

УДК 606

ДОСТАВКА ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ С ПОМОЩЬЮ СКАФФОЛДОВ, ИЗГОТОВЛЕННЫХ МЕТОДОМ 3D-ПЕЧАТИ, *in vitro* И *in vivo*

© 2025 г. В. О. Черномырдина^{1, 2}, И. А. Недорубова^{1, 2}, Т. Б. Бухарова^{1, 2},
В. П. Басина², А. Ю. Меглей², А. В. Васильев^{1, 2}, А. В. Миронов^{1, 3},
В. С. Кузнецова^{1, 2, *}, И. И. Бабиченко¹, Д. В. Гольдштейн², А. А. Кулаков¹

¹ФГБУ НМИЦ “Центральный научно-исследовательский институт стоматологии
и челюстно-лицевой хирургии” Минздрава России, Москва, 119021 Россия

²ФГБНУ “Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова”, Москва, 115522 Россия

³ФГБУ НИЦ “Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

*e-mail: tilia7@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.11.2024 г.

После доработки 06.12.2024 г.

Принята к публикации 07.12.2024 г.

Использование 3D-печати позволяет создавать новые эффективные костно-пластические материалы в виде биорезорбируемых имплантатов для восполнения протяженных костных дефектов в стоматологии и челюстно-лицевой хирургии. Для придания остеоиндуктивности в такие скаффолды могут быть включены генетические конструкции, несущие гены необходимых белков. С помощью антисольвентной 3D-печати были изготовлены ген-активированные скаффолды, на основе полилактогликолида и аденовирусных конструкций, несущих ген модельного зеленого флуоресцентного белка, позволяющего визуализировать продукты экспрессии трансгена. Изучена эффективность трансдукции мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани крыс аденовирусными векторами, импрегнированными в скаффолды. *In vivo* при имплантации скаффолдов и желатиновых губок с аденовирусными конструкциями, несущими ген зеленого флуоресцентного белка, отсутствовали признаки острого воспаления. Остатки волокон скаффолда были окружены гигантскими клетками инородных тел, между которыми разрасталась грануляционная ткань, представленная неструктурированными коллагеновыми волокнами. Иммуногистохимическое окрашивание позволило обнаружить, что спустя 14 сут макрофаги и гигантские клетки инородных тел поглощали белок GFP. Полученные результаты позволяют рассматривать разработанные ген-активированные скаффолды в качестве основы для создания материалов, несущих гены остеоиндуктивных белков, для регенерации обширных костных дефектов в стоматологии и челюстно-лицевой хирургии.

Ключевые слова: аденовирусный вектор, GFP, полилактид-ко-гликолид, 3D-печать

DOI: 10.56304/S0234275825010041

Восстановление костных дефектов, возникших в результате воспалительных заболеваний, травм или хирургических вмешательств, — частая задача хирургической стоматологии, челюстно-лицевой хирургии, травматологии и ортопедии. Эффективным подходом к решению проблемы является целевая доставка генов белков, обладающих остеоиндуктивными свойствами, для ускорения восстановления костной ткани [1]. В связи с этим активно раз-

рабатываются ген-активированные костно-пластические материалы, состоящие из биорезорбируемых, биосовместимых скаффолдов, несущих конструкции с генами остеоиндукторов. Аденовирусные векторы могут быть использованы для создания ген-активированных матрикс (ГАМ) благодаря способности трансдуцировать делящиеся и неделящиеся клетки, высокой пакующей емкости и низкому риску инсерционного мутагенеза [2, 3]. Одним из способов доставки аденовирусных конструкций в область восстановления костных дефектов является их включение в материалы на основе синтетических полимеров. В регенеративной медицине для создания скаффолдов широко используется синте-

Список сокращений: 3D-печать — трехмерная печать, PLGA — полилактогликолид, Ad-GFP — аденовирусный вектор, несущий ген зеленого флуоресцентного белка, ММСК-ЖТ — мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, полученные из жировой ткани, ГАМ — ген-активированный матрикс, DAPI — 4',6-диамидино-2-фенилиндола.

тический сополимер молочной и гликолевой кислот (PLGA), который обладает высокой биосовместимостью и биорезорбируемостью [4]. При разработке ген-активированных костно-пластических материалов важной характеристикой является структура скаффолда, которая обеспечивает миграцию клеток и прорастание сосудов, а также контролируемое высвобождение содержащихся в нем биоактивных веществ, [5]. Применение подходов трехмерной или 3D-печати позволяет создавать матриксы в соответствии с геометрией костного дефекта пациента с заданной микро- и макроархитектоникой. Это способствует оптимальной интеграции имплантата с окружающими тканями и быстрому восстановлению кости [6].

