGF164. Однако изоформа VEGF164 является преобладающей [13], что и повлияло на включение ее в со-

став. Белок FGF2 также имеет несколько изоформ (FGF1, FGF7). Но для создания терапевтического препарата нами был взят FGF2, так как он и VEGF обладают ярко выраженным синергетическим эффектом на неоангиогенез у взрослых [14]. Известно, что VEGF действует как митоген эндотелиальных клеток, хемотаксический агент и индуктор проницаемости сосудов. Он демонстрирует уникальные эффекты на множество компонентов каскада заживления ран, включая ангиогенез и, как недавно показано, на эпителизацию и отложение коллагена в ране. Известно, что FGF2 и VEGF оказывают сильное воздействие на эндотелиальные клетки сосудов микроциркуляторного русла и в меньшей мере они влияют на эндотелий крупных сосудов (аорты) [15].

За весь период наблюдения при внутрикожном введении плазмиды pBUDK-clVEGF164-clFGF2 крысам и собаке не наблюдалось негативного воздействия на общее состояние животных. Исследуемые нами показатели периферической крови крыс достоверно не отличались в обеих группах от нормы.

Большое значение в оценке защитных реакций организма играет изучение цитокинов, так как они вовлечены фактически в каждое звено иммунитета [16]. Лептин представляет собой секретируемый адипоцитами гормон с плеiotропными эффектами в физиологии и патофизиологии энергетического гомеостаза, эндокринологии и метаболизма. Лептин является также мощным прямым ангиогенным фактором, так как способствует образованию новых кровеносных сосудов. Он стимулирует миграцию и активацию эндотелиальных клеток *in vitro* и ангиогенез *in vivo* [17]. При этом дефицит лептина у мышей ухудшает восстановление поврежденной кожи [18]. Согласно полученным нами данным (табл. 2), концентрация лептина уже на 3-е сутки увеличивается в периферической крови крыс опытной и контрольной групп. Затем постепенно снижается к исходным значениям к 21-м суткам. Однако максимальное увеличение этого цитокина в крови крыс контрольной группы наблюдается на 3-е сутки, а в опытной группе идет дальнейшее увеличение с достижением максимума на 7-е сутки.

Фракталкин – уникальный хемокин, сочетающий свойства хемоаттрактанта и молекулы адгезии [19]. В настоящее время известно, что *in vitro* он индуцирует образование капилляров при культивировании HUVEC на синтетическом матриксе. Кроме того, он является ангиогенным медиатором *in vivo* [20]. Фракталкин вызывает активацию рецептора CX3CR1, который, в свою очередь, стимулирует выработку VEGF. Таким образом, он участвует в запуске механизма ангиогенеза в поврежденной ткани [21]. Максимальное увеличение этого показателя в опытной группе происходит на 7-е сутки, затем снижается на 14-е сутки. В контрольной группе данный показатель значительно не меняется.

Среди многообразия факторов роста, участвующих в процессах васкуляризации, одними из наиболее важных являются белки из семейства факторов роста эндотелия сосудов. VEGF является ключевым ангиогенным фактором роста, активирующим эндотелиальные клетки для миграции, пролиферации и формирования капиллярных трубок [22]. Локальная микросреда, индуцируемая VEGF, представляет собой баланс ферментативных промоторов и ингибиторов, создающих условия для миграции эндотелия [23]. В нашем эксперименте произошло увеличение концентрации VEGF в сыворотке крови опытных животных на 7-й день после введения плазмидного препарата с последующим постепенным снижением

к 21-му дню до исходных значений. В контрольной группе максимальное увеличение этого показателя происходит на 14-й день с последующим снижением к 21-му дню.

Таким образом, в опытной группе максимальная выработка VEGF и как следствие, стимуляция неоангиогенеза в области раны произошла на 7 дней раньше, чем в контроле.

Фактор некроза опухоли альфа (ФНО- α) достоверно не изменялся за весь период наблюдения во всех группах. ФНО- α является провоспалительным цитокином, который практически отсутствует в крови здорового человека. Он играет важную роль в нормальных и патологических биологических процессах. Этот цитокин содержится в кератиноцитах неповрежденной кожи, клетках потовых желез и пассивно высвобождается из них сразу после повреждения кожи [24]. В нашем случае, возможно, локально, в месте раны был повышен уровень этого цитокина. Однако в периферической крови его значения оставались практически неизменными на протяжении всего периода наблюдений. Вероятно, это связано с тем, что ни в опытной, ни в контрольной группах мы не наблюдали развитие сильной воспалительной реакции или возникновения хронического процесса, в которых, по известным данным [25], одну из главных ролей играет ФНО- α .

