

УДК [606:61]:612.419.014

Разработка костно-пластического материала, импрегнированного плазмидой с геном костного морфогенетического белка-2

© 2020 И.А. НЕДУРУБОВА^{1*}, Т.Б. БУХАРОВА¹, Ю.Д. ЗАГОСКИН³, А.В. ВАСИЛЬЕВ^{1,2}, Т.Е. ГРИГОРЬЕВ³, В.О. МОКРОУСОВА¹, С.Н. ЧВАЛУН³, Д.В. ГОЛЬДШТЕЙН¹, А.А. КУЛАКОВ²

¹ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», Москва, 115478

² Национальный медицинский исследовательский центр стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Минздрава России, Москва, 119021

³ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, 123098

*e-mail: irina0140@gmail.com

Поступила в редакцию 17.03.2020 г.

После доработки 03.04.2020 г.

Принята к публикации 19.07.2020 г.

Исследованы биологические свойства нового ген-активированного костно-пластического материала на основе хитозановых губок, импрегнированных плазмидами, несущими ген костного морфогенетического белка-2 (BMP2). Подобраны оптимальные условия трансфекции мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток с помощью реактива TurboFect. Показано остеоиндуцирующее действие разрабатываемого материала *in vitro*, связанное с увеличением экспрессии остеогенных маркеров в культурах мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. Проектируемый ген-активированный материал может быть использован для восполнения дефектов костной ткани.

Ключевые слова: ген-активированный материал, плазмиды, BMP-2, генная терапия, регенерация костной ткани

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-4-59-64

Для лечения травматических и дегенеративных заболеваний костной ткани требуются эффективные остеопластические материалы, которые позволили бы исключить необходимость использования аутотрансплантатов [1]. Известно, что костный морфогенетический белок-2 (BMP-2) является мощным остеоиндуктивным фактором, по своему регенеративному потенциалу не уступающий аутогенной костной ткани [2, 3]. Поскольку BMP-2 является паракринным фактором с коротким периодом полураспада и быстро теряет активность, требуется его введение в супрафизиологических концентрациях, что приводит к побочным эффектам и ограничивает его применение. Проектирование ген-активированных матриц, содержащих гены белков с терапевтическим действием, является новым перспективным направлением

в области разработки остеопластических материалов [4–6]. Основным преимуществом генной терапии перед использованием рекомбинантных белков является обеспечение локальной экспрессии терапевтических факторов в области повреждения в течение продолжительного времени без осложнений, связанных с рисками высокой дозировки препарата. Включение в остеопластический материал плазмидных конструкций, содержащих ген BMP2, может обеспечить пролонгированную секрецию BMP-2 в терапевтических концентрациях для эффективной регенерации костной ткани.

Применение плазмидных экспрессионных векторов считается наиболее биологически безопасным методом для генетической модификации клеток. Однако низкая эффективность доставки трансгена и высокая цитотоксичность за счет использования

Список сокращений: ММСК — мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки; BMP-2 — костный морфогенетический белок-2; TF — TurboFect.

трансфицирующих агентов являются существенными недостатками этого подхода [7, 8]. Подбор оптимальных условий трансфекции мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), обеспечивающих эффективную интернализацию векторов при сохранении достаточной жизнеспособности клеток, — ключевой вопрос при разработке плазмидных ген-активированных материалов, который определяет успешность их дальнейшего применения для репаративной регенерации.

В качестве материала носителя для плазмидных конструкций выбран хитозан — природный полимер с антибактериальными, фунгицидными и противоопухолевыми свойствами, биологическую активность которого можно моделировать за счет химических модификаций, изменения заряда и других характеристик [9, 10]. Целью работы была разработка ген-активированного материала на основе хитозана, импрегнированного плазмидами с геном *BMP2*, и оценка его остеиндуцирующего действия *in vitro*.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК)

Использовали культуры ММСК, полученные из липоаспирата взрослых здоровых доноров после подписания добровольного информированного согласия. ММСК культивировали в ростовой среде DMEM («ПанЭко», Россия), содержащей 10% эмбриональной сыворотки теленка (ЭТС; PAA Laboratories, Канада), 0,584 мг/мл L-глутамина («ПанЭко»), 5000 ед/мл гепарина натрия («ПанЭко»), 5000 ед/мл пенициллина («ПанЭко») и 5000 мкг/мл стрептомицина («ПанЭко») при 37 °С и 5% CO₂.

