

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc682221>

EDN: ZTLJPA



Свойства остеопластических матриксов на основе полилактидных микрочастиц и обогащённой тромбоцитами плазмы, импрегнированных аденовирусными конструкциями с геном *BMP2*

В.П. Басина¹, И.А. Недорубова¹, В.О. Черномырдина¹, А.Ю. Меглей¹, О.В. Махнач¹,
А.В. Миронов², Т.Е. Григорьев², Ю.Д. Загоскин², Д.В. Гольдштейн¹, Т.Б. Бухарова¹

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

² Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Ежегодно увеличивается число пациентов, нуждающихся в проведении операций по восстановлению костной ткани. Ген-активированные остеопластические матриксы представляют собой перспективную альтернативу традиционным методам костной пластики, поскольку обеспечивают длительную и направленную экспрессию генов-остеоиндукторов непосредственно в зоне дефекта.

Цель. Оценка свойств ген-активированных матриксов на основе полилактидных микрочастиц и обогащённой тромбоцитами плазмы, импрегнированных аденовирусными конструкциями с геном *BMP2*.

Методы. В работе использованы световая и флуоресцентная микроскопия, проточная цитофлуориметрия, спектрофотометрия, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, гистологическое окрашивание, гистоморфометрический анализ, МТТ-тест и биохимический тест.

Результаты. Посредством МТТ-теста и проточной цитофлуориметрии подобрана оптимальная концентрация аденовирусных векторов с геном *BMP2* для импрегнации в матриксы на основе полилактидных микрочастиц и обогащённой тромбоцитами плазмы. Показано, что полученные ген-активированные матриксы не оказывают цитотоксического действия и способствуют активной пролиферации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. Высвобождение генетических конструкций из матриксов происходило пролонгированно в течение 15 дней, что оценивалось спектрофотометрически. Методами флуоресцентной микроскопии и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени установлено, что ген-активированные матриксы обеспечивали эффективную и постепенную трансдукцию клеточных культур. С помощью анализа гистологических срезов через 28 сут после внутримышечной имплантации крысам была продемонстрирована биосовместимость матриксов *in vivo*. Ген-активированные матриксы индуцировали остеогенную дифференцировку мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани, что подтверждается возрастанием экспрессии маркёров остеогенной дифференцировки, активности щелочной фосфатазы и минерализации внеклеточного матрикса.

Заключение. Разработанные ген-активированные матриксы из полилактидных микрочастиц и обогащённой тромбоцитами плазмы, содержащие аденовирусные векторы с геном *BMP2*, показали свою эффективность в экспериментах *in vitro* и могут быть использованы для восполнения дефектов костной ткани.

Ключевые слова: ген-активированные матриксы; *BMP2*; полилактидные микрочастицы; обогащённая тромбоцитами плазма; аденовирусные векторы.

Как цитировать:

Басина В.П., Недорубова И.А., Черномырдина В.О., Меглей А.Ю., Махнач О.В., Миронов А.В., Григорьев Т.Е., Загоскин Ю.Д., Гольдштейн Д.В., Бухарова Т.Б. Свойства остеопластических матриксов на основе полилактидных микрочастиц и обогащённой тромбоцитами плазмы, импрегнированных аденовирусными конструкциями с геном *BMP2* // Гены и клетки. 2025. Т. 20, № 4. С. 311–324. DOI: 10.17816/gc682221 EDN: ZTLJPA

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc682221>

EDN: ZTLJPA

Properties of Osteoplastic Matrices Based on Polylactide Microparticles and Platelet-Rich Plasma Impregnated With Adenoviral Constructs Carrying *BMP2* Gene

Viktoriia P. Basina¹, Irina A. Nedorubova¹, Victoria O. Chernomyrdina¹, Anastasiia Yu. Meglei¹, Oleg V. Makhnach¹, Anton V. Mironov², Timofei E. Grigoriev², Yuriy D. Zagoskin², Dmitry V. Goldshtein¹, Tatiana B. Bukharova¹

¹ Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia;

² National Research Centre "Kurchatov Institute", Moscow, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: The number of patients requiring bone graft procedures is rising every year. Gene-activated osteoplastic matrices represent a promising alternative to traditional bone grafting methods, as they enable sustained and targeted expression of osteoinductive genes directly within the defect area.

AIM: The work aimed to evaluate the properties of gene-activated matrices based on polylactide microparticles and platelet-rich plasma impregnated with adenoviral constructs carrying the *BMP2* gene.

METHODS: Light and fluorescence microscopy, flow cytometry, spectrophotometry, real-time polymerase chain reaction, histological staining, histomorphometric analysis, MTT assay, and biochemical assays were performed.

