

УДК 606:61

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ГЕНАКТИВИРОВАННЫХ ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКИХ МАТРИКСОВ, ИМПРЕГНИРОВАННЫХ ПОЛИПЛЕКСАМИ С ГЕНОМ *VMP2*

© 2022 г. И. А. Недорубова^{1, *}, М. А. Хворостина^{1, 2}, В. О. Мокроусова^{1, 3}, А. В. Васильев^{1, 3},
Т. Е. Григорьев⁴, Ю. Д. Загоскин⁴, С. Н. Чвалун⁴, Т. Б. Бухарова¹, Д. В. Гольдштейн¹

¹ФГБНУ “Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова”, Москва, 115478 Россия

²ФНИЦ “Кристаллография и Фотоника” Российской академии наук, Институт фотонных технологий, Москва, 117333 Россия

³ФГБУ НМИЦ “Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии” Министерства здравоохранения России, Москва, 119021 Россия

⁴НИЦ “Курчатовский институт”, Москва, 123098 Россия

*e-mail: nedorubova.ia@gmail.com

Поступила в редакцию 17.07.2022 г.

После доработки 17.07.2022 г.

Принята к публикации 09.08.2022 г.

Поиск новых подходов для регенерации костной ткани — актуальная задача современной медицины. В ходе исследования разработаны генактивированные матриксы на основе хитозанового гидрогеля и полилактидных гранул, импрегнированные полиплексами с геном костного морфогенетического белка-2 (*VMP-2*). Показано, что полученные матриксы оказывают выраженное остеоиндуктивное действие на мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки крыс: наблюдается минерализация внеклеточного матрикса, увеличение экспрессии генов и продукции *Vmp-2* и щелочной фосфатазы. Таким образом, разработанные матриксы в перспективе могут быть использованы для восполнения дефектов костной ткани.

Ключевые слова: генактивированные матриксы, хитозан, полилактид, плазмидная ДНК

DOI: 10.56304/S0234275822050118

Повреждение костной ткани может быть вызвано широким спектром причин, таких как инфекции, травмы, метастатическое поражение, метаболические или генетические нарушения. Для лечения критических костных дефектов применяют остеопластические материалы или костные трансплантаты, полученные от пациента или донора. Однако существующие терапевтические подходы, как правило, не позволяют восстановить в полной мере структуру и функциональные свойства тканей в зоне дефекта. Для решения вопроса эффективной регенерации костной ткани в настоящее время разрабатываются подходы генной терапии. Они направлены на достижение терапевтических концентраций остеогенных индукторов за счет высокого уровня экспрессии их генов в резидентных клетках в зоне дефекта [1]. Для доставки це-

левых генов наиболее широко используют вирусные векторы с “отлаженными” природными механизмами проникновения в клетки. Однако вирусные частицы могут вызывать иммунный ответ [2], а некоторые векторы способствуют интеграции трансгена в геном хозяина, что приводит к риску инсерционного мутагенеза [3, 4]. В связи с этим все большее внимание уделяют невирусным способам доставки генов как более безопасным [5]. В качестве целевого гена наибольший интерес представляет ген костного морфогенетического белка-2 (*VMP2*) — одного из наиболее эффективных индукторов остеогенеза [6]. Для направленной доставки в зону костного дефекта и пролонгированного высвобождения плазмидные конструкции импрегнируют в биосовместимые биорезорбируемые материалы, получая так называемые генактивированные матриксы [7]. В качестве матриц-носителей для генной терапии костной ткани перспективно использование гидрогелей на основе природных полимеров, в том числе хитозана, обладающего бактерицидными, фунгицидными и противоопухолевыми свой-

Список сокращений: ВКМ — внеклеточный матрикс; ММСК — мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки; Хит 39% — хитозановые гидрогели со степенью деацетилирования хитозана 39%; Alpl — щелочная фосфатаза; *Vmp-2* — костный морфогенетический белок-2 крыс; PLA-гранулы — полилактидные гранулы; TF — TurboFect.

