

УДК 606:61

***In vitro* ИССЛЕДОВАНИЕ МАТРИКСОВ НА ОСНОВЕ АДЕНОВИРУСНЫХ КОНСТРУКЦИЙ С ГЕНОМ *BMP2*, ПОЛИЛАКТИДНЫХ ГРАНУЛ, КОЛЛАГЕНА И ФИБРИНА**

© 2023 г. В. О. Мокроусова¹, *, И. А. Недорубова¹, А. Ю. Меглей¹, В. П. Басина¹, А. В. Васильев¹, Т. Е. Григорьев², Ю. Д. Загоскин², С. Н. Чвалун², Д. В. Гольдштейн¹, Т. Б. Бухарова¹

¹ФГБНУ “Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова”, Москва, 115522 Россия

²НИЦ “Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

*e-mail: victoria-mok@yandex.ru

Поступила в редакцию 11.07.2023 г.

После доработки 16.07.2023 г.

Принята к публикации 20.07.2023 г.

С использованием сканирующей электронной и флуоресцентной микроскопии, иммуоферментного анализа, спектрофотометрических методов и ПЦР в реальном времени оценены свойства ген-активированных матриксов на основе полилактидных гранул, коллагена и фибрина. Установлено, что эти матриксы не оказывают токсического действия на культуру мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и поддерживают клеточную адгезию. Аденовирусные конструкции с геном *BMP2* в составе матриксов обладают высокой трансдуцирующей способностью. В присутствии матриксов наблюдается эффективная остеогенная дифференцировка культур мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. Полученные матриксы могут быть использованы при разработке новых методов лечения дефектов костной ткани.

Ключевые слова: ген-активированные матриксы, коллаген, пористые полилактидные гранулы (PLA), PRP, аденовирусные конструкции, *BMP2*

DOI: 10.56304/S0234275823020096

В настоящее время для восполнения костных дефектов в регенеративной медицине используют неактивированные остеопластические материалы. Они решают задачу заполнения дефекта, но не обладают способностью стимулировать неоостеогенез. В целях повышения эффективности лечения создаются остеопластические материалы на основе биорезорбируемых матриц-носителей, активированных остеоиндуктивными факторами роста или векторами с генами этих факторов. Использование генетических конструкций более предпочтительно, поскольку обеспечивает продолжительную локализованную экспрессию остеогенных белков в резидентных клетках в зоне костного дефекта [1]. В качестве целевого гена для регенерации костной ткани перспективно использование

гена костного морфогенетического белка 2 (*BMP2*), продукт которого является остеоиндуктором [2]. Наиболее предпочтительным способом доставки генов в клетки является применение аденовирусных векторов, которые обеспечивают высокую эффективность трансдукции как делящихся, так и неделящихся клеток, и сводят к минимуму риск возникновения инсерционного мутагенеза [3]. В качестве матрикса для доставки вирусных конструкций в область костного дефекта может быть использована композиция из биорезорбируемых биосовместимых материалов – пористых полилактидных гранул (PLA-гранул), коллагена (Col) и фибринового сгустка на основе обогащенной тромбоцитами плазмы (Platelet-rich plasma, PRP) [4]. PLA-гранулы служат депо биоактивных компонентов [5], а коллаген и PRP позволяют сохранять форму материала в течение нескольких недель и являются источниками факторов, участвующих в регенерации костной ткани.

Цель работы: оценка свойств ген-активированных матриксов на основе PLA-гранул, коллагена и PRP, импрегнированных аденовирусными конструкциями с геном *BMP2 in vitro*.

Список сокращений: ВКМ – внеклеточный матрикс; ММСК – мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки; ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка; GFP – зеленый флуоресцентный белок; Alpl – щелочная фосфатаза; *Bmp-2* – костный морфогенетический белок-2; Орп – остеопонтин; *Spp1* – ген белка остеопонтин; PLA-гранулы – полилактидные гранулы; PRP – обогащенная тромбоцитами плазма; Col – коллаген.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Аденовирусные конструкции