RESULTS: The optimal concentration of adenoviral vectors carrying the *BMP2* gene for impregnation into matrices based on polylactide microparticles and platelet-rich plasma was determined using the MTT assay and flow cytometry. The resulting gene-activated matrices were shown to be non-cytotoxic and to stimulate the active proliferation of multipotent mesenchymal stromal cells. As assessed by spectrophotometry, the matrices released genetic constructs in a sustained manner over 15 days. Fluorescence microscopy and real-time polymerase chain reaction confirmed effective and gradual transduction of cell cultures. Histological analysis of tissue sections obtained 28 days after intramuscular implantation in rats demonstrated *in vivo* biocompatibility of the matrices. The gene-activated matrices induced osteogenic differentiation of adipose tissue-derived multipotent mesenchymal stromal cells, confirmed by increased expression of osteogenic differentiation markers, elevated alkaline phosphatase activity, and extracellular matrix mineralization.

CONCLUSION: The developed gene-activated matrices composed of polylactide microparticles and platelet-rich plasma and incorporating adenoviral vectors carrying *BMP2* gene demonstrated effectiveness in *in vitro* experiments and may be used for repair of bone tissue defects.

Keywords: gene-activated matrices; *BMP2*; polylactide microparticles; platelet-rich plasma; adenoviral vectors.

To cite this article:

Basina VP, Nedorubova IA, Chernomyrdina VO, Meglei AY, Makhnach OV, Mironov AV, Grigoriev TE, Zagoskin YD, Goldshtein DV, Bukharova TB. Properties of Osteoplastic Matrices Based on Polylactide Microparticles and Platelet-Rich Plasma Impregnated With Adenoviral Constructs Carrying *BMP2* Gene. *Genes & cells*. 2025;20(4):311–324. DOI: 10.17816/gc682221 EDN: ZTLJPA

ОБОСНОВАНИЕ

Разработка эффективного способа восполнения обширных дефектов костной ткани представляет собой важную задачу в стоматологии, ортопедии и челюстно-лицевой хирургии [1]. Подходы генной терапии позволяют стимулировать естественные процессы регенерации костей. Перспективным является создание ген-активированных остеопластических материалов (ГАМ) — биосовместимых матриц, импрегнированных генетическими конструкциями. Они помогают обеспечить ускоренное заживление костных повреждений за счёт целенаправленной доставки генов белков-остеоиндукторов в резидентные клетки. Это позволяет достичь устойчивой и регулируемой продукции белка, который способствует привлечению в зону дефекта эндотелиальных, иммунных и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), а также индуцирует дифференцировку прогениторных клеток [2, 3].

Остеопластическим материалам необходимо иметь ряд характеристик для успешного заживления костных дефектов. Они должны быть биосовместимыми, биорезорбируемыми, а также обладать остеоиндуктивными свойствами и выступать в качестве каркаса для поддержания роста костной ткани [4]. Матрицы для доставки генетических конструкций могут быть созданы из природных и синтетических полимеров [5]. Полимолочная кислота (polylactic acid, PLA) представляет собой гидрофобный алифатический полиэфир, часто используемый при изготовлении матриксов для биомедицинского применения благодаря биосовместимости, термостабильности и биорезорбируемости [6]. Кроме того, механические свойства матриц на основе PLA могут быть подобраны в соответствии со свойствами костной ткани, а за счёт выбора структуры PLA может достигаться оптимальное время биодеградации каркасов [7, 8]. Таким образом, скорость замещения PLA матриксов может соответствовать времени восстановления костной ткани [9]. Показана эффективность использования матриксов на основе PLA с костным морфогенетическим белком 2 (bone morphogenetic protein 2, BMP2) и генетическими конструкциями, несущими его ген. Такие матриксы способны поддерживать адгезию клеток, стимулировать остеогенную дифференцировку ММСК и неоостеогенез в моделях ортотопического остеогенеза [10–14]. Кроме того, при создании матриксов перспективным компонентом является обогащённая тромбоцитами плазма (platelet-rich plasma, PRP). При активации PRP образуется фибриновый сгусток, имитирующий гематому, которая является важным элементом регенеративного процесса. Она способствует восстановлению костных дефектов и служит источником необходимых для заживления компонентов, таких как цитокины, факторы роста и ангиогенные факторы [15]. Показано, что использование комбинации PRP с BMP2 или плазмидой с геном *BMP2* приводит

к увеличению количества кровеносных сосудов, способствует пролиферации прогениторных клеток и ускоряет заживление костных дефектов [16–18]. Помимо этого, фибриновые сгустки, которые образуются в результате полимеризации фибриногена из PRP, можно использовать для формирования плотных каркасов, позволяющих обеспечить постепенное высвобождение содержимого.

