

Влияние ибупрофена на остеогенные свойства матриц, несущих аденовирусные конструкции с геном *BMP2*

И.А. Недорубова¹, В.О. Черномырдина^{1,2}, А.Ю. Меглей^{1,2}, В.П. Басина¹,
В.С. Кузнецова^{1,2}, А.В. Васильев^{1,2}, Т.Е. Григорьев^{3,4}, Ю.Д. Загоскин³,
С.Н. Чвалун³, Д.В. Гольдштейн¹, Т.Б. Бухарова¹

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

² ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» Минздрава России, Москва, Россия

³ ФГБУ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

⁴ ФГАОУ ВО Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Москва, Россия

Резюме. Введение. Разработка ген-активированных остеопластических материалов открывает новые возможности для эффективного лечения пациентов с дефицитом костной ткани.

Материалы и методы. Исследование проводили с использованием мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из жировой ткани крыс. Были получены матрицы на основе полилактидных гранул (PLA-гранул), коллагена I типа и фибрина, импрегнированные аденовирусными конструкциями с геном *BMP2* (Ad-*BMP2*) и ибупрофеном. Адгезию клеток на матрицах оценивали методом сканирующей электронной микроскопии. Кинетику высвобождения аденовирусов исследовали методом спектрофотометрии, а ибупрофена – УФ-спектрофотометрии. Эффективность остеогенной дифференцировки клеток оценивали по экспрессии генов остеогенных маркеров методом ПЦР в режиме реального времени, продукции белков остеоиндукторов методом иммуноферментного анализа, по активности щелочной фосфатазы и минерализации внеклеточного матрикса мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, полученных из жировой ткани крыс, при окрашивании ализариновым красным.

Результаты. Добавление ибупрофена во время трансдукции мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, полученных из жировой ткани крыс, аденовирусами с геном *BMP2* не только способствовало эффективной доставке целевого гена и продукции белка *BMP-2*, но и обеспечивало более выраженную остеогенную дифференцировку клеток. Включение ибупрофена в состав матриц на основе PLA-гранул, коллагена I типа и фибрина позволило добиться длительного высвобождения препарата из материала. Разработанные матрицы, импрегнированные Ad-*BMP2* и ибупрофеном, характеризуются высокими адгезионными свойствами. Вирусы, высвобождающиеся из матриц, эффективно трансдуцировали клетки и индуцировали остеогенную дифференцировку мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, полученных из жировой ткани крыс.

Заключение. Полученные матрицы, содержащие аденовирусные конструкции с геном *BMP2* и ибупрофеном, обладают остеогенными свойствами *in vitro* и имеют высокий потенциал использования для лечения костных дефектов.

Ключевые слова: аденовирусные векторы, ибупрофен, костный морфогенетический белок, полилактид, коллаген, фибрин, остеогенная дифференцировка

Для корреспонденции: Ирина Алексеевна Недорубова. E-mail: nedorubova.ia@gmail.com

Для цитирования: Недорубова И.А., Черномырдина В.О., Меглей А.Ю., Басина В.П., Кузнецова В.С., Васильев А.В., Григорьев Т.Е., Загоскин Ю.Д., Чвалун С.Н., Гольдштейн Д.В., Бухарова Т.Б. Влияние ибупрофена на остеогенные свойства матриц, несущих аденовирусные конструкции с геном *BMP2*. Клини. эксп. морфология. 2024;13(4):36–46. DOI: 10.31088/CEM2024.13.4.36-46.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 21-75-10147 (в области исследования свойств матриц), в рамках государственного задания Минобрнауки России для Медико-генетического научного центра имени академика Н.П. Бочкова (в области наработки аденовирусных конструкций) и государственного задания НИЦ «Курчатовский институт» (в области создания матриц).

Статья поступила 03.05.2024. Получена после рецензирования 16.05.2024. Принята в печать 24.06.2024.

Effect of ibuprofen on osteogenic properties of matrices carrying adenovirus with the *BMP2* gene

I.A. Nedorubova¹, V.O. Chernomyrdina^{1,2}, A.Yu. Meglei^{1,2}, V.P. Basina¹,
V.S. Kuznetsova^{1,2}, A.V. Vasilyev^{1,2}, T.E. Grigoriev^{3,4}, Yu.D. Zagoskin³,
S.N. Chvalun³, D.V. Goldshtein¹, T.B. Bukharova¹

¹Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia

²Central Research Institute of Dentistry and Maxillofacial Surgery, Moscow, Russia

³National Research Centre “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia

⁴Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russia

Abstract. Introduction. The development of gene-activated osteoplastic materials opens up new opportunities for effective treatment of patients with bone deficiency.

Materials and methods. The study was carried out using multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) isolated from adipose tissue of rats. We obtained matrices based on polylactide acid granules (PLA granules), type I collagen, and fibrin that were impregnated with adenovirus with the *BMP2* gene (Ad-*BMP2*) and ibuprofen. Cell adhesion on the matrices was assessed with scanning electron microscopy. The release kinetics of adenoviruses and ibuprofen was studied with spectrophotometry and UV spectrophotometry, respectively. We used real-time PCR to evaluate the efficiency of osteogenic differentiation of cells with the expression of genes of osteogenic markers; enzyme-linked immunosorbent assay to assess the production of proteins; and alizarin red staining to analyze the activity of alkaline phosphatase and the mineralization of the MSCs extracellular matrix.

Results. The addition of ibuprofen during transduction of MSCs with adenoviruses with the *BMP2* gene not only contributed to the effective delivery of the target gene and production of the BMP-2 protein, but also ensured more pronounced osteogenic differentiation of cells. The inclusion of ibuprofen in matrices based on PLA granules, type I collagen, and fibrin made it possible to achieve long-term release of the drug from the material. The developed matrices impregnated with Ad-*BMP2* and ibuprofen are characterized by high adhesive properties. Viruses released from the matrices effectively transduced cells and induced osteogenic differentiation of MSCs.

Conclusion. The developed matrices containing adenovirus with the *BMP2* gene and ibuprofen have osteogenic properties *in vitro* and a high potential use in the treatment of bone defects.

Keywords: adenoviral vectors, ibuprofen, bone morphogenetic protein, polylactide, collagen, fibrin, osteogenic differentiation

Corresponding author: Irina A. Nedorubova. E-mail: nedorubova.ia@gmail.com

For citation: Nedorubova I.A., Chernomyrdina V.O., Meglei A.Yu., Basina V.P., Kuznetsova V.S., Vasilyev A.V., Grigoriev T.E., Zagoskin Yu.D., Chvalun S.N., Goldshtein D.V., Bukharova T.B. Effect of ibuprofen on the osteogenic properties of matrices carrying adenovirus with the *BMP2* gene. Clin. exp. morphology. 2024;13(4):36–46 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2024.13.4.36-46.

Funding. The study was supported by the Russian Science Foundation, grant No. 21-75-10147 (in the field of assessing the properties of matrices), within the framework of the State Assignment of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation for Research Centre for Medical Genetics (in the field of development of adenoviral constructs) and National Research Centre “Kurchatov Institute” (in the field of creating matrices).

Received 03.05.2024. **Received in revised form** 16.05.2024. **Accepted** 24.06.2024.