В работе были использованы аденовирусные частицы, несущие кДНК генов *GFP* (Ad-GFP) и *hBMP2* (Ad-BMP2), которые наращивали в клеточной линии эмбриональных клеток почки человека (НЕК293), содержащей необходимую для репликации аденовируса E1-область. Клетки НЕК293 культивировали в ростовой среде ДМЕМ/F12 (“ПанЭко”, Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (PAA laboratories, Австрия), 0.584 мг/мл L-глутамин (“ПанЭко”), 5000 ед./мл пенициллина (“ПанЭко”) и 5000 мкг/мл стрептомицина (“ПанЭко”) в культуральных флаконах (SPL Lifesciences, Корея) при стандартных условиях 37°C в атмосфере 5% CO₂. Для характеристики вирусной суспензии определяли тканевую цитопатическую дозу (TCID). Нетрансдуцированные клетки НЕК293 высевали на 24-луночные планшеты. Клетки наращивали до полного монослоя в ростовой среде, а затем переводили на среду с 2% ЭТС. Далее клетки инкубировали с вирусной суспензией с разными разведениями (1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10000, 1 : 100000) в течение 2 ч, отмывали и добавляли ростовую среду с пониженным содержанием ЭТС (2%). Через 48 ч производили визуальный анализ цитопатического эффекта. Предельное разведение, при котором в 50% случаев наблюдается лизис клеток, было рассчитано с помощью Reed&Münch калькулятора. Матрицы импрегнировали суспензией аденовирусных конструкций с концентрацией 1280 TCID₅₀/мл.

Матрицы

В качестве матриц-носителей для генетических конструкций использовали PLA-гранулы, полученные из поли-L-лактоида (4032D, NatureWorks, США), размером 50–200 мкм и диаметром пор 2–10 мкм, коллаген 1 типа (“ИМТЕК”, Россия) и фибрин на основе PRP, которые были получены по ранее разработанным протоколам [6, 7]. PLA-гранулы объемом 100 мкл инкубировали с аденовирусными конструкциями (Ad-GFP или Ad-BMP2) в течение 1 ч при 37°C, после чего смешивали с 50 мкл коллагенового гидрогеля, добавляли 80 мкл PRP и для полимеризации 20 мкл раствора тромбина (Согтау, Польша) в растворе хлорида кальция (НПО “Микроген”, Россия). Таким образом были получены матрицы PLA/Col/PRP-Ad-GFP и PLA/Col/PRP-Ad-BMP2.

Клеточные культуры

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки выделяли из подкожно-жировой клетчатки крыс (ММСК ЖТ) по разработанной

ранее методике [8] и культивировали в ростовой среде ДМЕМ/F12, содержащей 10% ЭТС, 0.584 мг/мл L-глутамин, 5000 ед./мл пенициллина и 5000 мкг/мл стрептомицина при 37°C в атмосфере 5% CO₂. ММСК ЖТ высевали в 24-луночные планшеты с системой Transwell с размером пор 8 мкм (SPL Lifesciences). Для оценки остеогенной дифференцировки клетки культивировали в остеогенной среде ДМЕМ (“ПанЭко”), содержащей 10% ЭТС, 0.584 мг/мл L-глутамин, 0.05 мг/мл L-аскорбиновой кислоты (Sigma, США), 2.16 мг/мл β-глицерофосфата (Sigma), 5000 ед./мл пенициллина и 5000 мкг/мл стрептомицина в течение 14 сут.

МТТ-тест

Оценку жизнеспособности клеток проводили через 1 и 7 сут с помощью МТТ-теста. Клетки инкубировали с МТТ (0.5 мг/мл) в течение 2 ч, после чего среду с МТТ заменяли на ДМСО (“ПанЭко”) и перемешивали на шейкере (200 об/мин) в течение 20 мин. Затем оптическую плотность измеряли на планшетном спектрофотометре xMark (BioRad, США) при длине волны 570 и 620 нм, вычитая из величины, полученной при 570 нм, значение оптической плотности при 620 нм.

Окрашивание флуоресцентными красителями

ММСК ЖТ окрашивали РКН-26 (Red Fluorescent Cell Linker Kit, Sigma, США) в соответствии с инструкцией производителя и высевали на 24-луночные планшеты. Через 24 ч к клеткам помещали матрицы PLA/Col/PRP-Ad-BMP2. Для выявления живых клеток на 1 и 7 сутки ММСК ЖТ окрашивали Кальцеином АМ (Biotium, США) в концентрации 0.5 мкМ в течение 35 мин при 37°C. Для выявления мертвых клеток использовали DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) в концентрации 5 мкМ в течение 10 мин. Анализ проводили на автоматизированном имиджере Lionheart FX (BioTek Instruments Inc., США).

