

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГЕН-АКТИВИРОВАННЫХ ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ ИЗ ОКТАКАЛЬЦИЕВОГО ФОСФАТА И ПЛАЗМИДНЫХ ДНК, НЕСУЩИХ ГЕНЫ VEGF И SDF: ЧАСТЬ 1 – IN VITRO

И.Я. Бозо ^{1,2,3,4}, К.С. Майорова ⁵, А.Ю. Дробышев ², С.И. Рожков ², Г.А. Воложин ², И.И. Еремин ⁶, В.С. Комлев ^{4,7}, И.В. Смирнов ^{4,7}, А.А. Ризванов ⁸, А.А. Исаев ¹, В.К. Попов ⁴, Р.В. Деев ^{1,4,9}

¹ Институт стволовых клеток человека, Москва, Россия

² Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия

³ Государственный научный центр Российской Федерации «Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» ФМБА России, Москва, Россия

⁴ Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва, Россия

⁵ Институт общей генетики РАН, Москва, Россия

⁶ Центральная клиническая больница № 1 с поликлиникой Управления делами президента РФ, Москва, Россия

⁷ Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН, Москва, Россия

⁸ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

⁹ Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Рязань, Россия

Biological activity comparative evaluation of the gene-activated bone substitutes made of octacalcium phosphate and plasmid DNA carrying VEGF and SDF genes: part 1 – in vitro

I.Y. Bozo ^{1,2,3,4}, K.S. Maiorova ⁵, A.Y. Drobyshev ², S.I. Rozhkov ², G.A. Volozhin ², I.I. Eremin ⁶, V.S. Komlev ^{4,7}, I.V. Smirnov ^{4,7}, A.A. Rizvanov ⁸, A.A. Isaev ¹, V.K. Popov ⁴, R.V. Deev ^{1,4,9}

¹ Human Stem Cells Institute, Moscow, Russia

² A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia

³ State Research Center "A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center" of the FMBA of Russia, Moscow, Russia

⁴ Federal Research Center "Crystallography and photonics" RAS, Moscow, Russia

⁵ Institute of General Genetics of the RAS, Moscow, Russia

⁶ Central Clinical Hospital with Outpatient Health Center of the Business Administration for the President of the Russian Federation, Moscow, Russia

⁷ A.A. Baykov Institute of Metallurgy and Material Science of the RAS, Moscow, Russia

⁸ Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

⁹ I.P. Pavlov Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia

Значительная потребность в эффективных остеопластических материалах и недостатки разрешенных для клинического применения изделий определяют возрастающую активность биомедицинских разработок в данной области.

Мы разработали ген-активированные остеопластические материалы, состоящие из матрикса-носителя на основе октакальциевого фосфата (ОКФ) и одного из двух вариантов плазмидной ДНК: несущих один ген сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) или сразу два гена человека, кодирующие VEGF и фактор стромальных клеток-1α (SDF-1α). Целью исследования являлась оценка цитотоксичности разработанных ген-активированных материалов и их компонентов, а также биологической активности in vitro.

Было установлено, что как ОКФ, так и ген-активированные материалы не обладали цитотоксичностью, однако снижали пролиферативную активность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека: изделие с двухкассетной генной конструкцией снижало скорость удвоения клеточной культуры на 24,3% больше, чем материал с плазмидной ДНК, несущей только VEGF. Оба ген-активированных материала приводили к повышению уровня мРНК терапевтических генов, но в случае материала с двухкассетной системой увеличение продукции белка VEGF было большим.

Таким образом, разработанные ген-активированные материалы характеризовались отсутствием цитотоксических

High need for effective bone substitutes and drawbacks of the materials approved for clinical use determine the increasing activity of biomedical research in this area.

We have developed gene-activated bone substitutes consisting of a scaffold based on octacalcium phosphate (OCP) and one of the two variants of plasmid DNA carrying either a gene for vascular endothelial growth factor (VEGF) or two genes encoding VEGF and stromal derived factor-1α (SDF-1α). The aim of the study was to evaluate the cytotoxicity of the gene-activated materials and their components, as well as biological activity in vitro.

We found that both OCP and gene-activated bone substitutes did not have any cytotoxicity, but reduced the proliferative activity of human bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells: material with double-gene construct decreased cell culture doubling rate of 24.3% more compared with the material carrying plasmid DNA encoding only VEGF. Both gene-activated materials led to an increase in therapeutic genes mRNA levels, but the material with double-gene system enhanced VEGF protein production greater.

Thus, the gene-activated bone substitutes characterized by the absence of cytotoxic properties and possessed a specific activity increasing expression of the therapeutic genes. However, further studies are needed to detail the identified characteristics and assess the feasibility of the defined biological action in vivo.

e-mail: bozo.ilya@gmail.com

свойств и обладали специфической активностью в виде увеличения экспрессии терапевтических генов. Однако дальнейшие исследования необходимы для детализации выявленных особенностей и оценки реализуемости биологического действия *in vivo*.

Ключевые слова: ген-активированный остеопластический материал, октакальциевый фосфат, плазмидная ДНК, сосудистый эндотелиальный фактор роста, фактор стромальных клеток-1 α .

Введение

Эффективные остеопластические материалы крайне востребованы в клинической практике: в травматологии и ортопедии, нейрохирургии, челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии [1]. Большинство из разрешенных для применения остеопластических материалов относятся к категории «ординарных», так как не содержат стандартизированных по качественным и количественным показателям биологически активных компонентов, способных значительно усилить репаративный остеогистогенез, привести необходимые индуцирующие факторы и (или) камбиальные клеточные элементы. Ввиду недостаточной эффективности таких медицинских изделий в рамках клеточных, постгеномных и генных технологий активно разрабатываются новые материалы, способные составить эффективную альтернативу свободным костным аутотрансплантатам [2]. Данное исследование является частью разработки ген-активированных материалов.

Ген-активированные остеопластические материалы представляют собой класс медицинских изделий для костной пластики, отличительной особенностью которых является наличие генных конструкций — биологически активных нуклеиновых кислот, — несущих гены терапевтических белковых факторов [3]. После имплантации в костный дефект или область атрофии костной ткани генные конструкции высвобождаются из состава матрикса-носителя, поступают в клетки реципиентного ложа (иммунокомпетентные клетки, фибробласты, остеобласты) и экспрессируются в них в течение определенного периода времени с продукцией терапевтического белка, кодируемого генной конструкцией [2, 3]. Длительность экспрессии трансгена определяется видом вектора, выбранного для его доставки. В случае применения безопасного вектора — плазмидной ДНК — продолжительность экспрессии трансгена не превышает двух недель. Матрикс-носитель выполняет остеокондуктивную функцию, направляя формирующийся костный регенерат от стенок костного дефекта к центру области костной пластики, а также влияет на кинетику высвобождения генных конструкций и, в ряде случаев, на эффективность трансфекции *in vivo* [4].