Таким образом, выбор компонентов для создания ген-активированных скаффолдов, методов их изготовления, а также разработка модельных систем для изучения биологических свойств таких конструкций до сих пор остается актуальной задачей. Для исследования доставки целевого гена в клетки и ткани могут быть использованы аденовирусные конструкции с геном зеленого флуоресцентного белка (GFP) для облегчения визуализации продукта трансгена. Целью данной работы является изучение доставки аденовирусных конструкций, несущих ген зеленого флуоресцентного белка (GFP) с помощью матриксов, изготовленных методом антисольвентной 3D-печати на основе полилактогликолида в моделях *in vitro* и *in vivo*.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

3D-печать PLGA скаффолдов

Полилактогликолид (Purasorb PDLG7507 Corbion PURAC Biochem, Нидерланды) был использован для приготовления 10 мас. % раствора в тетрагликоле (Sigma-Aldrich, США). 1 г PLGA смешивали с 9 г тетрагликоля с помощью магнитной мешалки (DLab FlatSpin, Китай) в течение 2 сут при комнатной температуре, затем хранили в плотно закрытой упаковке при 7°C. 3D-скаффолды изготавливали на специально разработанном 3D-принтере (ФНИЦ “Кристаллографии и фоники РАН”, Россия) с системой шприцевого дозирования. Раствор PLGA вводили в ванну с водным осадком через иглу из нержавеющей стали диаметром 330 мкм при скорости потока 15 мкл/с и температуре 25°C. Каждый скаффолд хранили в дистиллированной воде при 37°C в течение 24 ч, затем промывали 95%-ным этанолом и сушили при комнатной температуре [7].

Получение ген-активированных скаффолдов PLGA, содержащих аденовирусные конструкции с геном GFP

Ген-активированные скаффолды были получены путем сорбции аденовирусных частиц с геном *GFP* из раствора в уже сформированные матриксы. Для этого матриксы на основе PLGA инкубировали в течение 24 ч с вирусными частицами в концентрации 125 нг/мкл.

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки получали из жировой ткани крысы (ММСК ЖТ) в соответствии с описанным протоколом [8]. Их культивировали в среде DMEM/F12 (“ПанЭко”, Россия) с 10% фетальной телячьей сыворотки (FCS, PAA Laboratories, Канада), 0.584 мг/мл L-глутамин (“ПанЭко”) и антибиотика (5000 ед/мл пенициллина и 5000 мкг/мл стрептомицина) (“ПанЭко”) при 37°C и 5% CO₂.

Трансдукция

Для исследования трансдуцирующей способности Ad-GFP, включенных в PLGA скаффолды, ММСК ЖТ инкубировали в присутствии матриксов в 24 луночных планшетах с системой Transwell (SPL Lifesciences, Корея) в течение 7 сут. Эффективность аденовирусной трансдукции оценивали методом флуоресцентной микроскопии по выявлению клеток, продуцирующих GFP, на автоматическом микроскопе Lionheart FX (Agilent BioTek, США) и методом проточной цитофлуориметрии. Для этого клетки снимали с планшетов с использованием раствора Версен-трипсин (“ПанЭко”) в течение 5 мин при 37°C, осаждали центрифугированием на Jouan BR4i, (Jouan, Франция) при 260 g, в течение 5 мин, супернатант отбирали, а осадок промывали раствором Хенкса (“ПанЭко”). Количество клеток, синтезирующих GFP, анализировали на проточном цитофлуориметре CyFlow Space (Partec, США) с максимумом возбуждения 495 нм и максимумом эмиссии 519 нм, а количественную оценку проводили с помощью программы Flo-Max (Partec, США).

Внутримышечная имплантация

Для оценки трансдуцирующих свойств *in vivo* проводили внутримышечную имплантацию носителей в виде желатиновой губки “Спонгостан” (Ethicon, США) или скаффолдов на основе PLGA, импрегнированных аденовирусными векторами, несущими ген *GFP*. Губку “Спонгостан” использовали в качестве модельной системы, поскольку в предыдущих исследованиях нами уже были изучены ее свойства и показана биосовместимость

при имплантации крысам [9]. Для проведения исследования *in vivo* использовали самцов крыс линии Wistar (ФГБУН “НЦБМТ” ФМБА России, Московская область, р/п Андреевка) массой 300–350 г. Крыс содержали в стандартных условиях вивария с открытым доступом к пище и воде. Все стадии исследования соответствовали законодательству Российской Федерации, международным этическим нормам и нормативным документам учреждения по правилам работы с лабораторными животными. Лабораторные животные были разделены на экспериментальные группы по 10 животных в каждой. Для проведения внутримышечной имплантации крысам сбрасывали шерсть в области задней поверхности бедра. После антисептической обработки в стерильных условиях делали продольный разрез кожи. Затем между головками трехглавой мышцы тупым путем формировали карман, в который помещали желатиновую губку или 3D-скаффолд с Ad-GFP. Животных выводили из эксперимента через 14 дней путем передозировки анестетика. Зоны имплантации материалов были взяты для гистологического исследования. Трансдуцированные клетки, продуцирующие GFP, после внутримышечной имплантации определяли флуоресцентным методом.

Иммуногистохимия

Кроличьи поликлональные антитела против GFP (GTX37759, GeneTex, США) использовали с системой визуализации на основе DAB (GTX73338), после чего окрашивали препарат гематоксилином и эозином (“Biovitrum”, Россия). Иммуногистохимическое окрашивание проводили в соответствии с протоколом производителя.