Для придания остеоиндуктивных свойств к материалам для костной пластики могут быть добавлены факторы роста, которые участвуют в регуляции остеогенной дифференцировки. Одним из наиболее изученных и часто используемых индукторов остеогенеза является белок BMP2 [19], который способен инициировать формирование костной ткани, преимущественно путём рекрутирования и стимуляции дифференцировки клеток-предшественников остеобластного дифферона [20]. Применение рекомбинантного BMP2 в составе матриц увеличивало образование кости в различных моделях дефектов костей животных [21–24]. Однако быстрая деградация белка в организме требует его использования в высоких концентрациях, что может приводить к нежелательным последствиям, ограничивая клиническое применение BMP2 [25, 26]. Многообещающей альтернативой белку BMP2 является доставка гена *BMP2* с помощью вирусных или невирусных конструкций в составе матриц, что обеспечивает локальную продукцию белка резидентными клетками в физиологических концентрациях. В отличие от невирусных способов доставки вирусные векторы позволяют добиться более эффективного переноса целевых генов в клетки-мишени [27]. В медицинской практике применяются аденовирусные векторы, которые могут трансдуцировать делящиеся и неделящиеся клетки. При этом ДНК не встраивается в геном клетки-хозяина, что минимизирует вероятность возникновения инсерционного мутагенеза [28]. Таким образом, конструирование ГАМ с использованием аденовирусных конструкций является перспективным и целесообразным подходом для лечения пациентов с дефектами костей.

ЦЕЛЬ

Разработка ГАМ на основе микрочастиц PLA и PRP, импрегнированных аденовирусными конструкциями с геном *BMP2*, и исследование их свойств.

МЕТОДЫ

Культивирование мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани крыс

Культуры ММСК были ранее получены из жировой ткани (ЖТ) крыс в лаборатории генетики стволовых клеток ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова» и охарактеризованы [29]. Клетки

культивировали при 37 °C и 5% CO₂ в ростовой среде на основе DMEM/F12 («ПанЭко», Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС; BioWest, Франция); 0,584 мг/мл L-глутамин («ПанЭко», Россия); 5000 ЕД/мл пенициллина и 5000 мг/мл стрептомицина («ПанЭко», Россия). Каждые три дня производили замену среды на свежую.

В ходе экспериментов *in vitro* ММСК ЖТ в плотности 50×10³ кл./мл высевали на дно 24-луночных планшетов, а матриксы помещали в подвесные вкладыши Transwell (SPL Life Sciences, Южная Корея). Замену половины среды проводили каждые три дня.

Определение оптимальной концентрации аденовирусной ДНК для эффективной трансдукции мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани крыс

В течение 24 ч ММСК ЖТ инкубировали совместно с суспензией аденовирусных векторов с геном *gfp* в концентрациях 10, 50 и 100 нг/мкл вирусной ДНК в вышеописанной среде DMEM/F12 с L-глутамином и антибиотиками, а также с добавлением 2% ЭТС. После этого клетки отмывали от вирусных конструкций. Эффективность трансдукции клеток на 1-е и 3-и сутки определяли по наличию клеток, продуцирующих зелёный флуоресцентный белок, с помощью автоматизированного имиджера Lionheart FX (BioTek, США), а также методом проточной цитофлуориметрии с использованием цитометра CyFlow ML (Partec, Япония).

Получение ген-активированных матриксов

Пористые микрочастицы PLA диаметром 0,1–0,4 мм, полученные из поли-L-лактида с молекулярной массой 200 кДа (NatureWorks, США), были изготовлены в отделе нанобиотехнологий НИЦ «Курчатовский институт» методом распыления с заморозкой и последующей сублимационной сушкой. Диаметр пор микрочастиц PLA составлял 2–10 мкм [30]. Микрочастицы стерилизовали в течение 30 мин в 70% растворе этанола, а затем отмывали физиологическим раствором на протяжении 1 ч.

Для получения PRP производили забор крови крыс путём сердечной пункции в пробирки с цитратом натрия и центрифугировали при 1100 об./мин в течение 10 мин при комнатной температуре. Супернатант, в котором находились тромбоциты и лейкоциты, собирали и центрифугировали при 3600 об./мин в течение 15 мин при комнатной температуре. Половину от бедного тромбоцитами супернатанта удаляли, а осадок ресуспендировали в оставшемся объёме.