Учитывая то, что ключевым компонентом ген-активированных материалов являются биологически активные нуклеиновые кислоты, фундамент для разработки таких медицинских изделий заложили достижения в области генной терапии. В частности, успешное внедрение геннотерапевтического лекарственного препарата «Неоваскулген» (Институт Стволовых Клеток Человека, Россия), действующим веществом которого является плазмидная ДНК с геном сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), сформировало предпосылки

Keywords: gene-activated bone substitute, octacalcium phosphate, plasmid DNA, vascular endothelial growth factor, stromal derived factor-1 α .

для разработки ген-активированных материалов, содержащих это же вещество. Ранее мы показали, что, благодаря ангиогенному эффекту плазмидной ДНК с VEGF, ген-активированные остеопластические материалы, изготовленные с использованием различных матриксов-носителей (композитный материал из коллагена и гидроксиапатита, ксеногенный костный матрикс, октакальциевый фосфат (ОКФ)), обладали выраженным остеоиндуктивным действием [5, 6]. Однако помимо ангиогенеза в регуляцию репаративной регенерации костной ткани вовлечено множество других механизмов, которые обеспечивают привлечение камбиальных клеток в зону остеогенеза, индукцию пролиферации и дифференцировки остеогенных клеток-предшественниц, стимулируют продукцию остеобластами компонентов костного межклеточного матрикса и т.д. В этой связи, спектр потенциально возможных трансгенов-кандидатов биологически активных нуклеиновых кислот для включения в состав ген-активированных остеопластических материалов довольно широк [2]. Выбор в каждом случае должен быть обусловлен спецификой показаний для костной пластики, пониманием, какой из механизмов, какой из остеоиндуцирующих факторов минимизирован в наибольшей степени, т.е. является главной причиной «остеогенной недостаточности» [5]. На наш взгляд, в случае протяженных (объемных) костных дефектов, составляющих основную клиническую проблему, причиной низкой активности естественного восстановления костной ткани является не только недостаточность кровоснабжения, но и малое количество камбиальных клеток. Привлечение клеток-предшественниц остеобластов из системных источников в зону костного дефекта теоретически позволило бы усилить репаративный процесс.

В этой связи, мы предположили, что введение в состав плазмидной ДНК с геном VEGF еще одного гена — последовательности, кодирующей фактор стромальных клеток-1 (SDF-1), — наделит ген-активированный материал более выраженными остеоиндуктивными свойствами. Известно, что SDF индуцирует хоуминг малодифференцированных клеток из костного мозга, в том числе MMCK, по градиенту концентрации [7]. Кроме того, через повышение транскрипционного фактора NF- κ B способен снижать активность дифференцировки камбиальных клеток в остеобластическом направлении, что способствует увеличению их пула [8]. Таким образом, целью настоящего исследования стала сравнительная оценка биологической активности ген-активированных материалов, содержащих идентичный матрикс-носитель на основе ОКФ и два варианта нуклеиновых кислот: плазмидную ДНК с геном VEGF и двухкассетную плазмидную ДНК с генами VEGF и SDF.

Материал и методы

Ген-активированные остеопластические материалы

Ген-активированные остеопластические материалы были изготовлены из носителя на основе ОКФ (в виде гранул диаметром 500–1000 мкм с пористостью до 70 %) и двух вариантов плазмидных ДНК — однокассетной системы с геном, кодирующим VEGF (pl-VEGF165) и двухкассетной — с двумя терапевтическими генами, кодирующими VEGF и SDF-1 α (pl-VEGF165-SDF-1 α), под одним цитомегаловирусным промотором.

Синтез ОКФ осуществлялся по ранее описанной технологии [6]. Источником pl-VEGF165 стал лекарственный препарат «Неоваскулген», предоставленный ПАО «Институт Стволовых Клеток Человека» [9, 10]. Необходимое для исследования количество pl-VEGF165-SDF-1 α было наработано компанией GenScript (США) согласно мастер-файлу, разработанному Казанским (Приволжским) федеральным университетом по заказу ООО «НекстГен» [11].

Совмещение матрикса-носителя на основе ОКФ и каждого из вариантов генных конструкций выполняли с использованием разработанного лабораторного протокола [12] с получением двух вариантов ген-активированных остеопластических материалов: ОКФ/pl-VEGF165 и ОКФ/pl-VEGF165-SDF-1 α , содержащих по 100 мкг биологически активных нуклеиновых кислот в 1 г матрикса-носителя.

Исследования in vitro

Исследования in vitro выполняли на культурах мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека (ММСК), культивированных в стандартных условиях [13] и предоставленных криобанком ГНЦ «ФМБЦ им. А.И. Бурназяна» ФМБА России.

Оценка цитотоксичности. ММСК были расселены в 12-луночные планшеты по 5×10^4 клеток на лунку. Образцы разработанных ген-активированных остеопластических материалов массой 50 мг на лунку помещались в специальные вставки с мембраной (величина пор 3 мкм) — «transwell»-систему (Corning, США). Вставки далее переносились в лунки культуральных планшетов. Цитотоксичность материалов оценивали по количеству погибших клеток в супернатанте и культуре клеток на 1, 3 и 5 сут. после начала совместного культивирования. Для этого отбирали супернатант и центрифугировали его 5 мин. с ускорением 200g. Параллельно клетку снимали с помощью 0,25% раствора трипсина/EDTA в течение 5 мин. с поверхности культурального пластика. Полученные клеточные осадки объединяли и проводили пробоподготовку для цитометрического анализа. На проточном цитофлуориметре (BD Biosciences, США) определяли количество погибших клеток, селективно окрашенных пропидий-йодидом. Контрольными группами служили ММСК без добавления каких-либо материалов, а также инкубированные только с генными конструкциями без ОКФ и с матриксами-носителями без генных конструкций. Регистрировали усиление сигнала по длине волны 535 нм от интеркалирующего флуоресцентного красителя пропидий-йодид. Цитоплазматическая мембрана живой клетки непроницаема для пропидий-йодида, тогда как в мертвых клетках

краситель проникает через мембрану и связывается с ДНК.

Оценка влияния на пролиферативную активность клеток. Оценку пролиферации выполняли в тех же экспериментальных и контрольных сериях, однако исходная численность клеток составила 1×10^4 , а сроки наблюдения — 3, 5 и 7 сут. Подсчет клеток проводился на автоматическом счетчике клеток Countess Automated Cell Counter (Invitrogen, США). Для расчета скорости удвоения клеточных популяций в первые 3 сут. использовали следующую формулу:

$$Td = T_x \times \ln(2) / \ln(N_x / N_0),$$

где Td — время удвоения клеточной популяции в течение расчетного периода времени; T_x — длительность культивирования; N_x — количество клеток через T_x ; N_0 — исходное количество клеток в культуре.