ствами [8]. Кроме того, хитозан может выступать в роли катионного полимера и способствовать доставке плазмид в клетки [9]. К существенным недостаткам гидрогелей хитозана относится низкий уровень прочности материала. Для улучшения механических характеристик матриц создаются комплексы на основе хитозанового гидрогеля с гранулами полилактида (PLA-гранулами). PLA-гранулы широко используют в медицине для производства хирургических нитей и штифтов, а также в системах доставки лекарств. Высокопористая структура PLA-гранул обеспечивает прорастание сосудов и миграцию остеогенных клеток-предшественников [10]. Кроме того, большая площадь поверхности внутри PLA-гранул позволяет использовать их для импрегнации плазмидными конструкциями в высоких концентрациях.

Целью работы было исследование остеогенных свойств генактивированных матриц на основе хитозанового гидрогеля и PLA-гранул, импрегнированных полиплексами с геном *BMP2*.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Полиплексы

Использовали плазмидную ДНК с целевым геном *BMP2* человека – TaqRFP-N-BMP2 (“Евроген”, Россия). Плазмиды амплифицировали в клетках *Escherichia coli* в среде LB Broth (Sigma-Aldrich, США) с 50 мкг/мл канамицина (Grisp, Португалия) и выделяли с использованием набора Zymo Pure II Plasmid Midiprep Kit (Zymo Research, США) по стандартному протоколу. Плазмиды TaqRFP-N-BMP2 и трансфицирующий агент TurboFect (TF; Thermo Fisher Scientific, США) в подобранном ранее соотношении: 2 мкг/мл к 4 мкл/мл [11] – инкубировали 20 мин при 37°C для образования полиплексов TaqRFP-N-BMP2/TF.

Матрицы

Хитозановые гидрогели с разной степенью деацетилирования хитозана (Хит 19.5%, Хит 39% и Хит 55%) и PLA-гранулы с диаметром пор от 2 до 10 мкм были получены по ранее разработанным протоколам [12]. Полиплексы инкубировали со стерильными PLA-гранулами, предварительно смоченными физиологическим раствором (“ПанЭко”, Россия), в течение 1 ч. Полученные PLA-гранулы смешивали с хитозановым гидрогелем и инкубировали при 37°C в течение 2 ч для гелеобразования.

Клеточные культуры

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) выделяли из подкожно-жировой клетчатки крыс по разработанной ранее методике [13]. ММСК культивировали в ростовой среде DMEM/F12 (“ПанЭко”), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (PAA Laboratories, Канада), 0.584 мг/мл L-глутамин (“ПанЭко”), 5000 ед/мл пенициллина (“ПанЭко”) и 5000 мкг/мл стрептомицина (“ПанЭко”) при 37°C в атмосфере 5% CO₂. ММСК высевали в 24-луночные планшеты системы Transwell с размером пор 8 мкм (SPL Lifesciences, Корея). Для оценки остеогенной дифференцировки клетки культивировали в остеогенной среде DMEM (“ПанЭко”), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 0.584 мг/мл L-глутамин, 0.05 мг/мл L-аскорбиновой кислоты (Sigma), 2.16 мг/мл β-глицерофосфата (Sigma), 5000 ед/мл пенициллина и 5000 мкг/мл стрептомицина, в течение 14 суток. В качестве положительного контроля использовали остеогенную среду с добавлением D3 (F. Hoffmann-La Roche, Швейцария).

Оценка цитосовместимости матриц

Цитотоксичность матриц оценивали в МТТ-тесте. Для этого клетки инкубировали с 0.5 мг/мл МТТ в течение 2 ч в CO₂-инкубаторе, после чего среду с МТТ заменяли на ДМСО и инкубировали на шейкере со скоростью перемешивания 200 об/мин в течение 20 мин. Оптическую плотность измеряли на планшетном спектрофотометре xMark (BioRad, США) при длине волны 570–620 нм. Также жизнеспособность клеток оценивали методом флуоресцентной микроскопии, используя люминесцентный инвертированный микроскоп Axio Observer.D1 с камерой AxioCam HRc (Carl Zeiss, Германия), путем выявления мертвых клеток, окрашенных флуоресцентным красителем DAPI в концентрации 5 мкг/мл в течение 10 мин при комнатной температуре, и живых клеток, окрашенных 0.5 мкМ Calcein AM (Biotium, США) в течение 35 мин при 37°C.