Введение плазмидного препарата стимулирует выработку ангиопротективных цитокинов с постепенным увеличением их концентрации в периферической крови крыс. Нерезкое и быстрое изменение концентрации цитокинов в крови, вероятно, связано с тем, что самые ранние события, происходящие в организме после повреждения ткани, включают в себя образование фибринового сгустка и активацию защитных сил организма. Через 3–4 дня, когда первоначальная инфекция будет устранена, происходит переключение на восстановление тканей и одновременно с этим происходит ускорение ангиогенеза, который является необходимым ранним этапом восстановления ткани [26]. Полученные нами результаты согласуются с данными о сверхэкспрессии белка в кожной ране после инъекции «голой» ДНК, которая достигает пика трансляции через 1 неделю после введения. Далее белок в ране детектируется на протяжении 2 недель и не определяется на 8-й неделе с момента введения. Местом синтеза белка в этом случае были собственно дерма и субдермальные слои кожи [27]. При этом полученные нами данные свидетельствуют о достоверном уменьшении площади раневой поверхности – в опытной группе происходит именно на 7-е сутки после введения препарата. К этому времени площадь раны у крыс опытной сокращается на 30%, а в контроле – на 10%.

Анализ гистологических данных на 21-е сутки показал, что в опытной группе крыс интенсивнее идет процесс капиллярообразования как на дне раны, так и на периферии. При этом параллельная ориентация коллагеновых волокон в собственно дерме крыс опытной группы обеспечивает формирование полноценной соединительной ткани, очаги воспаления не выявлены, что является показателем успешного заживления ткани. Базальный слой эпидермиса хорошо выражен в опытной группе по сравнению с контрольной. Известно, что благодаря этому слою эпидермиса происходит образование новых тканей и, соответственно, рост кожи, так как за счет деления базальных клеток кожи происходит замена старых ороговевших тканей вновь образованными молодыми [28]. Сосочковый

слой дермы хорошо выражен в образцах кожи опытной группы. Благодаря этому слою значительно повышается площадь взаимодействия эпидермиса и дермы. Известно, что этот слой играет большую роль в питании эпидермиса. Питательные вещества из кровеносных сосудов сетчатого слоя дермы проходят сначала через сосочковый слой, затем через базальную мембрану и, наконец, попадают в эпидермис [29]. Следует отметить, что в гистологических препаратах контрольной группы крыс выявлено полнокровие сосудов и диapedез эритроцитов, что является одним из признаков воспаления [30]. Эти явления характерны для инфекционных или сосудистых заболеваний. Следует отметить, что при диapedезе морфологические изменения в стенках капилляров отсутствуют, а избирательная индукция сосудистой проницаемости зависит от особенностей функционирования белка VE-cadherin на эндотелии сосудов и практически не зависит от воздействия VEGF на сосудистую стенку [30].

Таким образом, внутрикожное введение плазмиды pBUDK-clVEGF164-clFGF2 крысам и собаке по краю кожных ран стимулирует образование сосудов и регенерацию поврежденной ткани, не вызывая отрицательного влияния на организм животных в целом за весь период наблюдения. Показана эффективность и безопасность разработанного нами плазмидного препарата как *in vitro*, так и *in vivo*. Однако следует учитывать, что качественный уход и иные классические методы терапии являются важнейшим аспектом заживления ран, при этом регенеративные стратегии не следует рассматривать в качестве замены обязательных традиционных этапов и методов лечения (например, санации), но рекомендуется их применять в практике как взаимодополняющие.

Благодарности. Работа выполнена за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета.

