ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ТЕОРЕТИЧНИЙ РОЗДІЛ

УДК: 611.016.4+616-008.8:611.013.4

Бамбуляк А.В., Перебийніс П.П., Ткачик С.В., Яворський А.В.

ВИЗНАЧЕННЯ РІВНЯ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ BGP, COL 1, VEGF ПРИ ЗАМІЩЕННІ КІСТКОВИХ ДЕФЕКТІВ ТКАНИННИМИ ЕКВІВАЛЕНТАМИ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ НА ОСНОВІ ММСК-ЖТ

Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет», Чернівці, Україна

Кісткова тканина – одна з тих, що найчастіше підлягає трансплантації й поступається першістю лише компонентам крові. «Золотим стандартом» досі вважають пересадку аутологічної кістки, однак цей метод має певні недоліки, пов'язані з додатковим хірургічним втручанням. Альтернатива – використання аlogenної кістки, але в цьому разі є ризик імунологічного відторгнення донорської кістки і можливість інфікування реципієнта.

Перспективним напрямом заміщення об'ємних кісткових дефектів стало створення біоімплантатів на основі синтетичних біосумісних матеріалів, імпрегнованих факторами росту, що стимулюють ремоделювання кістки, або заселення стовбуровими (мультипотентними) клітинами. Найчастіше для заселення використовують мезенхімальні мультипотентні стромальні клітини (ММСК) [1-3]. Здатність ММСК диференціюватися в кілька видів мезенхімальних тканин і продукувати ними фактори росту робить ці клітини основними кандидатами при створенні тканинно-інженерних конструкцій для регенеративної медицини [4-6]. Джерелом ММСК можуть слугувати різні тканини, проте найчастіше в цій ролі використовують жирову тканину і кістковий мозок.

У фізіологічних умовах підвищення рівнів факторів росту і цитокінів призводить до міграції ММСК до місця ушкодження й утворення нової кістки за рахунок остеогенного диференціювання. З іншого боку, ММСК беруть участь у регуляції імунологічних реакцій, пов'язаних із процесами ремоделювання кісткової тканини, і викликають інгібування проліферації й продукування цитокінів антигенпрезентуючими клітинами і Т-лімфоцитами [7]. Нездиференційовані ММСК се-

кретують простагландин E2 (PGE2) і оксид азоту, індукуючи таким чином імунодепресивні ефекти, що розглядається як імовірний механізм запобігання відторгненню біоімплантата [8]. Здатність диференціювання ММСК людини в остеобластний фенотип у поєднанні з біоактивними матриксами може бути використана для заміщення ушкоджених кісток пацієнта внаслідок травм, остеопорозу, вроджених вад розвитку кісток і злоякісних новоутворів [9]. Заселення синтетичних матриксів аlogenних ММСК забезпечує основу для формування неокістки, тоді як імуномодуючі властивості ММСК дозволяють пригнічувати руйнівні впливи імунної відповіді хазяїна на імплантат [10].

Натепер накопичилися численні дані про вплив аlogenних диференційованих ММСК на імунну систему хазяїна. Однак відсутність стандартизованих дослідницьких випробувань вимагає подальших досліджень для оцінки впливу ММСК на імунну відповідь реципієнта і формування кісткової тканини, щоб оцінити доцільність і безпеку використання цих клітин при відновленні дефектів кісток [11].

Мета: з'ясувати рівень експресії генів BGP, Col 1, VEGF у ролі показників відновлення і мінералізації кістки при заміщенні кісткових дефектів тканинними еквівалентами кісткової тканини на основі мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин із жирової тканини.