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)

Для оценки адгезионных свойств матрицы PLA/Col/PRP-Ad-BMP2 помещали на дно 24-луночных планшетов и добавляли суспензию ММСК ЖТ. Клетки культивировали на поверхности матриц в течение 7 дней в ростовой среде. По окончании эксперимента клетки фиксировали 2.5%-ном растворе глutarового альдегида при 4°C в течение 12 ч. После чего образцы промывали PBS (“ПанЭко”) и последовательно дегидратировали в растворах этанола возрастающей концентрации: 50, 75, 80, 90 и 96% при 4°C. Клеточную адгезию ММСК ЖТ на поверхности матриц оценивали методом сканирующей элек-

тронной микроскопии (СЭМ) с помощью микроскопа Phenom ProX (Phenom, Нидерланды). Ускоряющее напряжение составило 15 кВ.

ПЦР в режиме реального времени

Экспрессию генов оценивали методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Для этого по окончании инкубации ММСК ЖТ в присутствии ген-активированных матриксов PLA/Col/PRP-Ad-BMP2 выделяли общую РНК из клеток с помощью набора RNeasy Plus Mini kit (Qiagen, Германия), синтез кДНК на матрице РНК проводили с использованием “RevertAid” (Thermo Scientific, Германия) согласно протоколам производителя. ПЦР-РВ проводили в термоциклере BioRad iQ cycler (BioRad, США) с использованием интеркалирующего красителя “SYBR Green I” (“Евроген”, Россия). Уровни экспрессии мРНК анализируемого гена были нормированы на средние значения экспрессии референсных генов Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) и Actin- β (*Act β*).

Иммуноферментный анализ

Методом иммуноферментного анализа (ИФА) оценивали продукцию белков, которые секретируется ММСК ЖТ в среду. Для этого среду собирали на протяжении всего периода инкубации клеток в присутствии матриксов PLA/Col/PRP-Ad-BMP2 и замораживали при -80°C . Далее раствор белков концентрировали на центрифужных фильтрах Amicon (Merck Millipore, США) и исследовали с помощью набора Quantikine Elisa kit (R&D Systems, США) согласно инструкции производителя. Измерения проводили на планшетном спектрофотометре xMark (Bio-Rad).

Окрашивание ализариновым красным

Для оценки минерализации внеклеточного матрикса (ВКМ) ММСК ЖТ использовали водный раствор ализаринового красного (Sigma-Aldrich, США). После промывки PBS с рН 7.4 (“ПанЭко”) клетки фиксировали охлажденным 70%-ным этанолом при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 30 мин. Затем дважды промывали дистиллированной водой и окрашивали 2%-ным водным раствором ализаринового красного с рН 4.1 в течение 5 мин. Для последующей световой микроскопии культуры дважды промывали дистиллированной водой для удаления несвязанного красителя. Визуализацию проводили с помощью микроскопа ZEISS Observer.D1 (Zeiss, Германия).

Статистическая обработка

Программу SigmaPlot 12.0 (Германия) использовали для построения графиков и статистиче-

ской обработки результатов. Все данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение (mean \pm SD). Для сравнения групп использовались *t*-критерий Стьюдента или *U*-критерий Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при уровне ниже 5% ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно результатам МТТ-теста и флуоресцентной микроскопии ген-активированные матриксы PLA/Col/PRP-Ad-BMP2 не оказывают цитотоксического действия на ММСК ЖТ в течение всего исследуемого периода. На 7 сутки относительная жизнеспособность клеток, культивируемых в присутствии матриксов PLA/Col/PRP-Ad-BMP2, составляла $105.9 \pm 5.1\%$ (рис. 1а). Большая часть клеток окрашены Кальцеином АМ, что свидетельствует об их жизнеспособности (рис. 1б, 1с), а незначительное количество мертвых клеток, окрашенных DAPI, сопоставимо со значениями контрольной группы – в присутствии неактивированных матриксов PLA/Col/PRP.

На поверхности матриксов наблюдали эффективную клеточную адгезию (рис. 2). Клетки хорошо прикрепляются и распластываются на пористой поверхности PLA-гранул и среди волокон гидрогеля, сохраняя характерную фибробластоподобную форму.

