УДК 576.536
DOI: 10.7868/S3034606126030061

ВЛИЯНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ПЛАЗМИДЫ, КОДИРУЮЩЕЙ ГЕНЫ КОШКИ *vegf164* И *fgf2*, НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК *IN VITRO*

Е. Ю. Закирова*, М. А. Тамбовский, А. А. Ризванов, Н. М. Александрова**

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008, Российская Федерация

** E-mail: lenahamzina@yandex.ru*

*** E-mail: maxim.tambovsky.kfu@gmail.com*

Аннотация. **Обоснование и цель**. Разработка генных препаратов, стимулирующих восстановление поврежденных мягких тканей, актуальна для ветеринарной практики. В настоящей работе мы представляем первый генно-терапевтический препарат для кошек, созданный на основе плазмидной ДНК и содержащий гены видоспецифичных белков кошки (*Felis catus*): фактор роста фибробластов 2 (*fgf2*) и фактор роста эндотелия сосудов (*vegf164*). Белки FGF2 и VEGF164 имеют положительное влияние на образование кровеносных сосудов, стимулируя процессы регенерации в месте введения. **Методика.** Плазмидная ДНК pBUDK-flVEGF164-flFGF2 была получена при помощи методов генной инженерии. Для получения и характеристики клеток кошки использовались методы выделения мезенхимных стволовых клеток из биоптата жировой ткани, методы дифференцировки мезенхимных стволовых клеток и проточная цитометрия, ПЦР-РВ. Для получения генномодифицированных клеток использовали метод трансфекции. **Результаты.** Выделенные из образца жировой ткани кошки мезенхимные стволовые клетки после трансфекции pBUDK-flVEGF164-flFGF2 продемонстрировали эффективную и одновременную экспрессию генов *vegf164* и *fgf2.* Генетическая модификация клеток кошки полученной плазмидой стимулировала образование капилляроподобных структур *in vitro*, но не влияла на остеодифференцировку и образование липидных капель в клетках при адиподифференцировке. **Заключение.** Созданный генный препарат обладает потенциальными регенеративными свойствами, так как стимулирует неоангиогенез и может быть использован для лечения кошек с повреждениями кожи, мышц, связок.

Ключевые слова: кошка, мезенхимные стволовые клетки, плазмида, фактор роста фибробластов, фактор роста эндотелия сосудов

Принятые сокращения: МСК — мезенхимные стволовые клетки, п. о.— пары оснований, VEGF — фактор рост эндотелия сосудов, FGF2 — фактор роста фибробластов, ПЦР-РВ — полимеразная цепная реакция в реальном времени.

Финансирование работы. Работа выполнена при финансовой поддержке Академии наук Республики Татарстан образовательным организациям высшего образования, научным и иным организациям на поддержку планов развития кадрового потенциала в части стимулирования их научных и научно-педагогических работников к защите докторских диссертаций и выполнению научно-исследовательских работ (Соглашение № 12/2025-ПД-КФУ от 22.12.2025).

Соблюдение этических стандартов. Забор жировой ткани проводили с разрешения локального этического комитета Казанского федерального университета (протокол № 1 от 23.02.2015 на проведение научного исследования по теме «Генная и клеточная терапия в регенеративной ветеринарной медицине»). На проведение всех операций по забору жировой ткани были получены письменные согласия владельцев животных, если они имелись.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Ссылка для цитирования. Закирова Е. Ю., Тамбовский М. А., Ризванов А. А., Александрова Н. М. Влияние рекомбинантной плазмиды, кодирующей гены кошки *vegf164* и *fgf2*, на дифференцировку мезенхимных стволовых клеток *in vitro*. Цитология / Cell and Tissue Biology, 2026, Т. 68. № 3. С. 298–307. doi: 10.7868/S3034606126030061

Поступила в редакцию: 04.02.2026
После доработки: 11.03.2026
Принята к публикации: 17.03.2026

© Закирова Е. Ю., Тамбовский М. А., Ризванов А. А., Александрова Н. М., 2026

ЦИТОЛОГИЯ / CELL AND TISSUE BIOLOGY, 2026, том 68, № 3, с. 298–307

DOI: 10.7868/S3034606126030061

Effect of Recombinant Plasmid Encoding Combinations *vegf164* and *fgf2* of Cat on Biological Activity Mesenchymal Stromal Cell *in vitro*

E. Y. Zakirova*, M. A. Tambovsky, A. A. Rizvanov, N. M. Aleksandrova**

Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, 420008, Russian Federation

** E-mail: lenahamzina@yandex.ru*

*** E-mail: maxim.tambovsky.kfu@gmail.com*

Abstract. **Objective:** The development of gene-based drugs that stimulate the regeneration of damaged soft tissues is current interest for veterinary practice. In this study, we present the first gene therapy drug for cats, created based on plasmid DNA and containing genes for pink-specific proteins (*Felis catus*): fibroblast growth factor 2 (*fgf2*) and vascular endothelial growth factor 164 (*vegf164*). The proteins FGF2 and VEGF164 positively influence blood vessel formation, thereby stimulating regeneration processes. **Methods:** The plasmid DNA pBUDK-flVEGF164-flFGF2 was obtained using genetic engineering methods. To obtain and characterize feline cells, techniques such as mesenchymal stem cell isolation from adipose tissue biopsies, differentiation protocols for mesenchymal stem cells, flow cytometry, and PCR–RT were used. For generating genetically modified cells, a transfection method was employed. **Results:** Mesenchymal stem cells isolated from feline adipose biopsy samples, after transfection with pBUDK-flVEGF164-flFGF2, demonstrated efficient and simultaneous expression of the *vegf164* and *fgf2* genes. The genetic modification of feline cells with the plasmid stimulated the formation of capillary-like structures in vitro but did not affect osteogenic differentiation or lipid droplet formation during adipogenic differentiation. **Conclusion:** Thus, the developed gene therapy has potential regenerative properties, as it stimulates neoangiogenesis and can be used to treat cats with skin, muscle, and ligament injuries.

Keywords: mesenchymal stem cells, plasmid, vascular endothelial growth factor, fibroblast growth factor

Funding: This work was supported the Tatarstan Academy of Sciences provided to higher education institutions, scientific and other organizations to support human resource development plans in terms of encouraging their research and academic staff to defend doctoral dissertations and conduct research activities (Agreement no. 12/2025-PD-KFU dated December 22, 2025).