Введение

В настоящее время разработка новых остеопластических материалов стала одним из ключевых направлений в области регенеративной медицины костной ткани. Многообещающим подходом является использование биорезорбируемых и биосовместимых матриц с включенными в них генетическими конструкциями, содержащими гены белков остеоиндукторов, в частности костного морфогенетического белка 2 (*BMP2*). BMP-2 представляет собой основной белок, участвующий в процессе остеогенеза путем рекрутирования и стимуляции дифференцировки клеток костной тка-

ни [1]. Такие ген-активированные матрицы (ГАМ) способны стимулировать регенерацию кости, активируя естественные механизмы остеогенной дифференцировки клеток.

Для доставки гена *BMP2* в клетки могут быть использованы различные вирусные и невирусные векторы, среди которых аденовирусы имеют наибольший потенциал клинического применения при лечении заболеваний костной ткани. К преимуществам векторов на основе аденовирусов относятся высокая эффективность доставки трансгена, возможность трансдукции делящихся и неделящихся клеточных популяций,

большая пакующая емкость. Проникая в клетки, они находятся в ядре в виде эписомы, сводя к минимуму риск возникновения инсерционного мутагенеза и обеспечивая временную экспрессию гена, что является предпочтительным при разработке методов лечения дефицита костной ткани [2]. Основная проблема использования аденовирусных конструкций – возникновение иммунной реакции на вектор и, следовательно, снижение эффективности терапии и возникновение нежелательных побочных эффектов [3]. Добиться снижения иммуногенности аденовирусов можно за счет применения нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП). Кроме того, есть данные, свидетельствующие о том, что НПВП незначительно повышают активность щелочной фосфатазы и образование коллагена I типа на ранней стадии дифференцировки культивируемых остеобластов, что может повлиять на минерализацию кости во время регенерации [4]. В настоящее время наиболее перспективным НПВП является ибупрофен (Ibu), действие которого основано на неселективном ингибировании циклооксигеназ (ЦОГ), что приводит к снижению синтеза простагландинов и препятствует развитию воспалительного процесса [5].

Еще одним подходом к снижению реакции организма на вирусы может быть включение аденовирусных векторов внутрь матриц-носителей, труднодоступных для иммунных клеток [6], или доставка трансдуцированных клеток в составе тканеинженерных конструкций [7]. Наряду с этим использование матриц будет обеспечивать локальную доставку генетических векторов в область костного дефекта. Для получения матриц могут быть использованы природные и синтетические полимеры. При разработке методов лечения заболеваний, связанных с дефицитом костной ткани, важно, чтобы материалы обладали оптимальными механическими свойствами, были биосовместимыми и биодеградируемыми [8, 9]. Необходимыми качествами обладают матрицы на основе полилактида (PLA), скорость биодеградации которых соответствует времени восстановления костной ткани, а продукты гидролиза естественным образом выводятся из организма [10]. Основным недостаток матриц на основе гранул PLA – неспособность материала сохранять форму, поэтому добавление в качестве связующего компонента различных гидрогелей позволит заметно увеличить как механические свойства материалов, так и способность к моделированию при имплантации. В то же время ненаполненные гранулами гидрогели обладают невысокими модулями упругости и не обеспечивают необходимую остеокондукцию. Коллаген I типа (Col) представляет наибольший интерес для разработки остеопластических материалов, поскольку является одним из основных компонентов кости, а продукты его разложения могут участвовать в синтезе нового костного матрикса [11]. Наряду с этим перспективно использовать фибриновый гидрогель на основе плазмы, обогащенной тромбоцитами (platelet-rich plasma, PRP),

которая может быть получена у пациента и характеризуется высокой биосовместимостью. Кроме того, PRP служит источником необходимых для регенерации компонентов, таких как цитокины, факторы роста и ангиогенные факторы [12]. Матрицы на основе PLA-гранул и фибринового гидрогеля, импрегнированные аденовирусными конструкциями с геном *BMP2* [13], показали высокую эффективность *in vivo* на модели критического дефекта теменных костей крыс. Коллаген в составе матриц может способствовать более выраженному репаративному остеогенезу.

Цель настоящей работы – исследовать влияние ибупрофена на свойства ГАМ на основе коллаген-фибринового гидрогеля и PLA-гранул, содержащих аденовирусные конструкции с геном *BMP2*, *in vitro*.

Материалы и методы

Исследование проводили с использованием мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, полученных из жировой ткани крыс (ММСК ЖТ). Манипуляции с животными были одобрены локальным этическим комитетом Сеченовского университета (PRC-079 от 06.04.2021). Жировую ткань после выделения помещали в среду ДМЕМ («ПанЭко», Россия), содержащую 1 мг/мл цефазолина («Биосинтез», Россия), переносили в чашки Петри, измельчали и добавляли 0,1% раствора коллагеназы I типа («ПанЭко», Россия) в среде ДМЕМ с цефазолином. Измельченную ткань инкубировали 1,5 часа при температуре +37°C, встряхивая каждые 15 минут. Клетки осаждали центрифугированием в течение 10 минут (1100 об./мин) при 15°C, высевали в чашки Петри и культивировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в ростовой среде ДМЕМ/F12 («ПанЭко», Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, Biosera, Франция), 0,584 мг/мл L-глутамина («ПанЭко», Россия), 5000 ед./мл пенициллина («ПанЭко», Россия) и 5000 мкг/мл стрептомицина («ПанЭко», Россия). Трансдукцию клеток проводили в среде ДМЕМ/F12 с антибиотиками и 2% ЭТС в течение 24 часов. Далее клетки культивировали в среде, содержащей ДМЕМ, 10% ЭТС, 0,584 мг/мл L-глутамина, 0,05 мг/мл L-аскорбиновой кислоты (Sigma, США), 2,16 мг/мл β-глицерофосфата (Sigma, США), 5000 ед./мл пенициллина и 5000 мкг/мл стрептомицина, при 37°C и 5% CO₂.

В качестве матриц-носителей для аденовирусных конструкций с геном *BMP2* человека и ибупрофена (Ibu) использовали матрицы на основе полилактидных гранул (PLA-гранул), коллагена I типа (Col, «ИМТЕК», Россия) и фибрина, полученного из PRP крыс. PLA-гранулы были изготовлены из поли-L-лактида с молекулярной массой 200 кДа (4032D, NatureWorks, США) методом распыления раствора в криованну и последующей лиофильной сушкой. Для формирования плотного фибринового сгустка к полученной по ранее описанной методике PRP [13] добавляли тромбин (100 NIH,

PZ Cormau, Польша) в 10% растворе хлорида кальция («Микроген», Россия).

Аденовирусные конструкции в концентрации 1280 TCID₅₀/мл и Ibu в концентрации 1,25 мг/мл по отдельности импрегнировали в пористые PLA-гранулы в течение 1 часа, после чего смешивали с коллагеновым гидрогелем, добавляли PRP и для полимеризации раствор тромбина в хлориде кальция.

