

ISSN 1814-6023 (Print)  
ISSN 2524-2350 (Online)

**КЛИНИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА**  
**CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE**

УДК 576.5; 577.21  
<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-2-95-103>

Поступила в редакцию 01.03.2024  
Received 01.03.2024

**В. Г. Богдан<sup>1</sup>, А. Г. Полешко<sup>2</sup>, А. Ю. Мисюкевич<sup>2</sup>, А. А. Смирнов<sup>2</sup>,  
С. В. Суховева<sup>2</sup>, А. В. Янцевич<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Отделение медицинских наук НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

<sup>3</sup>Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

**БИОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ,  
КОДИРУЮЩЕЙ ГЕН ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ ЧЕЛОВЕКА**

**Аннотация.** Установлен высокий биологический потенциал разработанной генно-инженерной плазмидной конструкции pcDNA<sup>TM</sup>3.1(-) VEGF165. Доказана ее способность индуцировать значимое повышение экспрессии гена *VEGF165* в мезенхимальных мультипотентных стромальных клетках и эндотелиоцитах человека и увеличивать наработку клетками белка VEGF165. Выявленная временная функциональная активность генно-инженерной конструкции в клетках и отсутствие генотоксического действия минимизирует вероятность онкотрансформации.

Созданная генно-инженерная векторная конструкция pcDNA<sup>TM</sup>3.1(-) VEGF165 может быть использована для разработки модели генотерапевтического лекарственного средства, способствующего ангиогенезу *in vivo* в ишемизированных тканях.

**Ключевые слова:** генно-инженерная плазмидная конструкция, ишемия, фактор роста эндотелия сосудов, VEGF165, трансфекция, экспрессия гена

**Для цитирования:** Биологический потенциал генно-инженерной конструкции, кодирующей ген фактора роста эндотелия сосудов человека / В. Г. Богдан [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2024. – Т. 21, № 2. – С. 95–103. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-2-95-103>

**Vasilii G. Bogdan<sup>1</sup>, Anna G. Poleshko<sup>2</sup>, Ala Yu. Misiukevich<sup>2</sup>, Andrei A. Smirnov<sup>2</sup>,  
Sviatlana V. Sukhaveyeva<sup>2</sup>, Aleksey V. Yantsevich<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Department of Medical Sciences of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup>Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

<sup>3</sup>Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

**BIOLOGICAL POTENTIAL OF A GENETIC ENGINEERING CONSTRUCTION  
ENCODING THE GENE FOR THE HUMAN VASCULAR ENDOTHELIUM GROWTH FACTOR**

**Abstract.** The high biological potential of the developed genetically engineered plasmid construct pcDNATM3.1(-) VEGF165 has been established. It has been proven to induce a significant increase in the expression of the gene VEGF165 in mesenchymal multipotent stromal cells and human endothelial cells and to increase the production of the VEGF165 protein by cells. The identified temporary functional activity of the genetically engineered construct in cells and the absence of genotoxic effects minimize the likelihood of oncotransformation.

The created genetically engineered vector construct pcDNATM3.1(-) VEGF165 can be used to develop a gene therapy drug model that promotes angiogenesis *in vivo* in ischemic tissues.

**Keywords:** genetically engineered plasmid construction, ischemia, vascular endothelial growth factor, VEGF165, transfection, gene expression

**For citation:** Bogdan V. G., Poleshko A. G., Misiukevich A. Yu., Smirnov A. A., Sukhaveyeva S. V., Yantsevich A. V. Biological potential of a genetic engineering construction encoding the gene for the human vascular endothelium growth factor. *Vestsi Natsyuanal'най akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2024, vol. 21, no. 2, pp. 95–103 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-2-95-103>

**Введение.** В настоящее время наиболее перспективным методом лечения ишемии нижних конечностей атеросклеротического или диабетического генеза является терапевтический ангиогенез, основанный на введении в ткани с нарушенным кровоснабжением рекомбинантных генетических конструкций, кодирующих гены факторов роста, и/или стволовых/прогениторных клеток с их сверхэкспрессией [1–4].

Образование, стабилизация и созревание кровеносных сосудов *in vivo* обусловлены действием проангиогенных факторов – белков-медиаторов ангиогенеза (факторы роста эндотелия сосудов человека (VEGF), ангиопоэтинов (ANGPT-1,2), основного фактора роста фибробластов (FGF-2), плацентарных факторов роста (PlGF-1,2), интерлейкина-8 (IL-8), тромбоцитарных факторов роста (PDGF), трансформирующего фактора роста-бета (TGF- $\beta$ )), а также привлечением с их помощью периваскулярных и гладкомышечных клеток [5–8].

