

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-338

**ГЕН-АКТИВИРОВАННЫЕ ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ МЕТОДОМ 3D-ПЕЧАТИ, СОДЕРЖАЩИЕ АДЕНОВИРУСНЫЕ КОНСТРУКЦИИ С ГЕНОМ *BMP2*\*****3D-PRINTED GENE-ACTIVATED OSTEOPLASTIC SCAFFOLDS IMPREGNATED WITH ADENOVIRAL CONSTRUCTS WITH THE *BMP2* GENE**

И. А. Недорубова<sup>1,2</sup>, В. О. Черномырдина<sup>1,2</sup>, А. Ю. Меглей<sup>1,2</sup>, В. П. Басина<sup>1</sup>, А. В. Миронов<sup>2,3</sup>,  
Е. М. Трифанова<sup>2,3</sup>, А. В. Васильев<sup>1,2</sup>, В. К. Попов<sup>3</sup>, Д. В. Гольдштейн<sup>1</sup>, А. А. Кулаков<sup>2</sup>, Т. Б. Бухарова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Медико-генетический научный центр им. акад. Н. П. Бочкова, Москва

<sup>2</sup>Центральный научно-исследовательский институт стоматологии  
и челюстно-лицевой хирургии Минздрава России, Москва

<sup>3</sup>Курчатовский комплекс кристаллографии и фотоники НИЦ «Курчатовский институт», Москва

I. A. Nedorubova<sup>1,2</sup>, V. O. Chernomyrdina<sup>1,2</sup>, A. Yu. Meglei<sup>1,2</sup>, V. P. Basina<sup>1</sup>, A. V. Mironov<sup>2,3</sup>,  
E. M. Trifanova<sup>2,3</sup>, A. V. Vasilyev<sup>1,2</sup>, V. K. Popov<sup>3</sup>, D. V. Goldshtein<sup>1</sup>, A. A. Kulakov<sup>2</sup>, T. B. Bukharova<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Research Centre for Medical Genetics, Moscow

<sup>2</sup>Central Research Institute of Dentistry and Maxillofacial Surgery, Moscow

<sup>3</sup>FSRC “Crystallography and photonics”, NRC “Kurchatov Institute”, Moscow

✉ nedorubova.ia@gmail.com

**Аннотация**

Методы 3D-печати позволяют формировать матрицы в соответствии с формой замещаемого костного дефекта. Добавление генетических конструкций с генами остеоиндуктивных белков обеспечивает экспрессию и терапевтическое действие этих факторов в области регенерации. Методом антисольвентной 3D-печати получены PLGA матрицы с аденовирусными частицами, несущими ген *BMP2*, обладающие остеогенными свойствами *in vitro* и перспективные для клинического применения.

**Abstract**

3D-printing methods make it possible to fabricate matrices in accordance with the shape of the substituted bone defect. The addition of genetic constructs with genes for osteoinductive proteins provides the expression and therapeutic effect of these factors in the area of regeneration. Using anti-solvent 3D-printing, PLGA matrices with adenoviral particles carrying the *BMP2* gene were obtained, which have osteogenic properties *in vitro* and are promising for clinical use.

Потребность в эффективных остеопластических материалах для лечения пациентов с врожденными и травматическими заболеваниями костной ткани является актуальной медицинской и социальной задачей. Разработка новых ген-активированных матриц (ГАМ), содержащих гены белков остеоиндукторов, является одним из наиболее перспективных подходов к лечению таких заболеваний. Для 3D-печати матриц, соответствующих форме замещаемого дефекта, могут применяться полимеры на основе сополимеров молочной и гликолевой кислот (PLGA), разрешенные к медицинскому применению. Доставка гена остеоиндуктора костного морфогенетического белка 2 (*BMP2*) может осуществляться с помощью аденовирусных конструкций — эффективного способа трансдукции клеток [1].

**Цель работы:** исследование свойств 3D-матриц на основе PLGA, импрегнированных аденовирусными конструкциями с геном *BMP2 in vitro*.

**Материалы и методы**

3D-матрицы на основе PLGA формировали методом антисольвентной 3D-печати [2]. Печать образцов проводили при 25 °С с использованием дозирующей насадки диаметром 330 мкм. Для получения ГАМ суспензию аденовирусных конструкций, несущих ген *BMP2* (Ad-*BMP2*) с концентрацией вирусной ДНК 125 нг/мкл, наносили на матрицы в течение 24 ч. Для оценки эффективности разработанных матриц использовали в качестве модельной культуры мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, полученные из жировой

\* Работа выполнена при поддержке РФФ (проект № 22-15-00425).