Определение продукции мРНК генов VEGF и SDF культурами ММСК. ММСК человека по $1,5 \times 10^5$ помещали в лунки 6-луночного планшета, куда после их адгезии добавляли образцы ген-активированных остеопластических материалов, либо носителей без pl-VEGF, либо вносили только генные конструкции без носителей. Для определения уровня экспрессии гена VEGF из клеток на 1, 3, 5, 7, 10 и 12 сут. выделяли общую РНК на колонках с помощью набора Pure Link RNA MiniKit (Invitrogen, США), согласно инструкции производителя.

Осажденные клетки тщательно лизировали в объеме 350 мкл лизирующего буфера в присутствии 1% β -меркаптоэтанола. Добавляли равный объем 70% этанола, вортексировали и переносили на колонки. Центрифугировали 1 мин. при 12,4 тыс. об. мин. Сливали супернатант, добавляли на мембрану 600 мкл промывочного раствора 1, центрифугировали 15 сек. при 12,4 тыс. об. мин. Затем убрали супернатант, добавляли на мембрану 500 мкл промывочного раствора 2, центрифугировали при тех же условиях, убрали жидкость. Повторяли отмывку с промывочным раствором 2. Переносили колонки в новые пробирки и центрифугировали 1 мин. при 12,4 тыс. об. мин. Переносили колонки в пробирки для сбора РНК. Непосредственно на мембрану вносили 15 мкл воды без РНКаз, инкубировали 1 мин. при комнатной температуре, центрифугировали 90 сек. при 12,4 тыс. об. мин. До дальнейшего применения пробы хранились при температуре -80°C . Далее проводили синтез первой цепи кДНК с помощью реактивов компании Promega (США). Относительный уровень экспрессии таргетных генов (VEGF и SDF) определяли по сравнению с экспрессией гена домашнего хозяйства β -актина с помощью набора для проведения ПЦР в реальном времени в присутствии SYBRGreenI и референсного красителя ROX (Синтол, Россия). Для выполнения ПЦР в реальном времени использовали праймеры, указанные в табл.

Определение продукции белка VEGF культурами ММСК. По $1,5 \times 10^5$ ММСК человека помещали в лунки 6-луночного планшета, куда после прикрепления клеток добавляли ген-активированные остеопластические материалы, генные конструкции без носителей, либо гранулы ОКФ без генных конструкций. На сроках 1, 3, 5, 7, 10 и 12 сут. забирали образцы среды (100 мкл) для последующего анализа. Измерения проводились в четырех повторениях на каждом сроке. В течение всех 12 сут. замена культуральной среды не производилась.

Таблица. Праймеры для выполнения ПЦР в реальном времени

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер
VEGF	ACATTGTTGGAAGAAGCAGCCC	AGGAAGGTCAACCACTCACACA
SDF-1	TGCCCTTCAGATTGTAGCCC	CTGTAAGGGTTCCTCAGGCG
β-actin	CGCCCCAGGCACCAGGGC	GGCTGGGGTGTGAAGGT

Определение количества VEGF проводили в супернатанте с использованием набора для иммуноферментного определения концентрации VEGF Duo Set ELISA Development System (R&D Systems, США), согласно инструкции производителя. Оптическую плотность измеряли на микропланшетном спектрофотометре EL340 Microplate Reader Biokinetic (Bio-Tech Instruments, США) при длине волны 450 нм, с референсной длиной волны 490 нм. Построение калибровочной кривой и обсчет данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPadPrizm5.

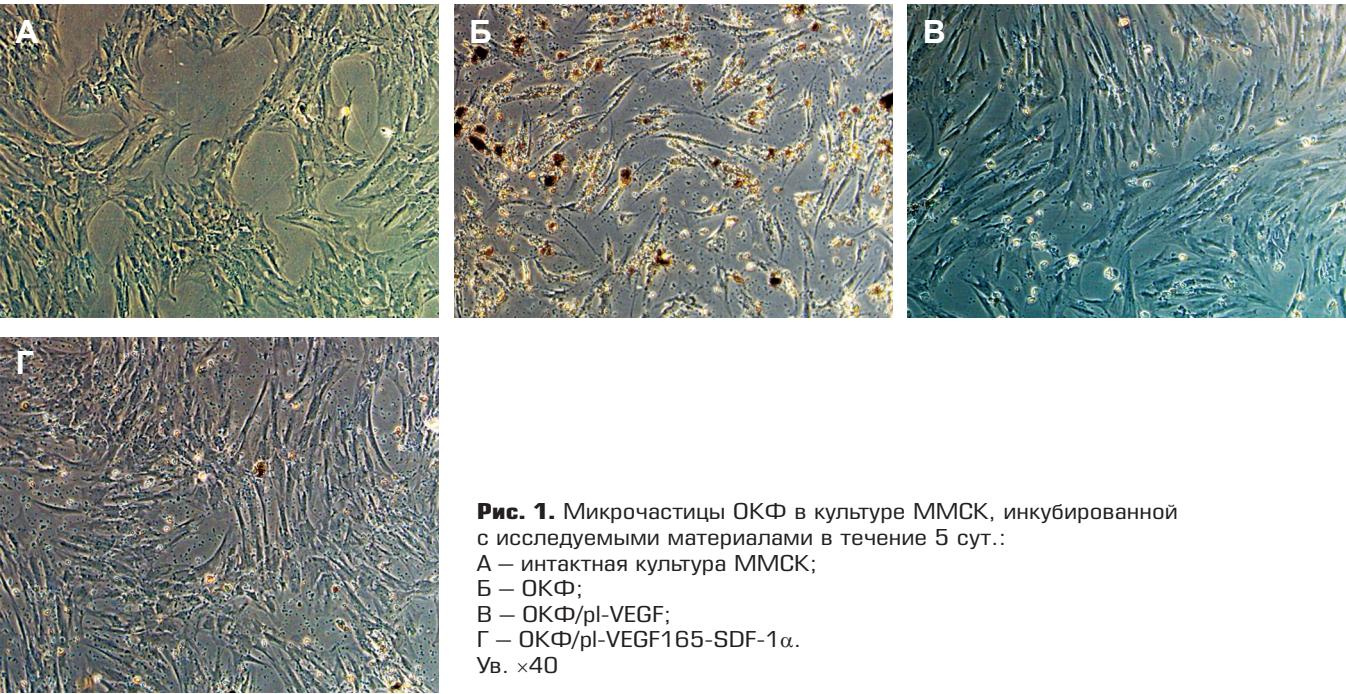
Статистический анализ

На первом этапе для статистического анализа полученных данных (количество живых и мертвых клеток, численность клеток в культурах разных сроков ко-инкубирования с материалами, уровни мРНК трансгенов, концентрация белка VEGF) были использованы описательные методы: определение среднего значения (M), медианы (Me), среднего квадратического отклонения (σ), стандартной ошибки среднего значения (m), межквартильного размаха (IQR), нижнего (LQ) и верхнего квартилей (UQ). Затем определяли соответствие распределения исследуемых количественных параметров закону нормального распределения с помощью критерия Шапиро-Уилка. Учитывая непараметрическое распределение количественных признаков для одновременного сравнения более двух независимых групп был ис-

пользован непараметрический критерий Краскелла – Уоллиса, а для дальнейшего выявления различий между двумя независимыми группами – U-критерий Манна – Уитни с поправкой Бонферрони. Для сравнения количественных параметров на разных сроках в пределах одной группы применяли критерий Вилкоксона. Во всех случаях уровень статистической значимости различий был принят за $p < 0,05$. Для статистического анализа использовали программу Statistica 10.0 (StatSoft, США).