Литература

1. Hedlund C.S. Large trunk wounds // Vet. Clin. North Am.: Small Anim. Pract. – 2006. – V. 36, No 4. – P. 846–872. – doi: 10.1016/j.cvs.2006.02.003.
2. Zakirova E.Yu., Shalimov D.V., Garanina E.E., Zhuravleva M.N., Rutland C.S., Rizvanov A.A. Use of biologically active 3D matrix for extensive skin defect treatment in veterinary practice: Case report // Front. Vet. Sci. – 2019. – V. 6. – Art. 76, P. 1–6. – doi: 10.3389/fvets.2019.00076.
3. Greenwood H.L., Singer P.A., Downey G.P., Martin D.K., Thorsteinsdottir H., Daar A.S. Regenerative medicine and the developing world // PLoS Med. – 2006. – V. 3, No 9. – Art. e381, P. 1496–1500. – doi: 10.1371/journal.pmed.0030381.
4. Le T.M., Morimoto N., Mitsui T., Notodihardjo S.C., Munisso M.C., Kakudo N., Kusumoto K. The sustained release of basic fibroblast growth factor accelerates angiogenesis and the engraftment of the inactivated dermis by high hydrostatic pressure // PLoS One. – 2019. – V. 14, No 2. – Art. e0208658, P. 1–14. – doi: 10.1371/journal.pone.0208658.
5. Tidd N., Michelsen J., Hilbert B., Quinn J. Minicircle mediated gene delivery to canine and equine mesenchymal stem cells // Int. J. Mol. Sci. – 2017. – V. 18, No 4. – Art. 819, P. 1–14. – doi: 10.3390/ijms18040819.
6. Litvin Y.A., Zakirova E.Yu., Zhuravleva M.N., Rizvanov A.A. Generation of plasmid DNA expressing species-specific therapy horse VEGF164 and FGF2 factors for gene therapy // BioNanoScience. – 2016. – V. 6, No 4. – P. 550–553. – doi: 10.1007/s12668-016-0273-2.

7. Закирова Е.Ю., Журавлева М.Н., Масгутов Р.Ф., Усманов Р.А., Ризванов А.А. Выделение, анализ и применение аутогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани собаки для лечения ложного сустава большеберцовой кости // *Гены и клетки*. – 2014. – Т. 9, № 3-1. – С. 70–75.
8. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method // *Methods*. – 2001. – V. 25, No 4 – P. 402–408. – doi: 10.1006/meth.2001.1262.
9. Журавлева М.Н., Закирова Е.Ю., Масгутов Р.Ф., Валуллин В.В., Деев Р.В., Ризванов А.А. Влияние рекомбинантных плазмидных конструкций, кодирующих комбинации генов *vegf* и *bmp2* собаки и лошади, на дифференцировку мезенхимальных стромальных клеток *in vitro* // *Гены и клетки*. – 2015. – Т. 10, № 3. – С. 42–48.
10. Schwarz R., Le Roux J.M., Schaller R., Neurand K. Micromorphology of the skin (epidermis, dermis, subcutis) of the dog // *Onderstepoort J. Vet. Res.* – 1979. – V. 46, No 2. – P. 105–109.
11. Фольмерхаус Б., Фревейн Й., Амзельгрубер В. и др. *Анатомия собаки и кошки. Практика ветеринарного врача*. – М.: АКВАРИУМ, 2003. – 580 с.
12. Sendra L., Herrero M.J., Aliño S.F. Translational advances of hydrofection by hydrodynamic injection // *Genes (Basel)*. – 2018. – V. 9, No 3. – Art. 136, P. 1–33. – doi: 10.3390/genes9030136.
13. Troy G.C., Huckle W.R., Rossmesl J.H., Panciera D., Lanz O., Robertson J.L., Ward D.L. Endostatin and vascular endothelial growth factor concentrations in healthy dogs, dogs with selected neoplasia, and dogs with nonneoplastic diseases // *J. Vet. Intern. Med.* – 2006. – V. 20, No 1. – P. 144–150. – doi: 10.1892/0891-6640(2006)20[144:eavegf]2.0.co;2.
14. Kano M., Morishita Y., Iwata C., Iwasaka S., Watabe T., Ouchi Y., Miyazono K., Miyazawa K. VEGF-A and FGF-2 synergistically promote neoangiogenesis through enhancement of endogenous PDGF-B–PDGFR β signaling // *J. Cell Sci.* – 2005. – V. 118, Pt. 16. – P. 3759–3768. – doi: 10.1242/jcs.02483.
15. Cavallaro U., Tenan M., Castelli V., Perilli A., Maggiano N., Van Meir E.G., Montesano R., Soria M.R., Pepper M.S. Response of bovine endothelial cells to FGF-2 and VEGF is dependent on their site of origin: Relevance to the regulation of angiogenesis // *J. Cell Biochem.* – 2001. – V. 82, No 4. – P. 619–633. – doi: 10.1002/jcb.1190.
16. Притулина Ю.Г., Криворучко И.В., Шенцова В.В., Филь Г.В., Астапченко Д.С., Сахарова Л.А. Анализ цитокинового статуса при ряде инфекционных заболеваний // *Усп. соврем. естествознания*. – 2014. – № 2. – С. 16–20.
17. Liapakis I.E., Anagnostoulis S., Karayiannakis A.J., Korkolis D.P., Lambropoulou M., Arnaud E., Simopoulos C.E. Recombinant leptin administration improves early angiogenesis in full-thickness skin flaps: An experimental study // *In Vivo*. – 2008. – V. 22, No 2. – P. 247–252.
18. Seitz O., Schurmann C., Hermes N., Muller E., Pfeilschifter J., Frank S., Goren I. Wound healing in mice with high-fat diet- or *ob* gene-induced diabetes-obesity syndromes: A comparative study // *Exp. Diabetes Res.* – 2010. – V. 2010. – Art. 476969, P. 1–15. – doi: 10.1155/2010/476969.
19. Wojdasiewicz P., Poniatowski L.A., Kotela A., Deszczyński J., Kotela I., Szukiewicz D. The chemokine CX3CL1 (fractalkine) and its receptor CX3CR1: Occurrence and potential role in osteoarthritis // *Arch. Immunol. Ther. Exp.* – 2014. – V. 62, No 5. – P. 395–403. – doi: 10.1007/s00005-014-0275-0.
20. You J.J., Yang C.H., Huang J.S., Chen M.S., Yang C.M. Fractalkine, a CX3C chemokine, as a mediator of ocular angiogenesis // *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* – 2007. – V. 48, No 11. – P. 5290–5298. – doi: 10.1167/iovs.07-0187.