Ethics Approval. The adipose tissue collection was conducted with the permission of the local ethics committee of Kazan Federal University (protocol № 1 dated 23.02.2015 for the scientific study on the topic "Gene and Cell Therapy in Regenerative Veterinary Medicine"). Written consent was obtained from the animal owners for all procedures involving the collection of adipose tissue, when such consent was available.

Conflict of interest. The authors of this work declare that they have no conflicts of interest.

For citation. Zakirova E. Y., Tambovsky M. A., Rizvanov A. A., Aleksandrova N. M. Effect of recombinant plasmid encoding combinations *vegf164* and *fgf2* of cat on biological activity mesenchymal stromal cell *in vitro.* Tsitologiya / Cell and Tissue Biology, 2026. V. 69. No. 3. P. 298–307. doi: 10.7868/S3034606126030061

Received 04.02.2026
Revised 11.03.2026
Accepted 17.03.2026

© Zakirova E. Y., Tambovsky M. A., Rizvanov A. A., Aleksandrova N. M., 2026

Генная терапия используется не только для лечения орфанных заболеваний человека (Popova et al., 2018), но и для терапии приобретенных заболеваний и травм (Gallo et al., 2025; Bezsonov et al., 2025). Фармацевтической промышленностью уже выпускаются генные препараты для терапии людей. Например, генно-терапевтический препарат неоваскулген (ОАО ИСКЧ, Россия) выпускается российской промышленностью. Он предназначен для лечения тяжелых форм ишемии нижних конечностей (атеросклероз сосудов ног) путем стимуляции роста новых кровеносных сосудов (терапевтического ангиогенеза). Неоваскулген представляет собой плазмиду с геном фактора роста эндотелия сосудов человека. Для лечения орфанного генетического заболевания миодистрофии Дюшенна фармацевтическая компания из Швейцарии выпускает инновационный генный препарат Elevidys (Roche, Швейцария), который доставляет в мышечные клетки ген, отвечающий за экспрессию укороченной, но функциональной версии белка дистрофина.

В ветеринарной медицине методы генной терапии заболеваний животных практически не применяются. Существуют разработки инъекционного генетического препарата для стерилизации кошек с целью замены хирургических операций по овариэктомии (Stocker et al., 2025). Также есть специально разработанный рекомбинантный инсулин для собак, больных диабетом (Jaén et al., 2017; Thampi et al., 2022).

Но в большинстве случаев животных используют в качестве моделей при разработке генетических препаратов для человека (Petersen-Jones et al., 2025). Однако существует возможность использования методов генной инженерии, позволяющих создать видоспецифичные генные препараты для животных, избегая при этом нежелательных осложнений и побочных эффектов при введении лекарственных средств, предназначенных человеку (Zakirova et al., 2022). Применение видоспецифичной плазмиды pBUDK-clVEGF164-clFGF2, содержащей гены биологически активных белков собаки, стимулировало регенерацию в области поврежденной кожи у собак. Исследователи отметили, что внутрикожные инъекции pBUDK-clVEGF164-clFGF2 приводили к усиленной выработке ангиопротекторных цитокинов (VEGF, лептина, фракталкина) с постепенным увеличением их концентрации в периферической крови крыс. При этом введение препарата не оказывало негативного влияния на общее состояние животного-реципиента (Zakirova et al., 2020). Выбор генов для плазмидного препарата был основан на том, что фактор роста фибробластов 2 (FGF2) и фактор рост эндотелия сосудов 164 (VEGF164) обладают взаимным положительным эффектом, стимулируя появление и развитие микроциркуляторного русла (Cavallaro et al., 2001; Murakami et al., 2011), который важен для протекания процессов восстановления в поврежденных тканях.

Для терапии травм мягких тканей кошек нами была создана плазмидная ДНК, содержащая видоспецифичные кодирующие последовательности белков VEGF164 и FGF2. Цель настоящего исследования — оценить способность плазмидной ДНК, содержащей видоспецифичные кодирующие последовательности белков VEGF164 и FGF2, влиять на образование капилляроподобных структур и дифференцировку мезенхимных стволовых клеток (МСК) кошки в остеогенном и адипогенном направлениях.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Создание плазмидной конструкции. Вновь синтезированная плазмидная ДНК (пДНК), содержала в своем составе видоспецифичные для кошки (*Felis catus*) кодон-оптимизированные последовательности генов *fgf2* и *vegf164*. Исходные кодирующие последовательности генов *vegf164* (NM_001009854.2) и *fgf2* (XM_045055899.1) кошки были оптимизированы по кодонам с использованием алгоритма «Optimum Gene» (GenScript, США) и клонированы в плазмиду pBUDCE4.1 (Invitrogen, США). Синтез *de novo* нуклеотидной последовательности кодон оптимизированных последовательностей кДНК *vegf164* и *fgf2* и клонирование кДНК в плазмидный вектор был осуществлен компанией GenScript (США). Эта же компания осуществляла секвенирование, определение стерильности и наличия токсинов в рекомбинантной плазмиде. Полученная пДНК представляла собой высококопийную плазмиду с двумя независимыми экспрессионными кассетами под контролем двух разных эукариотических промоторов: CMV и EF-1a.

Анализ экспрессии трансгенов *vegfl64* и *fgf2* проводили *in vitro* после трансфекции МСК кошки генетической конструкцией pBUDK-fcVEGF164-fcFGF2 с использованием трансфекционного агента TurboFect (ThermoFisherScientificInc, США). Трансфекцию проводили согласно рекомендациям производителя. Количественную оценку экспрессии мРНК генов проводили с использованием полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) на оборудовании CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (BioRad, США). Последовательности праймеров и зондов представлены в табл. 1. Для каждого целевого гена были проведены эксперименты в трех повторностях. Количество РНК было нормировано по количеству кДНК гена домашнего хозяйства. Серийное разведение кДНК, синтезированной из мРНК трансфицированных клеток, использовали для построения стандартной кривой для определения уровня экспрессии гена. Уровень экспрессии генов в нетрансфицированных клетках принимали за 100 %.

Животные. У клинически здоровых кошек (*Felis catus*) забор жировой ткани производили во время плановых операций по стерилизации животного ($n = 3$) в ветеринарной клинике при наличии письменного согласия владельца животного.