К одним из основных инструментов терапевтического ангиогенеза для формирования сосудистой сети в ишемизированной ткани можно отнести применение функционально активных в клетках человека векторных конструкций, в том числе на основе плазмидных ДНК, кодирующих один или несколько ростовых факторов. Биологические системы на основе плазмид, представляющих собой кольцевые ДНК, в качестве векторных платформ для доставки являются более привлекательной альтернативой моделям на основе рекомбинантных вирусных структур и белков/пептидов [1, 3, 9]. При использовании генотерапевтических плазмидных ДНК-препаратов в организм вводится нуклеиновая кислота, несущая в своей последовательности ген, кодирующий целевой белок, после чего трансляционный аппарат клеток с плазмидной ДНК начинает вырабатывать тот целевой белок, который и вызывает необходимый терапевтический эффект [1]. Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) играет ключевую роль в регуляции ангиогенеза [5–7]. Являясь основным митогенным и хемотаксическим стимулом для эндотелиоцитов, он увеличивает проницаемость сосудов, усиливает активность плазминогена, коллагеназ, способствует прорастанию сосудов в пораженную ишемизированную область. У человека VEGF представлен шестью изоформами. При этом короткие секретлируемые формы типа VEGF165 свободно диффундируют во внеклеточную среду и биологически более активны [10].

На сегодняшний день во всем мире генотерапевтические лекарственные средства для лечения ишемии нижних конечностей представлены единичными инновационными изделиями [2, 11, 12]. Многими научными коллективами активно ведутся разработки в направлении повышения эффективности существующих генотерапевтических ДНК-препаратов, в том числе за счет комбинации генов нескольких ростовых факторов в составе одной плазмидной конструкции, которые, как ожидается, будут обеспечивать аддитивный терапевтический эффект *in vivo* [11].

В связи с этим особую актуальность приобретает создание отечественных генно-инженерных конструкций, кодирующих гены факторов роста сосудов человека, как прототипа нового генотерапевтического лекарственного препарата для лечения ишемии.

Цель данной работы – определение на клеточном уровне *in vitro* особенностей биологического потенциала разработанного оригинального модулятора ангиогенеза генно-инженерной плазмидной векторной конструкции pcDNA<sup>TM</sup>3.1(-)VEGF165.

**Материалы и методы исследования.** *Культуры клеток.* Исследования проводили *in vitro*, используя культивированные в двух-трех пассажах мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки (МСК) и эндотелиоциты (ЭЦ) человека, так как известно, что эти клетки являются также непосредственными участниками ангиогенеза *in vivo* [5, 13, 14]. Первичные культуры клеток получены из биопсийного материала (жировая ткань для МСК, пупочная вена для ЭЦ) доноров-добровольцев по общепринятым методикам путем ферментативной обработки коллагеназой второго типа и трипсином по общепринятым методикам [15–17]. Биомассу клеток получали путем их культивирования в пассажах (при 37 °С, атмосфере 100%-ной влажности, постоянном давлении CO<sub>2</sub> 5 % в ростовых средах  $\alpha$ -MEM с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) – для МСК; MCDB 131 с добавлением 20 % ЭТС и факторов роста bFGF 2 (2 нг/мл), VEGF (10 нг/мл), эпидермального фактора роста (EGF) (10 нг/мл) – для ЭЦ) в присутствии антибиотиков пенициллина и стрептомицина. Для культивирования ЭЦ использовали покрытые 0,1%-ным желатином культуральные флаконы. Смену ростовой среды проводили каждые 3 сут.

При достижении 70–80 % конфлюентности монослоя МСК и ЭЦ переседали с плотностью 3 000 и 10 000 кл/см<sup>2</sup> соответственно и культивировали в полной питательной среде указанного выше состава.

Количество и жизнеспособность МСК и ЭЦ определяли с помощью автоматического счетчика клеток (BioRad, США), учитывая способность раствора трипанового синего проникать через цитоплазматическую мембрану погибших клеток. Среднее время удвоения популяции клеток ( $Y$ ) рассчитывали по формуле

$$Y = (\log_2 2)^t / (\log_2(N_t/N_0)),$$

где  $t$  – время прироста популяции клеток;  $N_t$  – количество клеток, полученное за время культивирования  $t$ ;  $N_0$  – исходное количество клеток, помещенных в культуральный флакон.

Все клетки обладали высокой жизнеспособностью, были пролиферативно активны, микробиологически стерильны. При этом МСК и ЭЦ имели характерный для них профиль экспрессии поверхностных маркерных молекул: CD73<sup>+</sup>/CD90<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup> – для МСК, CD31<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>/CD144<sup>+</sup>/CD146<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> – для ЭЦ.

*Плазмидные ДНК.* Очищенные pcDNA<sup>TM</sup>3.1(-) VEGF165 с экспрессионной кассетой человеческого фактора роста эндотелия сосудов 165 (размер – 5,994 kb) под контролем CMV-промотора были сконструированы и синтезированы в ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси», получены в препаративном количестве, очищены и переданы в ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси».

*Трансфекция.* Трансфекцию в клетки плазмидных рекомбинантных конструкций pcDNA<sup>TM</sup>3.1(-)VEGF165 проводили путем липофекции и электропорации. Липофекцию выполняли с использованием коммерческого набора Lipofectamine 3000 (Invitrogene, США), согласно инструкции производителя, электропорацию клеток – с помощью системы для трансфекции Neon<sup>TM</sup> (Invitrogene, США), согласно рекомендациям производителя. Используемые режимы электропорации: 1700 V/20 мс/1 имп, 1300 V/20 мс/2 имп, 1400 V/20 мс/2 имп – для МСК; 1500 V/20 мс/1 имп, 1000 V/40 мс/1 имп, 1100 V/40 мс/1 имп – для ЭЦ. Эффективность режимов трансфекции оценивали через 48 ч после липофекции/электропорации по количеству клеток, экспрессирующих репортерный белок GFP, и доли жизнеспособных клеток после воздействия методом проточной цитометрии.