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с помощью программы GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., США). Данные представляли как среднее \pm SD (стандартное отклонение). Нормальность распределения проверяли с помощью теста нормальности Шапиро–Уилка. Межгрупповые сравнения проводили с помощью *t*-теста Стьюдента или *U*-теста Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при вероятности менее 5% ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эффективность трансдукции ММСК ЖТ аденовирусными конструкциями, импрегнированными в PLGA скаффолды

Инкубация ММСК ЖТ с PLGA скаффолдами, содержащими Ad-GFP, приводила к трансдукции клеток. На первые сутки количество трансдуцированных клеток составляло $4.6 \pm 2.1\%$. На 4 сут

данный показатель увеличивался до $24.4 \pm 2.1\%$, а через 7 сут наблюдали $41.5 \pm 6.2\%$ трансдуцированных ММСК ЖТ (рис. 1). Полученная эффективность на первые сутки была ниже, чем в экспериментах, где клетки трансдуцировали Ad-GFP без скаффолда, что обусловлено более медленной кинетикой высвобождения аденовирусных векторов из скаффолда [10].

Имплантация губки “Спонгостан” с Ad-GFP

В области имплантации губки “Спонгостан” с Ad-GFP не было выявлено существенных различий с контрольной группой, где использовалась только губка, что говорит об отсутствии специфической тканевой реакции на аденовирусные конструкции. В обеих группах к концу 14 сут наблюдали материал, окруженный гигантскими клетками инородного тела (рис. 2), что является характерной картиной биодеградации губки “Спонгостан” [11]. Таким образом, показана высокая биосовместимость имплантированных ГАМ, содержащих аденовирусные векторы, при внутримышечной имплантации крысам.

Согласно результатам флуоресцентной микроскопии, при имплантации губки “Спонгостан” с Ad-GFP в цитоплазме фибробластоподобных клеток наблюдалось зеленое свечение, вызванное продукцией GFP, что свидетельствовало об эффективной трансдукции этих клеток аденовирусными векторами *in vivo* (рис.3).

Имплантация PLGA-скаффолдов с Ad-GFP

Для оценки биологических свойств PLGA-скаффолдов с Ad-GFP, в сравнении с губкой “Спонгостан”, используемой в различных исследованиях в качестве сравнения [11], скаффолды с аденовирусными конструкциями, несущими ген *GFP*, были имплантированы крысам внутримышечно. При сравнении групп, в которых были имплантированы PLGA-Ad-GFP и PLGA-скаффолды существенных различий в реакции окружающих тканей обнаружено не было. В обеих группах на 14 сутки волокна скаффолда были окружены гигантскими клетками инородных тел. Между ними разрасталась грануляционная ткань, представленная неструктурированными коллагеновыми волокнами. Были выявлены фибробластоподобные клетки, макрофаги и полнокровные кровеносные сосуды (рис. 4). Таким образом, имплантация изготовленных методом антисольвентной 3D-печати PLGA-скаффолдов с Ad-GFP не сопровождалась выраженным воспалительным ответом, что свидетельствовало о высокой биосовместимости ГАМ.