Результаты
Цитотоксичность

При оценке морфологии клеточных культур, инкубированных с остеопластическими материалами, на светооптическом уровне были выявлены отличия в плотности монослоя ММСК. Так, на 5-е и 7-е сут. в контроле интактная культура характеризовалась большей плотностью, а в случае ко-инкубирования с ген-активированными материалами или гранулами ОКФ без плазмидных ДНК клетки сохраняли более дискретное положение. Кроме того, в экспериментальных группах и в контроле с ОКФ в культуральной среде было выявлено значительное количество микрочастиц ОКФ, проникших через поры «transwell»-системы, т.е. имевших диаметр менее 3 мкм. Часть гранул акцептировалась клетками, сохранявшими при этом жизнеспособность и характерную для ММСК морфологию (рис. 1).



Ни в одном из случаев не было выявлено статистически значимых различий в численности погибших клеток при сравнении с показателем интактной культуры ММСК. В нескольких случаях различия между экспериментальными группами были статистически значимы. На крайнем сроке наблюдения доля погибших клеток в интактной культуре была несколько выше, чем при ко-инкубировании с генными конструкциями, ОКФ и ОКФ/pl-VEGF (рис. 2).

Влияние на пролиферацию ММСК

Добавление генных конструкций без ОКФ не влияло на пролиферативную активность ММСК. Однако на сроке 3 сут. количество клеток в культурах, ко-инкубированных с ген-активированными материалами и ОКФ, было меньшим, чем в контроле, хотя

различия не были статистически значимы. Через 5 сут. численность клеток в случае обоих вариантов ген-активированных материалов была статистически значимо меньшей, чем в интактной культуре, однако к 7 сут. показатели во всех группах выравнивались, а в случаях ОКФ и ОКФ/pl-VEGF даже несколько превышали значения в интактной группе (рис. 3).

Средняя скорость удвоения интактных культур ММСК в исследовании составила $42,41 \pm 5,78$ ч., что соответствует данным других исследователей [14]. Все материалы снижали пролиферативную активность клеток, однако различия с контрольной группой были статистически значимы только при сравнении с ОКФ/pl-VEGF165-SDF-1 α ($p = 0,012$). Средняя скорость удвоения в случае ОКФ составила $51,0 \pm 8,32$ ч.; ОКФ/pl-VEGF — $47,18 \pm 4,54$; ОКФ/pl-VEGF165-SDF-1 α — $57,49 \pm 3,71$ ч.

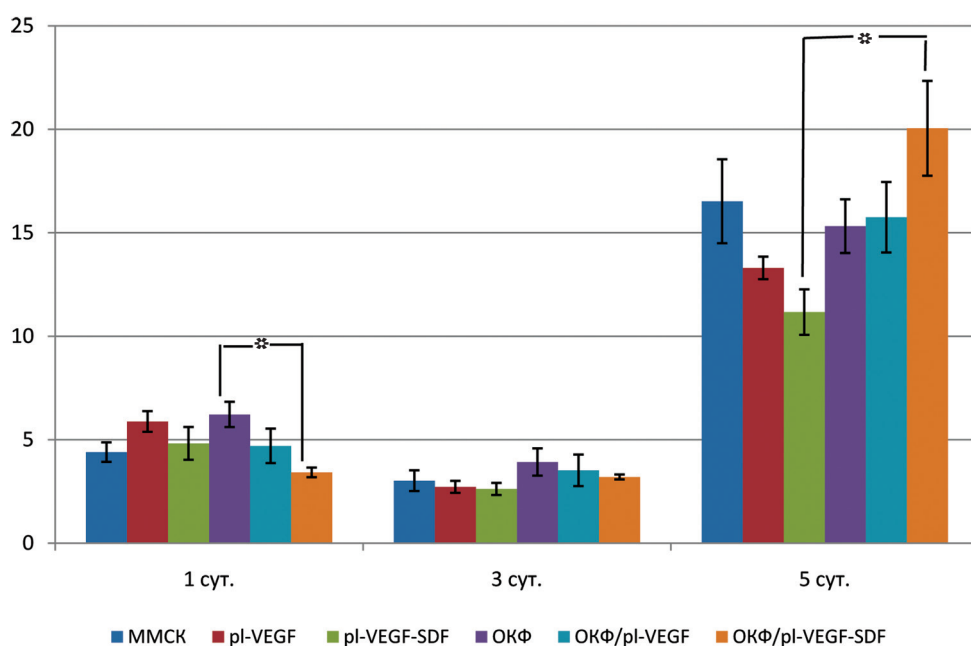


Рис. 2.

Доля погибших клеток (%) на разных сроках культивирования при ко-инкубировании с остеопластическими материалами или генными конструкциями без матрикса-носителя. * различия при сравнении показателей статистически значимы ($p < 0,05$)

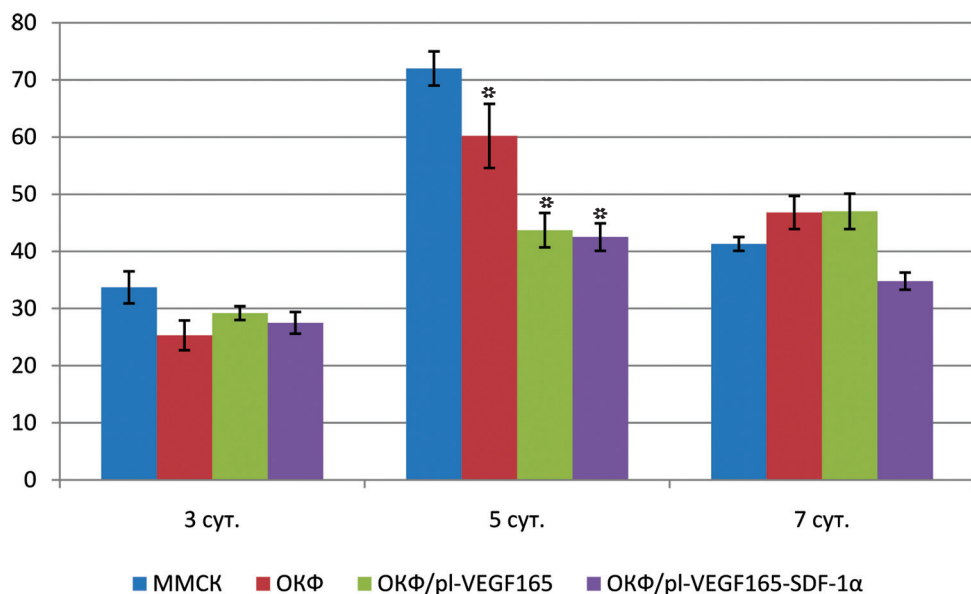


Рис. 3.