Как Ad-GFP, так и Ad-BMP2, импрегнированные в матриксы PLA/Col/PRP, высвобождаются из матриксов и эффективно трансдуцируют ММСК ЖТ. Начиная с 7 дня инкубации ММСК ЖТ в присутствии матриксов PLA/Col/PRP-Ad-GFP были замечены единичные трансдуцированные клетки, количество которых увеличивалось к 14 дню (рис. 3).

В клетках, культивируемых в присутствии матриксов PLA/Col/PRP-Ad-BMP2, на 14 сутки наблюдали увеличение уровня экспрессии гена *BMP2* в 13.1 ± 0.4 раз по сравнению с клетками с PLA/Col/PRP и увеличение продукции белка BMP-2 до 387.7 ± 31.5 пг/мл (рис. 4а, 4б).

Инкубация ММСК ЖТ с PLA/Col/PRP-Ad-BMP2 приводит к стимуляции остеогенной дифференцировки клеток. Согласно данным, приведенным на рис. 5а, 5б наблюдается увеличение экспрессии генов *Alpl* в 5.6 ± 0.8 раз и *Spp1* в 16.8 ± 0.6 раз, а также повышение продукции белков *Alpl* в 4.6 ± 0.6 раз и *Opn* в 10.4 ± 1.2 раза по сравнению с клетками, культивируемыми в присутствии PLA/Col/PRP (рис. 5с, 5д). Кроме того, было обнаружено увеличение активности щелочной фосфатазы в 3.2 ± 0.1 раза по сравнению с неактивированным матриксом (рис. 5е), а также минерализация ВКМ ММСК ЖТ (рис. 5ф).

Таким образом, согласно результатам проведенных экспериментов матриксы, состоящие из