Для оценки адгезионных свойств матриц после окончания культивирования ММСК ЖТ на их поверхности клетки фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида (Panreac, США) в течение 12 часов при температуре +4°C, затем промывали в PBS и дегидратировали при 4°C в батарее водных растворов этанола: 50%, 75%, 80%, 90% и в абсолютном этаноле. После этого образцы высушивали на воздухе и исследовали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с ускоряющим напряжением 15 кВ с использованием микроскопа Phenom ProX (Phenom, Нидерланды).

Для оценки кинетики высвобождения аденовирусных конструкций из матриц их помещали в пробирки с 2 мл физиологического раствора («ПанЭко», Россия) и инкубировали в течение 28 суток, отбирая по 100 мкл раствора каждые 3 суток. Аликвоты хранили при температуре –80°C. Затем выделяли вирусную ДНК с помощью набора QIAamp MinElute Virus Spin Kit (Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя и оценивали концентрацию вирусной ДНК на спектрофотометре Nano Drop OneC (Thermo Fisher Scientific, США) при 260 нм.

Кинетику высвобождения Ibu из матриц в физиологический раствор определяли по оценке поглощения раствора ибупрофена при 264 нм УФ-спектрофотометрии с использованием спектрофотометра Cary 50 (Varian, США).

Относительную экспрессию гена *BMP2* человека после трансдукции клеток аденовирусными векторами и генов остеогенных маркеров, экспрессирующихся в ММСК ЖТ крыс (*RunX2*, *Spp1* и *Alpl*), оценивали методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Для этого из клеток выделяли общую РНК с помощью набора RNeasy Plus Mini kit (Qiagen, Германия), проводили синтез кДНК на матрице РНК с использованием RevertAid (Thermo Scientific, Германия) согласно протоколам производителя. ПЦР-РВ проводили в термоциклере Bio-Rad iQ Cycler (Bio-Rad, США) с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I («Евроген», Россия). Уровни экспрессии мРНК анализируемых генов были нормированы на средние значения экспрессии референсных генов Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) и Actin-β (*Actβ*). Нуклеотидные последовательности используемых праймеров приведены в таблице.

Оценку продукции белков остеиндукторов (*BMP-2*, *Alpl*) в супернатанте проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА). Среду собирали на протяжении всего срока и хранили при температуре –80°C. Затем раствор белка концентрировали на центрифужных фильтрах Amicon (Merck Millipore, США) и исследовали с использованием наборов Quantikine Elisa kit (R&D Systems, США) и Elisa kit (Cloud-Clone Corp., КНР) согласно инструкциям производителей. Измерения проводили на планшетном спектрофотометре xMark (Bio-Rad, США).

Активность щелочной фосфатазы определяли в клеточных лизатах с помощью набора Quantitative Alkaline Phosphatase ES Characterization Kit (Merck Millipore, США) согласно инструкции производителя.

Для обнаружения минерализации ВКМ ММСК ЖТ клетки, фиксированные охлажденным 70% этанолом, были окрашены 2% водным раствором ализаринового

Таблица | Table

Последовательности праймеров | Primer sequences

Ген Gene	Последовательность нуклеотидов Nucleotide sequence
Actβ	for GAGATTACTGCCCTGGCTCC rev GCTCAGTAACAGTCCGCCTA
Alpl	for TGCCTACTTGTGTGGCGTGA rev CGTGACCTCGTTCCCCTGAG
BMP2	for ACTACCAGAAACGAGTGGGAA rev GCATCTGTTCTCGGAAAACCT
Spp1	for GACGATGACGACGGAGACC rev TGGCAGTGAAGGACTCATCA
RunX2	for ACAACAGAGGGCACAAGTTCTAT rev CTGCACTGAAGAGGCTGTTTG
Gapdh	for GCGAGATCCCGCTAACATCA rev CCCTTCCACGATGCCAAAGT

красного (Sigma-Aldrich, США) pH=4,1 в течение 5 минут. Далее ММСК ЖТ промывали дистиллированной водой от несвязавшегося красителя и получали изображения с помощью световой микроскопии.

Статистическую обработку данных проводили в программе SigmaPlot 12.0 (SYSTAT Software, США). В каждой группе было не менее шести биологических повторов, результаты представлены в виде среднее±стандартное отклонение. Для определения вида распределения использовали критерий Колмогорова–Смирнова. Для попарного сравнения групп использовали t-критерий Стьюдента или U-критерий Манна–Уитни. Для множественного сравнения групп применяли дисперсионный анализ One Way ANOVA Holm-Sidak тест. Различия между группами считались статистически значимыми при уровне ниже 5% ($p<0,05$).

Результаты

Показано, что трансдукция ММСК ЖТ Ad-BMP2 приводила к увеличению экспрессии целевого гена в 1042 ± 53 раза по сравнению с контрольными, не трансдуцированными клетками. Продукция белка BMP-2 клетками также существенно увеличивалась и через 14 суток составляла $210,6\pm3,0$ пг/мл. При этом добавление к клеткам Ibu в концентрации 0,125 мг/мл приводило к повышению эффективности трансдукции ММСК ЖТ: относительная экспрессия BMP2 в клетках в этом случае увеличивалась в 1158 ± 23 раза по сравнению с контролем, а продукция белка составляла 261 ± 3 пг/мл (рис. 1).

Через 14 суток после трансдукции ММСК ЖТ Ad-BMP2 без добавления Ibu и с добавлением Ibu наблюдалась эффективная остеогенная дифференцировка клеток (рис. 2). Показано увеличение экспрессии генов

RunX2 и *Spp1* в $5,2\pm1,1$ и $3,4\pm0,1$ раза, соответственно, для Ad-BMP2 и в $7,6\pm0,6$ и $9,1\pm0,3$ раза, соответственно, для Ad-BMP2 + Ibu. Кроме того, в трансдуцированных клетках обнаружено увеличение активности *Alpl* в $2,3\pm0,1$ раза для AdBMP2 и в $2,9\pm0,1$ раза после добавления Ad-BMP2 + Ibu по сравнению с контролем.

Затем были получены ГАМ, состоящие из PLA-гранул, коллагена I типа и фибринового гидрогеля на основе PRP (Mat). В качестве депо Ibu и аденовирусных конструкций были выбраны высокопористые PLA-гранулы. Включение Ibu в PLA-гранулы приводило к его быстрому высвобождению: уже через 1 сутки в растворе наблюдалось около 40% Ibu, а к 7-м суткам 90%. При этом смешивание гранул с гидрогелем способствовало более медленному выходу Ibu. Из Mat через 1 сутки высвобождалось около 15% Ibu, а полное высвобождение происходило только через 4 недели (рис. 3 А). Также оценили влияние Ibu в составе матриц на кинетику высвобождения аденовирусных конструкций из Mat. В течение первых 7 суток не было выявлено значимых различий в кинетике высвобождения AdBMP2 из матриц с включением Ibu и без него. Однако через 10 суток наблюдалось увеличение скорости высвобождения аденовирусных частиц из Mat-Ad-BMP2 + Ibu (рис. 3 В).

С помощью СЭМ оценили адгезионные свойства матриц, импрегнированных Ad-BMP2 с добавлением Ibu и без добавления Ibu (рис. 4). Показана высокая цитосовместимость всех исследуемых матриц. Импрегнация аденовирусных конструкций и Ibu не влияла на адгезию клеток к поверхности материалов и их морфологию. Часть ММСК ЖТ распластывалась на поверхности PLA-гранул, а часть клеток находилась в толще гидрогеля, при этом клетки имели характерную для ММСК полигональную форму.