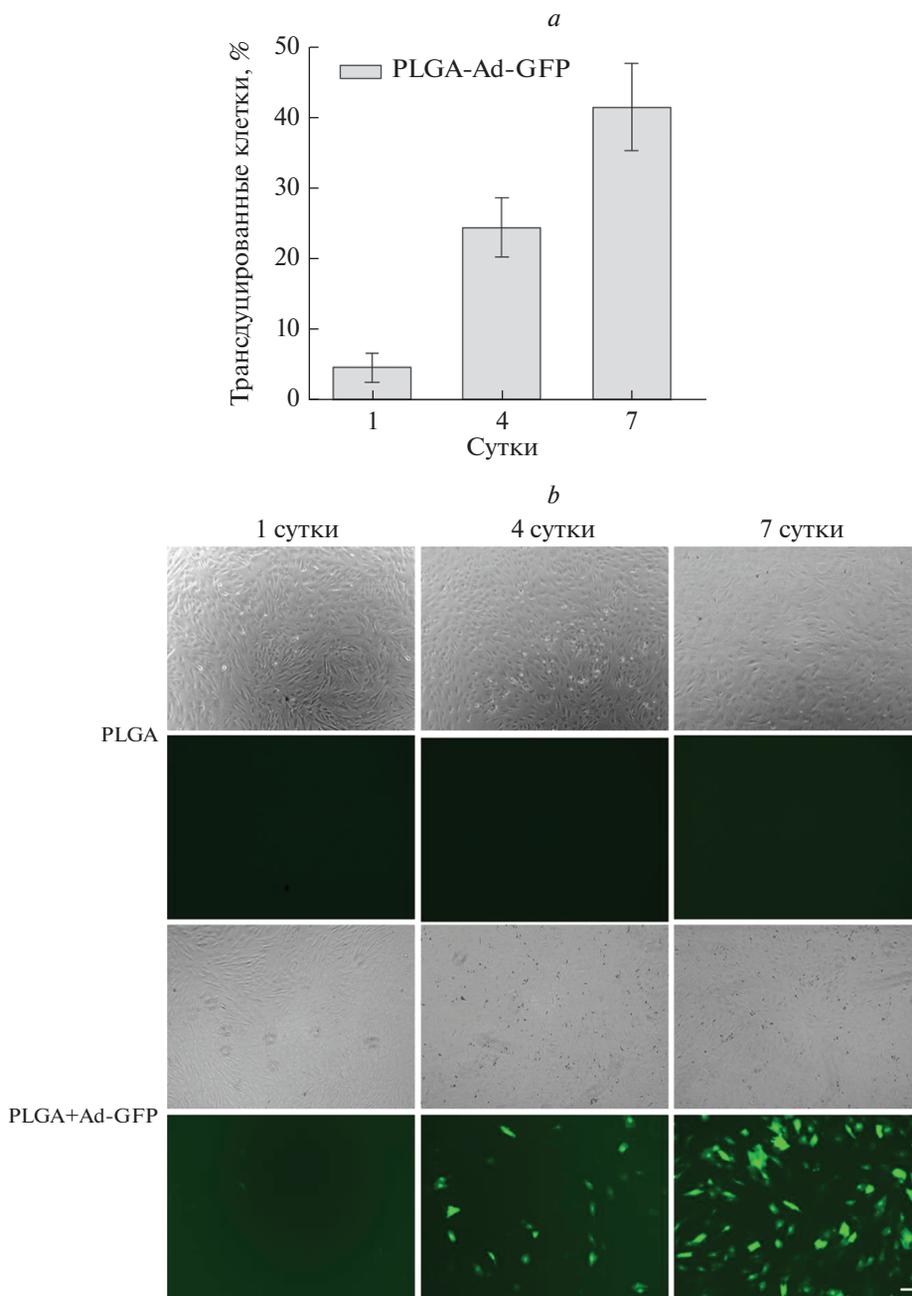


Рис. 1. Эффективность трансдукции ММСК ЖТ при инкубации с PLGA + Ad-GFP скаффолдами. *a* – Проточная цитофлуориметрия. *b* – Флуоресцентная и фазово-контрастная микроскопия. Масштабный отрезок = 100 мкм.

Fig. 1. Efficiency of MSC AT transduction during incubation with PLGA + Ad-GFP scaffolds. *a* – Flow cytometry. *b* – Fluorescence and phase contrast microscopy. Scale bar = 100 μm.

Иммуногистохимическое окрашивание белка GFP после имплантации губки “Спонгостан” и скаффолда на основе PLGA, импрегнированных Ad-GFP

Чтобы исключить вероятность автофлуоресценции материалов для подтверждения синтеза белка GFP трансдуцированными клетками было проведено иммуногистохимическое окрашивание.

Было выявлено большое количество фибробластоподобных клеток с окрашенной цитоплазмой в центре губки “Спонгостан” и в ее порах. По периферии было обнаружено выраженное окрашивание макрофагов, что свидетельствует о поглощении ими белка GFP к концу 14 сут эксперимента. Окрашивание фибробластоподобных клеток было более выражено в центре материала, чем на периферии (рис. 3). Этот результат можно объяснить