Плазмиды

Использовали плазмиды, несущие целевой ген *BMP2* (pcDNA3) и ген референсного белка EGFP (pEGFP-C1). Плазмиды наращивали в клетках *Escherichia coli* в среде с селективными антибиотиками и выделяли набором Plasmid Midiprep (BC124; «Евроген», Россия) по стандартному протоколу.

Трансфекция

Для трансфекции использовали трансфицирующий агент TurboFect (TF; Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкциями производителя. Подбирали эффективные соотношения доз TF (1 мкл, 2 мкл или 4 мкл) и плазмиды (1 мкг и 2 мкг). Для образования полиплексов TF и плазмиды инкубировали 20 мин при 37 °С. Затем раствор добавляли к клеткам или к исследуемым материалам.

Трансфекцию проводили с ММСК, адгезированными на пластике, или в виде суспензии. Адгезированные ММСК культивировали с полиплексами в течение 1, 6, 24 и 48 ч. ММСК в виде суспензии инкубировали с комплексами в течение 10 мин или 1 ч, а затем высевали в 24-луночные планшеты в той же среде или заменяли среду на свежую. Анализ трансфекции проводили через 24 и/или 48 ч после инкубации.

МТТ-тест

Для оценки жизнеспособности клеток после трансфекции в лунки добавляли 0,5 мг/мл 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид (МТТ; «ПанЭко») и инкубировали 2 ч при 37 °С. Затем кристаллы формазана элюировали с помощью DMSO («ПанЭко») и измеряли оптическую плотность на планшетном спектрофотометре xMark (Bio-Rad, США) при длине волны 570 нм, при расчете вычитая фоновое значение при 620 нм.

Проточная цитометрия

Для оценки эффективности трансфекции клетки снимали с планшетов, осаждали центрифугированием при 1200 об/мин в течение 5 мин и подсчитывали количество клеток, синтезирующих EGFP, на проточном цитофлуориметре CyFlow® Space (Partec, США). Анализ проводили с помощью программы FloMax.

Получение материала

Губчатые материалы на основе хитозана получали путем лиофилизации замороженных стерильных растворов в 2%-ной уксусной кислоте, при массовой концентрации хитозана 2,2%. Предварительно проводили реакетилирование хитозана с исходной степенью деацетилирования 65% в водно-спиртовой среде для получения хитозанов со степенью деацетилирования 55% или 19,5% [10]. Полученные матрицы в виде губок размером 0,5 см³ инкубировали с трансфицирующими комплексами: 10 мкг pcDNA3 + 20 мкл TF — в течение 15 мин.

Оценка остеогенного действия материала *in vitro*

Культуры ММСК высевали на дно лунок системы Transwell (Corning, США). Материалы помещали в фильтры внутри лунок и инкубировали в среде DMEM, 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 при 37 °С и 5% CO₂ 14 сут.