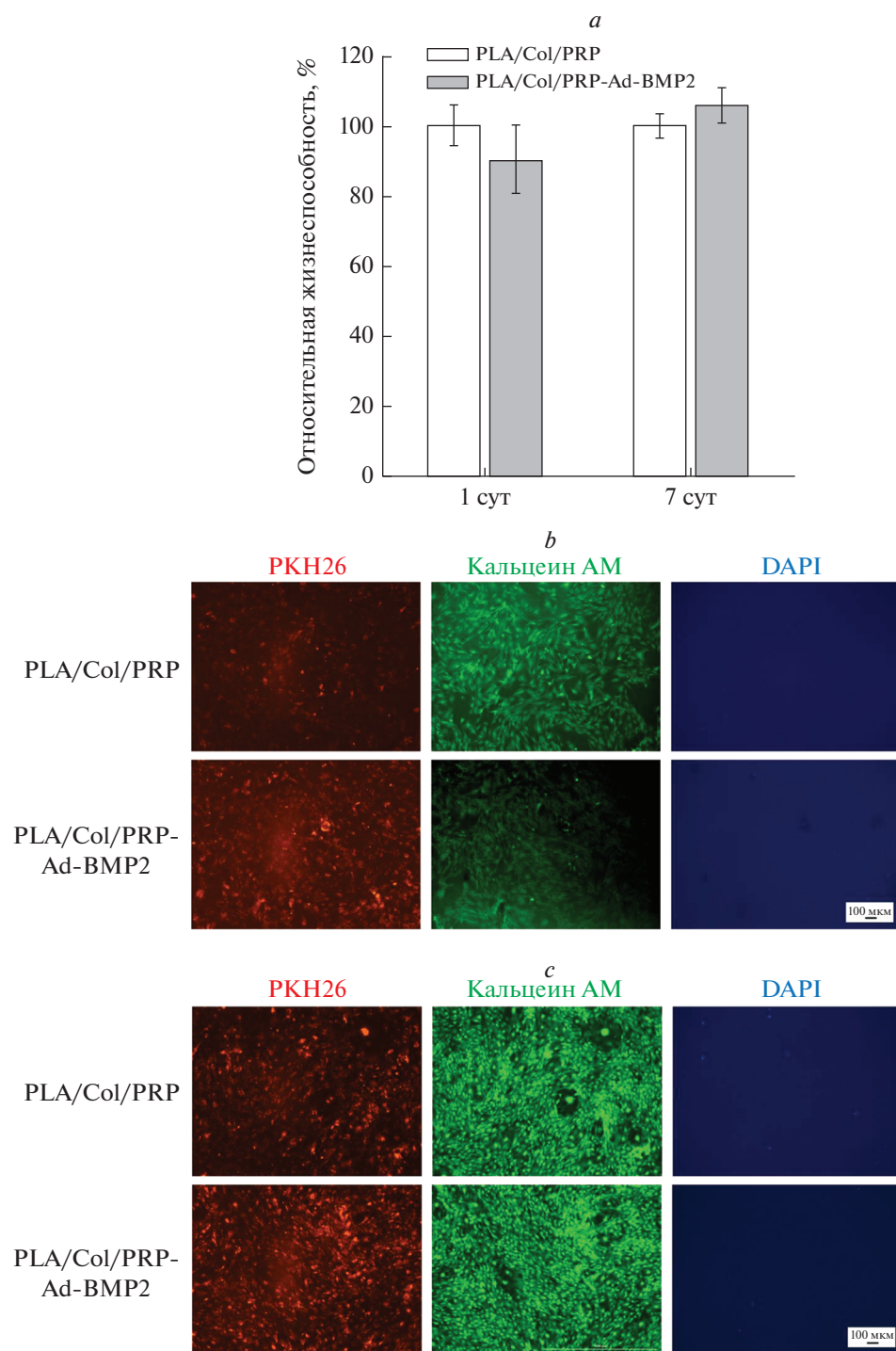


Рис. 1. Цитосовместимость матриц PLA/Col/PRP, импрегнированных Ad-BMP2, на ММСК ЖТ. *a* – МТТ-тест; *b* – флуоресцентная микроскопия ММСК ЖТ через 1 сут. инкубации с матриксами; *c* – флуоресцентная микроскопия ММСК ЖТ через 7 сут. инкубации с матриксами.

Fig. 1. Cytocompatibility of PLA/Col/PRP matrices impregnated with Ad-BMP2 on MSCs. *a* – MTT test; *b* – fluorescence microscopy of MSCs after 1 day of incubation with matrices; *c* – fluorescence microscopy of MSCs after 7 days of incubation with matrices

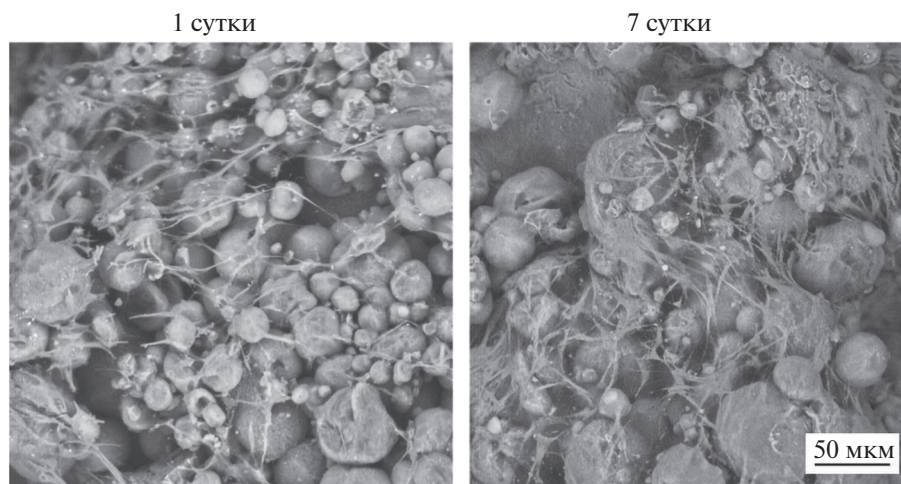


Рис. 2. Адгезия ММСК ЖТ на матрицах PLA/Col/PRP, импрегнированных Ad-BMP2. СЭМ.
Fig. 2. Adhesion of MSCs on PLA/Col/PRP matrices impregnated with Ad-BMP2. SEM.