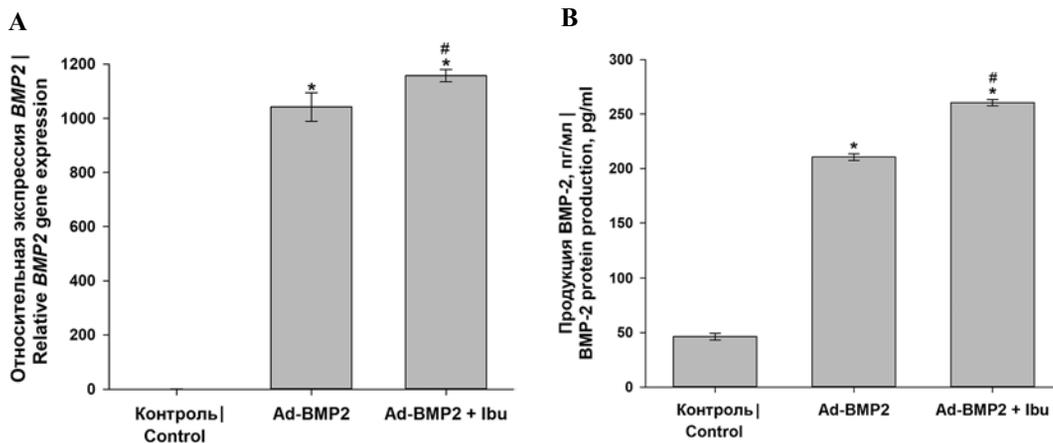


Рис. 1. Влияние Ibu на аденовирусную трансдукцию ММСК ЖТ.

А – относительная экспрессия гена BMP2. ПЦР-РВ. В – продукция белка BMP-2. ИФА

* $p<0,05$ (по сравнению с контролем). # $p<0,05$ (по сравнению с трансдуцированными клетками без Ibu)

Fig. 1. Ibu effect on adenoviral transduction of MSCs.

A – relative expression of the BMP2 gene. Real-time PCR. B – BMP-2 protein production. ELISA

* $p<0.05$ (compared to the control), # $p<0.05$ (compared to transduced cells without Ibu)

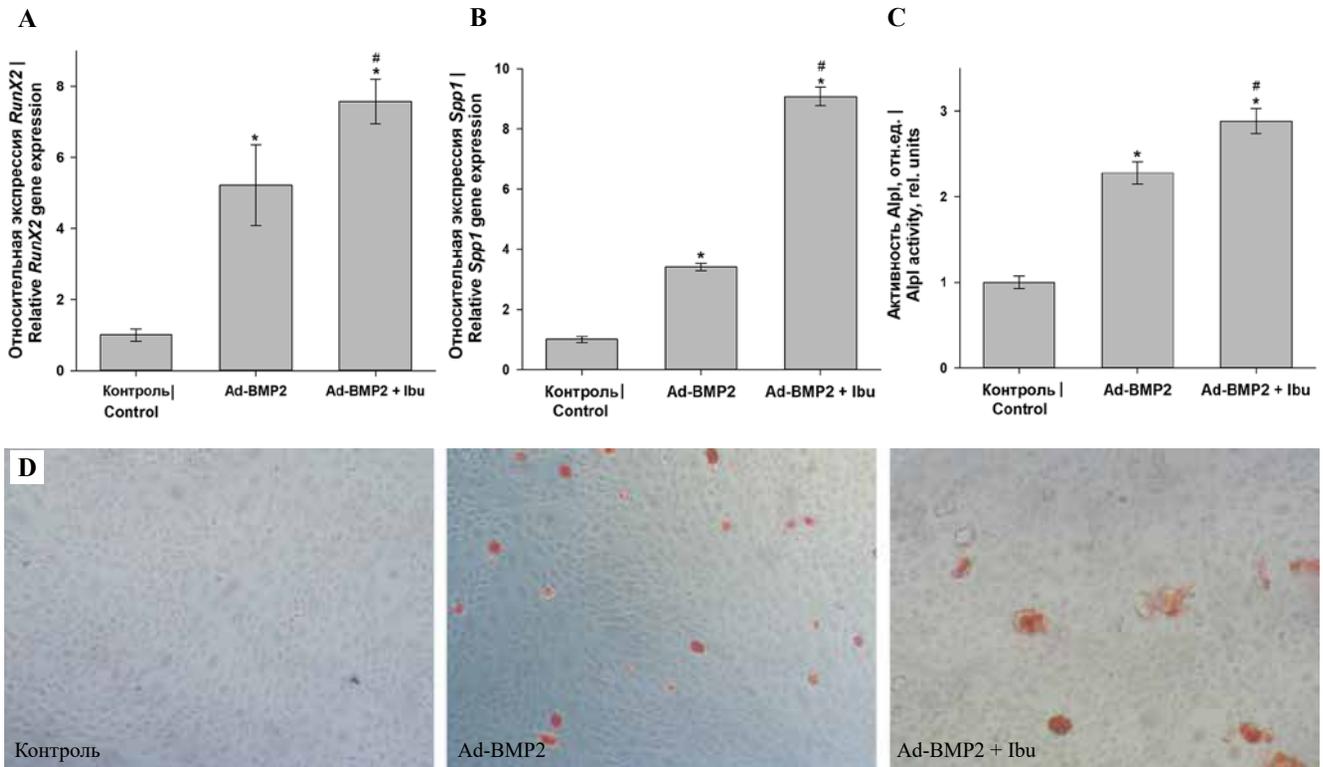


Рис. 2. Влияние Ibu на остеогенную дифференцировку ММСК ЖТ, трансдуцированных Ad-BMP2.

A, B – относительная экспрессия генов остеогенных маркеров. ПЦР-РВ. C – активность щелочной фосфатазы. Спектрофотометрия. D – минерализация ВКМ ММСК ЖТ. Окрашивание ализариновым красным, $\times 10$
* $p < 0,05$ (по сравнению с контролем), # $p < 0,05$ (по сравнению с трансдуцированными клетками без Ibu)

Fig. 2. Ibu effect on osteogenic differentiation of MSCs transduced with Ad-BMP2.