Матеріали і методи дослідження

Експеримент проведено на щурах лінії Вістар масою 200–250 г, яких було поділено на VI груп: I група (контрольна) – 15 інтактних тварин; II група (порівняльна) – 22 щури, в яких відновлення дефекту відбувалося під кров'яним згуст-

ком; III група (25 тварин) – відновлення кісткового дефекту при застосуванні ММСК-ЖТ, що пройшли остеогенне диференціювання (ОД); IV група (28 тварин) – відновлення кісткового дефекту за допомогою ММСК-ЖТ з ОД + збагачена тромбоцитами плазма (ЗТП); V група (27 тварин) – відновлення кісткового дефекту за допомогою ММСК-ЖТ з ОД + „Колапан”; VI група (28 тварин) – відновлення кісткового дефекту за допомогою тканинного еквівалента кісткової тканини (ТЕК), що містив ММСК-ЖТ + ЗТП + „Колапан”. Модель кісткового дефекту формували в тім’яній ділянці черепа щурів. Далі в утворений дефект імплантували заготовлений матеріал (5x5 мм). З експерименту щурів виводили передозуванням наркозу нембуталу дозами 30-50 мг/кг маси в терміни 1, 2, 3 місяці. Для визначення мРНК застосовували метод ПЛР зі зворотною транскрипцією (ОГ-ПЛР) у ділянці кількісної оцінки експресії генів до маркеру BGP-кістковий gla-протейн; VEGF- фактор росту судинного ендотелію і Col 1 (колаген 1 типу) [12]. Загальну РНК виділяли з кісткової тканини стандартним фенол-хлороформ-гуанідинізоціанатним методом за допомогою набору реагентів „РНК-Екстрат” для виділення РНК із крові, тканин, культур клітин кількома етапами згідно з рекомендаціями виробника. Отримані дані опрацьовували за допомогою програми «Bio-RadCFXManager 3.0». Статистичне обчислення цифрових значень виконували на комп’ютері за стандартними статистичними методами [7], на основі яких були опрацьовані алгоритми обчислення введених у таблиці значень (операційна система «Linux», база даних «MySQL», мова програмування «Perl»).

Результати дослідження та їх обговорення

Рівень експресії генів BGP, Col 1, VEGF фрагментів кісткової тканини в ролі показників відновлення і мінералізації кістки показав, що в інтактних тварин I групи була максимальна кількість копій кДНК, що кодує ген BGP – 8,126; мінімальне значення цього показника було встановлено в щурів II групи (спонтанне загоєння кісткового дефекту) і у тварин V групи (відновлення кісткового дефекту за допомогою комбінації ММСК-ЖТ + „Колапан”) – 5,496 і 5,624 відповідно, що було в 1,5 раза менше, ніж у групі інтактних тварин, $p < 0,05$. Водночас у щурів III групи (відновлення дефекту за допомогою ММСК-ЖТ з ОД) і IV групи (відновлення кісткового дефекту за допомогою ММСК-ЖТ + ЗТП) кількість копій кДНК, що кодують ген BGP, становила 6,283 і 6,824, що було в 1,3 раза і в 1,2 раза менше відносно даних у щурів контрольної групи, $p > 0,05$. Слід зауважити, що в щурів VI групи, де для відновлення кісткового дефекту застосовували комбінацію ММСК-ЖТ + ЗТП + „Колапан”, кіль-

кість копій кДНК, що кодують ген BGP, становила 7,328, що було в 1,1 раза менше даних у інтактних тварин, $p > 0,05$.

Центральним механізмом репарації кісткової тканини є формування кісткового матриксу, структурна основа якого – колагенові волокна, переважно представлені колагеном 1 типу. За результатами досліджень встановлено, що на 30 добу спостережень у інтактних тварин I групи кількість копій кДНК, що кодують ген Col1, дорівнювала 5,094. Дещо вищим було значення цього параметра у тварин II групи (спонтанне відновлення дефекту) – 5,525, у щурів III групи (ММСК-ЖТ з ОД) – 5,728 і в IV групі (відновлення кісткового дефекту комбінацією ММСК-ЖТ + ЗТП) – 5,624, $p > 0,05$. Найбільшу кількість копій кДНК, що кодують ген Col 1, визначали в щурів V (ММСК-ЖТ + „Колапан”) і VI груп (ММСК-ЖТ + ЗТП + „Колапан”) – 6,247, $p > 0,05$ і 7,523, $p < 0,05$, відповідно, що може зумовлюватися наявністю колагену в остеопластичному матеріалі „Колапан”. Збільшення кількості копій кДНК, що кодують ген Col1 у групах тварин, де застосовувались ММСК-ЖТ у різних комбінаціях, у порівнянні з даними в інтактних тварин I групи, ймовірно пов’язане з початком формування волокнистої тканини і резорбції кісткових уламків.