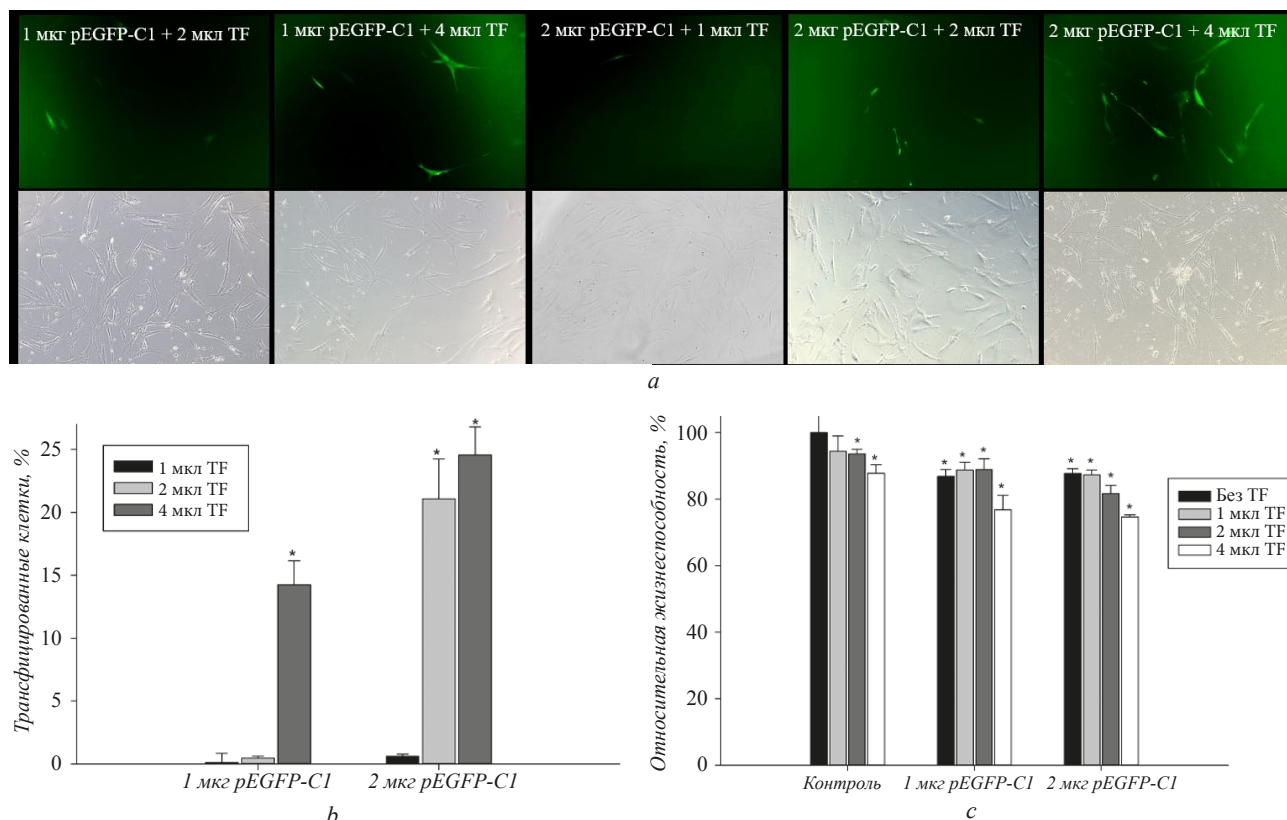


Рис. 1. Трансфекция клеток ММСК комплексами TF с плазмидой pEGFP-C1. *a* — Оценка эффективности трансфекции методом флуоресцентной микроскопии по накоплению EGFP в клетках ММСК через 24 ч. *b* — Оценка эффективности трансфекции методом проточной цитометрии через 24 ч. *c* — Оценка жизнеспособности клеток ММСК методом МТТ через 24 ч. * $p < 0,05$ (относительно контроля).

Fig. 1. Transfection of MSC with complexes of TF with pEGFP-C1 plasmid. *a* — Evaluation of transfection efficiency by fluorescence microscopy through the accumulation of EGFP in MSC cells after 24 h. *b* — Evaluation of transfection efficiency by flow cytometry after 24 h. *c* — Evaluation of MSC viability by MTT after 24 h. * $p < 0.05$ (vs the control).

ПЦР в режиме реального времени

Для оценки экспрессии генов маркеров остеогенной дифференцировки: *BMP2*, *RUNX2* и *ALPL* — проводили обратную транскрипцию с последующим анализом методом ПЦР в режиме реального времени с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green. Общую РНК выделяли из клеток по протоколу RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, США). Синтезировали кДНК с помощью набора для синтеза первой цепи кДНК с обратной транскриптазой RevertAid (Thermo Fisher Scientific). Полученные значения нормировали относительно генов сравнения: *GAPDH* и *ACTB*.

Статистическая обработка

Построение графиков и статистическую обработку результатов выполняли в программе SigmaPlot 12.0 (Германия). Все данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение (mean \pm SD). Группы сравнивались с использованием *t*-критерия Стьюдента или *U*-критерия Манна-Уитни в зависимости от распределения

Гаусса. Статистически значимыми считали различия при уровне ниже 5% ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Подбор эффективной дозировки полиплексов TF с плазмидой

Для определения наиболее эффективной дозировки плазмид и трансфицирующих агентов анализировали различные соотношения доз плазмид pEGFP-C1 (1 мкг и 2 мкг) и TF (1 мкл, 2 мкл и 4 мкл). Через 24 ч трансфекции ММСК, адгезированных на поверхности культуральных планшетов, наилучшие результаты получены при использовании 2 мкг pEGFP-C1 с 4 мкл TF (24,55 \pm 2,23%), 2 мкг pEGFP-C1 с 2 мкл TF (21,08 \pm 3,17%), 1 мкг pEGFP-C1 с 4 мкл TF (14,26 \pm 1,89%) (рис. 1*a, b*). При использовании 1 мкл TF трансфекции ММСК не наблюдалось. Кроме того, показано, что TF оказывает дозозависимое цитотоксическое действие на клетки ММСК (рис. 1*c*), и максимальная гибель клеток