A, B – relative expression of genes of osteogenic markers. Real-time PCR. C – alkaline phosphatase activity. Spectrophotometry. D – ECM mineralization of MSCs. Alizarin red staining, light microscopy, $\times 10$
* $p < 0.05$ (compared to the control), # $p < 0.05$ (compared to transduced cells without Ibu)

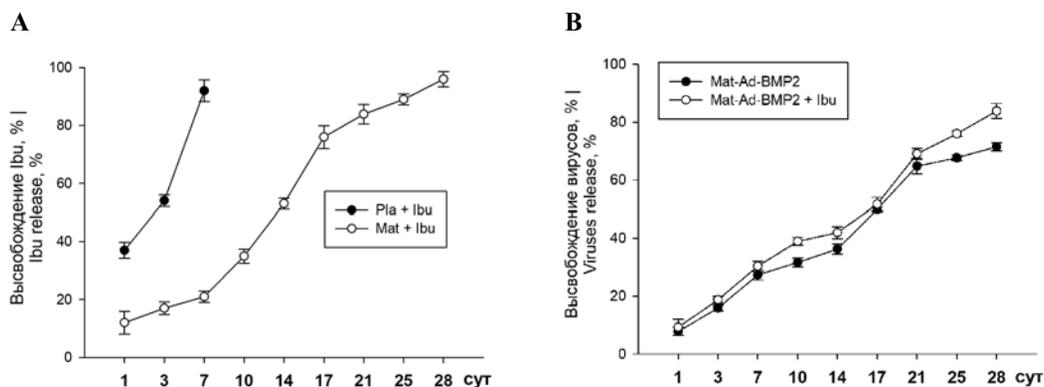


Рис. 3. Кинетика высвобождения Ibu (A) и аденовирусных конструкций (B) из Mat

Fig. 3. Release kinetics of Ibu (A) and adenovirus (B) from Mat

Трансдуцирующую способность аденовирусных конструкций в составе матриц оценивали по экспрессии целевого гена и продукции белка BMP-2 (рис. 5). Показано, что Ad-BMP2, импрегнированные в Mat, высвобождались из матриц и эффективно трансдуцировали ММСК ЖТ. Через 14 суток после инкуба-

ции клеток с ГАМ наблюдалось увеличение экспрессии гена *BMP2*, причем в клетках, культивируемых с Mat-Ad-BMP2 + Ibu, этот показатель был выше, чем для ММСК ЖТ в присутствии Mat-Ad-BMP2 без Ibu: в $13,1 \pm 0,4$ и $14,4 \pm 0,3$ раза, соответственно (рис. 5 A). Кроме того, наблюдалось увеличение продукции белка

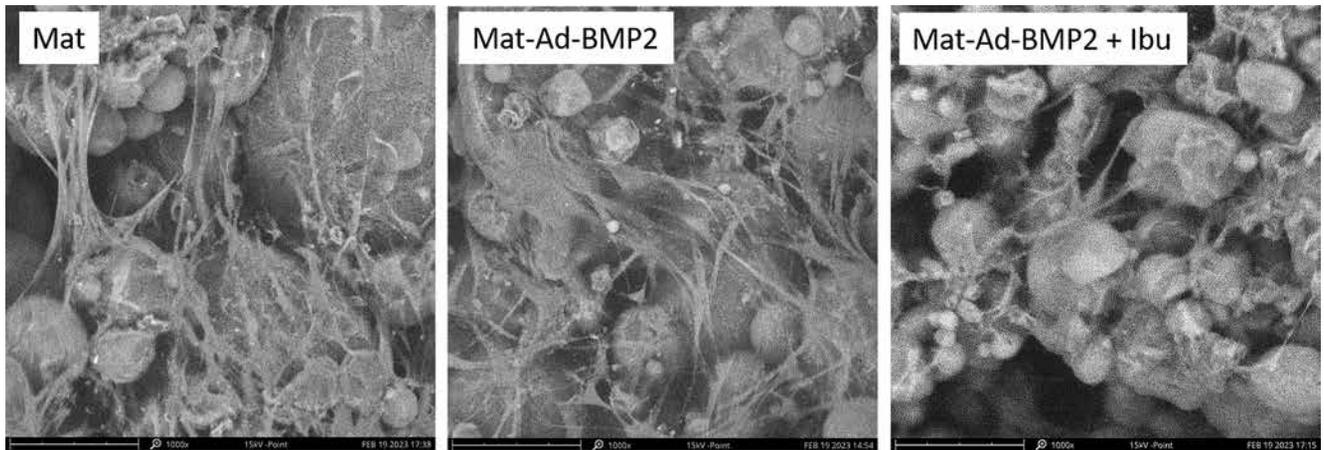


Рис. 4. Аджезия ММСК ЖТ на матрицах через 7 суток. СЭМ, $\times 1000$, масштабный отрезок 80 мкм
 Fig. 4. Adhesion of MSCs on matrices after 7 days. SEM, $\times 1000$, scale bar 80 μm

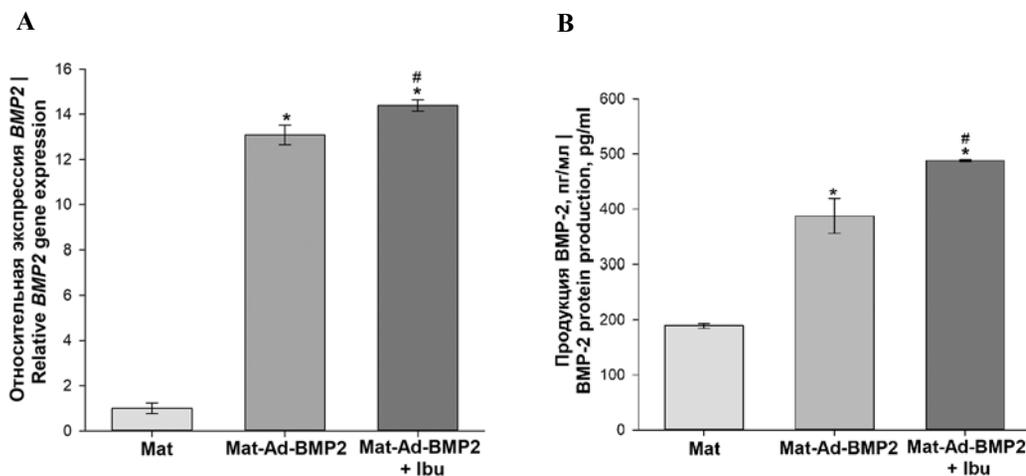


Рис. 5. Трансдуцирующая способность Ad-BMP2, импрегнированных в Mat.

А – относительная экспрессия гена *BMP2*. ПЦР-РВ. В – продукция белка BMP-2. ИФА
 * $p < 0,05$ (по сравнению с Mat), # $p < 0,05$ (по сравнению с Mat-Ad-BMP2 без Ibu)

Fig. 5. Transducing ability of Ad-BMP2 impregnated in Mat.

А – relative expression of the *BMP2* gene. Real-time PCR. В – BMP-2 protein production, ELISA
 * $p < 0.05$ (compared to Mat), # $p < 0.05$ (compared to Mat-Ad-BMP2 without Ibu)

BMP-2 в культурах ММСК ЖТ при инкубации с Mat-Ad-BMP2 в присутствии Ibu и без него (рис. 5 В). При этом также было обнаружено статистически значимое увеличение продукции BMP-2, продуцируемого клетками, которые культивировали с Mat-AdBMP2 с Ibu ($387,7 \pm 31,5$ пг/мл), по сравнению с Mat-Ad-BMP2 без Ibu ($487,7 \pm 1,9$ пг/мл).