21. *Ryu J., Lee C.W., Hong K.H., Shin J.A., Lim S.H., Park C.S., Shim J., Nam K.B., Choi K.J., Kim Y.H., Han K.H.* Activation of fractalkine/CX3CR1 by vascular endothelial cells induces angiogenesis through VEGF-A/KDR and reverses hindlimb ischaemia // *Cardiovasc. Res.* – 2008. – V. 78, No 2. – P. 333–340. – doi: 10.1093/cvr/cvm067.
22. *Prager G.W., Breuss J.M., Steurer S., Mihaly J., Binder B.R.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces rapid prourokinase (pro-uPA) activation on the surface of endothelial cells // *Blood.* – 2004. – V. 103, № 3. – P. 955–962. – doi: 10.1182/blood-2003-07-2214.
23. *Bao P., Kodra A., Tomic-Canic M., Golinko M., Ehrlich H., Brem H.* The role of vascular endothelial growth factor in wound healing // *J. Surg. Res.* – 2009. – V. 153, No 2. – P. 347–358. – doi: 10.1016/j.jss.2008.04.023.
24. *Kondo T., Ishida Y.* Molecular pathology of wound healing // *Forensic Sci. Int.* – 2010. – V. 203, No 1–3. – P. 93–98. – doi: 10.1016/j.forsciint.2010.07.004.
25. *Pfeffer K.* Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2003. – V. 14, No 3–4. – P. 185–191. – doi: 10.1016/s1359-6101(03)00022-4.
26. *Sainson R.C., Johnston D.A., Chu H.C., Holderfield M.T., Nakatsu M.N., Crampton S.P., Davis J., Conn E., Hughes C.C.* TNF primes endothelial cells for angiogenic sprouting by inducing a tip cell phenotype // *Blood.* – 2008. – V. 111, No 10. – P. 4997–5007. – doi: 10.1182/blood-2007-08-108597.
27. *Meuli M., Liu Y., Liggitt D., Kashani-Sabet M., Knauer S., Meuli-Simmen C., Harrison M.R., Adzick N.S., Heath T.D., Debs R.J.* Efficient gene expression in skin wound sites following local plasmid injection // *J. Invest. Dermatol.* – 2001. – V. 116, No 1. – P. 131–135. – doi: 10.1046/j.1523-1747.2001.00139.x.
28. *Гаврилов Л.Ф., Татаринцов В.Г.* Анатомия. – М.: Медицина, 1986. – 368 с.
29. *Caggiati A., Franceschini M., Heyn R., Rosi C.* Skin erythrodiapedesis during chronic venous disorders // *J. Vasc. Surg.* – 2011. – V. 53, No 6. – P. 1649–1653. – doi: 10.1016/j.jvs.2011.01.045.
30. *Hillgruber C., Pöppelmann B., Weishaupt C., Steingraber A., Wessel F., Berdel W.E., Gessner J.E., Ho-Tin-Noé B., Vestweber D., Goerge T.* Blocking neutrophil diapedesis prevents hemorrhage during thrombocytopenia // *J. Exp. Med.* – 2015. – V. 212, No 8. – P. 1255–1266. – doi: 10.1084/jem.20142076.