*Определение экспрессии гена белка VEGF165 в клетках.* Экспрессию гена белка VEGF165 в МСК и ЭЦ определяли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени на амплификаторе CFX Opus 96 (Bio-Rad, США) с помощью набора реагентов TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems Inc., США). Использовали праймеры к исследуемому гену со следующей нуклеотидной последовательностью: VEGF(F): GGAGATCCTTCGAGGAGCACTT; VEGF(R): GGCGATTTAGCAGCAGATATAAGAA. РНК из клеток выделяли с помощью набора RNAqueous®-4PCR Kit (Applied Biosystems Inc., США), согласно протоколу производителя. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрическим методом по оптической плотности ее раствора ( $\lambda = 260$  нм). Для исследований использовали 300 нг очищенной РНК. Синтез ДНК из РНК осуществляли с помощью набора High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems Inc., США), согласно руководству производителя. Уровень мРНК анализируемого гена выравнивали по отношению к мРНК референс-гена глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы TaqMan® GAPDH Control (Applied Biosystems Inc., США).

*Определение содержания белка VEGF165 в кондиционированной клеточной среде.* Экспрессионную активность МСК и ЭЦ человека в отношении фактора роста эндотелия сосудов VEGF165 оценивали по способности клеток в условиях культуры продуцировать данный белок в ростовую среду. Концентрацию белка в кондиционированной среде определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческого набора ELISA Kit VEGF-165 (BT LAB, Китай), согласно рекомендациям производителя, и пересчитывали на 10<sup>3</sup> клеток.

*Сортинг и клонирование клеток.* Для оценки стабильности экспрессии рекомбинантной плазмидной конструкции pcDNA<sup>TM</sup>3.1(-)VEGF165 в пассажах через 48 ч после котрансфекции МСК и ЭЦ плазмидной конструкцией pcDNA<sup>TM</sup>3.1(-)VEGF165 и плазмидой с геном зеленого

флуоресцентного белка (GFP) клетки с экспрессией репортерного белка выделяли из исследуемой общей их популяции в стерильных условиях с использованием сортера клеток S3e (Bio-Rad, США). Отсортированные клетки помещали на 6-луночные планшеты и культивировали в стандартных для них условиях до достижения плотности монослоя в 70–80 %, после чего пересаживали на новые культуральные флаконы. Концентрацию белка VEGF165 в кондиционированной среде клеток определяли в течение двух пассажей после стерильного сортирования клеток.

**Микроядерный тест.** Для оценки влияния рсDNA<sup>TM</sup>3.1(-)VEGF165 на генетическую стабильность культивированных клеток использовали окрашивание их красителем DAPI, позволяющее визуализировать повышенное количество микроядер в цитоплазме интерфазных клеток, что может свидетельствовать о потенциальной генотоксичности плазмидного препарата. Для этого клетки пассировали с плотностью 20 тыс/см<sup>2</sup>, инкубировали в стандартных условиях (5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C) 72 ч, после чего фиксировали клеточный монослой 70%-ным этанолом и окрашивали DAPI (2,5 мкг/мл, 5 мин). Далее клетки анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа, используя соответствующий канал измерения (детекция сигнала при  $\lambda = 425\text{--}475$  нм). Подсчитывали в 10 полях зрения общее количество клеток и количество клеток с микроядрами. Относительное количество микроядер высчитывали по формуле: (клетки с микроядрами/общее количество клеток) · 100 %.

**Криоконсервация МСК и ЭЦ.** Криоконсервацию полученной в культуре биомассы МСК и ЭЦ осуществляли, используя в качестве криопротектора диметилсульфоксид (ДМСО). Для этого к 0,65 мл клеток (1–2)·10<sup>6</sup>) в ростовой среде  $\alpha$ -МЕМ добавляли смесь, содержащую 0,3 мл охлажденной (4–8 °C) ЭТС и 0,05 мл ДМСО, суспензию осторожно перемешивали, герметично закрывали и выдерживали 1 ч при 4 °C, потом 2 ч при –20 °C и помещали в ультраморозильную камеру (–86 °C) для кратковременного криохранения.

**Статистическая обработка полученных данных.** Статистическую обработку полученных результатов проводили с применением пакета прикладных программ Statistica (версия 10.0, StatSoft Inc., США). Данные представляли в виде средних величин  $\pm$  ошибка среднего. Различия считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** Полученные в культуре клетки, используемые для трансфекции, имели типичную для них морфологию: МСК – фибробластоподобную, ЭЦ – фибробластоподобную (укороченная или овальная форма типа «булыжной мостовой») (рис. 1).

Клеточные культуры обладали характерным фенотипом (CD73<sup>+</sup>/CD90<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup> – для МСК; CD31<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>/CD144<sup>+</sup>/CD146<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> – для ЭЦ) и высокой жизнеспособностью (95  $\pm$  1,5 %). Клетки были пролиферативно активны, среднее время удвоения их популяции – 45,3  $\pm$  2 ч для МСК и 39,5  $\pm$  1,5 ч для ЭЦ.