Эффективность остеогенной дифференцировки ММСК ЖТ после инкубации с Mat-Ad-BMP2 с Ibu и без него оценивали по экспрессии гена *Alpl*, продукции и активности соответствующего белка и минерализации внеклеточного матрикса (ВКМ) (рис. 6). Показано существенное увеличение экспрессии гена *Alpl* в $5,6 \pm 0,8$ и $10,9 \pm 1,0$ раза, соответственно, для клеток в присутствии Mat-Ad-BMP2 и Mat-Ad-BMP2 + Ibu (рис. 6 А). При инкубации ММСК ЖТ с исследуемыми ГАМ наблюдалось увеличение продук-

ции данного белка в $4,6 \pm 0,6$ раза для Mat-Ad-BMP2 и в $5,3 \pm 0,5$ раза для Mat-Ad-BMP2 + Ibu по сравнению с неактивированными Mat (рис. 6 В). Наряду с этим обнаружено увеличение активности *Alpl* в $3,2 \pm 0,1$ раза в клетках, которые инкубировали с Mat-Ad-BMP2, и в $3,5 \pm 0,2$ раза с Mat-Ad-BMP2 + Ibu по сравнению с Mat (рис. 6 С). Кроме того, наблюдалась минерализация ВКМ ММСК ЖТ после инкубации клеток с ГАМ (рис. 6 D).

Обсуждение

Аденовирусы хорошо себя зарекомендовали в генной терапии, обладают высокой эффективностью трансдукции различных клеток и одобрены для клинического применения в качестве вакцин [14]. С учетом этого аденовирусные векторы представляют большой интерес при разработке новых ГАМ для регенерации

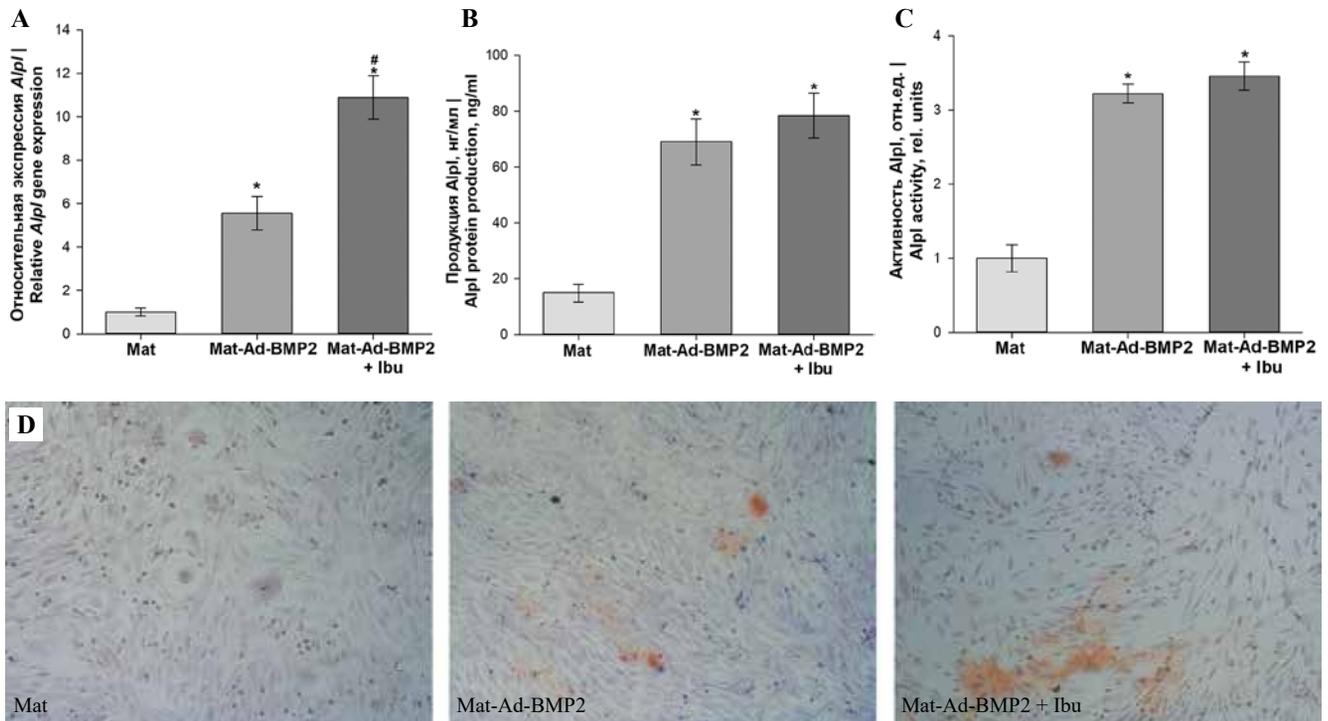


Рис. 6. Остеогенная дифференцировка ММСК ЖТ через 14 суток после инкубации с Mat-Ad-BMP2 с Ibu и без Ibu.

A – относительная экспрессия *Alpl*. ПЦР-РВ. B – продукция *Alpl*. ИФА. C – активность *Alpl*. Спектрофотометрия.

D – минерализация ВКМ ММСК ЖТ. Окрашивание ализариновым красным, световая микроскопия, $\times 10$

* $p < 0,05$ (по сравнению с Mat), # $p < 0,05$ (по сравнению с Mat-Ad-BMP2 без Ibu)

Fig. 6. Osteogenic differentiation of MSCs 14 days after incubation with Mat-Ad-BMP2 with and without Ibu.

A – relative expression of *Alpl* gene. Real-time PCR. B – *Alpl* protein production, ELISA. C – *Alpl* activity. Spectrophotometry.

D – ECM mineralization of MSCs. Alizarin red staining, light microscopy, $\times 10$

* $p < 0.05$ (compared to Mat), # $p < 0.05$ (compared to Mat-Ad-BMP2 without Ibu)

костной ткани. Основным ограничением использования аденовирусных конструкций может быть иммунный ответ организма, особенно при повторном введении вируса. Для решения этой проблемы векторы импрегнировали в биосовместимые матрицы на основе PLA-гранул, коллагена I типа и фибринового гидрогеля и добавили в состав ГАМ широко используемый НПВП – ибупрофен. Ранее было показано, что инкубация ММСК ЖТ с Ibu приводит к повышению доли клеток, трансдуцированных аденовирусными конструкциями с геном *GFP* [15]. В нашей работе добавление Ibu во время трансдукции клеток Ad-BMP2 способствовало увеличению экспрессии целевого гена и продукции белка.

Влияние НПВП на остеогенные свойства клеток зависит от механизма действия препарата и может как снижать, так и усиливать остеогенную дифференцировку клеток [16, 17]. Однако в литературе нет информации о действии Ibu на дифференцировку клеток при аденовирусной трансдукции. В нашем исследовании обнаружено, что добавление Ibu во время трансдукции ММСК ЖТ способствует более выраженной остеогенной дифференцировке клеток. Несмотря на то, что есть сообщения, что сами НПВП с неселектив-

ным ингибированием ЦОГ снижают активность *Alpl* преостеобластов [18], в данной работе показано, что при трансдукции ММСК ЖТ Ad-BMP2 в присутствии Ibu активность *Alpl* возросла по сравнению с трансдуцированными клетками без Ibu.

Высокие дозы Ibu оказывают цитотоксическое действие на ММСК ЖТ [15]. В связи с этим разрабатываются различные матрицы для пролонгированной доставки Ibu [19, 20], чтобы исключить риск возникновения нежелательных последствий, связанных с высокой дозировкой препарата. Включение Ibu в матрицы на основе PLA-гранул, коллагена I типа и фибринового гидрогеля позволило нам обеспечить более длительное и постепенное высвобождение НПВП по сравнению с матрицами на основе хитозана и наночастиц гидроксиапатита или хитозана и биоактивного стекла [19].