Получение культуры МСК из жировой ткани. Образцы жировой ткани отбирали в стерильных условиях ветеринарной операционной. Получение МСК из биоптата жировой ткани проводили по методике, описанной ранее (Закирова и др., 2021). Выделение МСК проводилось

Таблица 1. Нуклеотидная последовательность праймеров и зондов, использованная для количественного анализа экспрессии генов *fgf 2* и *vegf 164* методом ПЦР-РВ

Ген	Праймер и зонд
flVEGF	Прямой: AGATGCGGAGGATGCTGTAA
flVEGF	Обратный: AGGAAAGACATCTCGCCGAT
flVEGF	Зонд: [FAM] TGGGCACGCATTCCAGGCCC [BH1]
flFGF	Прямой: TGCTTCTTCTTCGAGAGGCT
flFGF	Обратный: CAGGATTTGGCAGACATGGG
flFGF	Зонд: [FAM] TCCAGCTGGTACGTGGCCCT [BH1]

путем ферментативного расщепления кусочков жировой ткани в растворе коллагеназы краба («Биолот», Россия) с конечной концентрацией 0.2% при 37 °С. Полученные клетки культивировали в ростовой среде DMEM, содержащей 10% сыворотки плодов коров, 100 мкг/мл стрептомицина, 100 ед./мл пенициллина, 2 мМ L-глутамина (все реактивы от «ПанЭко», Россия) при 37 °С и 5% CO_2. Рассев МСК при достижении монослоем конфлюэнтности 90% осуществляли с использованием 0.25% раствора трипсин–EDTA («ПанЭко», Россия). В работе использовали клетки 4–5-го пассажей, полученные от 3-х доноров.

Проточная цитофлюорометрия. Зафиксированную в 4%-ном формалине («Татхимфармпрепараты», Россия) клеточную суспензию промывали 0.9%-ным NaCl («ПанЭко», Россия) используя метод центрифугирования. Затем окрашивали согласно инструкции фирм–производителей, используя следующие растворы мышиных моноклональных антител (моноАТ) для определения маркеров МСК: против Thy-1, меченные PE/Cy5 (№ 328112; Biolegend, США), против CD29, меченые PE (№ 102208; Biolegend, США), против CD34, меченые Alexa Fluor 647 (sc7324; Santa Cruz Biotechnology, США) и против CD45, меченые Per CP (№ 304026: Biolegend, США). С помощью проточного цитофлуориметра FACS Aria III (BD Biosciences, США) проводили анализ клеток на наличие мембранных маркеров стволовости. Результат проточной цитометрии (не менее 100 тыс. клеток на 1 аликвоту) выражали в процентах от общего числа клеток в образце.

Дифференцировка МСК. Для подтверждения характеристик стволовости выделенных из жировой ткани клеточных культур их дифференцировали в адипо-, хондро- и остеогенном направлениях по описанным ранее методам (Закирова, 2021).

Клетки 3–6 пассажа (9×10^5) использовали для проведения дифференцировки в хондрогенном направлении. Клеточную суспензию отмывали от ростовой среды, осаждали центрифугированием и ресуспендировали в 90 мкл дифференцировочной среды или в 90 мкл обычной ростовой среды (контрольная группа). В лунки 24 луночного планшета капельно по 10 мкл наносили клеточные суспензии, используя 3 лунки для каждой группы. После чего полученные образцы в течение 2 ч культивировали при 37 °С в CO_2-инкубаторе для их адгезии без добавления среды. По завершении инкубации в каждую лунку добавляли по 500 мкл соответствующей среды, осторожно, стараясь не разбить сформированные группы клеток. Среда для контрольных групп состояла из α-MEM, содержащей 10% сыворотки плодов коров, 0.5 мкМ 2-фосфата аскорбиновой кислоты (Sigma, США), 100 мкг/мл стрептомицина, 100 ед./мл пенициллина, 2 мМ L-глутамина («ПанЭко», Россия). В состав хондрогенной среды входили DMEM High glucose («ПанЭко», Россия), 10% сыворотки плодов коров, 2 мМ L-глутамина, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 100 мкМ/л пирувата натрия («ПанЭко», Россия), 1-кратный ITS (Sigma, США), 0.5 мкМ 2-фосфата аскорбиновой кислоты (Sigma, США), 1 мкМ дексаметазона (Sigma, США) и 10 нг/мл TGFβ1 (Sigma, США). Смену сред проводили в течение 21 сут каждые 72ч. Полученные образцы окрашивали на присутствие кислых мукополисахаридов, являющихся маркером хондрообразования. Для этого их фиксировали по 5 мин в 95%-, затем в 70%-ном этиловом спирте, промывали дистиллированной водой по 30 с 3 раза. Затем окрашивали в течение 1 ч альциановым голубым (Alcian blue; Sigma, США), который готовили, растворяя 1 г порошка в 100 мл 0.1 н HCl. После этого образцы промывали проточной водой 2 мин и заливали дистиллированной водой. Полученный результат визуализировали в видимом свете с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа AxioObserver Z1 (Carl Zeiss, Германия).

Для исследования способности интактных МСК кошки к дифференцировке в адипо- и остеогенном направлениях клетки 3-го пассажа высевали в 12-луночные планшеты ($n = 3$) в концентрации 3×10^4 кл./лунка и выращивали в ростовой среде до получения 80% монослоя.

Адипогенную дифференцировку МСК проводили в течение 21 сут в среде, содержащей DMEM High glucose (ПанЭко, Россия), 10% сыворотки плодов коров с добавлением 100 мкг/мл стрептомицина, 100 ед./мл пенициллина, 2 мМ L-глутамина, 100 мкМ индометацина (Sigma, США), 1 мМ дексаметазона (Sigma, США), 10 мкг/мл инсулина (Sigma, США) и 500 мкМ 3-изобутил-1-метилксантина (IBMX). Смену среды проводили каждые 3 сут. Контролем служили МСК в культуре на ростовой среде без добавок.

Для изучения способности к адиподифференцировке генномодифицированных МСК кошки после образования 80% монослоя ростовую среду заменяли на адипогенную среду. Отрицательным контролем служили не трансфицированные МСК в культуре на ростовой

среде без добавок. Положительным контролем служили не трансфицированные МСК в соответствующей дифференцировочной среде.