Аденовирусные частицы с генами *BMP2* и *gfp* были получены в ходе совместной работы с сотрудниками ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика

Н.Ф. Гамалеи» [31]. Вирусные частицы наращивали в клетках HEK-293 из американского банка биоматериалов American Type Culture Collection. С этой целью клетки HEK-293 культивировали в среде DMEM/F12, содержащей 10% ЭТС, 0,584 мг/мл L-глутамин, 5000 ЕД/мл пенициллина и 5000 мг/мл стрептомицина, при 37 °C и 5% CO₂ до достижения 80% конфлюэнтного монослоя и затем инкубировали с суспензией вирусных частиц в среде, содержащей 2% ЭТС, в течение 48 ч. После этого клетки разрушали путём трёхкратного замораживания (до –80 °C) и оттаивания (до 37 °C). Затем выделяли вирусную ДНК с помощью набора QIAamp MinElute Virus Spin Kit (QIAGEN, Германия) согласно инструкции производителя и измеряли концентрацию с помощью спектрофотометра NanoDrop OneC (Thermo Fisher Scientific, США).

Получали ГАМ посредством инкубации 100 мкл микрочастиц PLA с аденовирусными конструкциями Ad-BMP2 или Ad-GFP с концентрацией вирусной ДНК 50 мкг/мл в течение 24 ч при 37 °C. Затем ГАМ смешивали с 80 мкл PRP и добавляли 20 мкл раствора тромбина (PZ Cormay, Польша) в 10% растворе хлорида кальция (НПО «Микроген», Россия) для полимеризации фибриногена. В результате формировался фибриновый сгусток, который соединял все компоненты матриксов.

Сканирующая электронная микроскопия

Для изучения структуры матриксов на основе микрочастиц PLA с PRP их фиксировали 2,5% раствором глutarового альдегида (Panreac, США) в течение 12 ч при 4 °C. Далее образцы промывали фосфатно-солевым буфером («ПанЭко», Россия) и проводили дегидратацию в батарее этанола с возрастающей концентрацией (50%→75%→80%→90%) с последующей обработкой абсолютным этанолом; все этапы выполняли при 4 °C. После образцы высушивали на воздухе, фиксировали на сменном предметном столике электронного микроскопа при помощи углеродной токопроводящей клейкой ленты и без дополнительной обработки исследовали на сканирующем электронном микроскопе Phenom ProX (Thermo Fisher Scientific, США) при ускоряющем напряжении 15 кВ и при низком вакууме, режим Торо с детектором SE.

Выделение вирусной ДНК и оценка кинетики высвобождения

Для оценки кинетики высвобождения аденовирусных конструкций из матриксов PLA/PRP-Ad-GFP и PLA/Ad-GFP их инкубировали в физиологическом растворе («ПанЭко», Россия) в течение 15 дней и измеряли концентрацию вирусной ДНК в физиологическом растворе каждые 3 сут. Выделение вирусной ДНК проводили с помощью набора QIAamp MinElute Virus Spin Kit (QIAGEN, Германия) согласно инструкции производителя. Концентрацию ДНК оценивали при длине волны 260 нм с помощью спектрофотометра NanoDrop OneC (Thermo Fisher Scientific, США).

Трансдуцирующая способность аденовирусных конструкций в составе ген-активированных матриксов

Предварительно окрашенные PKN-26 ММСК ЖТ (Sigma-Aldrich, США) инкубировали с вирусными конструкциями Ad-GFP и с матриксами PLA/PRP и PLA/PRP-Ad-GFP в течение 7 дней. Инкубацию клеток с Ad-GFP проводили в течение 24 ч, после чего производили отмывку вирусной суспензии и далее культивировали клетки в ростовой среде. Матрикс инкубировали с клетками на протяжении всего срока исследования. Эффективность трансдуцирующей способности Ad-GFP оценивали с помощью автоматизированного имиджера Lionheart FX (BioTek, США), а также путём исследования относительного уровня экспрессии гена *gfp* клетками на 1-е и 7-е сутки методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

Матричную РНК выделяли из клеток с помощью набора RNeasy Plus Mini kit (QIAGEN, Германия), а затем синтезировали комплементарную ДНК с помощью фермента RevertAid (Thermo Scientific, США) по протоколам производителя. После проводили ПЦР-РВ в термоциклере iCycler iQ (Bio-Rad, США), используя интеркалирующий краситель SYBR Green I («Евроген», Россия). Уровень экспрессии целевых генов был нормализован по значению экспрессии генов «домашнего хозяйства» Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) и Actin-β (*Actβ*). Последовательность используемых в работе праймеров представлена в табл. 1.