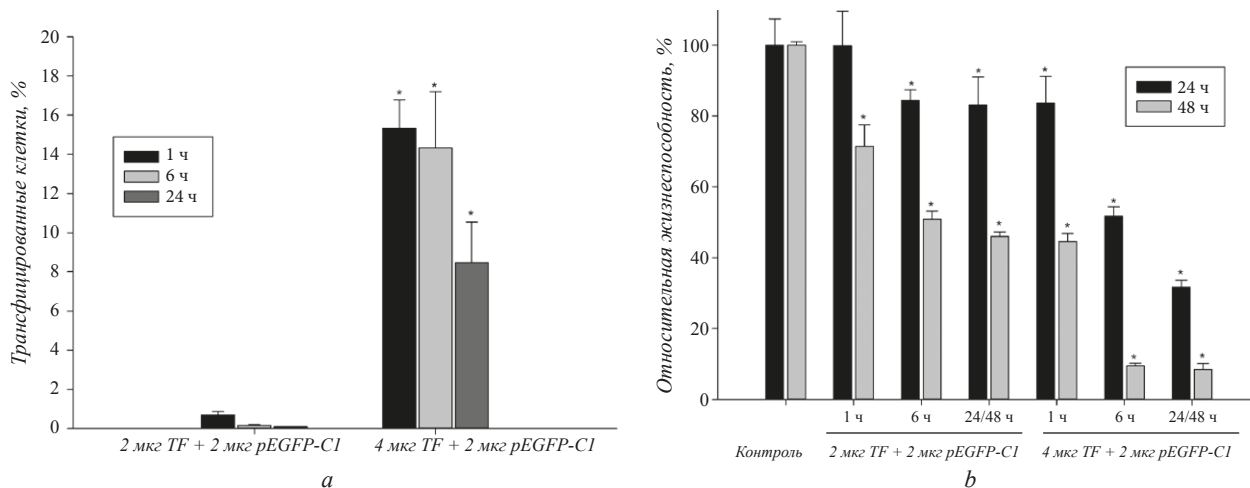


Рис. 2. Трансфекция адгезированных ММСК комплексами TF с плазмидой pEGFP-C1 в течение 1, 6 и 24 ч. *a* — Оценка эффективности трансфекции методом проточной цитометрии через 24 ч после трансфекции. *b* — Оценка жизнеспособности ММСК методом МТТ через 24 и 48 ч после трансфекции. **p* < 0,05 (по сравнению с соответствующим контролем).

Fig. 2. Transfection of adherent MSC with complexes of TF with plasmid pEGFP-C1 during 1, 6 or 24 h. *a* — Evaluation of transfection efficiency by flow cytometry 24 h after transfection. *b* — Evaluation of MSC viability by MTT 24 and 48 h after transfection. **p* < 0,05 (vs the corresponding control).

наблюдается при использовании 2 мкг pEGFP-C1 с 4 мкл TF.

Выбор времени и условий инкубации клеток ММСК с трансфицирующими комплексами

Для снижения токсического действия полиплексов TF с плазмидой время инкубации с клетками уменьшили до 1 и 6 ч. Показано, что в этом случае необходимо использовать TF в концентрации не менее 4 мкл с 2 мкг pEGFP-C1; причем тогда для эффективной трансфекции ММСК достаточно всего 1 ч инкубации (рис. 2*a*). В этом случае ММСК сохраняют достаточно высокую жизнеспособность через 24 ч (около 80%) и 48 ч (около 50%) после трансфекции (рис. 2*b*). Инкубация клеток с комплексами в течение 1 ч оказывает наименьшее цитотоксическое воздействие на клетки.

Ранее показано, что токсическое действие полиплексов можно снизить, если проводить трансфекцию ММСК в виде суспензии, что позволяет уменьшить время инкубации до 10 мин [11]. Мы тоже исследовали эффективность трансфекции ММСК в условиях суспензии. Выявлено, что инкубация клеток с 2 мкг pEGFP-C1 + 4 мкл TF в течение 10 мин (с последующим осаждением центрифугированием и без него) позволила получить наибольшее число трансфицированных ММСК (рис. 3*a*). Однако трансфекция в условиях суспензии приводила к значительно большей гибели клеток, чем в адгезионных культурах (рис. 3*b*).