Через 21 сут образцы окрашивали флуоресцентным липофильным красителем нильский красный (Sigma, США). Для этого удаляли питательную среду из лунок и фиксировали клетки 4%-ным раствором формалина («ПанЭко», Россия) 30 мин при комнатной температуре. Перед окрашиванием лунки тщательно промывали дистиллированной водой (3 раза по 5 мин). Для приготовления концентрированного раствора 50 мкг красителя растворяли в 1 мл диметилсульфоксида («Камхимком», Россия). Рабочий раствор получали разведением маточного раствора в 1000 раз фосфатно-солевом раствором Дюльбеко («ПанЭко», Россия). Ядра клеток докрашивали DAPI (1—2 мкг/мл; «Хеликон», Россия) в течение 5—10 мин при комнатной температуре. Далее образцы тщательно промывали фосфатно-солевым буфером («ПанЭко», Россия) для удаления не связавшегося красителя. Результаты оценивали под микроскопом AxioObserver Z1.

Для остеогенной дифференцировки МСК использовали среду α-МЕМ («ПанЭко», Россия), содержащую 10% сыворотки плодов коров, 100 нМ дексаметазона, 0.5 мкМ 2-фосфата аскорбиновой кислоты, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ L-глутамина. Контролем являлись МСК в культуре на ростовой среде без добавок. Через 21 сут для оценки прохождения остеодифференцировки использовали окрашивание по von Kossa. Перед окрашиванием из лунок планшета удаляли ростовую среду, клетки промывали 0.9%-ным раствором NaCl («ПанЭко», Россия) и фиксировали 4%-ным раствором формалина при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем лунки 3 раза тщательно промывали дистиллированной водой и заливали 2%-ным раствором $AgNO_3$ в дистиллированной воде, оставляли в темноте на 10 мин, затем выставляли на яркий свет. Через 1 ч раствор $AgNO_3$ заменяли дистиллированной водой. Результат визуализировали под микроскопом AxioObserver Z1.

Дифференцировку интактных и генномодифицированных МСК кошки в остеонаправлении проводили по методике, описанной выше. Отрицательным контролем при проведении эксперимента служили не трансфицированные МСК в культуре на ростовой среде без добавок. Положительным контролем служили не трансфицированные МСК в соответствующей дифференцировочной среде. Экспериментальная группа — трансфицированные МСК, растущие на остеогенной среде.

Для количественного определения отложения кальция во внеклеточном матриксе (признак остеогенной дифференцировки) в эксперименте с генномодифицированными МСК кошки применяли окрашивание с помощью ализаринового красного S («ПанЭко», Россия). Зафиксированные в 4%-ном формалине образцы промывали фосфатным буфером и инкубировали 5 мин с 2%-ным раствором красителя. После чего отмывали дистиллированной водой. Экстракцию связавшегося ализаринового красного S осуществляли раствором 10%-ной уксусной кислоты в течение 15 мин при покачивании на шейкере. Оптическую плотность полученного раствора определяли на спектрофотометре Infinite M200 pro (TECAN, Австрия) при длине волны 415 нм.

Формирование капилляроподобных структур МСК на матриксе Matrigel™. Матрикс Matrigel™ («ПанЭко», Россия) размораживали на льду в течение ночи, после чего его разводили предварительно охлажденными наконечниками в соотношении 1:100 холодной средой DMEM («ПанЭко», Россия). В охлажденные 96-луночные планшеты вносили раствор по 50 мкл на лунку равномерно распределяя по дну покачиванием. Для полимеризации геля планшет инкубировали при 37 °С в течение 30—60 мин. Далее промывали лунки 0.9%-ным NaCl и вносили клетки в концентрации 10 000 кл/лунка. Положительным контролем для трансфицированных МСК кошки служили интактные МСК, высеянные среду с Matrigel™, содержащую 2% сыворотки крови плодов коров и 10 нг/мл рекомбинантного белка VEGF (Sigma, США). Отрицательным контролем являлись интактные МСК кошки, высеянные на ту же среду с 2% сыворотки крови плодов коров (обедненная среда). Экспериментальными являлись генномодифицированные МСК кошки, которые росли на среде с 2% сыворотки крови плодов коров. Планшет помещали в CO_2-инкубатор при 37 °С и влажной атмосфере, содержащей 5% CO_2.

Формирование капилляроподобных структур оценивали через 16 ч культивирования с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа AxioObserver Z1, оценивая число сформировавшихся узлов ветвления в 10 полях зрения.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием методов первичного статистического анализа при помощи программы Excel 2016, результаты которого представлены в виде среднего арифметического значения по выборке и его стандартного отклонения. Вторичную статистическую обработку данных проводили с помощью непараметрического U-критерия Манна—Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости $P \leqslant 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наши исследования показали, что полученные из биоптата клетки несли маркеры МСК на клеточной мембране (Thy-1: 97 ± 3% и CD29: 55 ± 6%). Маркеры гематопоэтических стволовых клеток отсутствовали (CD34 и CD45). Согласно литературным источникам, на клеточной мембране МСК адипогенного происхождения человека и кошки должны присутствовать маркеры Thy-1 (он же CD90) и CD29 (Kim et al., 2017). Кроме этого, они должны нести на своей клеточной мембране маркеры CD105, CD73, CD44, HLA-ABC. При этом должны отсутствовать маркеры CD45, CD34 и HLA-DR (Закирова и др., 2021). Имеющиеся у нас в распоряжении антитела к CD105, CD44, CD73, HLA-ABC не метили клетки, т. к., вероятно, не имели афинности к МСК кошки (данные

не представлены), но окрашивали МСК человека. Поэтому для подтверждения принадлежности выделенных нами клеток к пулу МСК мы дифференцировали их *in vitro* в адипоциты, остеобласты и хондробласты, т. к. такие рекомендации были приняты для характеристики МСК животных (Gugjoo et al., 2019). Дифференцировка, проведенная по трем классическим направлениям (адипо, остео и хондро), подтвердила их биологическую принадлежность: происходило отложение депозитов кальция во внеклеточный матрикс, образование хрящеподобных структур и формирование липидных капель при культивировании в дифференцировочных средах (рис. 1).