Таблица 1. Последовательность праймеров для полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

Table 1. Sequence of primers for real-time polymerase chain reaction

Ген	Последовательность нуклеотидов
<i>Actβ</i>	forward GAGATTACTGCCCTGGCTCC reverse GCTCAGTAACAGTCCGCCA
<i>Alpl</i>	forward TGCCTACTTGTGTGGCGTGA reverse CGTGACCTCGTCCCTGAG
<i>Bglap</i>	forward CCTAGCAGACCATGAGGAC reverse CAGGTGAGAGGAGGAGGAG
<i>Gapdh</i>	forward GCGAGATCCCGCTAACATCA reverse CCCTCCACGATGCCAAAGT
<i>gfp</i>	forward ACGTAAACGGCCACAAGTTCA reverse CTGCCGTCCTCGATGTTGT
<i>Spp1</i>	forward GACGATGACGACGGAGACC reverse TGGCAGTGAAGGACTCATCA

Оценка цитотоксичности матриксов

Жизнеспособность клеток определяли с помощью МТТ-теста через 1 и 7 сут. С этой целью клетки инкубировали в течение 2 ч с 0,5 мг/мл 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия («ПанЭко», Россия) при 37 °С. Кристаллы формазана растворяли диметилсульфоксидом («ПанЭко», Россия), перемешивая на шейкере в течение 20 мин. Оптическую плотность раствора измеряли

на планшетном спектрофотометре xMark (Bio-Rad, США) при длине волны 570 нм, фоновое значение вычитали при 620 нм. Данные приведены относительно значений в контрольных лунках без добавления матриксов, которые были приняты за 100%.

Внутримышечная имплантация матриксов крысам

Исследования *in vivo* проводили на крысах линии Wistar массой 250–300 г. В каждой экспериментальной группе было по 6 животных. В качестве анестезии крысам вводили внутримышечно тилетамин + золазепам¹ (Virbac, Франция) и ксилазин (Interchemie Werken De Adelaar BV, Нидерланды) в дозах 30 и 5 мг/кг соответственно. Исследуемые матриксы имплантировали в двуглавую мышцу бедра крыс. Рану зашивали, используя материал викрил 5/0 (Ethicon, США). Через 28 сут после операции всех крыс усыпляли ингаляцией CO₂ и осуществляли резекцию участков имплантации.

Для проведения гистологического исследования образцы фиксировали 10% нейтральным забуференным раствором формалина («Лабико», Россия) в течение не менее 24 ч и заливали в парафин. После чего получали срезы толщиной 5–10 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином и с помощью микроскопа Axio Observer D1 с камерой AxioCam HRc Axioimager M.1 (Carl Zeiss, Германия) делали фотографии гистологических срезов, по которым оценивали биосовместимость матриксов. Для оценки соотношения количества гигантских многоядерных клеток инородных тел к площади среза в поле зрения (на 1 мм²) было проанализировано 20 полей.

Остеогенная дифференцировка мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани

Для исследования остеогенной дифференцировки ММСК ЖТ клетки культивировали в присутствии ГАМ в остеогенной среде на основе ростовой среды с добавлением 0,05 мг/мл L-аскорбиновой кислоты (Sigma-Aldrich, США) и 2,16 мг/мл β-глицерофосфата натрия (Sigma-Aldrich, США). Эффективность оценивали по изменению уровня экспрессии генов остеогенных маркёров (*Spp1*, *Bglap* и *Alpl*) [32], активности щелочной фосфатазы (*Alpl*) и минерализации внеклеточного матрикса ММСК ЖТ.

Активность *Alpl* определяли в клеточных лизатах с использованием набора для количественной оценки активности щелочной фосфатазы (Elabscience Biotechnology, Китай) в соответствии с инструкциями производителя. Измерения проводили на планшетном спектрофотометре xMark (Bio-Rad, США).

Для оценки минерализации внеклеточного матрикса после отмывки клеток фосфатно-солевым буферным раствором («ПанЭко», Россия) ММСК ЖТ фиксировали

¹ Здесь и далее: лекарственное средство не зарегистрировано в Российской Федерации.

охлаждённым 70% этанолом в течение 30 мин при +4 °С. Затем клетки окрашивали 2% водным раствором ализаринового красного с pH 4,1 (Sigma-Aldrich, США) в течение 5 мин. Для удаления несвязавшегося красителя производили двукратную отмывку дистиллированной водой. Получали изображения с помощью микроскопа Axio Observer D1 с камерой AxioCam HRc Axioimager M.1 (Carl Zeiss, Германия).