Таким образом, наиболее эффективно культуры ММСК трансфицируются в адгезионном состоянии при использовании трансфицирующих

комплексов, содержащих 2 мкг pEGFP-C1 и 4 мкл TF на 1 мл среды в течение 1 ч. Этот способ позволяет достичь значимой эффективности трансфекции (15,33±1,45%) при высокой относительной жизнеспособности клеточной культуры (83,58±7,58%).

Трансфекции ММСК плазмидами pcDNA3, кодирующими ген *BMP2*, по разработанному протоколу привела к значительному увеличению экспрессии целевого гена через 14 сут после трансфекции (почти в 2 000 раз по сравнению с контролем) (рис. 4), что подтверждает высокую эффективность трансфекции ММСК плазмидами с целевым геном в выбранных условиях.

Оценка остеогенного действия материала на основе хитозана *in vitro*

Культивирование ММСК в присутствии хитозановых губок, импрегнированных плазмидами pcDNA3, несущими целевой ген *BMP2*, приводит к значительному увеличению экспрессии генов маркеров остеогенной дифференцировки: *RUNX2* и *ALPL*. Материалы на основе хитозана с более высокой степенью деацетилирования (55%) оказывают более выраженное остеогенное действие, чем материалы с 19,5% деацетилирования (рис. 5).

Это может быть вызвано увеличением количества аминогрупп, несущих положительный заряд и тем самым способных связывать большее количество отрицательно заряженных плазмид, что в дальнейшем приводит к эффективному высвобождению этих плазмид и, как следствие, к успешной трансфекции. Ранее нами показано,

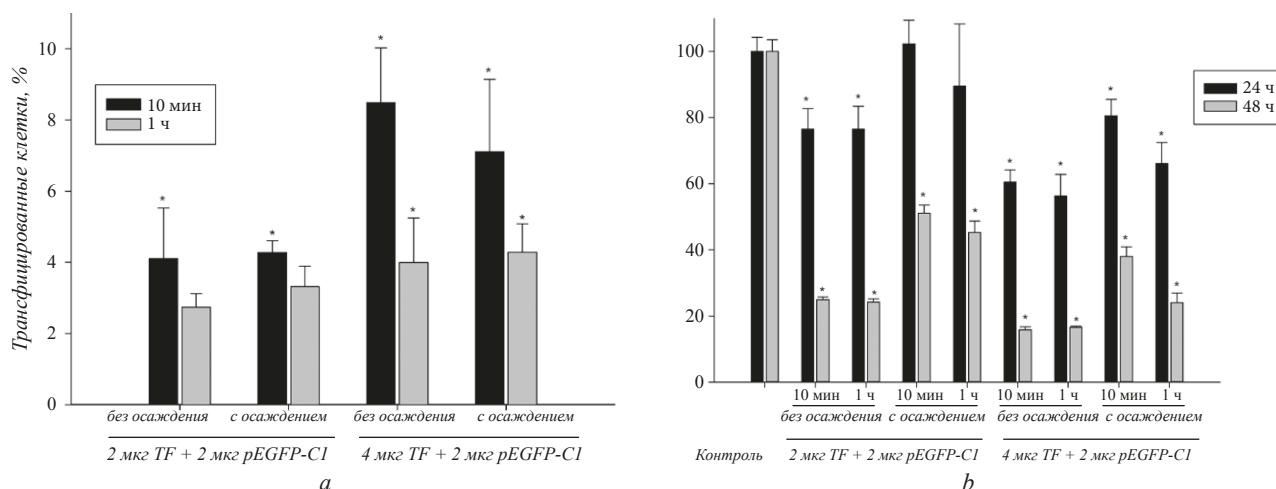


Рис. 3. Трансфекция ММСК в условиях суспензии комплексами TF с плазмидой pEGFP-C1 в течение 10 мин и 1 ч. *a* — Оценка эффективности трансфекции методом проточной цитометрии через 24 ч после трансфекции. *b* — Оценка жизнеспособности ММСК методом МТТ через 24 и 48 ч после трансфекции. **p* < 0,05 (по сравнению с соответствующим контролем).