VEGF-фактор росту судинного ендотелію, що стимулює ріст судин, також є однією з критичних умов для регенерації кістки і безпосередньо стимулює міграцію й диференціювання первинних остеобластів, а також є медіатором остеοіндуктивних факторів TGF- β 1, IGF, FGF-2.

Крім цього, в умовах *in vitro* й *in vivo* застосування тканинних еквівалентів кісткової тканини обмежено недостатністю утворення судин, що, своєю чергою, викликає дефіцит поживних речовин і призводить до утруднення утворення кісткової тканини [13].

За результатами досліджень встановлено (табл. 1), що в інтактних тварин I групи на 30 добу спостережень була максимальна кількість копій кДНК, що кодують VEGF, – 1,600. При спонтанному загоєнні кісткового дефекту (II група) і при відновленні кісткового дефекту комбінацією ММСК-ЖТ + ЗТП (IV група) кількість копій кДНК цього гена була в 1,3 раза менше і коливалася від 1,240 до 1,190 відповідно, $p > 0,05$.

У тварин при імплантації в кістковий дефект ММСК-ЖТ з остеогенним диференціюванням (III група) і при застосуванні комплексу ММСК-ЖТ + ЗТП + „Колапан” кількість копій кДНК гена VEGF становила 1,000 і 0,960, що було в 1,6 і 1,7 раза менше, ніж у інтактних тварин I групи. Найменша кількість копій кДНК гена VEGF досліджена в щурів, де для відновлення кісткового дефекту застосовували комплекс ММСК-ЖТ + „Колапан” – 0,700, що було у 2,3 раза менше порівняно з даними в інтактних тварин.

Таблиця 1
Кількість копій кДНК, що кодують гени BGP, Col 1, VEGF, регенеруючих кісткових фрагментів на 30 добу спостережень у групах експериментальних тварин

Копії кДНК	I група (контрольна)	II група (порівняльна)	III група (ММСК-ЖТ з ОД)	IV група (ММСК-ЖТ + ЗТП)	V група (ММСК-ЖТ + „Колапан”)	VI група (ММСК-ЖТ + ЗТП + „Колапан”)
BGP-ген	8,196±0,87	5,496±0,73°	6,283±0,80	6,824±0,82	5,624±0,74°°	7,328±0,75
Col 1-ген	5,094±0,65	5,525±0,52	5,728±0,56	5,624±0,58	6,247±0,65	7,523±0,68°° **, ■, ΔΔ
VEGF-ген	1,600±0,32	1,240±0,21	1,000±0,19	1,190±0,20	0,700±0,16°°	0,960±0,18

Примітки: 1. °° $p < 0,05$ – достовірна різниця значень відносно даних у I групі;
 2. ** $p_1 < 0,05$ – достовірна різниця значень відносно даних у II групі;
 3. ■ $p_2 < 0,05$ – достовірна різниця значень відносно даних у III групі;
 4. ΔΔ $p_3 < 0,05$ – достовірна різниця значень відносно даних у IV групі