Статистический анализ

В каждом эксперименте использовали не менее 4 биологических повторов и результаты представляли в виде $M \pm SD$. Построение графиков и статистический анализ

выполняли в программах Excel и SigmaPlot 12.0 (Systat Software, Германия). Межгрупповые различия статистически анализировали с помощью теста Холма–Сидака после однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA).

РЕЗУЛЬТАТЫ

При инкубации ММСЖ ЖТ с Ad-GFP наблюдали увеличение количества трансдуцированных клеток при возрастании концентрации вирусной ДНК (рис. 1). Однако не выявлено статистически значимых различий значений данного показателя между группами клеток, культивируемых с 50 и 100 нг/мкл Ad-GFP как на 1-е, так

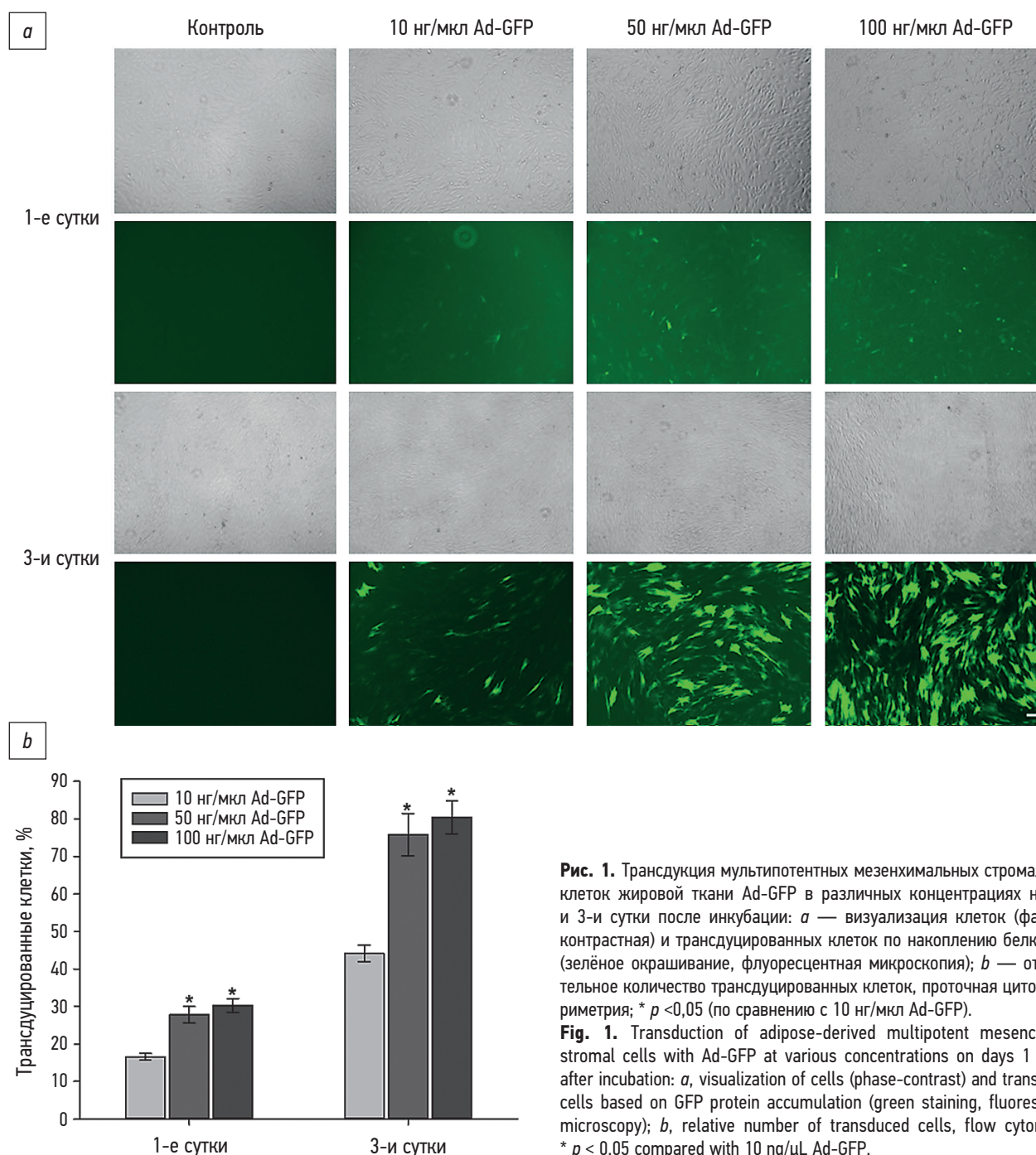


Рис. 1. Трансдукция мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани Ad-GFP в различных концентрациях на 1-е и 3-и сутки после инкубации: *a* — визуализация клеток (фазово-контрастная) и трансдуцированных клеток по накоплению белка GFP (зелёное окрашивание, флуоресцентная микроскопия); *b* — относительное количество трансдуцированных клеток, проточная цитофлуориметрия; * $p < 0,05$ (по сравнению с 10 нг/мкл Ad-GFP).