Таблица 1. Последовательность праймеров, используемых в ПЦР в реальном времени

Table 1. Primers used for real-time PCR

Ген	Последовательность праймера*, 5' → 3'
<i>Actb</i>	For: GAGATTACTGCCCTGGCTCC Rev: GCTCAGTAACAGTCCGCCTA
<i>Alpl</i>	For: TGCCTACTTGTGTGGCGTGA Rev: CGTGACCTCGTTCCCTGAG
<i>Bmp2</i>	For: CGTCCTCAGCGAGTTTGAGT Rev: CAGGTCGAGCATATAGGGGG
<i>Gapdh</i>	For: GCGAGATCCCGCTAACATCA Rev: CCCTTCCACGATGCCAAAGT

* *Примечание:* For – прямой праймер; Rev – обратный праймер.

* *Note:* For—forward primer; Rev—reverse primer.

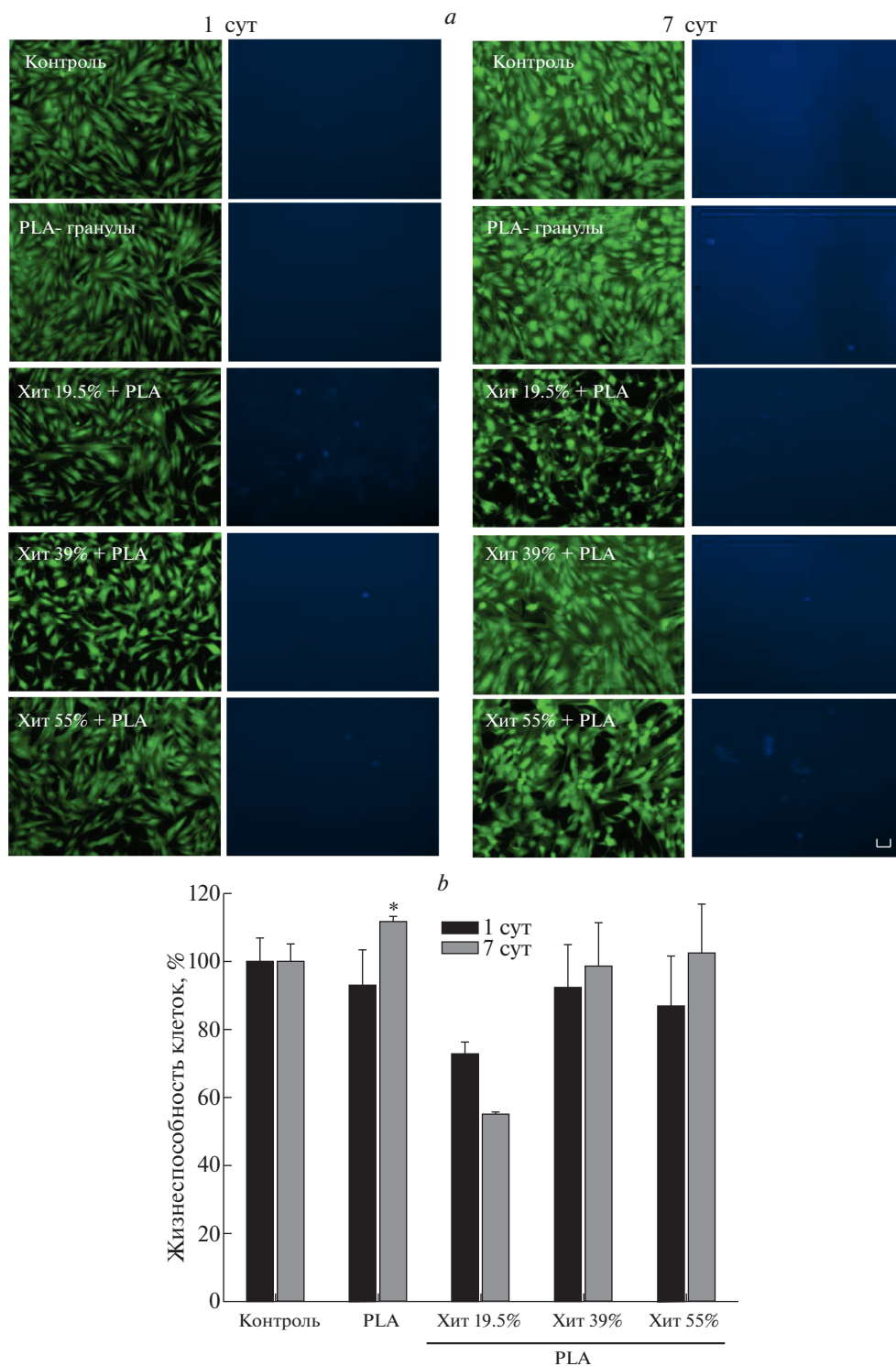


Рис. 1. Оценка цитотоксичности матриц на основе PLA-гранул и хитозанового гидрогеля с разной степенью деацетилирования хитозана на клетках ММСК. *a* – Флуоресцентная микроскопия живых ММСК, окрашенных Calcein AM (зеленый), и мертвых, окрашенных DAPI (синий). Масштабный отрезок – 100 мкм. *b* – МТТ-тест относительной жизнеспособности ММСК. * $p < 0.05$ (по сравнению с контролем).