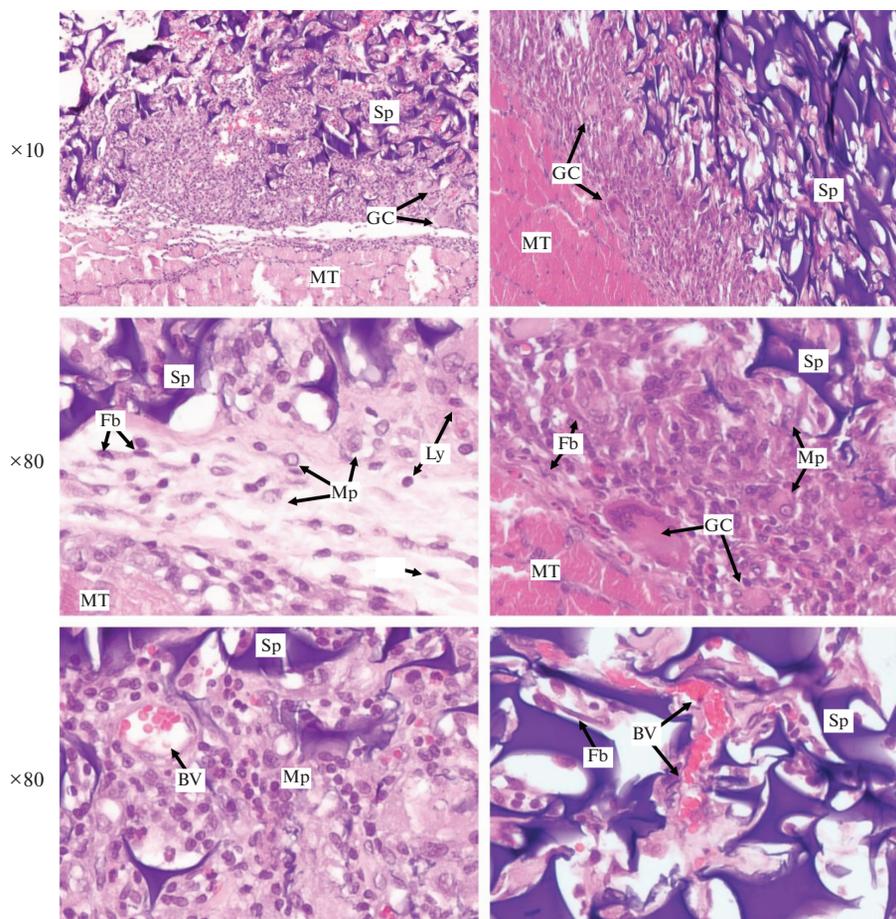


Рис. 2. Внутримышечная имплантация губки “Спонгостан” с аденовирусной конструкцией, несущей ген *GFP* (Ad-GFP), в сравнении с губкой без Ad-GFP. Увеличение $\times 10$, $\times 80$. BV – кровеносные сосуды, Mp – макрофаги, GC – гигантские клетки инородного тела, Fb – фибробластоподобные клетки, Sp – остатки имплантированной губки, MT – мышечная ткань, Ly – лимфоциты и плазмоциты.

Fig. 2. Intramuscular implantation of Spongostane sponge with an adenovirus construct carrying the *GFP* gene (Ad-GFP), compared with a sponge without Ad-GFP. Magnification $\times 10$, $\times 80$. BV – blood vessels, Mp – macrophages, GC – foreign-body giant cell, Fb – fibroblast-like cells, Sp – remnants of an implanted sponge, MT – muscle tissue, Ly – lymphocytes and plasmocytes.

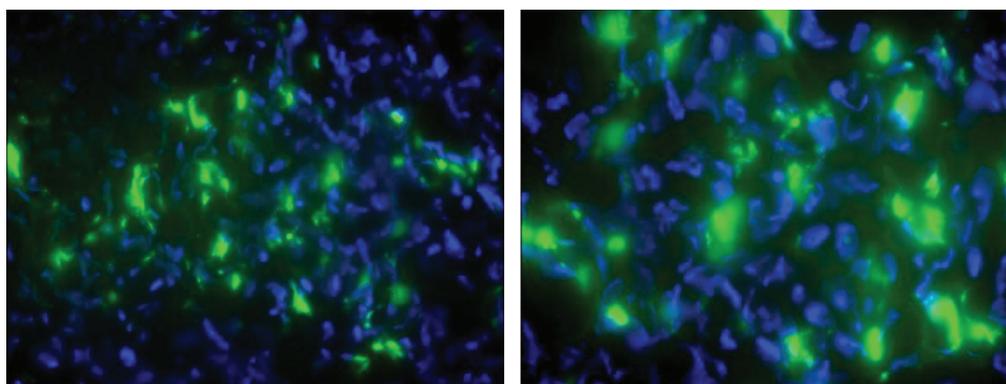


Рис. 3. Внутримышечная имплантация губки “Спонгостан” с аденовирусным вектором, несущим ген *GFP*. Ядра – синие (DAPI), цитоплазма трансдуцированных клеток – зеленая (GFP). Увеличение $\times 100$ и $\times 200$.

Fig. 3. Intramuscular implantation of “Spongostan” sponge with an adenovirus vector carrying the *GFP* gene. The nuclei are blue (DAPI), the cytoplasm of the transduced cells is green (GFP). Magnification of $\times 100$ and $\times 200$.