Аденовирусные конструкции, высвобождающиеся из ГАМ, эффективно трансдуцируют ММСК ЖТ. *In vitro* исследование остеогенных свойств разработанных ГАМ показало, что включение в состав матриц Ibu приводит к значимому увеличению экспрессии гена *Alpl* в ММСК ЖТ по сравнению с клетками, которые инкубировали с Mat-Ad-BMP2 без Ibu, что может быть

связано с положительным влиянием Ибу на эффективность трансдукции клеток. Можно предположить, что в *in vivo* исследованиях матрикса будут способствовать выраженной регенерации костной ткани, а включенный в состав Ибу будет снижать иммунный ответ на вирусные векторы и положительно влиять на трансдукцию Ad-BMP2 клеток-предшественников и их дифференцировку в остеобласты.

Заключение

Таким образом, разработанные ген-активированные матриксы, импрегнированные Ad-BMP2 и Ибу, показали высокую эффективность в экспериментах *in vitro*: они не оказывают токсического действия, поддерживают клеточную адгезию и способствуют остеогенной дифференцировке мезенхимальных стромальных клеток, полученных из жировой ткани крыс. Разработанные матриксы обладают высоким потенциалом для клинического применения при лечении пациентов с дефектами костной ткани.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Т.Б. Бухарова, Д.В. Гольдштейн, С.Н. Чвалун, И.А. Недорубова. Сбор и обработка материала – В.О. Черномырдина, А.Ю. Меглей, В.П. Басина, В.С. Кузнецова, А.В. Васильев, Т.Е. Григорьев, Ю.Д. Загоскин. Написание текста – И.А. Недорубова. Редактирование – Т.Б. Бухарова.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – T.B. Bukharova, D.V. Goldshtein, S.N. Chvalun, I.A. Nedorubova. Collected the data and performed the analysis – V.O. Chernomyrdina, A.Yu. Meglei, V.P. Basina, V.S. Kuznetsova, A.V. Vasilyev, T.E. Grigoriev, Y.D. Zagoskin. Wrote the paper – I.A. Nedorubova. Edited the manuscript – T.B. Bukharova.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. Carreira AC, Alves GG, Zambuzzi WF, Sogayar MC, Granjeiro JM. Bone morphogenetic proteins: structure, biological function and therapeutic applications. *Arch Biochem Biophys*. 2014;561:64–73. DOI: 10.1016/j.abb.2014.07.011.
2. Atasoy-Zeybek A, Kose GT. Gene therapy strategies in bone tissue engineering and current clinical applications. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1119:85–101. DOI: 10.1007/5584_2018_253.
3. Vannucci L, Lai M, Chiappesi F, Ceccherini-Nelli L, Pistello M. Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiol*. 2013;36(1):1–22. PMID: 23435812.
4. Ho ML, Chang JK, Chuang LY, Hsu HK, Wang GJ. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and prostaglandins on osteoblastic functions. *Biochem Pharmacol*. 1999;58(6):983–90. DOI: 10.1016/s0006-2952(99)00186-0.
5. Kulesza A, Zielniok K, Hawryluk J, Paczek L, Burdzinska A. Ibuprofen in therapeutic concentrations affects the secretion of human bone marrow mesenchymal stromal cells, but not their proliferative and migratory capacity. *Biomolecules*. 2022;12(2):287. DOI: 10.3390/biom12020287.
6. Gabal Y, Ramsey JD. Surface modification of adenovirus vector to improve immunogenicity and tropism. *Methods Mol Biol*. 2021;2183:357–66. DOI: 10.1007/978-1-0716-0795-4_18.
7. Бухарова Т.Б., Волков А.В., Воронин А.С., Филимонов К.А., Чаплыгин С.С., Мурушиди М.Ю. и др. Разработка тканеинженерной конструкции на основе мультипотентных стромальных клеток жировой ткани человека, трансфицированных геном костного морфогенетического белка BMP-2. *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2013;1(5):45–51. Доступно по адресу: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=18912641> (получено 25.04.2024). Bukharova TB, Volkov AV, Voronin AS, Filimonov KA, Chaplygin SS, Murushidi MYu et al. Development of tissue engineering construction based on multipotent stromal cells of human adipose tissue transfected with the gene of bone morphogenic protein BMP-2. *Clinical and experimental morphology*. 2013;1(5):45–51 (In Russ.). Available from: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=18912641> (accessed 25.04.2024).
8. Alonzo M, Primo FA, Kumar SA, Mudloff JA, Dominguez E, Fregoso G et al. Bone tissue engineering techniques, advances and scaffolds for treatment of bone defects. *Curr Opin Biomed Eng*. 2021;17:100248. DOI: 10.1016/j.cobme.2020.100248.
9. Чекишева Т.Н. Наноматериалы и их роль в регенерации костной ткани. *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2019;8(4):19–24. DOI: 10.31088/CEM2019.8.4.19-24. Chekischeva TN. Nanomaterials and their role in bone tissue regeneration. *Clinical and experimental morphology*. 2019;8(4):19–24 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2019.8.4.19-24.
10. da Silva D, Kaduri M, Poley M, Adir O, Krinsky N, Shainsky-Roitman J et al. Biocompatibility, biodegradation and excretion of polylactic acid (PLA) in medical implants and therapeutic systems. *Chem Eng J*. 2018;340:9–14. DOI: 10.1016/j.cej.2018.01.010.
11. Sorushanova A, Delgado LM, Wu Z, Shologu N, Kshirsagar A, Raghunath R et al. The collagen suprafamily: from biosynthesis to advanced biomaterial development. *Adv Mater*. 2019;31(1):e1801651. DOI: 10.1002/adma.201801651.
12. Etulain J. Platelets in wound healing and regenerative medicine. *Platelets*. 2018;29(6):556–68. DOI: 10.1080/09537104.2018.1430357.
13. Bukharova TB, Nedorubova IA, Mokrousova VO, Meglei AY, Basina VP, Nedorubov AA et al. Adenovirus-based gene therapy for bone regeneration: a comparative analysis of *in vivo* and *ex vivo* BMP2 gene delivery. *Cells*. 2023;12(13):1762. DOI: 10.3390/cells12131762.
14. Chang J. Adenovirus vectors: excellent tools for vaccine development. *Immune Netw*. 2021;21:e6. DOI: 10.4110/in.2021.21.e6.
15. Бухарова Т.Б., Недорубова И.А., Мокроусова В.О., Меглей А.Ю., Васильев А.В., Гольдштейн Д.В. Влияние ибупрофена на аденовирусную трансдукцию культур мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. *Медицинская генетика*. 2022;21(12):4–9. DOI: 10.25557/2073-7998.2022.12.4-9.