Количество ММСК в культуре ($\times 10^3$) на разных сроках культивирования при ко-инкубировании с остеопластическими материалами. * различия при сравнении показателей с интактной культурой статистически значимы ($p < 0,05$)

Специфическая активность ген-активированных материалов

Транскрипция терапевтических генов

На всех сроках наблюдения уровень мРНК гена *VEGF* в культурах, ко-инкубированных с ген-активированными материалами, был выше эндогенного уровня транскрипции в интактных ММСК. Различия с контрольной группой были статистически значимы практически на всех сроках наблюдения. При этом добавление в среду культивирования только генных конструкций без матрикса-носителя и каких-либо агентов, повышающих трансфекцию, не приводило к изменению уровня мРНК *VEGF*. В то же время, даже ОКФ без биологически активных нуклеиновых кислот вызывал увеличение экспрессии гена *VEGF*, которое до 5 сут. наблюдения превышало показатель в группе с ОКФ/pl-VEGF165-SDF-1 α . Наибольший уровень транскрипции гена *VEGF* на-

блюдался на 5 сут. в случае ОКФ/pl-VEGF, затем определялось резкое снижение. В случае ОКФ/pl-VEGF165-SDF-1 α пик экспрессии смещался вправо с достижением максимума на 10 сут. (рис. 4А).

Уровень экспрессии гена *SDF* также был сопоставимый в интактной культуре ММСК и при внесении в культуральную среду исследуемых генных конструкций. Однако максимальное пиковое значение показателя было выявлено в группе ОКФ/pl-VEGF165-SDF-1 α на 5 сут., статистически значимо отличающееся от интактной культуры ($p = 0,016$). При этом в случае ОКФ/pl-VEGF165 также наблюдалось значительное увеличение уровня продукции мРНК *SDF*, но меньшее, по сравнению с ОКФ/pl-VEGF165-SDF-1 α , и пиком на 10 сут. Динамика изменения экспрессии гена *SDF* в случае ОКФ и ОКФ/pl-VEGF165 была практически идентичной, с разницей лишь в абсолютных значениях: минимум на 5 сут. (не считая 1 сут.) и пиком на 10 сут. (рис. 4Б).

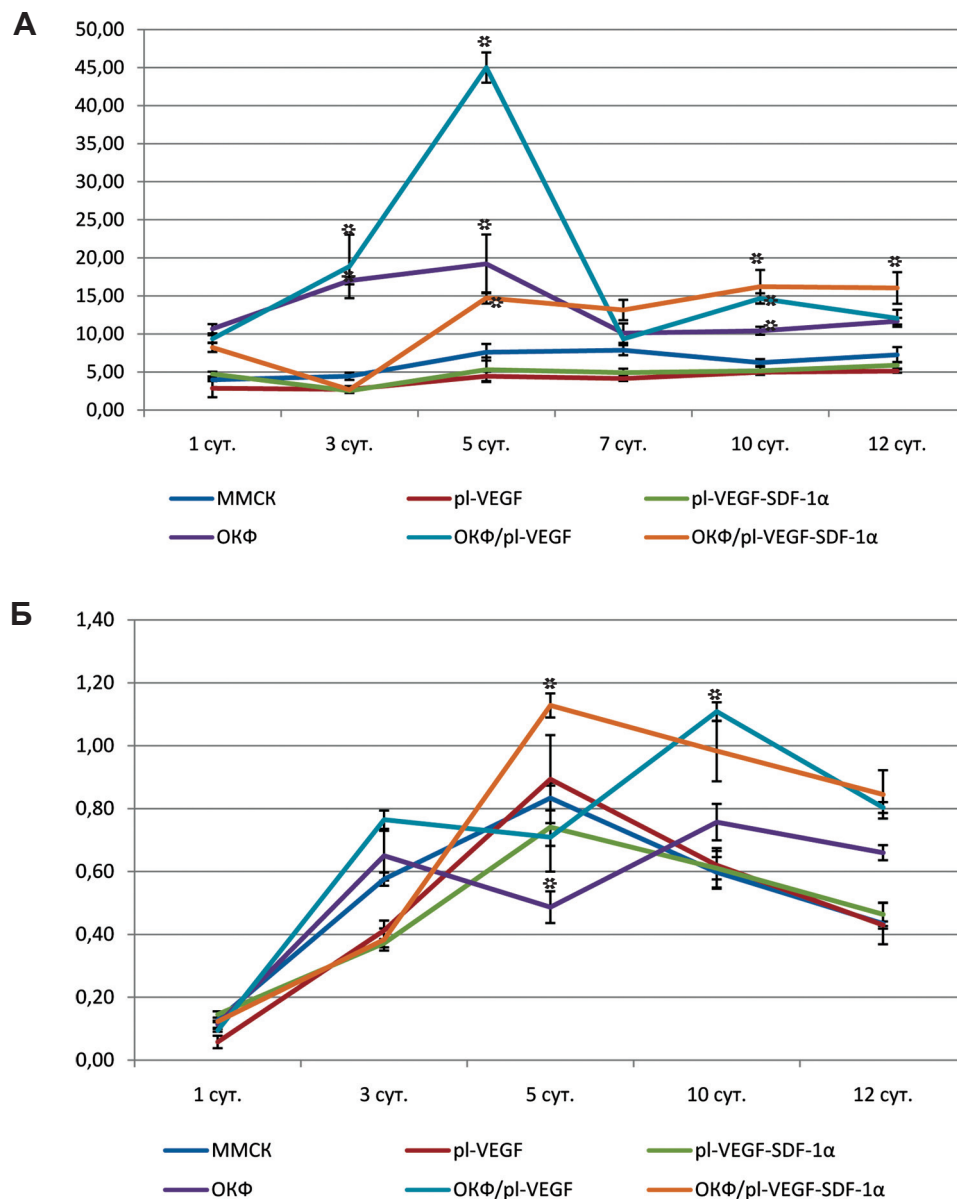


Рис. 4. Уровни мРНК терапевтических генов *VEGF* (А) и *SDF* (Б) в культурах ММСК, ко-инкубированных с исследуемыми материалами.