Fig. 1. Evaluation of the cytotoxicity of matrices based on PLA-granules and chitosan hydrogel with different degrees of chitosan deacetylation on MSCs. *a*—Fluorescence microscopy of live MSCs stained with Calcein AM (green) and dead cells stained with DAPI (blue). Scale bar—100 μm . *b*—MTT-test of relative viability of MSCs. * $p < 0.05$ (compared to control).

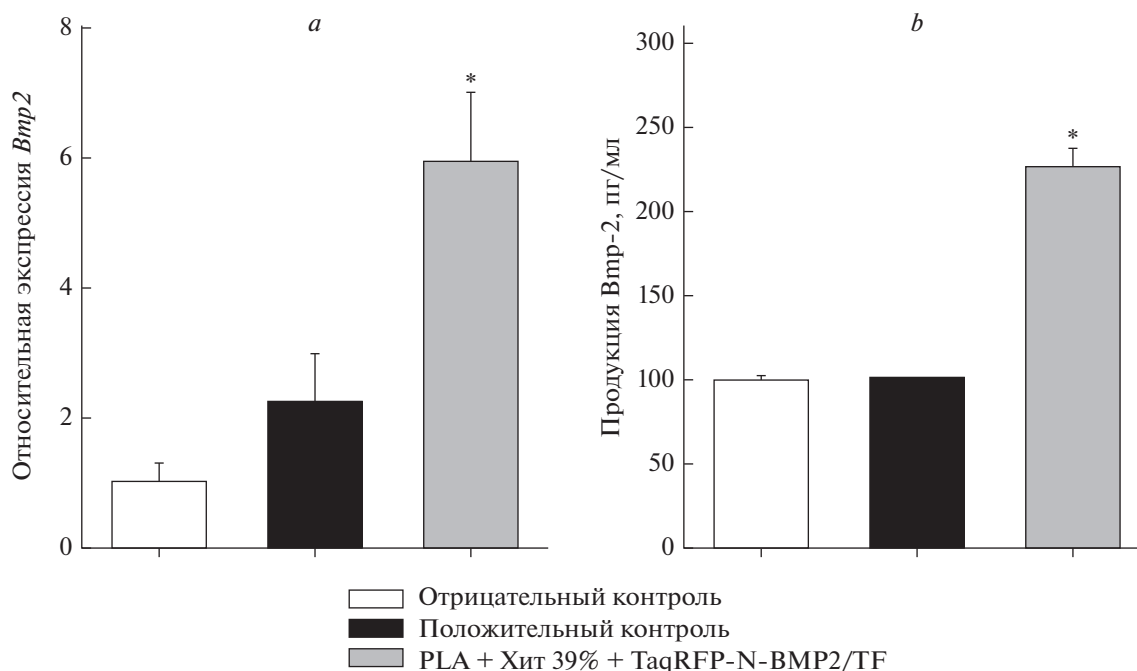


Рис. 2. Исследование трансфицирующей способности матриц на основе PLA-гранул и Хит 39%, импрегнированных полиплексами TaqRFP-N-BMP2/TF, через 14 суток инкубации. *a* – Анализ относительной экспрессии гена *Bmp2* методом ПЦР в реальном времени. *b* – Иммуоферментный анализ продукции белка Bmp-2. * $p < 0.05$ (по сравнению с отрицательным контролем).