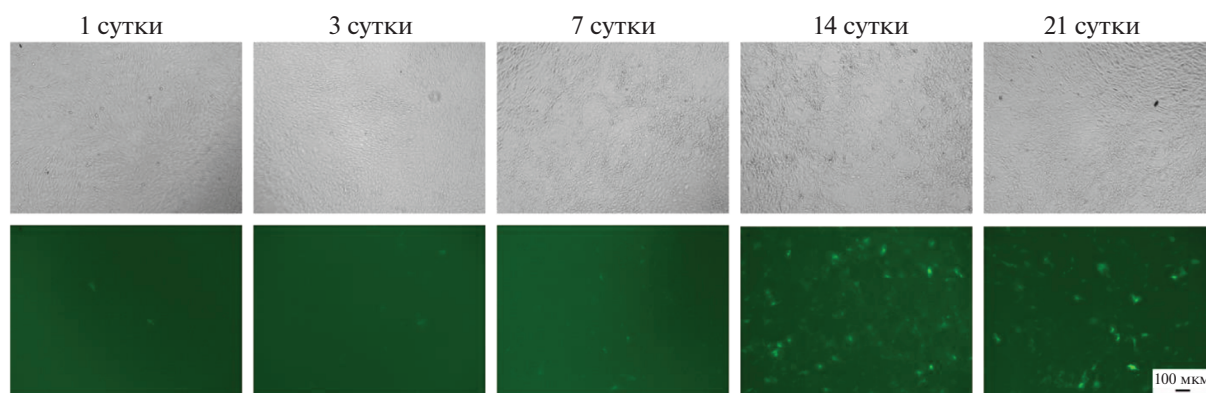


Рис. 3. Трансдуцирующая способность Ad-GFP, импрегнированных в матрицы PLA/Col/PRP на ММСК ЖТ. Флуоресцентная и фазово-контрастная микроскопия.
Fig. 3. Transducing ability of Ad-GFP impregnated into PLA/Col/PRP matrices on MSCs. Fluorescence and phase contrast microscopy.

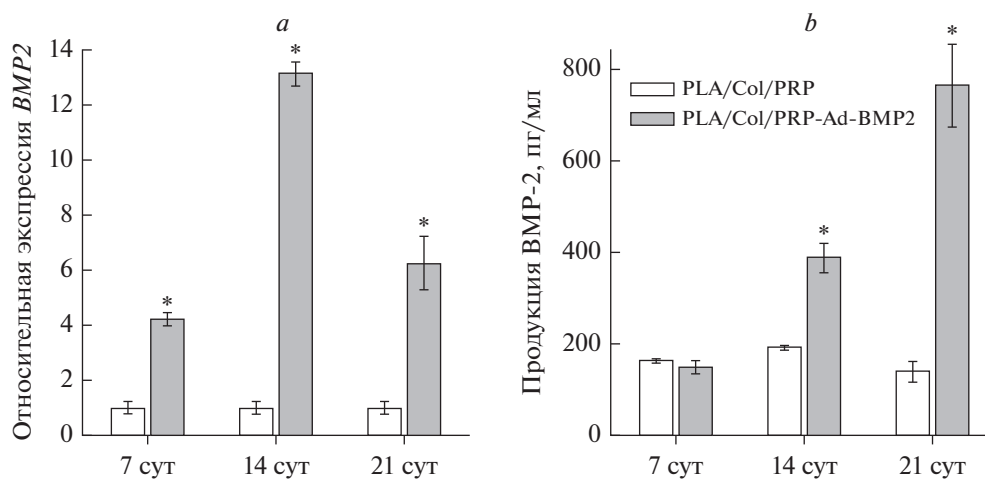


Рис. 4. Трансдуцирующая способность Ad-BMP2, импрегнированных в матрицы PLA/Col/PRP на ММСК ЖТ. *a* – Относительная экспрессия гена *BMP2*, ПЦР-РВ; *b* – продукция белка BMP-2, ИФА. * $p < 0.05$ (по сравнению с PLA/Col/PRP).

Fig. 4. Transducing ability of Ad-BMP2 impregnated into PLA/Col/PRP matrices on MSCs. *a* – Relative expression of the *BMP2* gene, real-time PCR; *b* – BMP-2 protein production, ELISA. * $p < 0.05$ (compared to PLA/Col/PRP).