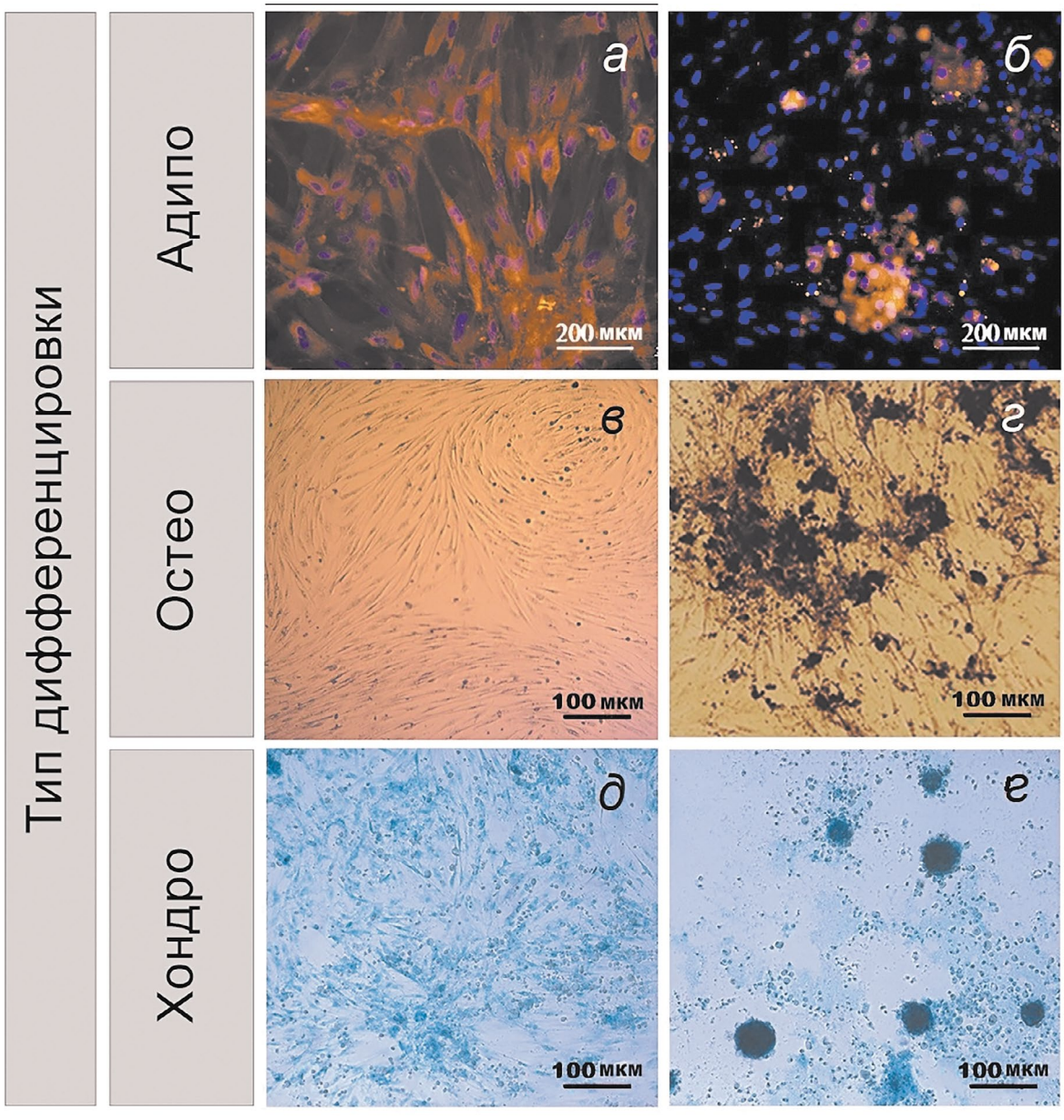


Рис. 1. Результаты дифференцировки МСК кошки в трех направлениях: адипогенном (адипо), остеогенном (остео) и хондрогенном (хондро). *а, в, д* — контрольные клетки, выросшие на ростовой среде без добавок; *б, г, е* — клетки, выросшие на соответствующей дифференцировочной среде. Липидные капли, образованные при прохождении адиподифференцировки в клетках, окрашиваются в желто-оранжевый цвет при использовании красителя нильский красный (*б*), чего не наблюдается в контрольных клетках (*а*). Ядра клеток в обоих случаях докрашены DAPI. При остеодифференцировке МСК кошек депозиты кальция окрашиваются раствором $AgNO_3$ в коричнево-черный цвет (*г*), у контрольных клеток такого окрашивания нет (*в*). После хондродифференцировки МСК хрящеподобные структуры окрашиваются раствором альцианового голубого в темно-синий цвет (*е*) в отличие от контроля (*д*)

Следовательно, выделенные нами из жировой ткани кошек клетки являются МСК.

Электрофорез, проведенный в 1%-ном агарозном геле, показал, что была получена заявленная ДНК-конструкция (рис. 2). После рестрикции на геле имеются две полосы, наибольший фрагмент находится на уровне 4500 пар оснований (п. о.), меньший фрагмент с длиной около 1200 п. о. соответствует участку плазмиды, полученному после воздействия рестриктаз SpeI и SmaI. Сумма длин полос соответствует 5700 п. о., что примерно совпадает с длиной конечного конструкта по карте плазмиды pBUDK- fcVEGF164-fcFGF. Это доказывает соответствие молекулярной массе созданной генетической плазмидной ДНК-конструкции. Содержание эндотоксина составляет $\leqslant 0.04$ EU/мг.

После проведенной трансфекции МСК кошки пДНК анализ экспрессии целевых генов (ПЦР-РВ) показал 20-кратное увеличение экспрессии мРНК генов *vegf164* и *fgf2* через 24 ч в МСК, трансфицированных плазмидой pBUDK-fcVEGF164-fcFGF2, а через 48 ч — 30-кратное по сравнению с нативными МСК (рис. 3). Таким образом, подтверждено наличие сверхэкспрессии генов *vegf164* и *fgf2* после *in vitro* трансфекции МСК кошек pBUDK-fcVEGF164-fcFGF2.

Результаты проведенных экспериментов показали, что МСК на матриксе Matrigel™ обладают следующей способностью образовывать узлы ветвления капилляроподобных структур: МСК, трансфицированные плазмидной ДНК, образуют в среднем 42 ± 5 узла ветвления ($P \leqslant 0.005$ по сравнению с отрицательным контролем МСК), интактные МСК кошки, выращенные на обогащенной среде с добавлением белка VEGF164 (положительный контроль), образуют 38 ± 5 ($P \leqslant 0.005$ по сравнению с отрицательным контролем) узлов ветвления, а интактные МСК кошки, выросшие на обедненной среде — 17 ± 5 узлов ветвления (рис. 4). Количество образовавшихся узлов ветвления в экспериментальной группе и группе положительного контроля достоверно не отличаются друг от друга. Мы предполагаем, что увеличение количества узлов ветвления в группе генномодифицированных pBUDK-fcVEGF164-fcFGF2 МСК обусловлено синтезом белков VEGF164 и FGF2 и их непосредственным влиянием на биологическую активность клеток.