После оптимизации условий трансфекции для полученных в культуре клеток в МСК и ЭЦ вводили рекомбинантные плазмидные конструкции с геном *VEGF165*. Далее трансфицированные клетки культивировали 72 ч в стандартных для них условиях, после чего изучали влияние

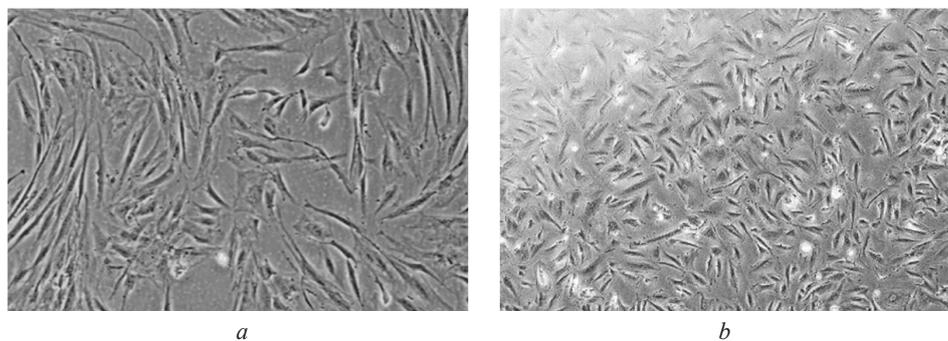


Рис. 1. Микрофотографии МСК (а) и ЭЦ (б) в условиях культуры, третий пассаж. Фазово-контрастная микроскопия.  $\times 40$

Fig. 1. Microphotographs of MSC (a) and EC (b) cell culture conditions, passage 3 cells. Magnification, phase contrast microscop.  $\times 40$

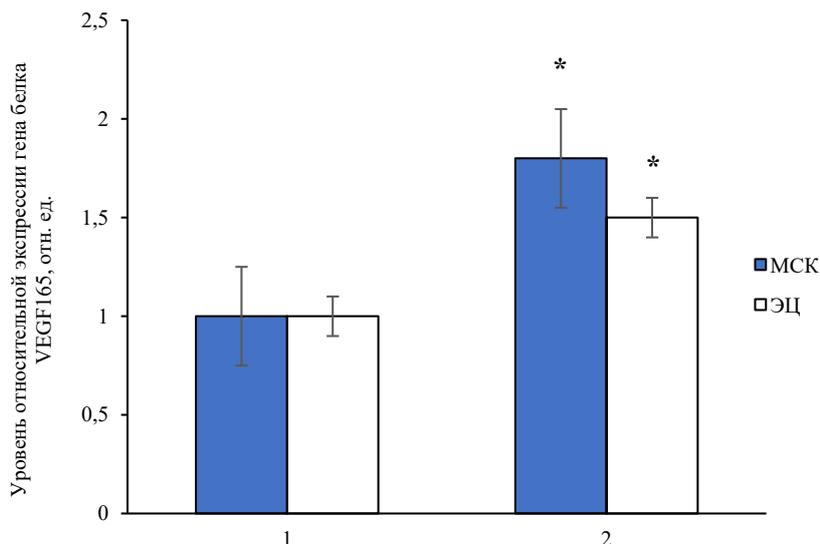


Рис. 2. Экспрессия гена фактора роста VEGF165 в культивированных МСК и ЭЦ человека (1 – контрольные клетки, 2 – клетки после трансфекции (72 ч культивирования)).

\* – статистически значимые отличия средних значений относительно контрольных клеток ( $p \leq 0,05$ )

Fig. 2. Expression of the growth factor gene VEGF165 in cultured human MSC and EC (1 – control cells, 2 – cells after transfection (72 hours of cultivation)).

\* – statistically significant differences in average values with respect to control cells ( $p \leq 0.05$ )

функциональной активности плазмидной конструкции на экспрессию МСК и ЭЦ фактора VEGF165.

С целью определения изменения экспрессии белка VEGF165 в МСК и ЭЦ на уровне транскрипции после трансфекции клеток генно-инженерной плазмидной конструкцией для оценки ее биологической активности исследована экспрессия гена фактора роста в контрольных и трансфецированных клетках. Выявлены изменения содержания транскриптов гена *VEGF165* в культивированных МСК и ЭЦ после их трансфекции по сравнению с их содержанием в контрольных клетках, в которые плазмиду не вводили. Обнаружено, что в МСК человека после трансфекции экспрессия гена белка VEGF165 увеличилась в 1,8 раза, а в ЭЦ – в 1,5 раза ( $p \leq 0,05$ ) (рис. 2).

Параллельно исследованию относительного уровня экспрессии гена данного фактора роста в контрольных и опытных МСК и ЭЦ методом ИФА исследовали содержание его белкового продукта в кондиционированных ростовых средах клеток. Определяли концентрацию белка в кондиционированной среде, полученной при культивировании трансфецированных МСК и ЭЦ в течение 72 ч в стандартных условиях, и сравнивали этот показатель с таковым в контрольных клетках, в которые не вводилась генно-инженерная конструкция. В результате оказалось, что при введении в клетки разработанной плазмидной конструкции *pcDNA<sup>TM</sup>3.1(-)VEGF165* значительно повышается наработка клетками белка VEGF165, синтетическая активность в отношении VEGF165 в МСК увеличивается в более чем в 100 раз, а в ЭЦ – более чем в 250 раз ( $p \leq 0,05$ ) (табл. 1).