Поступила в редакцию
17.04.2020

Закирова Елена Юрьевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник НИЛ OpenLab Генные и клеточные технологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: lenahamzina@yandex.ru

Аймалетдинов Александр Маазович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник НИЛ OpenLab Генные и клеточные технологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: allekss1982@mail.ru

Александрова Наталья Михайловна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник НИЛ OpenLab Генные и клеточные технологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: natalya5566@yandex.ru

Ганиев Ильнур Махмутович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник НИЛ OpenLab Генные и клеточные технологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: ilnurgm-vgora@mail.ru

Софронова Светлана Анатольевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник НИЛ OpenLab Генные и клеточные технологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: svetaaleta@mail.ru

Валева Анастасия Николаевна, кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры хирургии, акушерства и патологии мелких домашних животных

Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана
Сибирский тракт, д. 35, г. Казань, 420074, Россия
E-mail: anastasya.74@mail.ru

Гаранина Екатерина Евгеньевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник НИЛ OpenLab Генные и клеточные технологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: kathryn.cherenkova@gmail.com

Ризванов Альберт Анатольевич, доктор биологических наук, директор Научно-клинического центра прецизионной и регенеративной медицины

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: rizvanov@gmail.com

ISSN 2542-064X (Print)
ISSN 2500-218X (Online)

UCHENYE ZAPISKI KAZANSKOGO UNIVERSITETA. SERIYA ESTESTVENNYE NAUKI
(Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series)

2020, vol. 162, no. 3, pp. 361–380

doi: 10.26907/2542-064X.2020.3.361-380

Developing a Species-Specific Genetic Agent for Treatment of Skin Defects in Dogs

E.Yu. Zakirova^{a*}, *A.M. Aimaletdinov*^{a**}, *N.M. Alexandrova*^{a***}, *I.M. Ganiev*^{a****},
S.A. Sofronova^{a*****}, *A.N. Valeeva*^{b*****}, *E.E. Garanina*^{a*****}, *A.A. Rizvanov*^{a*****}

^aKazan Federal University, Kazan, 420008 Russia

^bKazan State Academy of Veterinary Medicine, Kazan, 420074 Russia

E-mail: *lenahamzina@yandex.ru, **alleks1982@mail.ru, ***natalya5566@yandex.ru,
****ilnurgm-vgora@mail.ru, *****svetaaleta@mail.ru, *****anastasya.74@mail.ru,
*****kathryn.cherenkova@gmail.com, *****rizvanov@gmail.com

Received April 17, 2020

Abstract

Gene therapy is important in veterinary medicine due to the current need for more species-specific drugs, because they have proven to prevent an allergic response to heterologous proteins and other problems with the recipient immunity. In this study, we developed species-specific genetically engineered plasmid constructs based on the pBUDK – cIVECF164 – cIFGF2 plasmid DNA, all encoding genes of the canine vascular endothelial and fibroblast growth factors, which can be used to treat skin, muscle, and ligament injuries in dogs. *In vitro* studies of these constructs demonstrated that they induce angiogenesis

in mesenchymal stem cells. *In vivo* studies of the plasmid DNA revealed stimulation of skin regeneration in rats and dogs without affecting the general state of animals. No complications were observed after the subcutaneous injection of the plasmid DNA. The results obtained offer a tremendous potential for further advance in veterinary medicine.