Известно, что белок VEGF является стимулятором ангиогенеза. Он активирует пролиферацию и дифференцировку эндотелиоцитов и таким образом влияет на развитие новых кровеносных сосудов (ангиогенез) и выживание незрелых кровеносных сосудов (сосудистая поддержка) (Samatoshenkov et al., 2019). Так же белок VEGF влияет на пролиферацию и миграцию перицитов (Shaw et al., 2024). Другой ген, входящий в состав плазмиды, кодирует белок FGF2. Это ключевой сигнальный белок, участвующий в росте, развитии, регенерации тканей, заживлении ран, ангиогенезе (формировании сосудов) и нейрогенезе (Murakami et al., 2008; Nickle et al., 2024).

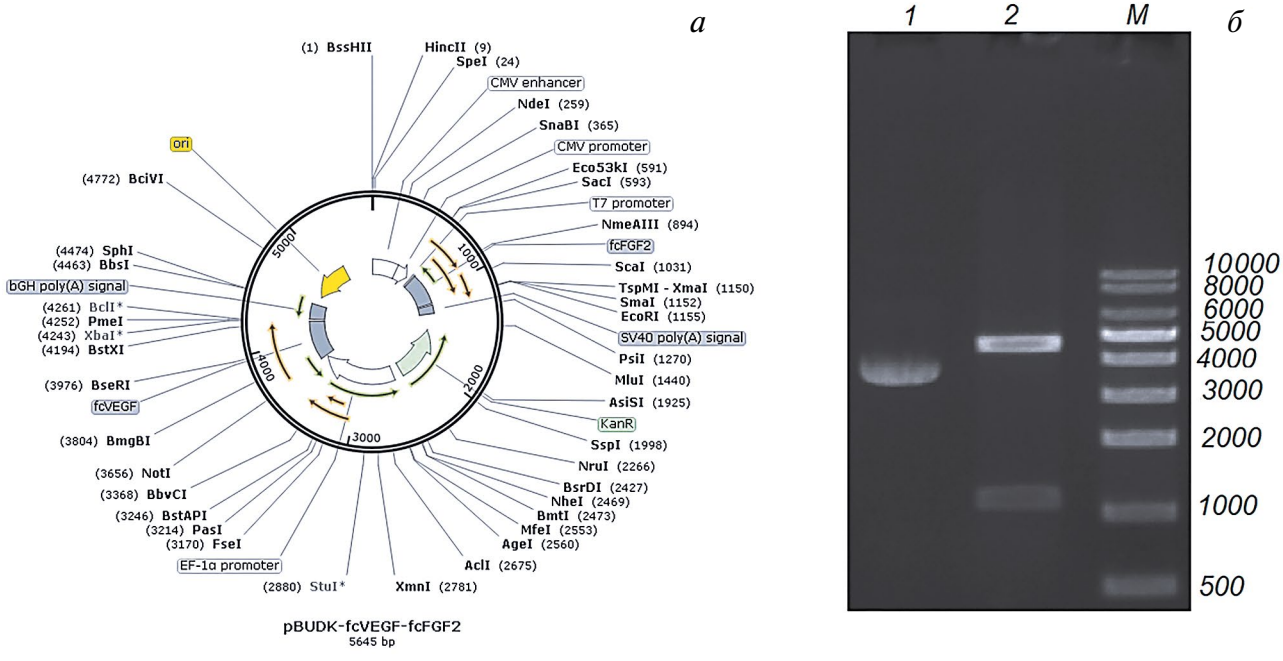


Рис. 2. Карта плазмидной ДНК pBUDK-fcVEGF164-fcFGF2 (*а*) и электрофореграмма плазмидной ДНК в 1%-ном агарозном геле (*б*). Полосы (*б*): *1* — интактная плазмидная ДНК pBUDK-fcVEGF164-fcFGF2, *2* — плазмидная ДНК после рестрикции SpeI и SmaI, *M* — маркер длин фрагментов ДНК (ThermoScientific, США), справа указано число пар оснований ДНК, соответствующее каждой полосе маркера

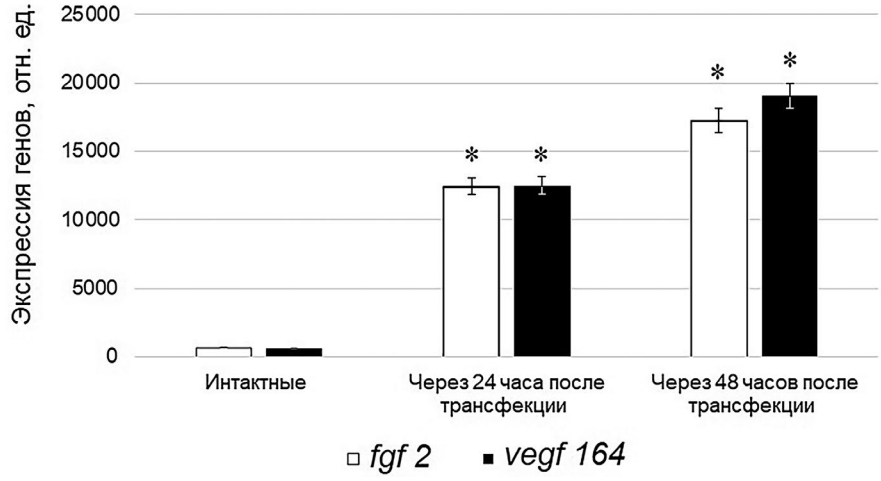


Рис. 3. Относительный уровень экспрессии генов *fgf2* и *vegf164* в МСК кошки после трансфекции плазмидой pBUDK-fcVEGF164-fcFGF2 через 24 и 48 ч по сравнению с интактными МСК (контроль). Различия с контролем достоверны (*) при $P \leqslant 0.005$ ($n = 3$)