Таблица 1. Содержание белка VEGF165 в кондиционированной среде МСК и ЭЦ, пгр/10<sup>3</sup> клеток

Table 1. Content of VEGF165 protein in the conditioned medium of MSC and EC, pgr/10<sup>3</sup> cells

Тип клеток	Содержание VEGF165 в клетках	
	МСК	ЭЦ
Интактные (контрольные)	20 ± 2,5	10,75 ± 1,5
Трансфецированные	2 150 ± 3,0*	758 ± 2,0*
Трансфецированные после культивирования в течение двух пассажей	20,3 ± 2,1	9,68 ± 1,3

Примечание. \* – статистически значимые отличия средних значений относительно интактных (контрольных) клеток ( $p \leq 0,05$ ).

Таким образом, можно отметить выраженную однонаправленную положительную динамику экспрессии гена *VEGF165* и его белкового продукта в секретах МСК и ЭЦ, подвергшихся трансфекции плазмидной конструкцией pcDNA<sup>TM</sup>3.1(-)VEGF165. Кроме того, полученные результаты свидетельствуют о том, что векторная конструкция функционально активна в отношении исследуемых клеток.

Также важно отметить, что после двух пассажей пассирования клеток после их трансфекции содержание фактора VEGF165 в кондиционированных средах МСК и ЭЦ снижалось до характерного для контрольных клеток уровня. Данный факт можно объяснить как снижением жизнеспособности трансфицированных клеток, а соответственно, их последующей элиминации из клеточной популяции, так и возможной нестабильностью функциональной активности экзогенной генетической конструкции и/или ее элиминацией из клеток при делении, что также ожидается, так как в клетках запускаются адаптационные механизмы, реализующие поддержание гомеостаза.

Косвенным подтверждением сформулированного предположения является факт зафиксированного затухания экспрессии GFP и снижения содержания VEGF165 в кондиционированной среде клеток после культивирования в течение двух пассажей, отсортированных и котрансфицированных плазмидными конструкциями МСК и ЭЦ с изначально функционально активными экспрессионными кассетами, кодирующими VEGF165 и GFP (рис. 3).

В данном исследовании важно было оценить также способность генно-инженерной конструкции с экспрессионной кассетой фактора роста VEGF165 оказывать генотоксический эффект и влияние на функциональную активность культивированных МСК и ЭЦ. Выявлено, что при культивировании в течение двух пассажей после трансфекции МСК и ЭЦ сохраняются генетическая стабильность, а также исходный фенотипический профиль клеток (табл. 2).