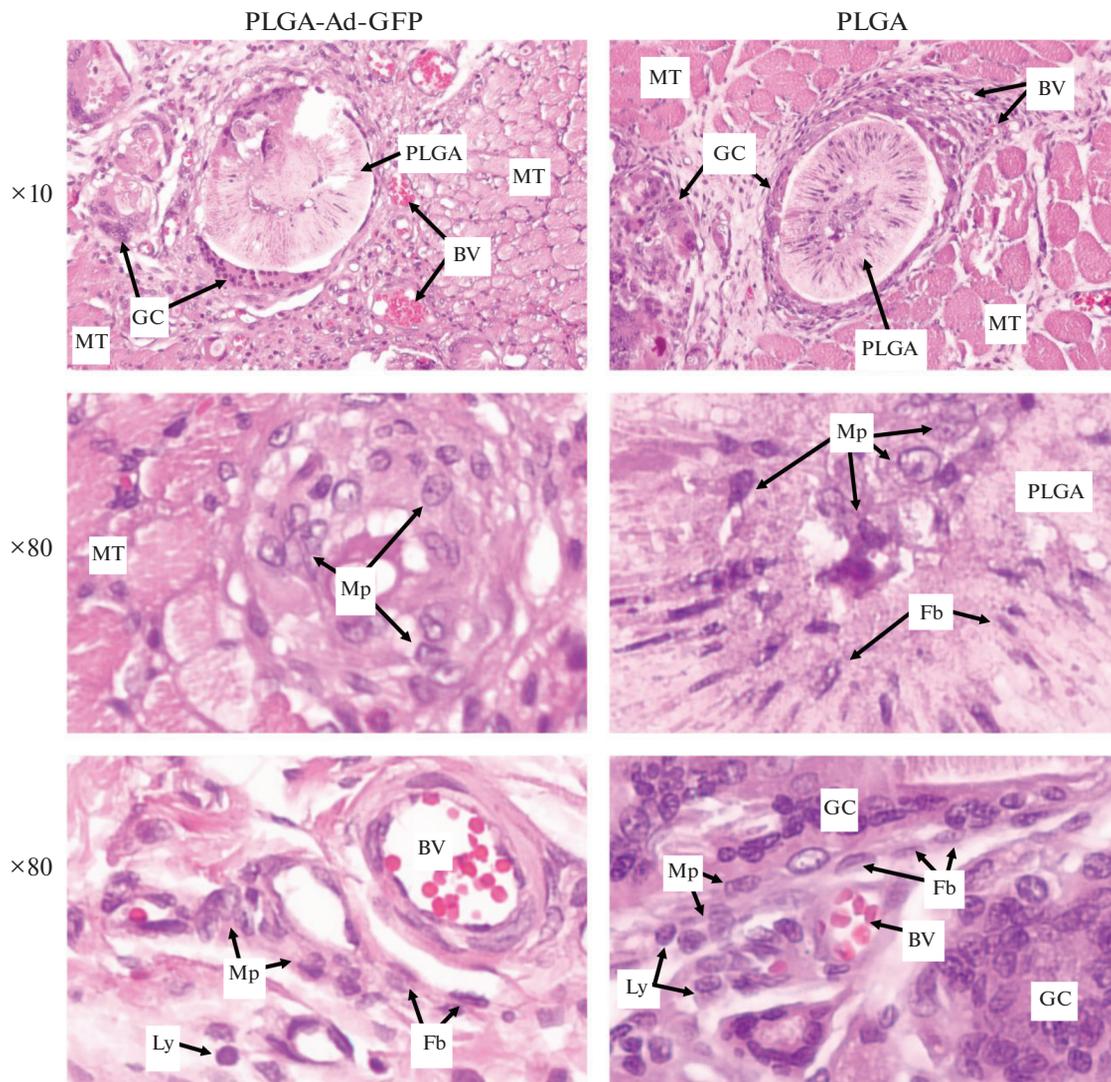


Рис. 4. Внутримышечная имплантация PLGA-скаффолда с аденовирусными конструкциями, несущими ген *GFP* (Ad-GFP), в сравнении со скаффолдом без Ad-GFP. Увеличение $\times 10$, $\times 80$. BV – кровеносные сосуды, MF – макрофаги, GC – гигантские клетки инородного тела, Fb – фибробластоподобные клетки, PLGA – остатки имплантированного скаффолда, MT – мышечная ткань, Ly – лимфоциты и плазмоциты.

Fig. 4. Intramuscular implantation of PLGA scaffold with an adenovirus construct carrying the *GFP* gene (Ad-GFP), compared with a scaffold without Ad-GFP. Magnification $\times 10$, $\times 80$. BV – blood vessels, Mp – macrophages, GC – foreign-body giant cell, Fb – fibroblast-like cells, PLGA – remnants of an implanted scaffold, MT – muscle tissue, Ly – lymphocytes and plasmocytes.

тем, что клетки, мигрировавшие внутрь губки, впоследствии были трансдуцированы аденовирусным вектором и начали синтезировать белок [12].

При имплантации скаффолдов на основе PLGA, содержащих Ad-GFP, выявлено, что накопление белка происходило не только в макрофагах и фибробластоподобных клетках, но и в порах нитей каркаса. В то же время в некоторых полях зрения наблюдали фибробластоподобные клетки с окрашенной цитоплазмой (рис. 5). Полученные результаты подтверждают, что трансдукция клеток *in vivo* проходила эффективно и приводила к синтезу белка. Ранее было показано успешное ис-

пользование 3D-скаффолдов для доставки полиплексов с геном *GFP* при внутримышечной имплантации крысам [13]. Однако включение полиплексов в состав 3D-скаффолдов вызывало более выраженную воспалительную реакцию по сравнению с неактивированными материалами. В то же время использование в данном исследовании аденовирусных векторов не приводило к реакции со стороны окружающих тканей и поэтому является более предпочтительным.

Таким образом, согласно результатам проведенных исследований *in vitro* и *in vivo*, аденовирусные векторы, несущие ген *GFP*, демонстриру-