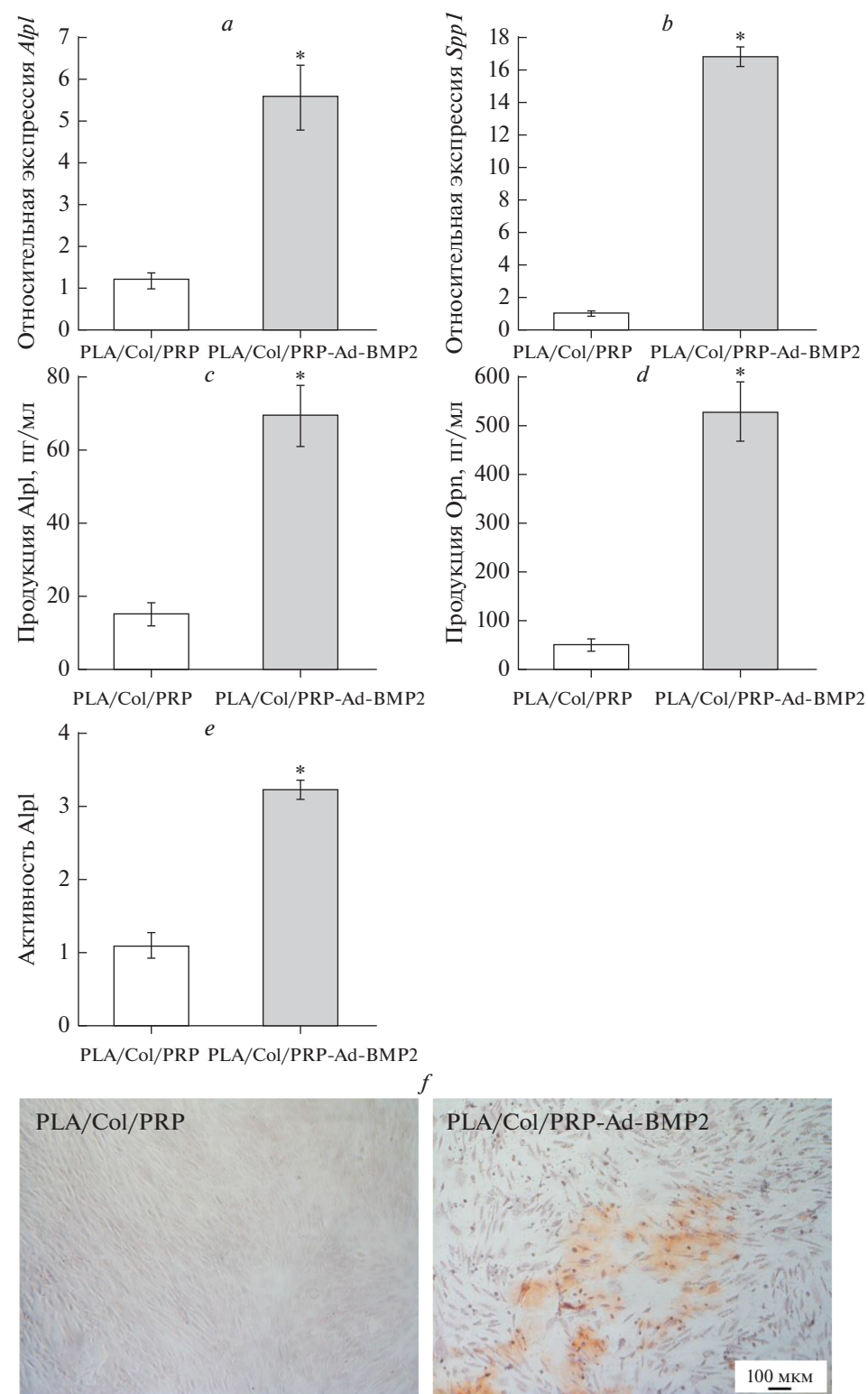


Рис. 5. Остеогенная дифференцировка ММСК ЖТ через 14 сут после инкубации с матриксами PLA/Col/PRP-Ad-BMP2. *a, b* – относительная экспрессия генов остеогенных маркеров, ПЦР-РВ; *c, d* – продукция белков остеогенных маркеров, ИФА; *e* – активность щелочной фосфатазы, спектрофотометрия * $p < 0.05$ (по сравнению с PLA/Col/PRP); *f* – минерализация ВКМ ММСК ЖТ, окрашивание ализариновым красным, световая микроскопия.

Fig. 5. Osteogenic differentiation of MSCs 14 days after incubation with PLA/Col/PRP-Ad-BMP2 matrices. *a, b* – relative expression of osteogenic markers genes, real-time PCR; *c, d* – production of osteogenic marker proteins, ELISA; *e* – alkaline phosphatase activity, spectrophotometry * $p < 0.05$ (compared to PLA/Col/PRP); *f* – mineralization of ECM MSCs, staining with alizarin red, light microscopy.