Fig. 2. Investigation of the transfecting ability of matrices based on PLA-granules and Chit 39% impregnated with TaqRFP-N-BMP2/TF polyplexes 14 days after incubation. *a* – Assay of the relative expression of *Bmp2* gene by real-time PCR. *b* – ELISA assay of Bmp-2 protein production. * $p < 0.05$ (compared to negative control).

ПЦР в режиме реального времени

Тотальную РНК выделяли с помощью набора RNeasy Plus Mini kit (Qiagen, Германия), синтез кДНК проводили с использованием RevertAid (Thermo Fisher Scientific) согласно протоколам производителей. Экспрессию генов *Bmp2* и *Alpl* (ген щелочной фосфатазы) оценивали методом ПЦР в реальном времени в термоциклере BioRad iQ sycler (Bio-Rad) с интеркалирующим красителем SYBR Green I (“Евроген,” Россия). Полученные значения анализируемых генов нормировали на средние значения экспрессии референсных генов: *Gapdh* и *Actb*. Праймеры к исследуемым генам приведены в табл. 1.

Иммуоферментный анализ (ИФА)

Для оценки продукции белка Bmp-2, секретруемого ММСК в среду, использовали ИФА “сэндвич”-типа. Среду собирали на протяжении всего срока инкубации клеток с исследуемыми матриксами и хранили при -80°C . Затем все фракции объединяли, белок концентрировали на центрифужных фильтрах Amicon (Merck Millipore, США) и исследовали с использованием набора Quantikine Elisa kit (R&D Systems, США), согласно ин-

струкции производителя. Измерения проводили на планшетном спектрофотометре xMark.

Иммуоцитохимическое окрашивание

Клетки, фиксированные 4%-ным раствором формалина, инкубировали с кроличьими поликлональными антителами против *Alpl* (Abcam, Великобритания) с последующим инкубированием с антителами против кроличьего IgG (H + L), конъюгированными с Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific). Ядра клеток окрашивали DAPI (1 мкг/мл) в течение 10 мин. С помощью флуоресцентной микроскопии получали изображения клеток, используя микроскоп Axio Observer.D1 с камерой AxioCam HRc.

Окрашивание ализариновым красным

Для анализа минерализации внеклеточного матрикса (ВКМ) клетки фиксировали охлажденным 70%-ным этанолом в течение 30 мин при 4°C , окрашивали 2%-ным водным раствором ализаринового красного (Sigma-Aldrich) при pH 4.1 в течение 5 мин. Культуру дважды промывали дистиллированной водой от несвязавшегося красите-