© И. А. Недорубова, В. О. Черномырдина, А. Ю. Меглей, В. П. Басина, А. В. Миронов, Е. М. Трифанова, А. В. Васильев, В. К. Попов, Д. В. Гольдштейн, А. А. Кулаков, Т. Б. Бухарова, 2024

ткани крыс (ММСК ЖТ). Цитосовместимость матриц оценивали методом МТТ-теста и с помощью флуоресцентной микроскопии путем окрашивания живых клеток Кальцеином АМ, а мертвых — DAPI. Способность матриц к поддержанию адгезии клеток анализировали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Способность PLGA-Ad-BMP2 матриц трансдуцировать ММСК ЖТ оценивали по экспрессии целевого гена *BMP2* методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) и по продукции BMP-2, определенной методом иммуноферментного анализа (ИФА). Индукцию остеогенной дифференцировки ММСК ЖТ после инкубации с PLGA-Ad-BMP2 анализировали по экспрессии генов методом ПЦР-РВ и продукции белков остеогенных маркеров методом ИФА.

### Результаты

PLGA-Ad-BMP2 матрицы не оказывают цитотоксического действия на ММСК ЖТ. Через 1 и 7 суток относительная жизнеспособность клеток составляла  $102,4 \pm 2,9 \%$  и  $101,6 \pm 2,3 \%$ , соответственно, что не отличается от контроля, в котором клетки инкубировали без добавления матриц.

С помощью флуоресцентной микроскопии обнаружено, что при инкубации ММСК ЖТ с PLGA-Ad-BMP2 большая часть клеток живые, практически не наблюдалось мертвых клеток, окрашенных DAPI. При этом к 7 суткам плотность живых ММСК ЖТ, окрашенных Кальцеином АМ, значительно увеличивалась. Методом СЭМ показано, что клетки адгезированы на поверхности PLGA-Ad-BMP2, имели характерную для ММСК морфологию. Через 7 суток инкубации ММСК ЖТ с PLGA-Ad-BMP2 уровень экспрессии целевого гена *BMP2* увеличивался в  $3,5 \pm 0,6$  раза по сравнению с 3D-матриксами на основе PLGA без аденовирусных конструкций. Продукция белка BMP-2 в ММСК ЖТ, культивируемых в присутствии PLGA-Ad-BMP2, также возрастала в 2,3 раза по сравнению с контрольными клетками. Показано, что ГАМ обладают остеоиндуктивными свойствами. Через 14 суток после инкубации ММСК ЖТ с PLGA-Ad-BMP2 наблюдалось статистически значимое увеличение экспрессии генов щелочной фосфатазы (*Alpl*) в  $2,3 \pm 0,1$  раза, остеокальцина (*Bglap*, *Ocn*) — в  $1,8 \pm 0,3$  раз и остеооптина (*Spp1*, *Opn*) — в  $11,8 \pm 0,3$  раз по сравнению с клетками, которые культивировали в присутствии неактивированных 3D PLGA матриц. Продукция данных белков также возрастала, и через 14 суток концентрация *Alpl* составляла  $284 \pm 4$  нг/мл, *Ocn*  $108 \pm 5$  пг/мл и *Opn*  $3 \pm 0$  нг/мл.

Таким образом, полученные нами данные подтверждают эффективность разработанных 3D-матриц на основе PLGA, импрегнированных аденовирусными конструкциями с геном *BMP2*, *in vitro*: PLGA-Ad-BMP2 матрицы являются цитосовместимыми, обеспечивают эффективную трансдукцию ММСК ЖТ и индуцируют остеогенную дифференцировку клеток. А метод их формирования с применением антисольвентной 3D-печати является перспективным подходом к созданию персонализированных остеопластических материалов.

### Литература

1. Bukharova T. B., Nedorubova I. A., Mokrousova V. O. et al. Adenovirus-based gene therapy for bone regeneration: a comparative analysis of *in vivo* and *ex vivo* BMP2 gene delivery // *Cells*. 2023. Vol. 12(13). P. 1762.
2. Mironov A. V., Mironova O. A., Khvorostina M. A., Popov V. K. 3D-printing of polylactic-co-glycolic acid fiber scaffolds using an antisolvent phase separation process // *Polymer*. 2019. 182(2). P. 121845.