* различия при сравнении с интактной культурой ММСК статистически значимы, $p < 0,05$

Анализ белковых продуктов терапевтических генов

Через 3 сут. ко-инкубирования в случае ген-активированных материалов и ОКФ наблюдался статистически значимо более низкий уровень продукции белка VEGF, по сравнению с интактной культурой ММСК. К 5 сут. показатели во всех группах практически выравнивались с незначительным превышением в случае ОКФ/pl-VEGF165. Однако, начиная с 7 сут., максимальные значения наблюдались в случае ОКФ/pl-VEGF165-SDF-1 α , а также — pl-VEGF165-SDF-1 α на крайней временной отметке. Уровень продукции белка в группах pl-VEGF165 и ОКФ/pl-VEGF165 лишь незначительно превышал показатель интактной культуры на сроках 7–12 сут. (рис. 5).

Обсуждение

Ген-активированные остеопластические материалы, составляющие альтернативу тканеинженерным костным графтам и материалам с факторами роста, приобретают все большую значимость в качестве потенциально эффективных изделий для костной пластики. Лишенные недостатков других активированных материалов [2], первые изделия с генными конструкциями, кодирующими терапевтические белки, в ближайшие годы, вероятно, будут внедрены в клиническую практику.

Начиная с 2010 г., основным компонентом разрабатываемых нами ген-активированных материалов была плазмидная ДНК, несущая ген *VEGF* — активное вещество препарата «Неоваскулген». В экспериментальных исследованиях *in vitro* и *in vivo* была показана их безопасность и выраженные остеоиндуктивные свойства. Благодаря ангиогенному эффекту разработанные ген-активированные материалы обеспечивали формирование костного регенерата в центральной части критического дефекта теменной кости кролика уже с 15 сут. после имплантации, т.е. служили источником репаративного остеогистогенеза [15, 16]. К 90 сут. после операции достигалась полная консолидация дефектов. Успешные результаты 5 лет исследований привели к созданию двух вариантов ген-активированных

остеопластических материалов, содержащих плазмидную ДНК с геном *VEGF* и отличающихся матриксом-носителем (композитный материал на основе коллагена и гидроксиапатита, ОКФ). Первое изделие показало успешные результаты в инициативном клиническом исследовании [17], второе находится на стадии регистрационных клинических испытаний (Разрешение федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения №610/2016 от 05 июля 2016).

Однако, учитывая многогранность этиологических и патогенетических факторов остеогенной недостаточности, характерной для протяженных (объемных) костных дефектов, нерешенность проблемы лечения пациентов с такой патологией, обоснован поиск путей совершенствования ген-активированных материалов, одним из которых является использование генных конструкций с несколькими терапевтическими генами (в одной или разных векторных системах). Такое направление оптимизации уже реализовано в ряде экспериментальных исследований [2, 18–20].

Поставив задачу расширить ангиогенный механизм остеоиндуцирующего действия ген-активированного материала за счет способности индуцировать хоуминг малодифференцированных клеток-предшественниц остеобластов из системных источников, мы внесли в состав его биологически активного компонента дополнительный трансген — *SDF*. До проверки реализуемости таких эффектов *in vivo* мы предприняли сравнительное исследование *in vitro*.

Отсутствие статистически значимых различий по количеству погибших клеток в культурах ММСК, ко-инкубированных с исследуемыми материалами, подтвердило отсутствие цитотоксических свойств ген-активированных изделий и их компонентов — ОКФ и плазмидных ДНК с одним (*VEGF*) или двумя терапевтическими генами (*VEGF-SDF*). Иными словами, двухкассетные конструкции не компрометируют безопасность ген-активированных материалов, что коррелирует с данными других авторов [19]. Однако, как ОКФ, так и ген-активированные материалы в некоторой степени снижали пролиферативную активность клеток *in vitro*, что может быть связано, в том числе, и с индукцией их дифференцировки, которая

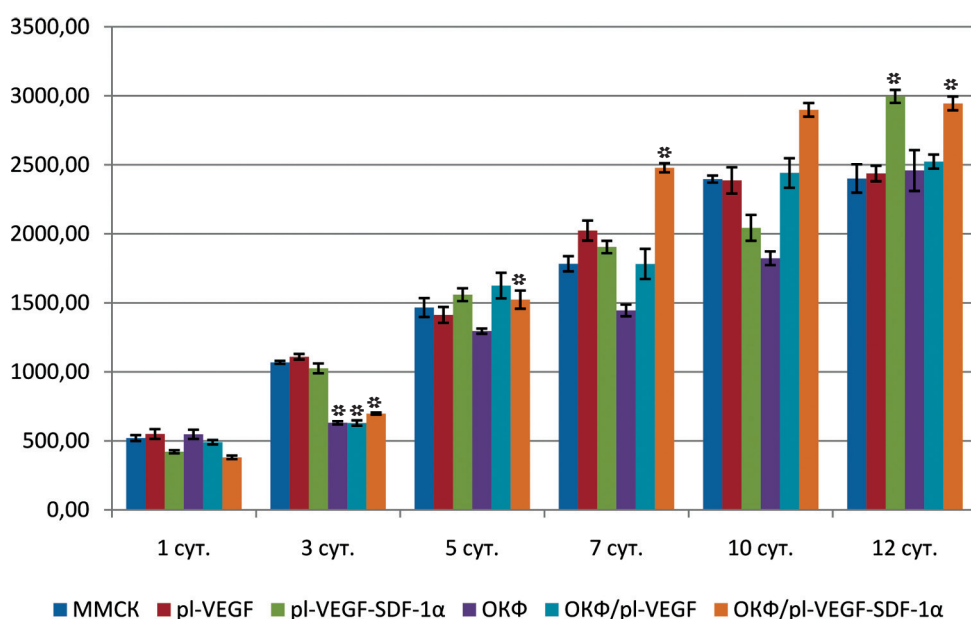


Рис. 5.

Концентрация белка VEGF в культуральной среде (пг/мл) при ко-инкубации ММСК с исследуемыми материалами.

* различия при сравнении показателей с интактной культурой статистически значимы ($p < 0,05$)

закономерно сопровождается снижением способности к митотическому делению. Такой эффект требует дальнейших исследований с определением фенотипических проявлений дифференцировки ММСК под воздействием ОКФ и ген-активированных материалов.

Продукция целого спектра биологически активных веществ, таких как основной фактор роста фибробластов (bFGF), гепатоцитарный фактор роста (HGF), трансформирующий фактор роста- β (TGF- β), индуцированный гипоксией фактор (HIF) и др., благодаря которым обеспечивается регуляция процессов репаративной регенерации и ремоделирования тканей, характерна для ММСК. Известно, что культура ММСК костного мозга человека численностью 1×10^6 клеток продуцирует около 750 пг/мл VEGF [21]. В этой связи, проявлением специфической активности разрабатываемых ген-активированных материалов является повышение эндогенного уровня мРНК генов *VEGF* и *SDF*, а также терапевтического белка VEGF в культуральной среде.