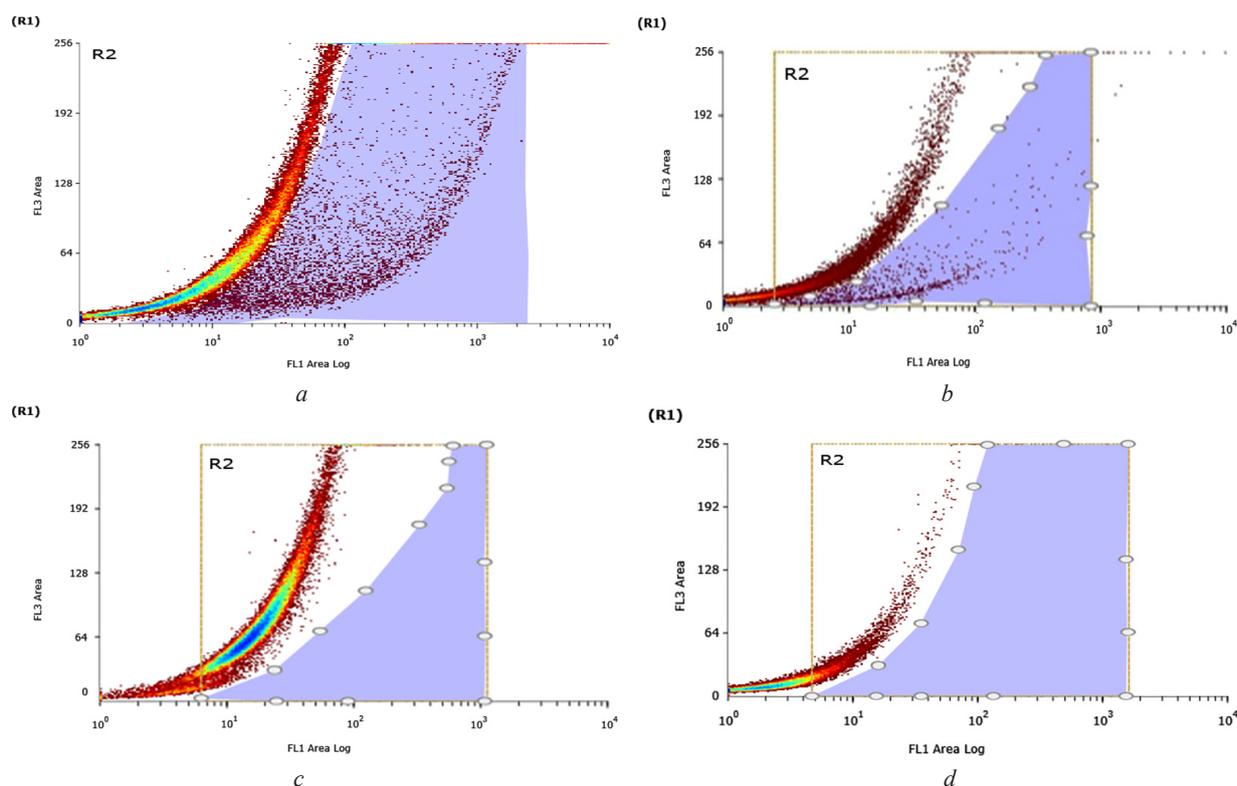


Рис. 3. Экспрессия репортерного белка GFP в культивированных МСК (*a* – после котрансфекции, *b* – второй пассаж после котрансфекции) и ЭЦ (*c* – после котрансфекции, *d* – второй пассаж после котрансфекции), котрансфицированных плазмидными конструкциями с экспрессионными кассетами, кодирующими VEGF165 и GFP

Fig. 3. Expression of the GFP reporter protein in cultured MSCs (*a* – after cotransfection, *b* – 2nd passage after cotransfection) and EC (*c* – after cotransfection, *d* – passage 2 cells after cotransfection), cotransfected with plasmid constructs with expression cassettes encoding VEGF165 and GFP

Т а б л и ц а 2. Экспрессия CD-маркеров культивированными МСК и ЭЦ, %

T a b l e 2. Expression of CD markers by cultured MSC and EC, %

CD-маркер	CD73	CD90	CD105	CD31	CD117	CD144	CD146
Маркер контрольных МСК в популяции	98,8 ± 0,2	99 ± 0,1	98,4 ± 0,2	–	–	–	–
Маркер МСК в популяции после трансфекции векторной конструкцией pcDNA <sup>TM</sup> 3.1(-)VEGF165 и прокультивированных два пассажа	98,5 ± 0,2	99 ± 0,1	98,0 ± 0,2	–	–	–	–
Маркер контрольных ЭЦ в популяции	–	–	–	93 ± 1	89 ± 5	98 ± 1	99 ± 1
Маркер ЭЦ в популяции после трансфекции векторной конструкцией pcDNA <sup>TM</sup> 3.1(-)VEGF165 и прокультивированных два пассажа	–	–	–	95 ± 1	89 ± 5	98 ± 1	99 ± 1

Визуализация и подсчет микроядер в клетках после их окраски DAPI показали отсутствие статистически достоверного влияния функциональной активности плазмидной генно-инженерной конструкции pcDNA<sup>TM</sup>3.1(-)VEGF165 на количество микроядер в МСК и ЭЦ. Доказано, что в клеточной культуре допустимая доля клеток с микроядрами, при которой клетки еще считаются биобезопасными, составляет 27 %. Процент клеток в полученных нами препаратах МСК и ЭЦ не изменялся как для контрольных, так и для трансфицированных клеток (5 и 6 % соответственно), что свидетельствовало о хорошем состоянии репаративного аппарата клеточных культур и об отсутствии рисков, связанных с их онкотрансформацией.

Время удвоения популяции снижалось в среднем в 1,2 и 1,4 раза ( $p \leq 0,05$ ) для МСК и ЭЦ соответственно, а в среде культивирования на протяжении первого после трансфекции пассажа можно было наблюдать открепленные погибшие клетки. Причем этот эффект уже полностью нивелировался во втором раунде пассирования. Временный эффект негативного воздействия на жизнеспособность и пролиферативную активность клеток в культуре можно объяснить очевидным токсическим воздействием липофекционного агента/электрического тока на цитоплазматическую мембрану клеток при трансфекции.

### Выводы

1. В результате исследований *in vitro* впервые установлен высокий биологический потенциал разработанной генно-инженерной плазмидной конструкции pcDNA<sup>TM</sup>3.1(-)VEGF165, который проявляется в ее способности индуцировать значимое повышение экспрессии гена *VEGF165* в мезенхимальных мультипотентных стромальных клетках и эндотелиоцитах человека и увеличивать наработку этими клетками белка VEGF165.

2. Выявленная временная функциональная активность pcDNA<sup>TM</sup>3.1(-)VEGF165 в клетках включает продленную гиперэкспрессию фактора роста, характерную для опухолевых линий, что в сочетании с отсутствием генотоксического действия плазмидной конструкции минимизирует вероятность переключения биохимических процессов в трансфицированных клеточных культурах и их онкотрансформацию.

3. Созданная генно-инженерная векторная конструкция pcDNA<sup>TM</sup>3.1(-)VEGF165 может быть использована для разработки модели генотерапевтического лекарственного средства, способствующего ангиогенезу *in vivo* в ишемизированных тканях.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках отдельного проекта фундаментальных и прикладных исследований НАН Беларуси (№ ГР 20230113).

**Acknowledgements.** The work was carried out within the framework of a separate project for fundamental and applied research of the National Academy of Sciences of Belarus (No. GR 20230113).