Keywords: species-specific gene therapy, vascular endothelial growth factor, fibroblast growth factor, dog, skin damage

Acknowledgments. The study was supported by the Kazan Federal University Strategic Academic Leadership Program.

Figure Captions

- Fig. 1. *a)* Physical map of the pBUDK-clVEGF164-clFGF2 plasmid DNA; *b)* electrophoresis of the plasmid DNA in 8% agarose gel: 1 – preparation of the pBUDK-clVEGF164-clFGF2 plasmid DNA (upper band – relaxed circle, lower band – supercoil); 2 – plasmid DNA after the SacI and MluI restriction; 3 – DNA marker (ThermoScientific Inc.) (number of base pairs in the DNA strand per band marker, on the right side of each band).
- Fig. 2. Relative level of the *fgf2* and *veg164* expression in the MSC of a dog after the transfection with the pBUDK-clVEGF164-clFGF2 plasmid DNA. Note: * $p \leq 0.005$ compared with the intact MSC ($n = 3$).
- Fig. 3. Histological slides of the rat skin from the control (*a, b, c*) and experimental (*d, e, f*) groups stained for CD34 (green), cell nuclei are blue (DAPI).
- Fig. 4. Histological slides of the rat skin in the area of complete reepithelialization on the 28th day after the skin injury, hematoxylin and eosin staining: *a)* control group; *b)* experimental group. Note: I – epidermis; II – dermis; 1 – basal epidermal layer; 2 – papillary layer; 3 – microvasculature; 4 – erythrocyte diapedesis.
- Fig. 5. Dynamics of changes in the area of skin injuries in dogs. Note: the arrow shows the day of subcutaneous injection of the pBUDK-clVEGF164-clFGF2 plasmid DNA to dog no. 1.
- Fig. 6. Histological slides of the dog skin in the area of complete reepithelialization on the 70th day after the skin injury, hematoxylin and eosin staining: *a)* dog no. 1, *b)* dog no. 2. Note: I – epidermis; II – dermis; 1 – basal epidermal layer; 2 – microvasculature.

References

- Hedlund C.S. Large trunk wounds. *Vet. Clin. North Am.: Small Anim. Pract.*, 2006, vol. 36, no. 4, pp. 846–872. doi: 10.1016/j.cvsm.2006.02.003.
- Zakirova E.Yu., Shalimov D.V., Garanina E.E., Zhuravleva M.N., Rutland C.S., Rizvanov A.A. Use of biologically active 3D matrix for extensive skin defect treatment in veterinary practice: Case report. *Front. Vet. Sci.*, 2019, vol. 6, art.76, pp. 1–6. doi: 10.3389/fvets.2019.00076.
- Greenwood H.L., Singer P.A., Downey G.P., Martin D.K., Thorsteinsdottir H., Daar A.S. Regenerative medicine and the developing world. *PLoS Med.*, 2006, vol. 3, no. 9, art. e381, pp. 1496–1500. doi: 10.1371/journal.pmed.0030381.
- Le T.M., Morimoto N., Mitsui T., Notodihardjo S.C., Munisso M.C., Kakudo N., Kusumoto K. The sustained release of basic fibroblast growth factor accelerates angiogenesis and the engraftment of the inactivated dermis by high hydrostatic pressure. *PLoS One*, 2019, vol. 14, no. 2, art. e0208658, pp. 1–14. doi: 10.1371/journal.pone.0208658.
- Tidd N., Michelsen J., Hilbert B., Quinn J. Minicircle mediated gene delivery to canine and equine mesenchymal stem cells. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, vol. 18, no. 4, art. 819, pp. 1–14. doi: 10.3390/ijms18040819.
- Litvin Y.A., Zakirova E.Yu., Zhuravleva M.N., Rizvanov A.A. Generation of plasmid DNA expressing species-specific horse VEGF164 and FGF2 factors for gene therapy. *BioNanoScience*, 2016, vol. 6, no. 4, pp. 550–553. doi: 10.1007/s12668-016-0273-2.
- Zakirova E.Yu., Zhuravleva M.N., Masgutov R.F., Usmanov R.A., Rizvanov A.A. Isolation, analysis, and application of autogenic adipose derived multipotential mesenchymal stromal cells from dog for therapy pseudoarthrosis of tibial bone. *Geny Kletki*, 2014, vol. 9, no. 3-1, pp. 70–75. (In Russian)

8. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 2001, vol. 25, no. 4, pp. 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
9. Zhuravleva M.N., Zakirova E.Yu., Masgutov R.F., Valiullin V.V., Deev R.V., Rizvanov A.A. Effect of recombinant plasmid constructs encoding combinations of dog and horse vegf and bmp2 cDNAs on mesenchymal stromal cell differentiation in vitro. *Geny Kletki*, 2015, vol. 10, no. 3, pp. 42–48. (In Russian)
10. Schwarz R., Le Roux J.M., Schaller R., Neurand K. Micromorphology of the skin (epidermis, dermis, subcutis) of the dog. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 1979, vol. 46, no. 2, pp. 105–109.
11. Vollmerhaus B., Frewein J., Amselgruber W. *Anatomiya sobaki i koshki* [Anatomy of Cats and Dogs]. Moscow, AKVARIUM BUK, 2003. 580 p. (In Russian)
12. Sendra L., Herrero M.J., Aliño S.F. Translational advances of hydrofection by hydrodynamic injection. *Genes* (Basel), 2018, vol. 9, no. 3, art. 136, pp. 1–33. doi: 10.3390/genes9030136.
13. Troy G.C., Huckle W.R., Rossmeisl J.H., Panciera D., Lanz O., Robertson J.L., Ward D.L. Endostatin and vascular endothelial growth factor concentrations in healthy dogs, dogs with selected neoplasia, and dogs with nonneoplastic diseases. *J. Vet. Intern. Med.*, 2006, vol. 20, no. 1, pp. 144–150. doi: 10.1892/0891-6640(2006)20[144:eavegf]2.0.co;2.
14. Kano M., Morishita Y., Iwata C., Iwasaka S., Watabe T., Ouchi Y., Miyazono K., Miyazawa K. VEGF-A and FGF-2 synergistically promote neoangiogenesis through enhancement of endogenous PDGF-B–PDGFR β signaling. *J. Cell Sci.*, 2005, vol. 118, pt. 16, pp. 3759–3768. doi: 10.1242/jcs.02483.
15. Cavallaro U., Tenan M., Castelli V., Perilli A., Maggiano N., Van Meir E.G., Montesano R., Soria M.R., Pepper M.S. Response of bovine endothelial cells to FGF-2 and VEGF is dependent on their site of origin: Relevance to the regulation of angiogenesis. *J. Cell Biochem.*, 2001, vol. 82, no. 4, pp. 619–633. doi: 10.1002/jcb.1190.
16. Pritulina Yu.G., Krivoruchko I.V., Shentsova V.V., Fil' G.V., Astapchenko D.S., Sakharova L.A. Analysis of cytokine status in a number of infectious diseases. *Usp. Sovrem. Estestvozn.*, 2014, no. 2, pp. 16–20. (In Russian)
17. Liapakis I.E., Anagnostoulis S., Karayiannakis A. J., Korkolis D. P., Lambropoulou M., Arnaud E., Simopoulos C.E. Recombinant leptin administration improves early angiogenesis in full-thickness skin flaps: An experimental study. *In Vivo*, 2008, vol. 22, no. 2, pp. 247–252.
18. Seitz O., Schurmann C., Hermes N., Muller E., Pfeilschifter J., Frank S., Goren I. Wound healing in mice with high-fat diet- or *ob* gene-induced diabetes-obesity syndromes: A comparative study. *Exp. Diabetes Res.*, 2010, vol. 2010, art. 476969, pp. 1–15. doi: 10.1155/2010/476969.
19. Wojdasiewicz P., Poniatowski Ł.A., Kotela A., Deszczyński J., Kotela I., Szukiewicz D. The chemokine CX3CL1 (fractalkine) and its receptor CX3CR1: Occurrence and potential role in osteoarthritis. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 2014, vol. 62, no. 5, pp. 395–403. doi: 10.1007/s00005-014-0275-0.
20. You J.J., Yang C.H., Huang J.S., Chen M.S., Yang C.M. Fractalkine, a CX3C chemokine, as a mediator of ocular angiogenesis. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.*, 2007, vol. 48, no. 11, pp. 5290–5298. doi: 10.1167/iovs.07-0187.
21. Ryu J., Lee C.W., Hong K.H., Shin J.A., Lim S.H., Park C.S., Shim J., Nam K.B., Choi K.J., Kim Y.H., Han K.H. Activation of fractalkine/CX3CR1 by vascular endothelial cells induces angiogenesis through VEGF-A/KDR and reverses hindlimb ischaemia. *Cardiovasc. Res.*, 2008, vol. 78, no. 2, pp. 333–340. doi: 10.1093/cvr/cvm067.
22. Prager G.W., Breuss J.M., Steurer S., Mihaly J., Binder B.R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces rapid prourokinase (pro-uPA) activation on the surface of endothelial cells. *Blood*, 2004, vol. 103, no. 3, pp. 955–962. doi: 10.1182/blood-2003-07-2214.
23. Bao P., Kodra A., Tomic-Canic M., Golinko M., Ehrlich H., Brem H. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *J. Surg. Res.*, 2009, vol. 153, no. 2, pp. 347–358. doi: 10.1016/j.jss.2008.04.023.
24. Kondo T., Ishida Y. Molecular pathology of wound healing. *Forensic Sci. Int.*, 2010, vol. 203, nos. 1–3, pp. 93–98. doi: 10.1016/j.forsciint.2010.07.004.
25. Pfeffer K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2003, vol. 14, nos. 3–4, pp. 185–191. doi: 10.1016/s1359-6101(03)00022-4.