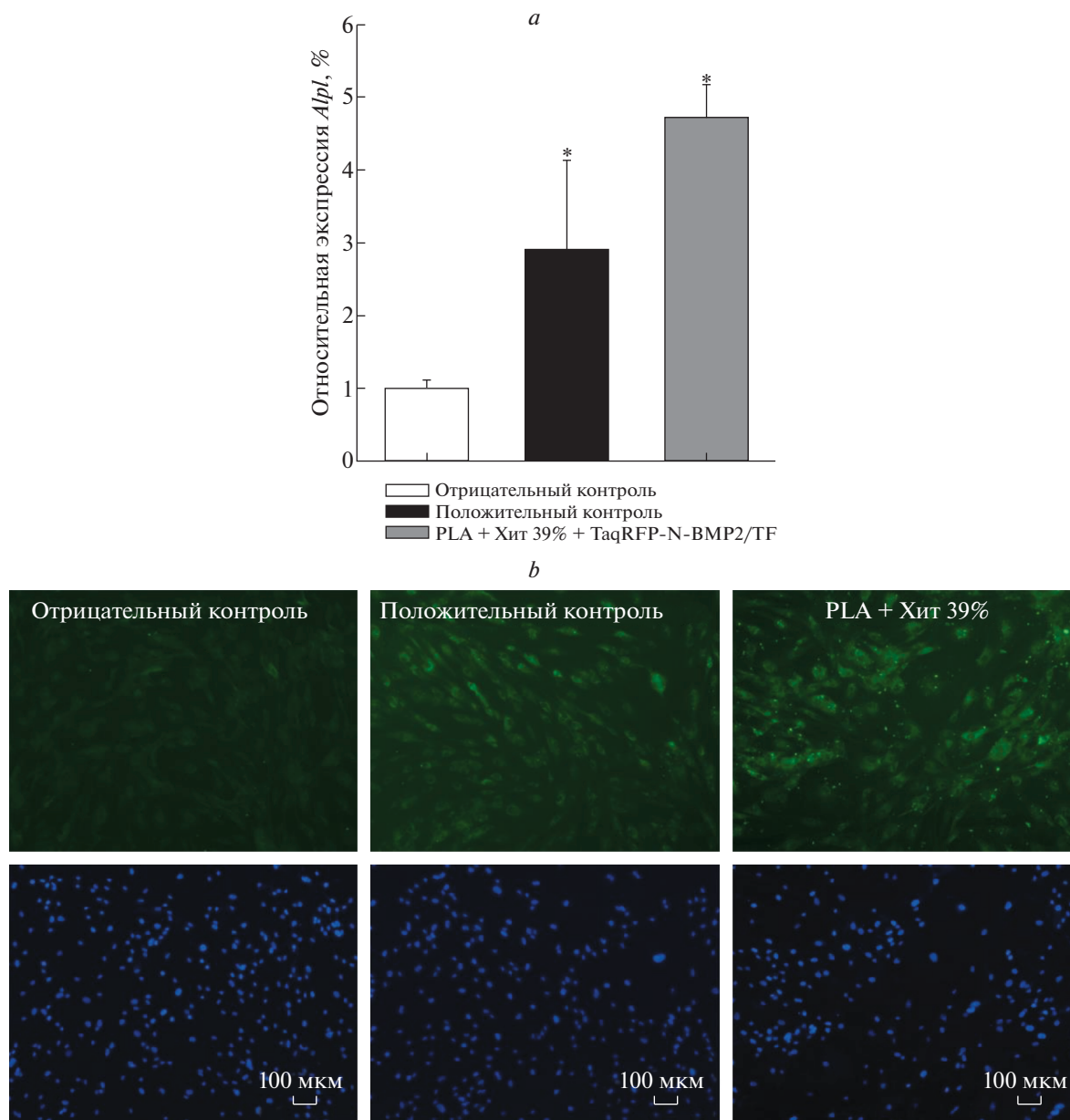


Рис. 3. Оценка остеиндуцирующего действия матриц на основе PLA-гранул и Хит 39%, импрегнированных полиплексами TaqRFP-N-BMP2/TF, на ММСК через 14 суток инкубации. *a* – Анализ относительной экспрессии гена *Alpl* методом ПЦР в реальном времени. * $p < 0.05$ (по сравнению с отрицательным контролем). *b* – Иммуноцитохимический анализ продукция белка Alpl (зеленый); ядра клеток окрашены DAPI (синий).

Fig. 3. Evaluation of the osteoinductive effect of matrices based on PLA-granules and Chit 39% impregnated with TaqRFP-N-BMP2/TF polyplexes on MSCs 14 days after incubation. *a* – Assay of the relative expression of *Alpl* gene by real-time PCR. * $p < 0.05$ (compared to negative control). *b* – Immunocytochemical assay of Alpl protein production (green); cell nuclei stained with DAPI (blue).

ля и с помощью световой микроскопии получали изображения клеток.

Статистический анализ

Построение графиков и статистический анализ результатов выполняли в программе Sigma-Plot 12.0 (Германия). Все данные представлены

как среднее значение \pm стандартное отклонение (mean \pm SD). Группы сравнивали с использованием *t*-критерия Стьюдента (для распределения, приближенного к нормальному) или *U*-критерия Манна–Уитни (для ненормального распределения) в зависимости от вида распределения. Для определения вида распределения использовали критерий Колмогорова–Смирнова. Статистиче-



Рис. 4. Минерализация ВКМ ММСК после инкубации с матриксами на основе PLA-гранул и Хит 39%, импрегнированных полиплексами TaqRFP-N-BMP2/TF. Световая микроскопия, окрашивание ализариновым красным.

Fig. 4. MSCs ECM mineralization after incubation with matrices based on PLA-granules and Chit 39% impregnated with TaqRFP-N-BMP2/TF polyplexes. Light microscopy, Alizarin red staining.