На всех сроках наблюдения уровень мРНК гена *VEGF* в культурах, ко-инкубированных с ген-активированными материалами, был выше эндогенного уровня транскрипции в интактных ММСК. Такой эффект может быть обусловлен как специфической активностью генных конструкций, входящих в состав ген-активированных материалов, так и влиянием матрикса-носителя. Чтобы дифференцировать первопричины эффекта были предусмотрены контрольные группы с инкубацией культур ММСК с ОКФ без генных конструкций. Оказалось, что даже в случаях матрикса без плазмидной ДНК уровень мРНК гена *VEGF* в клетках повышался, при этом различия с показателем интактной культуры были статистически значимы на всех сроках, за исключением 7 сут. (рис. 4А). Причиной такого влияния ОКФ может являться гипоксический эффект, иные минорные неспецифические влияния на клетки, запускающие их компенсаторно-адаптационные механизмы, характеризующие их реакцию на изменение микроокружения. С другой стороны, матрикс-носитель, содержащий фосфаты кальция, мог индуцировать дифференцировку клеток в остеобластическом направлении. И в том, и в другом случае одним из фенотипических проявлений изменения морфофункциональной активности клеток является продукция ряда биологически активных веществ, в том числе VEGF [22, 23]. Однако только лишь неспецифическим влиянием матриксов нельзя объяснить повышение уровня транскрипции гена *VEGF* культурами, ко-инкубированными с ген-активированными материалами, поскольку в этих случаях прирост мРНК гена VEGF был более существенным, по сравнению с ОКФ без генных конструкций. В ряде случаев, несмотря на малое количество повторений в группах ($n = 4$), различия были статистически значимы (рис. 4А). Таким образом, повышение продукта транскрипции гена *VEGF* в культурах ММСК было обусловлено как неспецифическим действием матриксов-носителей, так и специфической активностью плазмидной ДНК с геном *VEGF*, входящей в состав ген-активированных материалов. Пик транскрипции трансгена был выявлен на 5 сут. в случае ОКФ/pl-VEGF165 и 10 сут. в группе с ОКФ/pl-VEGF165-SDF-1 α .

Важно, что наибольший уровень транскрипции гена *SDF* наблюдался в случае ген-активированного материала с двухкассетной плазмидной ДНК. Однако

увеличение экспрессии этого гена было выявлено и в случае ОКФ/pl-VEGF165 с пиком на 10 сут., что косвенно может свидетельствовать о наличии некоторых связей в механизмах регуляции синтеза белков VEGF и SDF-1, возможном потенцирующем эффекте продукта транскрипции/трансляции гена *VEGF* на *SDF* или наличии общих для обоих генов транскрипционных факторов. Это предположение подтверждается данными других исследователей. В частности, известно, что в ряде случаев белок VEGF индуцирует секрецию SDF-1 α [24], повышает уровень экспрессии мРНК гена *SDF* и его рецептора CXCR4 [25]. Биологический смысл такого эффекта может заключаться в привлечении и удержании в периваскулярных нишах ММСК костного мозга.

В группах с внесением в культуральную среду только генных конструкций статистически значимых изменений в уровне мРНК трансгенов по сравнению с интактной культурой ММСК не наблюдалось, что, вероятно, обусловлено низким уровнем трансфекции клеток. В данном исследовании осознанно не использовались агенты, повышающие уровень трансфекции, чтобы обеспечить максимальную приближенность к условиям *in vivo*. Повышение же уровня мРНК генов *VEGF* на *SDF* в группах с ген-активированными материалами может быть связано с оптимизирующим влиянием матрикса-носителя на процесс поступления плазмидной ДНК в клетки. Так, широко известным является кальций-фосфатный метод оптимизации трансфекции, основанный на применении хлорида кальция и растворов фосфатных буферов, которые формируют преципитаты фосфатов кальция, связывающие молекулы ДНК генных конструкций и поступающие в клетки за счет эндоцитоза [26]. Более того, уже выдвигались предположения, что ген-активированные материалы, состоящие из фосфатов кальция и плазмидной ДНК, обладают более высокой эффективностью трансфекции [4], однако механизмы такого эффекта не были детализированы. В нашем исследовании только в группах с ген-активированными материалами и ОКФ на светооптическом уровне в зоне с клетками были обнаружены микрочастицы, расположенные как вне-, так и внутриклеточно (рис. 1). По всей видимости, эти микрочастицы диаметром менее 3 мкм представляли собой преципитаты фосфатов кальция, которые связывали молекулы ДНК генных конструкций и поступали в клетки. Такое предположение требует дальнейшего экспериментального обоснования.

При оценке продукции терапевтического белка, было выявлено, что в течение первых трех суток в группах с остеопластическими материалами показатель находился на уровне, значительно ниже контроля, что может быть обусловлено замедлением скорости удвоения клеточных популяций. Однако к пятым суткам концентрация VEGF во всех сериях выравнивалась, несмотря на большее количество клеток к данному сроку в интактной культуре и в случае ММСК, ко-инкубированных с генными конструкциями без ОКФ. Однако в дальнейшем, несмотря на повышение уровня мРНК трансгенов, накопленная концентрация белка VEGF в культуре в случае с ОКФ/pl-VEGF165 лишь незначительно превышала показатель интактных ММСК. В то же время в группах с ОКФ/pl-VEGF165-SDF-1 α и даже pl-VEGF165-SDF-1 α наблюдался существенный прирост с достижением статистической значимости различий

при сравнении с культурой ММСК на крайних сроках наблюдения. Такое несоответствие между уровнями транскрипции трансгенов и продукцией терапевтического белка может быть связано с реализацией посттранскрипционных механизмов регуляции времени жизни мРНК [2]. Теоретически, благодаря таким механизмам трансфицированные клетки сохраняют нормальную реакцию на стимулы микроокружения и при отсутствии необходимости в терапевтическом белке могут нивелировать воздействие генной конструкции, даже содержащей цитомегаловирусный промотор. Такое предположение подтверждают полученные нами данные в части ген-активированного материала с плазмидной ДНК, несущей ген *VEGF*, однако в случае ОКФ/рl-VEGF165-SDF-1 α статистически значимо больший уровень гена *VEGF* коррелировал с достоверно повышенной концентрацией белка VEGF. Выявление механизмов, факторов и условий, которые привели к таким различиям, требуют дальнейших экспериментальных исследований.

Заключение

Разработанные нами ген-активированные материалы и их компоненты — ОКФ, рl-VEGF165 и рl-VEGF165-SDF-1 α — не обладают цитотоксическими эффектами, однако снижали скорость удвоения клеточных культур. При этом ген-активированный материал ОКФ/рl-VEGF165-SDF-1 α на 24,3% в большей степени снижал пролиферативную активность ММСК костного мозга человека *in vitro*, чем

ОКФ/рl-VEGF165. Механизм такого влияния может быть обусловлен индукцией дифференцировки клеток, что требует дальнейших исследований.