За даними молекулярно-генетичного аналізу кількості копій кДНК, що кодують гени BGP, Col1 та VEGF, регенеруючих кісткових ферментів установлено подальше зростання кількості їхніх копій на 60 добу спостережень. За результатами проведених досліджень нами встановлено, що максимальне збільшення кількості копій BGP-гена досліджувалось у III, IV і VI групах: 7,394; 7,935 і 8,000 копій відповідно, $p > 0,05$. Зростання кількості копій Col1-гена у фрагментах кісткової тканини черепа експериментальних тварин у цей термін спостережень, яке було вище значень у інтактних тварин, свідчило про високе утворення колагену та було максимальним у тварин III групи, де імплантувалися ММСК-ЖТ, що пройшли остеогенне диференціювання, – 6,839 копій, $p > 0,05$; у IV групі, де для

заміщення кісткового дефекту застосовували комбінацію ММСК-ЖТ + ЗТП, – 6,735 копій та в VI групі, де використовували ММСК-ЖТ + ЗТП + „Колапан”, – 7,634 копій, $p < 0,05$. Найменшу кількість копій Col1 досліджували у фрагментах кісткової тканини тварин V групи – 6,000, $p > 0,05$.

На 60 добу спостережень (табл. 2) досліджували збільшення кількості копій кДНК, що кодують ген VEGF, регенеруючих кісткових ферментів, свідчило про продовження активного процесу судиноутворення в досліджуваних зразках [14]. Привертало увагу те, що максимальна кількість копій цього гена досліджувалась у зразках кісткової тканини тварин II групи – 1,360 копій, IV групи – 1,390 копій і VI групи – 1,350 копій, $p > 0,05$.

Таблиця 2
Кількість копій кДНК, що кодують гени BGP, Col 1, VEGF, регенеруючих кісткових фрагментів на 60 добу спостережень у групах експериментальних тварин

Копії кДНК	I група (контрольна)	II група (порівняльна)	III група (ММСК-ЖТ з ОД)	IV група (ММСК-ЖТ + ЗТП)	V група (ММСК-ЖТ + „Колапан”)	VI група (ММСК-ЖТ + ЗТП + „Колапан”)
BGP-ген	8,196±0,87	6,507±0,82	7,394±0,90	7,935±1,06	6,735±0,84	7,634±0,88
Col 1-ген	5,094±0,65	6,636±0,78	6,839±0,80	6,735±0,79	6,000±0,72	7,634±0,80°°
VEGF-ген	1,600±0,32	1,360±0,22	1,280±0,20	1,390±0,23	0,980±0,18	1,350±0,22

Примітка: °° $p < 0,05$ – достовірна різниця значень відносно даних у контролі.

Рівень експресії генів BGP, Col 1 і VEGF фрагментів кісткової тканини у ролі показників відновлення і мінералізації кістки щурів після 90 діб спостережень представлено в табл. 3.

Через 3 місяці спостережень визначали зниження рівня продукції BGP-гена у всіх досліджуваних групах, що пов'язано з тим, що основна частка BGP експресується у фазі формування кістки і бере участь у процесі мінералізації остеїда, що, за даними наших досліджень, припадало на 60-денний термін спостереження. Най-

більшу кількість копій BGP-гена на 90 добу спостережень визначали в піддослідних тварин II і III дослідних груп (6,280±0,70 і 6,380±0,72 відповідно), кількість яких не відрізнялася статистичною значущістю від даних у тварин контрольної групи, $p > 0,05$. При цьому, у тварин IV, V і VI груп кількість копій BGP-гена була в 1,5, 1,4 і 1,6 раза менше відносно даних у інтактних щурів, $p < 0,05$, та не відрізнялися статистичною значущістю між собою, $p_1 - p_4 > 0,05$.