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Liu, Y. Gene therapy with plasmid DNA / Y. Liu, S. Musetti, L. Huang // *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery* / ed. D. J. Abraham. – John Wiley & Sons, Inc., 2021. – P. 1–35. <https://doi.org/10.1002/0471266949.bmc073.pub3>
2. Богдан, В. Г. Стимуляция ангиогенеза в комплексном лечении пациентов с хронической артериальной недостаточностью нижних конечностей / В. Г. Богдан, С. Г. Лепешко // *Воен. медицина*. – 2017. – № 2. – С. 117–119.
3. Червяков, Ю. В. Эффективность генной терапии и стандартного консервативного лечения хронической ишемии нижних конечностей атеросклеротического генеза / Ю. В. Червяков, О. Н. Власенко // *Вестн. хирургии им. И. И. Грекова*. – 2018. – Т. 177, № 2. – С. 64–69.
4. Механизм стимуляции ангиогенеза в ишемизированном миокарде с помощью стромальных клеток жировой ткани / К. А. Рубина [и др.] // *Кардиология*. – 2010. – Т. 50, № 2. – С. 51–61.
5. Semenza, G. L. Vasculogenesis, angiogenesis, and arteriogenesis: mechanisms of blood vessel formation and remodeling / G. L. Semenza // *J. Cell Biochem.* – 2007. – Vol. 102, N 4. – P. 840–847. <https://doi.org/10.1002/jcb.21523>
6. Molecular profiling of angiogenesis markers / S.-C. Shih [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2002. – Vol. 161, N 1. – P. 35–41. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64154-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64154-5)
7. Секрция ангиопоитинов тканью плаценты при физиологическом развитии беременности и при гестозе / О. И. Степанова [и др.] // *Журн. акушерства и женских болезней*. – 2010. – № 6. – С. 69–74.
8. Васина, Л. В. Функциональная гетерогенность эндотелия / Л. В. Васина, Т. Д. Власов, Н. Н. Петрищев // *Артериальная гипертензия*. – 2017. – Т. 23, № 2. – С. 88–102.
9. Kishwar, H. K. Gene expression in mammalian cells and its applications / H. K. Kishwar // *Adv. Pharmaceut. Bull.* – 2013. – Vol. 3, N 2. – P. 257–263. <https://doi.org/10.5681/apb.2013.042>
10. Дифференциальная экспрессия изоформ сосудисто-эндотелиального фактора роста человека и новые подходы к терапевтическому ангиогенезу / К. Г. Скрыбин [и др.] // *Докл. Акад. наук*. – 2004. – Т. 397, № 6. – С. 838–841.
11. Генная терапия в регенеративной медицине: последние достижения и актуальные направления развития / Е. А. Слободкина [и др.] // *Гены и Клетки*. – 2020. – Т. 15, № 1. – С. 6–16.
12. Макаревич, П. И. Три десятилетия развития генной терапии: вехи и перспективы / П. И. Макаревич // *Регенерация органов и тканей*. – 2023. – Т. 1, № 1. – С. 16–24.
13. Engineering vascularized tissue / R. K. Jain [et al.] // *Nat. Biotechnol.* – 2005. – Vol. 23, N 7. – P. 821–823. <https://doi.org/10.1038/nbt0705-821>
14. Hirschi, K. K. Pericytes in the microvasculature / K. K. Hirschi, P. A. D'Amore // *Cardiovasc. Res.* – 1996. – Vol. 32, N 4. – P. 687–698.
15. Ravishankar, P. Isolation of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood / P. Ravishankar, M. A. Zeballos, K. Balachandran // *J. Vis. Exp.* – 2017. – Vol. 127. – Art. 56021. <https://doi.org/10.3791/56021>
16. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells / B. Baudin [et al.] // *Nat. Protocols*. – 2007. – Vol. 2, N 3. – P. 481–485. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.54>
17. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells / P. A. Zuk [et al.] // *Mol. Biol. Cell.* – 2002. – Vol. 13, N 12. – P. 4279–4295. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-02-0105>

## References

1. Liu Y., Musetti S., Huang L. Gene therapy with plasmid DNA. *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, 2021, pp. 1–35. <https://doi.org/10.1002/0471266949.bmc073.pub3>
2. Bogdan V. G., Lepeshko S. G. Stimulation of angiogenesis in treatment of patients with chronic arterial insufficiency of the lower limbs. *Voennaya meditsina* [Military medicine], 2017, no. 2, pp. 117–119 (in Russian).
3. Chervyakov Yu. V., Vlasenko O. N. Comparison of the effectiveness of gene therapy and standard conservative therapy for patients with chronic lower limb ischemia due to atherosclerosis. *Vestnik khirurgii imeni I. I. Grekova* [Grekov's Bulletin of Surgery], 2018, vol. 177, no. 2, pp. 64–69 (in Russian).
4. Rubina K. A., Kalinina N. I., Efimenko A. Yu., Lopatina T. V., Melikhova V. S., Tsokolaeva Z. I., Syssoeva V. Yu., Tkachuk V. A., Parfenova E. V. The mechanism of stimulation of angiogenesis in ischemic myocardium with the help of stromal cells of adipose tissue. *Kardiologiya* [Cardiology], 2010, vol. 50, no. 2, pp. 51–61 (in Russian).
5. Semenza G. L. Vasculogenesis, angiogenesis, and arteriogenesis: mechanisms of blood vessel formation and remodeling. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2007, vol. 102, no. 4, pp. 840–847. <https://doi.org/10.1002/jcb.21523>
6. Shih S.-C., Robinson G. S., Perruzzi C. A., Calvo A., Desai K., Green J. E., Ali I. U., Smith L. E. H., Senger D. R. Molecular profiling of angiogenesis markers. *American Journal of Pathology*, 2002, vol. 161, no. 1, pp. 35–41. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64154-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64154-5)
7. Stepanova O. I., Lesnichiya M. V., L'vova T. Yu., Sokolov D. I., Sel'kov S. A. Angiopoietins placental secretion in normal pregnancies and those complicated by preeclampsia. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh boleznei* [Journal of obstetrics and women's diseases], 2010, no. 6, pp. 69–74 (in Russian).
8. Vasina L. V., Vlasov T. D., Petrishchev N. N. Functional heterogeneity of the endothelium. *Arterial'naya gipertenziya* [Arterial hypertension], 2017, vol. 23, no. 2, pp. 88–102 (in Russian).
9. Kishwar H. K. Gene expression in mammalian cells and its applications. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2013, vol. 3, no. 2, pp. 257–263. <https://doi.org/10.5681/apb.2013.042>