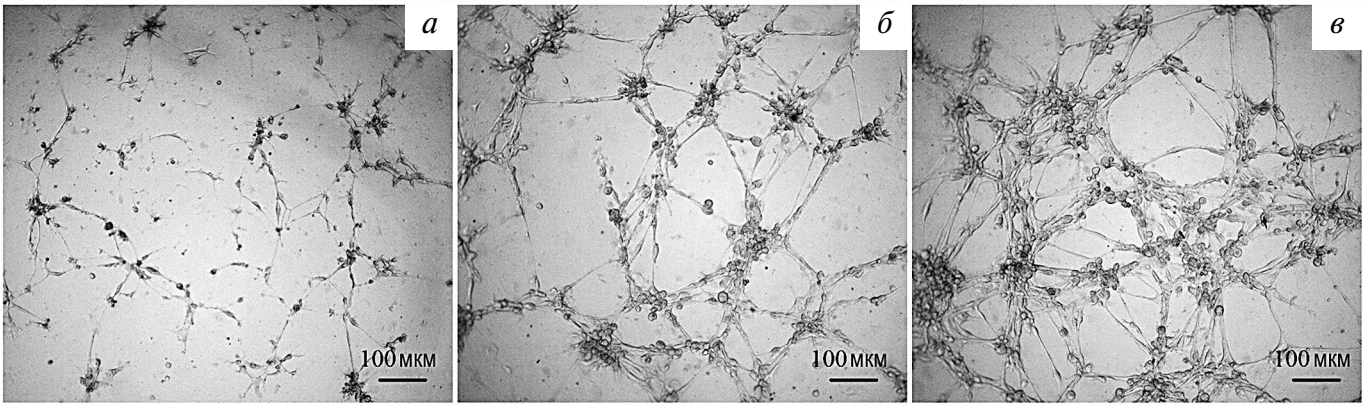


Рис. 4. Формирование узлов ветвления МСК кошки. *а* — Интактные МСК, выросшие на обедненной среде (отрицательный контроль). *б* — Интактные МСК, выросшие на обогащенной среде (положительный контроль). *в* — МСК после трансфекции плазмидой pBUDK-fcVEGF164-fcFGF2, выросшие на обедненной среде

Анализ остеодифференцировки после окрашивания ализариновым красным S контрольных и трансфицированных МСК показал, что оптическая плотность (D) контрольных образцов составила 0.144 ± 0.006 усл. ед. После прохождения остеодифференцировки у интактных МСК показатель D составил 0.785 ± 0.06 ($P \leqslant 0.005$ по сравнению с контролем), а у генномодифицированных МСК — 0.8465 ± 0.036 ($P \leqslant 0.005$ по сравнению с контролем). Следует отметить, что значения D после дифференцировки у интактных и трансфицированных клеток не отличались друг от друга. Это говорит о незначительной разнице этих образцов способностей откладывать кальций и, следовательно, о незначительном влиянии плазмиды pBUDK-fcVEGF164-fcFGF2 на процессы остеодифференцировки МСК кошки. Между тем существуют данные, полученные *in vivo*, о положительном влиянии белка VEGF на образование костной ткани (Kakudo et al., 2006; Rumney et al., 2019).

Сравнение результатов адиподифференцировки говорит о том, что генномодифицированные МСК так же, как и интактные МСК, накапливают внутриклеточные липиды под влиянием компонентов дифференцировочной среды (рис. 5). Генетическая модификация МСК кошки не вносит изменений в дифференцировку в этом направлении.

Таким образом, в исследованиях *in vitro* разработанная плазмидная конструкция pBUDK-fcVEGF164-fcFGF2 способствует формированию капилляроподобных структур МСК после трансфекции, но не влияет на остеодифференцировку и адиподифференцировку МСК. Полученные данные позволяют судить о перспективности применения ее в качестве лекарственного препарата для лечения травм мягких тканей кошек.