Fig. 1. Transduction of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells with Ad-GFP at various concentrations on days 1 and 3 after incubation: *a*, visualization of cells (phase-contrast) and transduced cells based on GFP protein accumulation (green staining, fluorescence microscopy); *b*, relative number of transduced cells, flow cytometry; * $p < 0.05$ compared with 10 ng/ μ L Ad-GFP.

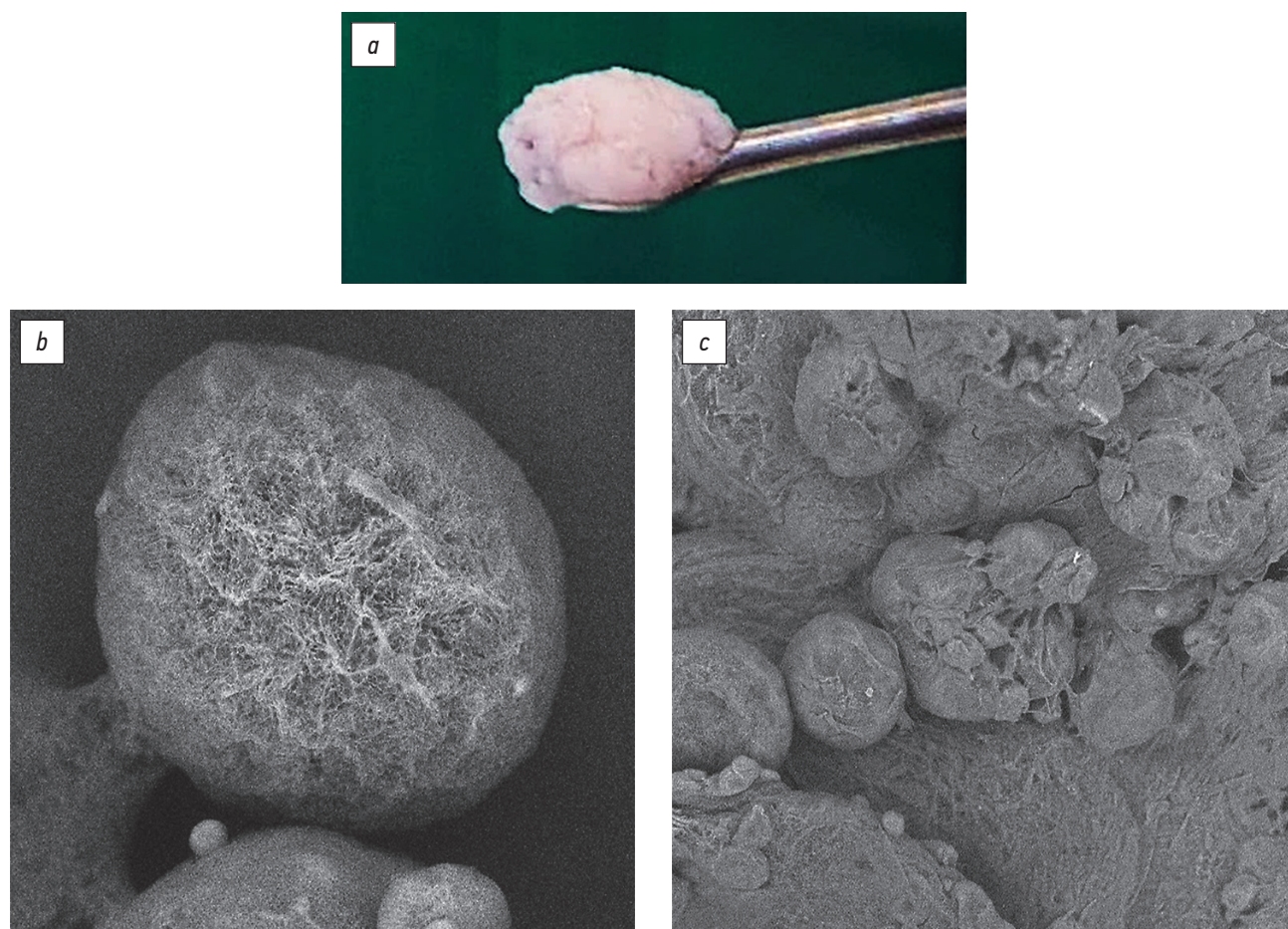


Рис. 2. Ген-активированные остеопластические материалы на основе микрочастиц полимолочной кислоты (polylactic acid, PLA) и обогащённой тромбоцитами плазмы (platelet-rich plasma, PRP), импрегнированные Ad-BMP2: *a* — внешний вид PLA/PRP-Ad-BMP2; *b* — структура микрочастиц PLA; *c* — PLA/PRP; сканирующая электронная микроскопия, 1000× (*b*) и 500× (*c*).