ски значимыми считали различия при уровне ниже 5% ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам МТТ-теста и флуоресцентной микроскопии показано, что цитосовместимость материалов на основе хитозана зависит от степени его деацетилирования. Гидрогель на основе хитозана со степенью деацетилирования 19.5% оказался наиболее цитотоксичным (рис. 1), а добавка PLA-гранул к хитозановому гидрогелю приводила к снижению цитотоксического действия материала на ММСК. Наибольшей цитосовместимостью обладали матриксы на основе PLA-гранул в составе хитозанового гидрогеля со степенью деацетилирования 39 и 55%. Однако ранее нами [12] было обнаружено, что в системе *in vivo*, при подкожной имплантации крысам, снижение степени деацетилирования хитозана приводит к уменьшению лейкоцитарной инфильтрации. Учитывая эти факторы, для исследования мы выбрали матриксы на основе PLA-гранул и Хит 39% как обладающие наибольшей биосовместимостью.

Выбранные для работы матриксы импрегнировали полиплексами с геном *BMP2*. Ранее показано, что для трансфекции ММСК жировой ткани предпочтительно использовать трансфицирующий агент TF, так как он обеспечивает эффективную доставку плазмид в клетки [14]. Нами выявлено, что культивирование ММСК в присутствии ген-активированных матриксов на основе PLA-гранул и Хит 39%, импрегнированных полиплексами TaqRFP-N-BMP2/TF, через 14 сут инкубации приводит к значительному увеличению экспрессии генов-маркеров остеогенной дифференцировки: в 5.95 ± 1.06 раз для *Bmp2* (рис. 2a) и 4.73 ± 0.45 раз для *Alpl* (рис. 3a) по сравнению с отрицательным контролем; причем эти показатели выше, чем для положительного контроля (в присутствии

D3): 2.21 ± 0.78 и 2.92 ± 1.21 для *Bmp2* и *Alpl* соответственно.

Кроме того, через 14 суток инкубации в присутствии ген-активированных матриксов на основе PLA-гранул и Хит 39%, импрегнированных полиплексами с геном *BMP2*, наблюдали увеличение продукции белков *Bmp-2* (рис. 2b) и *Alpl* (рис. 3b), а также усиление минерализации ВКМ в культурах ММСК (рис. 4).

Таким образом, в результате проведенного исследования показано, что разработанные матриксы на основе хитозанового гидрогеля со степенью деацетилирования хитозана 39% и PLA-гранул, импрегнированные полиплексами с геном *BMP2*, обладают выраженным остеоиндуктивным действием на ММСК жировой ткани крыс и в перспективе могут быть использованы для генной терапии костной ткани.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ “Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова” (в области медико-биологических исследований) и государственного задания НИЦ “Курчатовский институт” (в области создания матриксов).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Balmayor E.R., Van Griensven M. Gene therapy for bone engineering. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2015, 3, 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00009>
2. Nayak S., Herzog R.W. Progress and prospects: immune responses to viral vectors. *Gene Ther.*, 2010, 17(3), 295–304. <https://doi.org/10.1038/gt.2009.148>