10. Skryabin K. G., El'darov M. A., Kamardinov D. K., Zinov'eva M. V., Ivanov D. S., Prasolov V. S. [et al.]. Differential expression of human vascular endothelial growth factor isoforms and new approaches to therapeutic angiogenesis. *Doklady Akademii nauk* [Reports of the Academy of Sciences], 2004, vol. 397, no. 6, pp. 838–841 (in Russian).
11. Slobodkina E., Karagyaur M. N., Balaban'yan V. Yu., Makarevich P. I. Gene therapy in regenerative medicine: recent achievements and actual directions of development. *Geny i Kletki* [Genes and Cells], 2020, vol. 15, no. 1, pp. 6–16 (in Russian).
12. Makarevich P. I. Three decades of gene therapy development: milestones and prospects. *Regeneratsiya organov i tkanei* [Regeneration of organs and tissues], 2023, vol. 1, no. 1, pp. 16–24 (in Russian).
13. Jain R. K., Au P., Tam J., Duda D. G., Fukumura D. Engineering vascularized tissue. *Nature Biotechnology*, 2005, vol. 23, no. 7, pp. 821–823. <https://doi.org/10.1038/nbt0705-821>
14. Hirschi K. K., D'Amore P. A. Pericytes in the microvasculature. *Cardiovascular Research*, 1996, vol. 32, no. 4, pp. 687–698.
15. Ravishankar P., Zeballos M. A., Balachandran K. Isolation of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood. *Journal of Visualized Experiments*, 2017, vol. 127, art. 56021. <https://doi.org/10.3791/56021>
16. Baudin B., Bruneel A., Bosselut N., Vaubourdolle M. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nature Protocols*, 2007, vol. 2, no. 3, pp. 481–485. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.54>
17. Zuk P. A., Zhu M., Ashjian P., de Ugarte D. A., Huang J. I., Mizuno H., Alfonso Z. C., Fraser J. K., Benhaim P., Hedrick M. H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*, 2002, vol. 13, no. 12, pp. 4279–4295. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-02-0105>

### Информация об авторах

*Богдан Василий Генрихович* – д-р мед. наук, профессор, академик-секретарь Отделения медицинских наук НАН Беларуси (пр-т Независимости, 66, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [medic@presidium.bas-net.by](mailto:medic@presidium.bas-net.by)

*Поляшко Анна Григорьевна* – канд. биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [renovacio888@yandex.ru](mailto:renovacio888@yandex.ru)

*Мисюкевич Алла Юрьевна* – науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [alla.misyukevich.91@mail.ru](mailto:alla.misyukevich.91@mail.ru)

*Смирнов Андрей Александрович* – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [aasm96@bk.ru](mailto:aasm96@bk.ru)

*Суховеева Светлана Владимировна* – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [suhoveevalmbc@mail.ru](mailto:suhoveevalmbc@mail.ru)

*Янцевич Алексей Викторович* – канд. хим. наук, доцент, директор. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В. Ф. Купревича, 5-2, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [yantsevich@iboch.by](mailto:yantsevich@iboch.by)

### Information about the authors

*Vasily G. Bogdan* – D. Sc. (Med.), Professor, Academician-Secretary of the Department of Medical Sciences of the National Academy of Sciences of Belarus (66, Nezavisimosti Ave., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [medic@presidium.bas-net.by](mailto:medic@presidium.bas-net.by)

*Anna G. Poleshko* – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Head of the Laboratory. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [renovacio888@yandex.ru](mailto:renovacio888@yandex.ru)

*Ala Yu. Misyukevich* – Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [alla.misyukevich.91@mail.ru](mailto:alla.misyukevich.91@mail.ru)

*Andrei A. Smirnov* – Junior Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [aasm96@bk.ru](mailto:aasm96@bk.ru)

*Sviatlana V. Sukhaveyeva* – Ph. D. (Biol.), Senior Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [suhoveevalmbc@mail.ru](mailto:suhoveevalmbc@mail.ru)

*Aleksey V. Yantsevich* – Ph. D. (Chem.), Associate Professor, Director. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5-2, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [yantsevich@iboch.by](mailto:yantsevich@iboch.by)