Оба ген-активированных материала приводят к повышению уровня экспрессии трансгенов с пиком на 5 сут., но в случае ОКФ/рl-VEGF165-SDF-1 α дальнейшее снижение уровня мРНК более плавное и медленное, тогда как в группе с ОКФ/рl-VEGF165 — резкое. Вероятно, за счет матрикса-носителя из ОКФ увеличивается эффективность трансфекции клеток генными конструкциями, однако наибольший прирост продукции терапевтического белка VEGF наблюдалось в случае ОКФ/рl-VEGF165-SDF-1 α при сравнении с ОКФ/рl-VEGF165, что может быть обусловлено различиями в посттранскрипционных механизмах регуляции полужизни мРНК трансгенов, кодируемых исследованными генными конструкциями.

Таким образом, оба варианта ген-активированных материалов подтвердили отсутствие цитотоксичности и показали определенную биологическую активность. Для детализации механизмов специфического действия разработанных изделий, причин выявленных эффектов и обоснования выдвинутых предположений требуются дальнейшие исследования.

Благодарности

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 15-13-00108.

ЛИТЕРАТУРА:

- García-García E., Coathup M.J., Blunn G.W. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. *Bone* 2015; 81: 112-21.
- Deev R.V., Drobyshev A.Y., Bozo I.Y. et al. Ordinary and activated bone grafts: applied classification and the main features. *Biomed Res Int.* 2015; 2015: 365050.
- Evans C.H. Gene delivery to bone. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2012; 64(12): 1331-40.
- Keeney M., van den Beucken J.J., van der Kraan P.M. et al. The ability of a collagen/calcium phosphate scaffold to act as its own vector for gene delivery and to promote bone formation via transfection with VEGF(165). *Biomaterials* 2010; 31(10): 2893-902.
- Гололобов В.Г., Дедух Н.В., Деев Р.В. Скелетные ткани и органы. В кн.: *Руководство по гистологии*, 2 издание. Т.1. 2011; СПб: СпецЛит. С. 238-322.
- Komlev V.S., Barinov S.M., Bozo I.I. et al. Bioceramics composed of octacalcium phosphate demonstrate enhanced biological behaviour. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2014; 6(19): 16610-20.
- Marquez-Curtis L.A., Janowska-Wieczorek A. Enhancing the migration ability of mesenchymal stromal cells by targeting the SDF-1/CXCR4 axis. *Biomed. Res. Int.* 2013; 2013: 561098.
- Niederberger E., Geisslinger G. Proteomics and NF- κ B: an update. *Expert Rev. Proteomics* 2013; 10(2): 189-204.
- Deev R., Plaksa I., Bozo I. et al. Results of an international postmarketing surveillance study of pl-VEGF165 safety and efficacy in 210 patients with peripheral arterial disease. *Am. J. Cardiovasc. Drugs*. 2017 Jan 3. doi: 10.1007/s40256-016-0210-3. [Epub ahead of print]
- Deev R.V., Bozo I.Y., Mzhavanadze N.D. et al. pCMV-veg165 intramuscular gene transfer is an effective method of treatment for patients with chronic lower limb ischemia. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 2015; 20(5): 473-82.
- Ризванов А.А., Соловьева В.В., Салафутдинов И.И. и др. Кодон-оптимизированные последовательности фармацевтическая композиция для восстановления кровеносных сосудов. Приоритет от 18.06.2014. Патент РФ №2557385 от 24.06.2015.
- Исаев А.А., Киселев С.Л., Деев Р.В. и др. Биоконкомпозит для обеспечения восстановительных процессов после повреждения у млекопитающего, способ его получения (варианты) и применения. Приоритет от 29.12.2011. Патент РФ №2519326 от 14 апреля 2014, патент Украины №112450 от 12.09.2016.
- Дробышев А.Ю., Рубина К.А., Сысоева В.Ю. и др. Клиническое исследование применения тканеинженерной конструкции на основе аутологичных стромальных клеток из жировой ткани у пациентов с дефицитом костной ткани в области альвеолярного отростка верхней челюсти и альвеолярной части нижней челюсти. *Вестник экспериментальной и клинической хирургии* 2011; IV(4): 764-72.

- Зорин В.Л., Зорина А.И., Еремин И.И. и др. Сравнительный анализ остеогенного потенциала мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток слизистой оболочки полости рта и костного мозга. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2014; IX(1): 50-7.
- Деев Р.В., Дробышев А.Ю., Бозо И.Я. и др. Создание и оценка биологического действия ген-активированного остеопластического материала, несущего ген VEGF человека. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2013; 8(3): 78-85.
- Бозо И.Я., Деев Р.В., Дробышев А.Ю. и др. Эффективность ген-активированного остеопластического материала на основе октакальциевого фосфата и плазмидной ДНК с геном vegf в восполнении «критических» костных дефектов. *Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова*. 2015; 1: 35-42.
- Bozo I.Y., Deev R.V., Drobyshev A.Y. et al. World's first clinical case of gene-activated bone substitute application. *Case Reports in Dentistry* 2016; 2016: 8648949.
- Feichtinger G.A., Hofmann A.T., Slezak P. et al. Sonoporation increases therapeutic efficacy of inducible and constitutive BMP2/7 *in vivo* gene delivery. *Hum. Gene Ther. Methods*. 2014; 25(1): 57-71.
- Liu J.Z., Hu Y.Y., Ji Z.L. Co-expression of human bone morphogenetic protein-2 and osteoprotegerin in myoblast C2C12. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2003; 17(1): 1-4.
- Yang L., Zhang Y., Dong R. et al. Effects of adenoviral-mediated coexpression of bone morphogenetic protein-7 and insulin-like growth factor-1 on human periodontal ligament cells. *J. Periodontal. Res.* 2010; 45(4): 532-40.
- Amable P.R., Teixeira M.V., Carias R.B. et al. Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly. *Stem Cell Res. Ther.* 2014; 5(2): 53.
- Berendsen A.D., Olsen B.R. How vascular endothelial growth factor-A (VEGF) regulates differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Histochem. Cytochem.* 2014; 62(2): 103-8.
- Liu Y., Berendsen A.D., Jia S. et al. Intracellular VEGF regulates the balance between osteoblast and adipocyte differentiation. *J. Clin. Invest.* 2012; 122(9): 3101-13.
- Grunewald M., Avraham I., Dor Y et al. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell*. 2006; 124(1): 175-89.
- Hong X., Jiang F., Kalkanis S.N. et al. SDF-1 and CXCR4 are up-regulated by VEGF and contribute to glioma cell invasion. *Cancer Lett.* 2006; 236(1): 39-45.
- Graham F.L., van der Eb A.J. Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology* 1973; 54(2):536-9.

Поступила: 01.11.2016