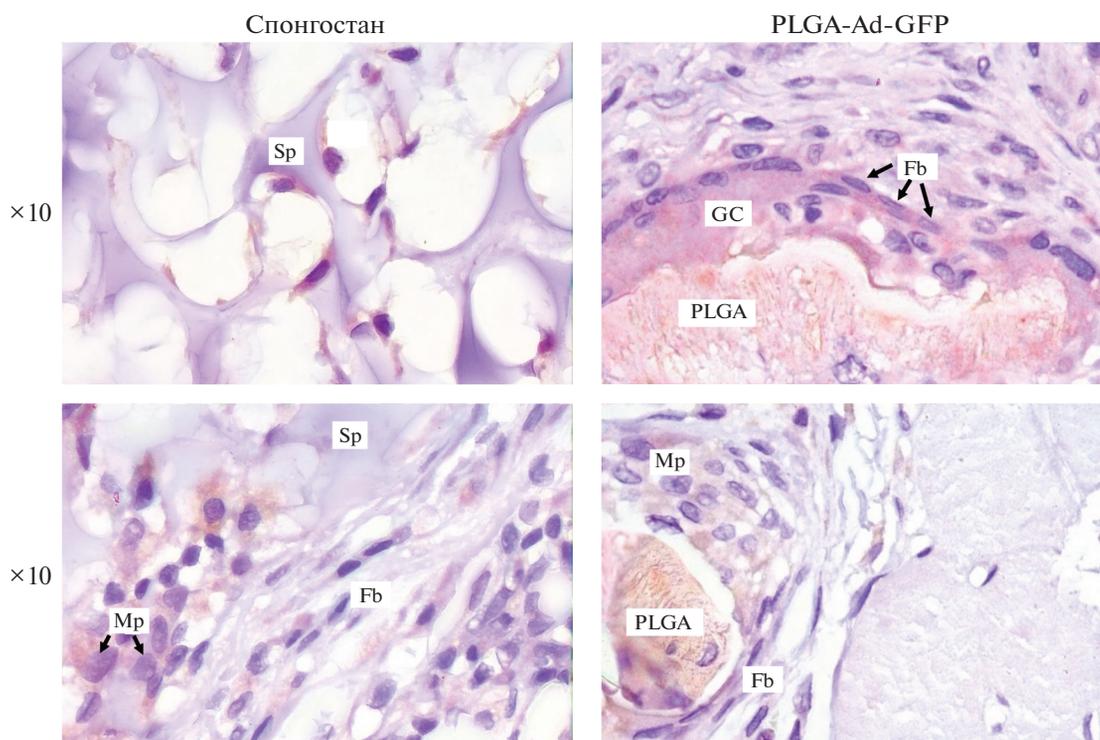


Рис. 5. Иммуногистохимическое окрашивание на белок GFP губки “Спонгостан” и скаффолда PLGA, импрегнированных Ad-GFP. MF – макрофаги, GC – гигантские клетки инородного тела, Fb – фибробластоподобные клетки, PLGA – остатки имплантированного скаффолда, Sp – остатки имплантированной губки. Увеличение 100×.

Fig. 5. Immunohistochemical staining for GFP protein of “Spongostan” sponge and PLGA scaffold impregnated with Ad-GFP. Mp – macrophages, GC – foreign-body giant cell, Fb – fibroblast-like cells, PLGA – remnants of an implanted scaffold, Sp – remnants of an implanted sponge. Magnification of 100×.

ют высокую трансдуцирующую способность как в культурах клеток, так и при внутримышечной имплантации вне зависимости от типа носителя. Разработанные 3D-скаффолды, изготовленные методом антисольвентной 3D-печати, характеризовались биосовместимыми свойствами и не препятствовали трансдукции клеток и синтезу белка GFP. Это означает, что исследованные ГАМ могут рассматриваться в качестве основы для дальнейшей разработки биосовместимых материалов, несущих целевые гены остеоиндукторов, для замещения обширных дефектов в клинической медицине, включая стоматологию и челюстно-лицевую хирургию.

ЭТИЧЕСКИЕ НОРМЫ

Все работы с животными проведены в соответствии с законодательством Российской Федерации, международными этическими нормами и нормативными документами учреждения по правилам работы с лабораторными животными.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работы в части *in vitro* и *in vivo* исследований выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00425). В части изготовления 3D-скаффолдов работа выполнена на уникальном оборудовании, предоставленном ФГБУ НИЦ “Курчатовский институт”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. De Vega R.E., Panos J., Van Griensven M., Evans C.H., Balmayor E.R. Gene Therapy for Bone Healing: Lessons Learned and New Approaches. *Transl. Res.*, 2022, 236, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2021.04.009>. Gene
2. Laird N.Z., Aciri T.M., Tingle K., Salem A.K. Gene- and RNAi-activated scaffolds for bone tissue engineering: Current progress and future directions. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2021, 174, 613–627. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.05.009>
3. Vorburger S.A., Hunt K.K. Adenoviral Gene Therapy. *The Oncologist*, 2002, 1(7), 46–59. <https://doi.org/10.1634/THEONCOLOGIST.7-1-46>
4. Lanao R.P.F., Jonker A.M., Wolke J.G.C., Jansen J.A., Van Hest J.C.M., Leeuwenburgh S.C.G. Physicochemical