Таблиця 3
Кількість копій кДНК, що кодують гени BGP, Col 1 і VEGF, регенеруючих кісткові фрагменти на 90 добу спостережень у групах експериментальних тварин

Копії кДНК	I група (контрольна)	II група (порівняльна)	III група (ММСК-ЖТ з ОД)	IV група (ММСК-ЖТ + ЗТП)	V група (ММСК-ЖТ + „Колапан”)	VI група (ММСК-ЖТ + ЗТП + „Колапан”)
BGP-ген	8,196±0,87	6,280±0,70	6,380±0,72	5,525±0,65°°	6,000±0,67°°	5,000±0,63°°
Col 1-ген	5,094±0,65	6,200±0,88	5,700±0,76	5,400±0,82	5,920±0,78	5,192±0,74
VEGF-ген	1,600±0,32	1,250±0,21	1,180±0,19	1,260±0,22	1,000±0,17	1,200±0,21

Примітка: °° $p < 0,05$ – достовірна різниця значень відносно даних у контролі.

Через 3 місяці досліджень визначали зниження активності продукції гена Col 1, що вказувало на завершення процесу резорбції кісткових уламків і наявність сформованої волокнистої тканини [15]. Привертало увагу те, що значення показника, який вивчали в усіх групах дослідження, дорівнювали даним у інтактних тварин I групи, $p > 0,05$, і між собою, $p_1 - p_4 > 0,05$, і коливалися від найменших значень у щурів VI групи – $5,192 \pm 0,74$, до максимальних у тварин II групи – $6,200 \pm 0,88$.

Через 90 діб експерименту досліджували високу активність продукції VEGF-гена в піддослідних тварин, яка дорівнювала даним у щурів контрольної групи, $p > 0,05$. При цьому, максимальна активність продукції VEGF-гена визначалась у тварин IV, II та VI груп і коливалася від $1,200 \pm 0,21$ копій у VI групі до $1,260 \pm 0,22$ копій у IV групі дослідження.

Висновки

Отже, за даними молекулярно-генетичного аналізу кількості копій кДНК, що кодують гени BGP, Col1 і VEGF, найбільш позитивні зміни, які сприяли відновленню, мінералізації кістки та повному закриттю дефекту, спостерігали при заміщенні кісткових дефектів зразками IV і VI.

Перспективи подальших досліджень

Плануємо провести низку молекулярних, біохімічних, гістологічних досліджень, щоб остаточно довести доцільність використання ММСК-ЖТ у реконструктивній медицині.

Список літератури

1. New S.E. Towards reconstruction of epithelialized cartilages from autologous adipose tissue-derived stem cells / New S.E., Ibrahim A., Guasti L. // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* – 2016. – Vol. 11, № 11. – P. 3078-3089.
2. All-trans retinoic acid modulates Wnt 3A-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells via activating the PI3K/AKT/GSK3 β signalling pathway / Zhang S., Chen X., Hu Y. [et al.] // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 2016. – Vol. 42, № 422. – P. 243-253.
3. Zimmermann J.A. Enhanced Immunosuppression of T cells by sustained presentation of bioactive interferon- γ within three-dimensional mesenchymal stem cell constructs / Zimmermann J.A., Hettiaratchi M.H., McDevitt T.C. // *Stem Cells Transl. Med.* – 2017. – Vol. 6, № 1. – P. 223-237.

4. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine / Bianco P., Cao X., Frenette P.S. [et al.] // *Nat. Med.* – 2013. – Vol. 19, № 1. – P. 35-42.
5. From "bench to bedside": current advancement on large-scale production of mesenchymal stem cells / [Bunpetch V., Wu H., Zhang S., Ouyang H.W.] // *Stem Cells Dev.* – 2017. – Vol. 26, № 9. – P. 1662-1673.
6. Perspectives on whole-organ assembly: moving toward transplantation on demand / [Soto-Gutierrez A., Wertheim J.A., Ott H.C., Gilbert T.W.] // *J. Clin. Invest.* – 2012. – Vol. 122, № 11. – P. 3817-3823.
7. The immunogenicity and immunomodulatory function of osteogenic cells differentiated from mesenchymal stem cells / Liu H., Kemeny, D.M., Heng B.C. [et al.] // *J. Immunol.* – 2006. – Vol. 176, № 5. – P. 2864-2871.
8. Luk F. Inflammatory conditions dictate the effect of mesenchymal stem or stromal cells on b cell function / Luk F., Carreras-Planella L., Korevaar S.S. // *Front. Immunol.* – 2017. – Vol. 8. – P. 1042.
9. Hardy J.G. Electrical stimulation of human mesenchymal stem cells on conductive nanofibers enhances their differentiation toward osteogenic outcomes / Hardy J.G., Villancio-Wolter M.K., Sukhvasi R.C. [et al.] // *Macromolecular Rapid Communications.* – 2015. – Vol. 36, № 1. – P. 1884-1890.
10. Lin G.L. Integration of BMP, Wnt, and notch signaling pathways in osteoblast differentiation / Lin G.L., Hankenson K.D. // *J. Cell Biochem.* – 2011. – Vol. 112, № 12. – P. 3491-3501.
11. First-in-human study and clinical case reports of the alveolar bone regeneration with the secretome from human mesenchymal stem cells / [Katagiri W., Osugi M., Kawai T., Hibi H.] // *Head Face Med.* – 2016. – Vol. 12, № 5. – P. 1-10.
12. Guarino V. Bioactive scaffolds for bone and ligament tissue / Guarino V., Causa F., Ambrosio L. // *Expert. Rev. Med. Devices.* – 2007. – Vol. 4, № 3. – P. 405-418.
13. Aubin J. Regulation of osteoblast formation and function / Aubin J. // *Rev. Endocrinol. Metab. Disord.* – 2001. – Vol. 2, № 1. – P. 81-94.
14. Feinberg A.W. Engineered tissue grafts: opportunities and challenges in regenerative medicine / Feinberg A.W. // *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* – 2012. – Vol. 4, № 2. – P. 207-220.
15. Histological examination on osteoblastic activities in the alveolar bone of transgenic mice with induced ablation of osteocytes / Li M., Hasegawa T., Hogo H. [et al.] // *Histol. Histopathol.* – 2013. – Vol. 28, № 3. – P. 327-335.

**Стаття надійшла
03.08.2019 р.**

Резюме

Кісткова тканина є однією з тих, що найчастіше підлягає трансплантації й поступається першістю лише компонентам крові. «Золотим стандартом» досі вважають пересадку аутологічної кістки, однак цей метод має певні недоліки, пов'язані з додатковим хірургічним втручанням. Альтернатива цьому – використання алогенної кістки, але в цьому разі є ризик імунологічного відторгнення донорської кістки і можливість інфікування реципієнта. Перспективним напрямом для заміщення об'ємних кісткових дефектів є створення біоімплантів на основі синтетичних біосумісних матеріалів, імпрегнованих факторами росту, що стимулюють ремоделювання кістки, або заселення стовбуровими (мультипотентними) клітинами. Найчастіше для заселення використовують мезенхімальні мультипотентні стромальні клітини.

Ключові слова: мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини жирової тканини, кістковий дефект, BGP-кістковий gla-протеїн, VEGF - фактор росту судинного ендотелію, колаген 1 типу.

Резюме

Костная ткань является одной из тех, которая наиболее часто подвергается трансплантации и уступает первенство лишь компонентам крови. «Золотым стандартом» до сих пор считается пересадка аутологичной кости, однако этот метод имеет определенные недостатки, связанные с дополнительным хирургическим вмешательством. Альтернативой является использование аллогенной кости, но в этом случае возникают риск иммунологического отторжения донорской кости и возможность инфицирования реципиента. Перспективным направлением для замещения объемных костных дефектов является создание биоимплантатов на основе синтетических биосовместимых материалов, импрегнированных факторами роста, которые стимулируют ремоделирование кости, или заселение стволовыми (мультипотентными) клетками. Чаще всего для заселения используют мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани, костный дефект, BGP-костный gla-протеин, VEGF - фактор роста сосудистого эндотелия, коллаген 1 типа.