- Bukharova TB, Nedorubova IA, Mokrousova VO, Meglei AY, Vasilyev AV, Goldstein DV.* Influence of ibuprofen on adenoviral transduction of multipotent mesenchymal stromal cells. *Medical Genetics.* 2022;21(12):4–9 (In Russ.). DOI: 10.25557/2073-7998.2022.12.4-9.
16. *Pountos I, Georgouli T, Calori GM, Giannoudis PV.* Do nonsteroidal anti-inflammatory drugs affect bone healing? A critical analysis. *Sci World J.* 2012;2012:606404. DOI: 10.1100/2012/606404.
17. *Hadjicharalambous C, Alexaki VI, Alpantaki K, Chatzinikolaidou M.* Effects of NSAIDs on the osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Pharm Pharmacol.* 2016;68(11):1403–8. DOI: 10.1111/jphp.12595.
18. *Hadjicharalambous C, Alpantaki K, Chatzinikolaidou M.* Effects of NSAIDs on pre-osteoblast viability and osteogenic differentiation. *Exp Ther Med.* 2021;22(1):740. DOI: 10.3892/etm.2021.10172.
19. *Kumar P, Dehiya BS, Sindhu A.* Ibuprofen-loaded CTS/nHA/nBG scaffolds for the applications of hard tissue engineering. *Iran Biomed J.* 2019;23(3):190–9. DOI: 10.29252/23.3.190.
20. *Zhao L, Chen S, Xie C, Liang Q, Xu D, Chen W et al.* The fabrication of multifunctional sodium alginate scaffold incorporating ibuprofen-loaded modified PLLA microspheres based on cryogenic 3D printing. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2022;33(1):1269–88. DOI: 10.1080/09205063.2022.2049059.

Информация об авторах

Ирина Алексеевна Недорубова – научный сотрудник лаборатории генетики стволовых клеток Медико-генетического научного центра имени академика Н.П. Бочкова.

Виктория Олеговна Черномырдина – младший научный сотрудник лаборатории генетики стволовых клеток Медико-генетического научного центра имени академика Н.П. Бочкова, младший научный сотрудник отдела общей патологии Центрального научно-исследовательского института стоматологии и челюстно-лицевой хирургии.

Анастасия Юрьевна Меглей – младший научный сотрудник лаборатории цитогенетики Медико-генетического научного центра имени академика Н.П. Бочкова, младший научный сотрудник отдела общей патологии Центрального научно-исследовательского института стоматологии и челюстно-лицевой хирургии.

Виктория Павловна Басина – лаборант-исследователь лаборатории генетики стволовых клеток Медико-генетического научного центра имени академика Н.П. Бочкова.

Валерия Сергеевна Кузнецова – кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории генетики стволовых клеток Медико-генетического научного центра имени академика Н.П. Бочкова, старший научный сотрудник отдела общей патологии Центрального научно-исследовательского института стоматологии и челюстно-лицевой хирургии.

Андрей Вячеславович Васильев – доктор медицинских наук, доцент, старший научный сотрудник лаборатории генетики стволовых клеток Медико-генетического научного центра имени академика Н.П. Бочкова, начальник управления научных и лабораторных исследований Центрального научно-исследовательского института стоматологии и челюстно-лицевой хирургии.

Тимофей Евгеньевич Григорьев – кандидат физико-математических наук, заместитель руководителя по научной работе Курчатовского комплекса нано-, био-, инфо-, когнитивных и социогуманитарных наук и природоподобных технологий Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», директор Физтех-школы природоподобных, плазменных и ядерных технологий имени И.В. Курчатова Московского физико-технического института.

Юрий Дмитриевич Загоскин – кандидат химических наук, старший научный сотрудник Курчатовского комплекса нано-, био-, инфо-, когнитивных и социогуманитарных наук и природоподобных технологий Национального исследовательского центра «Курчатовский институт».

Сергей Николаевич Чвалун – доктор химических наук, профессор, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник Курчатовского комплекса нано-, био-, инфо-, когнитивных и социогуманитарных наук и природоподобных технологий Национального исследовательского центра «Курчатовский институт».

Дмитрий Вадимович Гольдштейн – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией генетики стволовых клеток Медико-генетического научного центра имени академика Н.П. Бочкова.

Татьяна Борисовна Бухарова – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории генетики стволовых клеток Медико-генетического научного центра имени академика Н.П. Бочкова.

Author information

Irina A. Nedorubova – Researcher, Stem Cell Genetics Laboratory, Research Centre for Medical Genetics.
<https://orcid.org/0000-0001-8472-7116>

Victoria O. Chernomyrdina – Junior Researcher, Stem Cell Genetics Laboratory, Research Centre for Medical Genetics; Junior Researcher, General Pathology Department, Central Research Institute of Dentistry and Maxillofacial Surgery.
<https://orcid.org/0000-0003-3828-8495>

Anastasiia Yu. Meglei – Junior Researcher, Laboratory of Cytogenetics, Research Centre for Medical Genetics; Junior Researcher, General Pathology Department, Central Research Institute of Dentistry and Maxillofacial Surgery.
<https://orcid.org/0000-0003-2970-7176>

Viktoriia P. Basina – Laboratory Research Assistant, Stem Cell Genetics Laboratory, Research Centre for Medical Genetics.
<https://orcid.org/0009-0006-0127-6502>

Valeriya S. Kuznetsova – Cand. Sci. (Med.), Researcher, Stem Cell Genetics Laboratory, Research Centre for Medical Genetics; Senior Researcher, General Pathology Department, Central Research Institute of Dentistry and Maxillofacial Surgery.
<https://orcid.org/0000-0001-8643-1642>

Andrey V. Vasilyev – Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Senior Researcher, Stem Cell Genetics Laboratory, Research Centre for Medical Genetics; Head of the Scientific and Laboratory Research Department, Central Research Institute of Dentistry and Maxillofacial Surgery.
<https://orcid.org/0000-0002-7169-2724>

Timofei E. Grigoriev – Cand. Sci. (Phys.-Math.), Deputy Head for Research, Kurchatov Unit of Nano- and Biosciences, Information and Cognitive Sciences, Humanities and Social Sciences, and Nature-Like Technologies, National Research Centre “Kurchatov Institute”; Head of the I.V. Kurchatov Phystech School of Nature-like, Plasma and Nuclear Technologies, Moscow Institute of Physics and Technology.
<https://orcid.org/0000-0001-8197-0188>

Yuriy D. Zagoskin – Cand. Sci. (Chem.), Senior Researcher, Kurchatov Unit of Nano- and Biosciences, Information and Cognitive Sciences, Humanities and Social Sciences, and Nature-Like Technologies, National Research Centre “Kurchatov Institute”.
<https://orcid.org/0000-0002-5825-8333>

Sergei N. Chvalun – Dr. Sci. (Chem.), Professor, Corresponding Members of the Russian Academy of Sciences, Chief Researcher, Kurchatov Unit of Nano- and Biosciences, Information and Cognitive Sciences, Humanities and Social Sciences, and Nature-Like Technologies, National Research Centre “Kurchatov Institute”.
<https://orcid.org/0000-0001-9405-4509>

Dmitry V. Goldshtein – Dr. Sci. (Biol.), Professor, Head of the Stem Cell Genetics Laboratory, Research Centre for Medical Genetics.
<https://orcid.org/0000-0003-2438-1605>

Tatiana B. Bukharova – Cand. Sci. (Biol.), Leading Researcher, Research Centre for Medical Genetics.
<https://orcid.org/0000-0003-0481-256X>