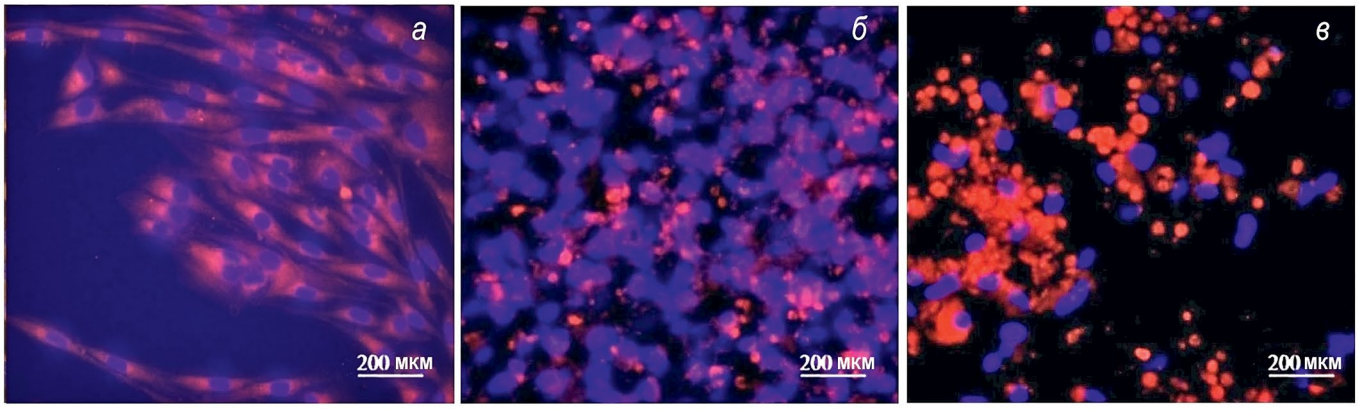


Рис. 5. Адипогенная дифференцировка МСК кошки. *а* — Интактные МСК кошки (контроль); *б* — интактные МСК кошки после адиподифференцировки; *в* — МСК кошки после трансфекции плазмидой pBUDK-fcVEGF164-fcFGF2 и адиподифференцировки; вновь образованные жировые включения в клетках окрашены липофильным красителем нильский красный в красно-оранжевый цвет, ядра на препаратах докрашены DAPI (синий цвет)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Закирова Е. Ю., Аймалетдинов А. М., Тамбовский М. А., Ризванов А. А.* 2021. Сравнительная характеристика линий мезенхимных стволовых клеток различных видов животных. Цитология. Т. 63. № 2. С. 139. (Zakirova E. Yu., Aimaletdinov A. M., Tambovsky M. A., Rizvanov A. A. 2021. Comparative characteristics of mesenchymal stem cell lines from different animal species. Cell Tiss. Biol. (Tsitologiya). V. 63. № 2. P. 139). https://doi.org/10.31857/S0041377121020097
2. *Bezsonov E., Chernyi N., Saruhanyan M., Shimchenko D., Bondar N., Gavrilova D., Baig M. S., Malogolovkin A.* 2025. Gene Therapy approaches for atherosclerosis focusing on targeting lipid metabolism and inflammation. Int. J. Mol. Sci. V. 26. Art. ID: 6950. https://doi.org/10.3390/ijms26146950
3. *Cavallaro U., Tenan M., Castelli V., Perilli A., Maggiano N., Van Meir E. G., Montesano R., Soria M. R., Pepper M. S.* 2001. 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. V. 82. P. 619. https://doi.org/10.1002/jcb.1190
4. *Gallo M. C., Elias A., Reynolds J., Ball J. R., Lieberman J. R.* 2025. Regional gene therapy for bone tissue engineering: a current concepts review. Bioengineering. V. 12. Art. ID: 120. https://doi.org/10.3390/bioengineering12020120
5. *Gugjoo M. B., Fazili M. R., Gayas M. A., Ahmad R., Dhama K.* 2019. Animal mesenchymal stem cell research in cartilage regenerative medicine — a review. Vet. Q. V. 39. P. 95. https://doi.org/10.1080/01652176.2019.1643051
6. *Jaén M. L., Vilà L., Elias I., Jimenez V., Rodó J., Maggioni L., Ruiz-de Gopegui R., Garcia M., Muñoz S., Callejas D., Ayuso E., Ferré T., Grifoll I., Andaluz A., Ruberte J., Haurigot V., Bosch F.* 2017. Long-term efficacy and safety of insulin andglucokinase gene therapy for diabetes: 8-year follow-up in dogs. Mol. Therapy: Methods Clin. Devel. V. 6. P. 1. https://doi.org/10.1016/j.omtm.2017.03.008
7. *Kakudo N., Kusumoto K., Wang Y. B., Iguchi Yu, Ogawa Yu.* 2006. Immunolocalization of vascular endothelial growth factor on intramuscular ectopic osteoinduction by bone morphogenetic protein-2. Life Sci. V. 79. P. 1847. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.06.033
8. *Kim H. R., Lee J., Byeon J. S., Gu N. Y., Lee J., Cho I. S., Cha S.* H. 2017. Extensive characterization of feline intra-abdominal adipose-derived mesenchymal stem cells. J. Vet. Sci. V. 18. P. 299. https://doi.org/10.4142/jvs.2017.18.3.299
9. *Murakami M., Nguyen L. T., Hatanaka K., Schachterle W., Chen P. Y., Zhuang Z. W., Black B. L., Simons M.* 2011. FGF-dependent regulation of VEGF receptor 2 expression in mice. J. Clin. Invest. V. 121. P. 2668. https://doi.org/10.1172/JCI44762

10. *Murakami M., Nguyen L. T., Zhuang Z. W., Moodie K, Carmeliet P., Stan R., Simons M.* 2008. The FGF system has a key role in regulating vascular integrity. J. Clin. Invest. V. 118. P. 3355.
https://doi.org/10.1172/JCI35298

11. *Nickle A., Ko S., Merrill A. E.* 2024. Fibroblast growth factor 2. Differentiation. V. 139. PMID: 37858405.
https://doi.org/10.1016/j.diff.2023.10.001

12. *Petersen-Jones S. M., Beckwith-Cohen B.* 2025. Gene therapy advances using canine and feline animal models of inherited retinal degeneration. Eye (Lond). V. 39. P. 2143.
https://doi.org/10.1038/s41433-025-03825-y

13. *Popova I. Yu., Grebennikova T. A., Tiulpakov A. N., Kulikova K. S., Rozhinskaya L. Y., Belaya Zh. E.* 2018. Rare genetic diseases of the bone tissue: the case of a family with osteogenesis imperfecta and X-linked hypophosphataemia. Osteoporosis Bone Diseases. V. 21. P. 28. (In Russ.).
https://doi.org/10.14341/osteo9756

14. *Rumney R. M., Lanham S. A., Kanczler J. M., Kao A. P., Thiagarajan L., Dixon J. E., Tozzi G., Oreffo R. O.* 2019. In vivo delivery of VEGF RNA and protein to increase osteogenesis and intraosseous angiogenesis. Sci Rep. V. 9. P. 17745.
https://doi.org/10.1038/s41598-019-53249-4.

15. *Samatoshenkov I. V., Alekseeva K. V., Zhuravleva M. N.* 2019. Comparison of the effectiveness of angiogenesis stimulation in the ischemic limbs of rats when delivering a combination of VEGF and Ang genes in direct and cell-mediated ways. Creative Cardiol. V. 13. P. 250 (in Russ.).
https://doi.org/10.24022/1997-3187-2019-13-3-250-262

16. *Shaw P., Dwivedi S. K. D., Bhattacharya R., Mukherjee P., Rao G.* 2024. VEGF signaling: Role in angiogenesis and beyond. Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer. V. 1879. Art. ID: 189079.
https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2024.189079

17. *Stocker W. A., Olenick L., Maskey S., Skrombolas D., Luan H., Harrison S., Wilson M., Traas A., Heffernan M., Busfield S., Walton K., Harrison C.* 2025. Gene therapy with feline anti-Müllerian hormone analogs disrupts folliculogenesis and induces pregnancy loss in female domestic cats. Nat. Commun. V. 16. P. 1668.
https://doi.org/10.1038/s41467-025-56924-5

18. *Thampi P., Samulski R. J., Grieger J. C., Phillips J. N., McIlwraith C. W., Goodrich L. R.* 2022. Gene therapy approaches for equine osteoarthritis. Front. Vet. Sci. V. 9. Art. ID: 962898.
https://doi.org/: 10.3389/fvets.2022.962898

19. *Zakirova E. Y., Aimaletdinov A. M., Alexandrova N. M., Ganiev I. M., Sofronova S. A., Valeeva A. N., Garanina E. E., Rizvanov A. A.* 2020. Developing a species-specific genetic agent for treatment of skin defects in dogs. Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki (Russ.). V. 162. P. 361.
https://doi.org/10.26907/2542-064X.2020.3.361-380

20. *Zakirova E. Y., Malanyeva A. G., Rutland C. S., Aimaletdinov A.* 2022. Genetic therapy in veterinary medicine. BioNanoSci. V. 12. P. 1397.
https://doi.org/10.1007/s12668-022-00986-y