Fig. 3. Transfection of MSC suspension with complexes of TF with plasmid pEGFP-C1. *a* — Evaluation of transfection efficiency by flow cytometry 24 h after transfection. *b* — Evaluation of MSC viability by MTT 24 and 48 h after transfection. **p* < 0,05 (vs the corresponding control).

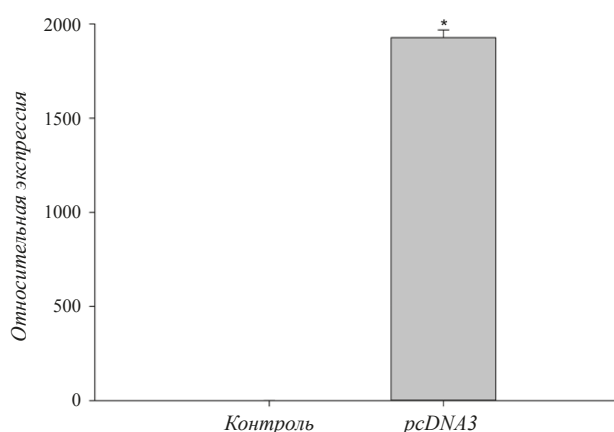


Рис. 4. Относительная экспрессия *BMP2* после трансфекции клеток ММСК полиплексами, образованными 2 мкг pcDNA3 + 4 мкл TF. Анализ проведен методом ПЦР в режиме реального времени через 14 суток после трансфекции. **p* < 0,05.

Fig. 4. *BMP2* relative expression after transfection of MSC with polyplexes from 2 µg of pcDNA3 + 4 µl of TF. The results of RT-PCR assay after 14 days after transfection are presented. **p* < 0,05.

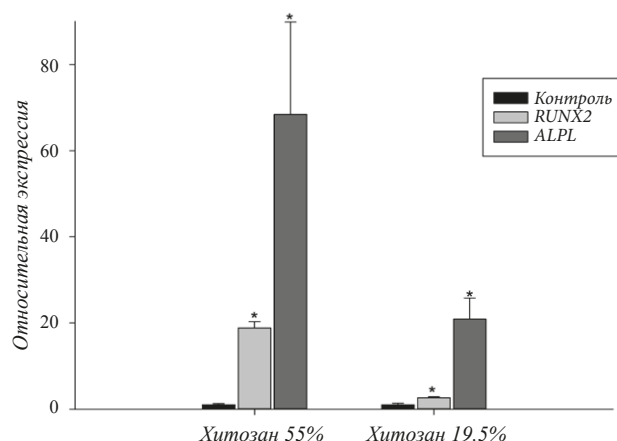


Рис. 5. Оценка экспрессии генов *RUNX2* и *ALPL* после сокультивирования клеток ММСК с хитозановыми матрицами, импрегнированными полиплексами 10мкг pcDNA3 + 20мкл TF. Анализ проведен методом ПЦР в режиме реального времени через 14 суток после трансфекции. **p* < 0,05.

Fig. 5. Evaluation of *RUNX2* and *ALPL* expression after cocultivation of MSC with chitosan matrices impregnated with polyplexes from 10 µg pcDNA3 + 20 µl TF. The results of RT-PCR assay after 14 days after transfection are presented. **p* < 0,05.

что уменьшение положительного заряда хитозана повышает его биосовместимость, снижая лейкоцитарную инфильтрацию при имплантации [10]. Импрегнация хитозана плазмидами позволит нейтрализовать положительный заряд аминок групп, что существенно снизит развитие воспалительной реакции при введении материала.

В результате проведенного исследования подобраны оптимальные условия трансфекции

ММСК при использовании трансфицирующих комплексов. Показано, что хитозановый материал со степенью деацетилирования 55%, импрегнированный плазмидными конструкциями с геном *BMP2*, оказывает остеоиндуцирующее действие на культуру ММСК *in vitro*. Разработанный ген-активированный материал может стать эффективным инструментом, использование которого позволит восполнять дефекты костной ткани.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 16-15-00298 по теме: «Разработка и изучение биологического действия костнопластического отверждаемого композитного материала с заданной кинетикой высвобождения индукторов неоостеогенеза»).