3. Knight S., Collins M., Takeuchi Y. Insertional mutagenesis by retroviral vectors: current concepts and methods of analysis. *Curr. Gene Ther.*, 2013, 13(3), 211–227. <https://doi.org/10.2174/1566523211313030006>
4. David R.M., Doherty A.T. Viral vectors: the road to reducing genotoxicity. *Toxicol. Sci.*, 2017, 155(2), 315–325. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw220>
5. Недорубова И.А., Бухарова Т.Б., Васильев А.В., Гольдштейн Д.В., Кулаков А.А. Невирусная доставка гена *BMP2* для регенерации костной ткани. *Гены и Клетки*. 2020, 15(4), 33–39. <https://doi.org/10.23868/202012005>
6. Кузнецова В.С., Васильев А.В., Бухарова Т.Б., Гольдштейн Д.В., Кулаков А.А. Безопасность и эффективность применения морфогенетических белков кости 2 и 7 в стоматологии. *Стоматология*, 2019, 98(1), 64–69. <https://doi.org/10.17116/stomat20199801164>
7. Деев Р.В., Дробышев А.Ю., Бозо И.Я. Ординарные и активированные остеопластические материалы. *Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова*, 2015, 1, 51–69. <https://doi.org/10.32414/0869-8678-2015-1-51-69>
8. Azuma K., Osaki T., Minami S., Okamoto Y. Anticancer and anti-inflammatory properties of chitin and chitosan oligosaccharides. *J. Funct. Biomater.*, 2015, 6(1), 33–49. <https://doi.org/10.3390/jfb6010033>
9. Li H., Ji Q., Chen X., Sun Y., Xu Q., Deng P., Hu F., Yang J. Accelerated bony defect healing based on chitosan thermosensitive hydrogel scaffolds embedded with chitosan nanoparticles for the delivery of BMP2 plasmid DNA. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2016, 105(1), 265–273. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35900>
10. Feng P., Wu P., Gao C., Yang Y., Guo W., Yang W., Shuai C. A multimaterial scaffold with tunable properties: toward bone tissue repair. *Adv. Sci.*, 2018, 5(6), 1700817. <https://doi.org/10.1002/advs.201700817>
11. Nedorubova I.A., Bukharova T.B., Zagoskin Yu.D., Vasilyev A.V., Grigoriev T.E., Mokrousova V.O., Chvalun S.N., Goldshtein D.V., Kulakov A.A. Development of osteoplastic material impregnated with plasmid encoding bone morphogenetic protein-2. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2021, 57(7), 818–822. <https://doi.org/10.1134/S000368382107005X>
12. Vasilyev A.V., Kuznetsova V.S., Bukharova T.B., Grigoriev T.E., Zagoskin Yu.D., Nedorubova I.A., Babichenko I.I., Chvalun S.N., Goldshtein D.V., Kulakov A.A. Influence of the degree of deacetylation of chitosan and BMP-2 concentration on biocompatibility and osteogenic properties of BMP-2/PLA granule-loaded chitosan/ β -glycerophosphate hydrogels. *Molecules*, 2021, 26(2), 261. <https://doi.org/10.3390/molecules26020261>
13. Бухарова Т.Б., Волков А.В., Антонов Е.Н., Выхрова Е.Б., Попова А.В., Попов В.К., Гольдштейн Д.В. Тканеинженерная конструкция на основе мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани, полилактидных носителей и тромбоцитарного геля. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*, 2013, 8(4), 61–68.
14. Nedorubova I.A., Bukharova T.B., Vasilyev A.V., Syachina M.A., Goldshtein D.V., Kulakov A.A. Comparative study of *BMP-2* gene delivery to human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells with turbofect and polyethylenimine. *2021 IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.*, 2021, 677(4), 042024. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/677/4/042024>

Efficiency of Gene-Activated Osteoplastic Matrices Impregnated with Polyplexes with the *BMP2* gene

I. A. Nedorubova^{a, #}, M. A. Khvorostina^{a, b}, V. O. Mokrousova^{a, c}, A. V. Vasilyev^{a, c},
T. E. Grigoriev^d, Y. D. Zagoskin^d, S. N. Chvalun^d, T. B. Bukharova^a, and D. V. Goldshtein^a

^aResearch Center for Medical Genetics, Moscow, 115478 Russia

^bInstitute of Photon Technologies of Federal Scientific Research Centre “Crystallography and Photonics”, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117333 Russia

^cCentral Research Institute of Dental and Maxillofacial Surgery, Moscow, 119021 Russia

^dKurchatov Institute National Research Centre, Moscow, 123098 Russia

[#]e-mail: nedorubova.ia@gmail.com

Abstract—The search for new approaches to bone regeneration is an important task in modern medicine. In this study, gene-activated matrices based on chitosan hydrogel and polylactide granules impregnated with polyplexes with the gene for the bone morphogenetic protein 2 (*BMP-2*) have been developed. It was shown that the obtained matrices have a pronounced osteoinductive effect on rat multipotent mesenchymal stromal cells: extracellular matrix mineralization was observed, as well as an increase in gene expression and production of *Bmp-2* and alkaline phosphatase. Thus, the developed matrices can further be used for the regeneration of bone defects.

Keywords: gene-activated matrices, chitosan, polylactide, plasmid DNA