PLA/Col/PRP активированные геном *BMP2*, обладают высокой цитосовместимостью с ММСК ЖТ и выраженными остеоиндуктивными свойствами *in vitro*. Это означает, что созданные матриксы имеют высокий потенциал для использования в клинической практике и в будущем могут найти широкое применение в регенеративной медицине для лечения дефектов костной ткани.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 21-75-10147 в части *in vitro* исследования ген-активированных матриксов и в рамках государственного задания НИЦ “Курчатовский институт” в части получения полилактонидных гранул.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Balmayor E.R., van Griensven M.* Gene therapy for bone engineering. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2015, 3, 1–7.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00009>
2. *Chen D., Zhao M., Mundy G.R.* Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*, 2004, 22, 233–241.
<https://doi.org/10.1080/08977190412331279890>
3. *Warnock J.N., Daigre C., Al-Rubeai M.* *Viral Vectors for Gene Therapy: Methods in Molecular Biology*; 2011; ISBN 9781617790942.
4. *Etulain J.* Platelets in wound healing and regenerative medicine. *Platelets*, 2018, 29, 556–568.
<https://doi.org/10.1080/09537104.2018.1430357>
5. *Tyler B., Gullotti D., Mangraviti A., Utsuki T., Brem H.* Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2016, 107, 163–175.
<https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2016.06.018>
6. *Nedorubova I.A., Bukharova T.B., Mokrousova V.O., Khvorostina M.A., Vasilyev A.V., Nedorubov A.A., Grigoriev T.E., Zagoskin Y.D., Chvalun S.N., Kutsev S.I., Goldshtein D.V.* Comparative Efficiency of Gene-Activated Matrices Based on Chitosan Hydrogel and PRP Impregnated with BMP2 Polyplexes for Bone Regeneration. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, 23.
<https://doi.org/10.3390/ijms232314720>
7. *Vasilyev A.V., Bukharova T.B., Kuznetsova V.S., Zagoskin Y.D., Minaeva S.A., Grigoriev T.E., Antonov E.N., Osidak E.O., Galitsyna E.V., Babichenko I.I., Domogatskyf S.P., Popov V.K., Chvalunc S.N., Goldshtein D.V., Kulakova A.A.* Comparison of Impregnated Bone Morphogenetic Protein-2 Release Kinetics from Biopolymer Scaffolds. *Inorg. Mater. Appl. Res.*, 2019, 10, 1093–1100.
<https://doi.org/10.1134/S2075113319050332/FIGURES/4>
8. *Bukharova T.B., Arutyunyan I.V., Shustrov S.A., Alekseeva I.S., Fedyunina I.A., Logovskaya L.V., Volkov A.V., Rzhabinina A.A., Grigor'yan A.S., Kulakov A.A., Goldshtein D.V.* Tissue engineering construct on the basis of multipotent stromal adipose tissue cells and osteomatrix for regeneration of the bone tissue. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2011, 152, 153–158.
<https://doi.org/10.1007/S10517-011-1476-8/METRICS>

***In vitro* Study of Matrices Based on Adenoviral Constructs with the *BMP2* Gene, Polylactide Granules, Collagen and Fibrin**

V. O. Mokrousova^{a, #}, I. A. Nedorubova^a, A. Yu. Meglei^a, V. P. Basina^a, A. V. Vasilyev^a, T. E. Grigoriev^b, Y. D. Zagoskin^b, S. N. Chvalun^b, D. V. Goldshtein^a, and T. B. Bukharova^a

^aResearch Centre for Medical Genetics, Moscow, 115522 Russia

^bNational Research Centre “Kurchatov Institute”, Moscow, 123182 Russia

[#]e-mail: victoria-mok@yandex.ru

Abstract—The properties of gene-activated matrices based on polylactide granules, collagen and fibrin were evaluated using scanning electron and fluorescence microscopy, immunoenzymatic analysis, spectrophotometric methods and real-time PCR. It was found that these matrices have no toxic effect on the cultures of mesenchymal stem cells and support cell adhesion. Adenovirus constructs with the *BMP2* gene in matrices have a high transducing ability. Effective osteogenic differentiation of multipotent mesenchymal stromal cell cultures is observed in the presence of matrices. The obtained matrices can be used in the development of new methods for the treatment of bone defects.

Keywords: gene-activated matrices, collagen, porous polylactide granules (PLA), PRP, adenoviral constructs, *BMP2*