ЛИТЕРАТУРА

1. Деев Р.В., Дробышев А.Ю., Бозо И.Я. Обычные и активированные остеопластические материалы. *Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Пруорова*. 2015, 1, 51–69. doi: 10.32414/0869-8678
2. Carreira A.C., Zambuzzi W.F., Rossi M.C., et al. Bone morphogenetic proteins: promising molecules for bone healing, bioengineering, and regenerative medicine. *Vitam. Horm.*, 2015, 99, 293–322. doi: 10.1016/bs.vh.2015.06.002
3. Кузнецова В.С., Васильев, А.В., Бухарова Т.Б., и др. Безопасность и эффективность применения ВМР-2 и ВМР-7 в стоматологии. *Стоматология*, 2019, 98(1), 64–69. doi:10.17116/stomat20199801164
4. D'Mello S., Atluri K., Geary S.M., Hong L., et al. Bone regeneration using gene-activated matrices. *AAPS J.*, 2017, 19(1), 43–53. doi: 10.1208/s12248-016-9982-2
5. Li D.D., Pan J.F., Ji Q.X., et al. Characterization and cytocompatibility of thermosensitive hydrogel embedded with chitosan nanoparticles for delivery of bone morphogenetic protein-2 plasmid DNA. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2016, 27(8), 134. doi: 10.1007/s10856-016-5743-0
6. Odabas S., Feichtinger G.A., Korkusuz P., et al. Auricular cartilage repair using cryogel scaffolds loaded with BMP-7-expressing primary chondrocytes. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 2013, 7(10), 831–840. doi: 10.1002/term.1634
7. Santos J.L., Pandita D., Rodrigues J., et al. Non-viral gene delivery to mesenchymal stem cells: methods, strategies and application in bone tissue engineering and regeneration. *Curr. Gene Ther.*, 2011, 11(1), 46–57. doi: 10.2174/156652311794520102
8. Zhang Y., Satterlee A., Huang L. *In vivo* gene delivery by nonviral vectors: overcoming hurdles? *Mol. Ther.*, 2012, 20(7), 1298–1304. doi: 10.1038/mt.2012.79
9. Kazuo A., Osaki T., Minami S., Okamoto Y. Anticancer and anti-inflammatory properties of chitin and chitosan oligosaccharides. *J. Funct. Biomater.*, 2015, 6(1), 33–49. doi: 10.3390/jfb6010033
10. Васильев А.В., Кузнецова В.С., Бухарова Т.Б. и др. Повышение биосовместимости хитозановых гидрогелей с перспективой их использования в качестве основы для костно-пластических материалов в стоматологии. *Стоматология*, 2019, 98(6), 12–18. doi: 10.17116/stomat20199806212
11. Paidikondala M., Kadekar S., Varghese O.P. Innovative strategy for 3D transfection of primary human stem cells with BMP-2 expressing plasmid DNA: a clinically translatable strategy for *ex vivo* gene therapy. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, 20(1), 56. doi: 10.3390/ijms20010056

Development of Osteoplastic Material Impregnated with Plasmid Encoding Bone Morphogenetic Protein-2

I.A. NEDORUBOVA^{1*}, T.B. BUKHAROVA¹, Yu. D. ZAGOSKIN³, A.V. VASILYEV^{1,2}, T.E. GRIGORIEV³, V.O. MOKROUSOVA¹, S.N. CHVALUN³, D.V. GOLDSHTEIN¹, and A.A. KULAKOV²

¹ Research Centre for Medical Genetics, Moscow, 115478 Russia

² Central Research Institute of Dental and Maxillofacial Surgery, Moscow, 119021, Russia

³ Kurchatov Institute National Research Center, Moscow, 123098, Russia

e-mail: irina0140@gmail.com

Received March 17, 2020

Revised April 3, 2020

Accepted July 19, 2020

Abstract—The biological properties of a new gene-activated osteoplastic material based on chitosan sponges impregnated with plasmids with the gene for the bone morphogenetic protein-2 (*BMP2*) have been studied. The optimal conditions for transfection of multipotent mesenchymal stromal cells with TurboFect reagent were selected. The *in vitro* osteoinducing effect of the developed material associated with an increase in the expression of osteogenic markers in mesenchymal stromal cells was shown. The designed gene-activated material can be used to repair bone defects.

Key words: gene-activated material, plasmids, BMP-2, gene therapy, bone regeneration

Funding—The work was supported by the Russian Science Foundation (Grant no. 16-15-00298).

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-4-59-64