UDC: 611.016.4+616-008.8:611.013.4

DYNAMICS OF INDICATORS OF MARKERS OF BONE METABOLISM IN BONE DEFECT REPLACEMENT FABRIC EQUIVALENTS OF BONE TISSUE ON THE BASIS OF MMSC-AT

Bambuliak A.V., Perebujnis P.P., Tkachuk S.V., Javorskiy A.V.

Higher state educational establishment of Ukraine "Bukovinian state medical university" Chernivtsi, Ukraine

Summary

Bone tissue is one of the most commonly transplantable and inferior to blood components only. The "gold standard" is still considered to be an autologous bone transplant, but this method has some drawbacks associated with additional surgery. The alternative is the use of allogeneic bone, but in this case there is a risk of immunological rejection of the donor bone and the possibility of infection of the recipient. A promising area for the replacement of volumetric bone defects is the creation of bioimplants based on synthetic biocompatible materials impregnated with growth factors that stimulate bone remodeling, or the settlement of stem (multipotent) cells. Most often, mesenchymal multipotent stromal cells are used for settlement.

The aim of the study: to find out the level of expression of BGP, Col 1, VEGF genes as indicators of bone repair and mineralization by replacement of bone defects with tissue equivalents of bone tissue based on multipotent mesenchymal stromal cells from adipose tissue.

Materials and methods. The experiment was conducted on the Wistar line rats, weighing 200-250 grams, which were divided into VI groups. A bone defect model was formed in the parietal section of the skull of rats. The formed defect implanted the harvested material. Reverse transcription PCR (OG-PCR) was used to quantify mRNA expression for the BGP-bone marker gla protein; VEGF is a vascular endothelial growth factor and Sol 1 (type 1 collagen). Total RNA was isolated from bone tissue by a standard phenol-chloroform-guanidinisothiocyanate method using a set of RNA-Extra reagents to isolate RNA from blood, tissues, cell cultures in several steps according to the manufacturer's recommendations. The data obtained were processed using Bio-Rad CFX Manager 3.0. The obtained results are processed statistically.

Research results and their discussion. The highest number of copies of the BGP gene, at 90 days of observations, was determined in experimental animals of the II and III experimental groups ($6,280 \pm 0,70$ and $6,380 \pm 0,72$, respectively), the number of which did not differ in statistical significance from the data in the animals of the control group, $p > 0.05$. However, in animals of IV, V and VI groups the number of copies of BGP-gene was 1.5, 1.4 and 1.6 times smaller in relation to the data in intact rats, $p < 0.05$, and did not differ in statistical significance, $p_1 - p_4 > 0.05$. After 3 months of studies determined the decrease in the activity of the production of the gene Col 1. It was noted that the value of the parameter studied in all study groups was equal to the data in intact animals of group I, $p < 0,05$ and among themselves, $p_1 - p_4 < 0,05$, and ranged from the lowest values in group VI rats - $5,192 \pm 0,74$, and maximum values in group II animals - $6,200 \pm 0,88$. After 90 days of experimental studies, the high activity of VEGF gene production in experimental animals, which was equal to the data in control rats, $p < 0,05$ was investigated. The maximum activity of VEGF gene production was determined in animals of groups IV, II and VI and ranged from $1,200 \pm 0,21$ copies in group VI to $1,260 \pm 0,22$ copies in group IV.

Conclusions. Thus, according to molecular genetic analysis of the number of cDNA copies encoding BGP, Col 1 and VEGF genes, the most positive changes that contributed to bone repair, mineralization, and complete closure of the defect were observed with the replacement of bone defects in IVa VI specimens.

Keywords: multipotent mesenchymal stromal cells of adipose tissue, bone defect, BGP-bone gla-protein, VEGF - vascular endothelial growth factor, type 1 collagen.