- properties and applications of poly(lactic-co-glycolic acid) for use in bone regeneration. *Tissue Eng. Part B, Rev.*, 2013, 4(19), 380–390.
<https://doi.org/10.1089/TEN.TEB.2012.0443>
5. Alonzo M., Primo A.F., Kumar A.S., Mudloff J.A., Dominguez E., Fregoso G., Ortiz N., Weiss W.M., Joddar B. Bone tissue engineering techniques, advances, and scaffolds for treatment of bone defects. *Curr. Opin. Biomed. Eng.*, 2021, 17, 100248.
<https://doi.org/10.1016/j.cobme.2020.100248>
 6. Mayfield C.K., Ayad M., Lechtholz-Zey E., Chen Y., Lieberman J.R. 3D-Printing for Critical Sized Bone Defects: Current Concepts and Future Directions. *Bioeng.*, 2022, 9(11), 680.
<https://doi.org/10.3390/BIOENGINEERING9110680>
 7. Mironov A.V., Grigoryev A.M., Krotova L.I., Skaletsky N.N., Popov V.K., Sevastianov V.I. 3D printing of PLGA scaffolds for tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 2017, 1(105), 104–109.
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.35871>
 8. Бухарова Т.Б., Волков А.В., Антонов Е.Н., Вихрова Е.Б., Попова А.В., Попов В.К. Голдштейн Д.В. Тканеинженерная конструкция на основе мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани, полилактидных носителей и тромбозитарного геля. *Гены и Клетки*. 2013, 4(8), 61–68.
<https://doi.org/10.23868/gc121615>
 9. Васильев А.В., Кузнецова В.С., Галицына Е.В. и др. Биосовместимость и остеогенные свойства коллаген-фибронектинового гидрогеля, импрегнированного BMP-2. *Стоматология*, 2019, 98(6–2), 5–11.
<https://doi.org/10.17116/stomat2019980625>
 10. Bukharova T.B., Nedorubova I.A., Mokrousova V.O., Meglei A.Y., Basina V.P., Nedorubov A.A., Vasilyev A.V., Grigoriev T.E., Zagoskin Y.D., Chvalun S.N., Kutsev S.I., Goldshtein D.V. Adenovirus-Based Gene Therapy for Bone Regeneration: A Comparative Analysis of *in vivo* and *ex vivo* BMP2 Gene Delivery. *Cells*, 2023, 12(13), 1762.
 11. Kos M., Staniszewska-Kuś J., Matusiewicz M., Łuczak K., Klempous R., Pielka S. Tissue reaction after implantation of Spongostan, as the carrier of xenogenic bone morphogenetic protein. Experimental study. *Polim. Med.*, 2003, 33(1–2), 25–33.
 12. Kim D.S., Lee J.K., Kim J.H., Lee, J., Kim D.S., An S., Park S.B., Kim T.H., Rim J.S., Lee S., Han D.K. Advanced PLGA hybrid scaffold with a bioactive PDRN/BMP2 nanocomplex for angiogenesis and bone regeneration using human fetal MSCs. *Sci. Adv.*, 2021, 7(50), eabj1083.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.abj1083>
 13. Khvorostina M.A., Mironov A.V., Nedorubova I.A., Bukharova T.B., Vasilyev A.V., Goldshtein D.V., Komlev V.S., Popov V.K. 3D Printed Gene-Activated Sodium Alginate Hydrogel Scaffolds. *Gels*, 2022 8(7), 421.
<https://doi.org/10.3390/gels8070421>

In Vitro and *in Vivo* Delivery of Genetic Constructions on 3D-Printed Scaffolds

V. O. Chernomyrdina^{a, b}, I. A. Nedorubova^{a, b}, T. B. Bukharova^{a, b}, V. P. Basina^b,
 A. Yu. Megley^b, A. V. Vasilyev^{a, b}, A. V. Mironov^{a, c}, V. S. Kuznetsova^{a, b, #},
 I. I. Babichenko^a, D. V. Goldshtein^b, and A. A. Kulakov^a

^aCentral Research Institute of Dentistry and Maxillofacial Surgery Ministry of Health of Russia, Moscow, 119021 Russia

^bResearch Centre for Medical Genetics, Moscow, 115522 Russia

^cNRC “Kurchatov Institute”, Moscow, 123182 Russia

[#]e-mail: tilia7@yandex.ru

Abstract—The use of 3D printing in the creation of bioresorbable implants for filling extended bone defects allows for the development of new, effective materials in dentistry and maxillofacial surgery. Gene-activated scaffolds based on polylactoglycolide and adenoviral constructs carrying the gene of a model green fluorescent protein, which allows visualization of transgene expression products, were manufactured using antisolvent 3D printing. The transduction efficiency of rat adipose tissue multipotent mesenchymal stromal cells by adenoviral vectors impregnated into the scaffolds was investigated. *In vivo* studies showed that when scaffolds and gelatin sponges were implanted with adenoviral constructs containing the green fluorescent protein gene, there was no evidence of acute inflammation. Remnants of the scaffold filaments were surrounded by giant foreign body cells, and granulation tissue, represented by unstructured collagen fibers, grew between them. After 14 days, immunohistochemical staining showed that macrophages and giant foreign body cells had absorbed the GFP protein. The results allow to consider the developed gene-activated scaffolds as a basis for the creating materials that carry osteoinductive protein genes and could be used for the regeneration of bone defects in dentistry and maxillofacial surgery.

Keywords: adenoviral vector, GFP, polylactide-co-glycolide, 3D printing