26. Sainson R.C., Johnston D.A., Chu H.C., Holderfield M.T., Nakatsu M.N., Crampton S.P., Davis J., Conn E., Hughes C.C. TNF primes endothelial cells for angiogenic sprouting by inducing a tip cell phenotype. *Blood*, 2008, vol. 111, no. 10, pp. 4997–5007. doi: 10.1182/blood-2007-08-108597.
27. Meuli M., Liu Y., Liggitt D., Kashani-Sabet M., Knauer S., Meuli-Simmen C., Harrison M.R., Adzick N.S., Heath T.D., Debs R.J. Efficient gene expression in skin wound sites following local plasmid injection. *J. Invest. Derm.*, 2001, vol. 116, no. 1, pp. 131–135. doi: 10.1046/j.1523-1747.2001.00139.x.
28. Gavrilov L.F., Tatarinov V.G. *Anatomiya* [Anatomy]. Moscow, Meditsina, 1986. 368 p. (In Russian)
29. Caggiati A., Franceschini M., Heyn R., Rosi C. Skin erythrodiapedesis during chronic venous disorders. *J. Vasc. Surg.*, 2011, vol. 53, no. 6, pp. 1649–1653. doi: 10.1016/j.jvs.2011.01.045.
30. Hillgruber C., Pöppelmann B., Weishaupt C., Steingraber A., Wessel F., Berdel W.E., Gessner J., Ho-Tin-Noé B., Vestweber D., Goerge T. Blocking neutrophil diapedesis prevents hemorrhage during thrombocytopenia. *J. Exp. Med.*, 2015, vol. 212, no. 8, pp. 1255–1266. doi: 10.1084/jem.20142076.

Для цитирования: Закирова Е.Ю., Аймалетдинов А.М., Александрова Н.М., Ганиев И.М., Софронова С.А., Валеева А.Н., Гаранина Е.Е., Ризванов А.А. Создание видоспецифичного генного препарата для лечения дефектов кожи собак // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2020. – Т. 162, кн. 3. – С. 361–380. – doi: 10.26907/2542-064X.2020.3.361-380.

For citation: Zakirova E.Yu., Aimaletdinov A.M., Alexandrova N.M., Ganiev I.M., Sofronova S.A., Valeeva A.N., Garanina E.E., Rizvanov A.A. Developing a species-specific genetic agent for treatment of skin defects in dogs. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennyye Nauki*, 2020, vol. 162, no. 3, pp. 361–380. doi: 10.26907/2542-064X.2020.3.361-380. (In Russian)