Fig. 2. Gene-activated osteoplastic materials based on polylactic acid (PLA) microparticles and platelet-rich plasma (PRP) impregnated with Ad-BMP2: *a*, appearance of PLA/PRP-Ad-BMP2; *b*, structure of PLA microparticles; *c*, PLA/PRP; scanning electron microscopy, ×1000 (*b*) and ×500 (*c*).

и на 3-и сутки. Инкубация ММСК ЖТ с 50 и 100 нг/мкл Ad-GFP через 3 сут приводила к трансдукции ($75,8 \pm 5,7$)% и ($80,4 \pm 4,4$)% клеток соответственно. На основании полученных данных для последующих экспериментов была выбрана концентрация 50 нг/мкл вирусной ДНК, обеспечивающая высокую эффективность трансдукции при минимальной вирусной нагрузке.

Были получены ГАМ на основе микрочастиц PLA и гидрогеля PRP в соотношении 1:1, содержащие Ad-BMP2 или Ad-GFP с концентрацией вирусной ДНК 50 нг/мкл (рис. 2, *a*). С помощью сканирующей электронной микроскопии показана детальная структура матриц (рис. 2, *b*, *c*). Микрочастицы PLA имеют сферическую форму, хорошо видна их высокопористая поверхность. Гидрогель PRP образует аморфную матрицу, окружающую частицы PLA, обеспечивая их механическую фиксацию.

Изучение кинетики высвобождения вирусных конструкций из матриц на основе PLA/PRP в сравнении с микрочастицами PLA показало, что аденовирусные конструкции с геном *gfp* высвобождались из матриц постепенно, но с различной скоростью (рис. 3). Из матриц

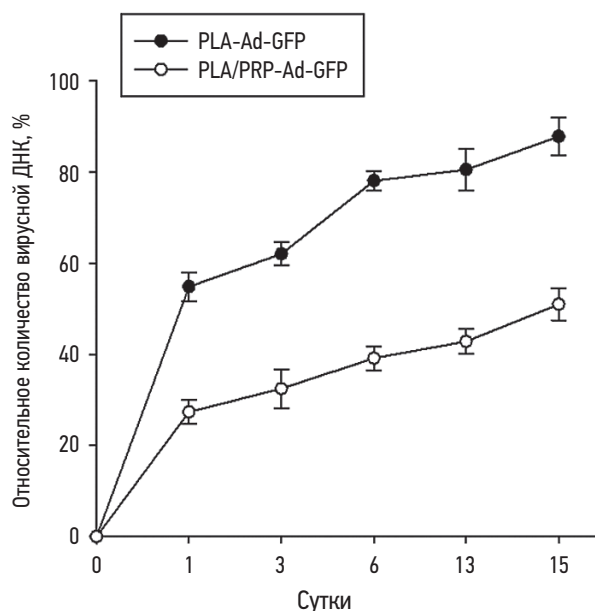


Рис. 3. Кинетика высвобождения Ad-GFP из матриц, спектрофотометрия.

Fig. 3. Kinetics of Ad-GFP release from matrices, spectrophotometry.

на основе микрочастиц PLA уже на 1-е сутки высвободилось 55% Ad-GFP, а к 15-му дню это значение достигло 87%. Выход вирусных векторов из матриц на основе PLA/PRP происходил медленнее. На 1-е сутки высвободилось 27% Ad-GFP, а через 2 нед было выявлено только 51% вирусных частиц. Таким образом, матрицы на основе микрочастиц PLA с добавлением гидрогеля обеспечивают более пролонгированное высвобождение генетических конструкций.

По наличию MMCK ЖТ, продуцирующих белок GFP, была подтверждена трансдуцирующая способность Ad-GFP, высвобождающихся из матриц PLA/PRP (рис. 4, а). Уже на 1-е сутки после инкубации матриц PLA/PRP-Ad-GFP в отдельных клетках отмечено наличие флуоресцентного белка, к 7-м суткам число клеток, продуцирующих GFP, увеличивалось. Данные подтверждают также уровень экспрессии гена *gfp* в MMCK ЖТ, который увеличивался в 17 раз на 7-е сутки после инкубации

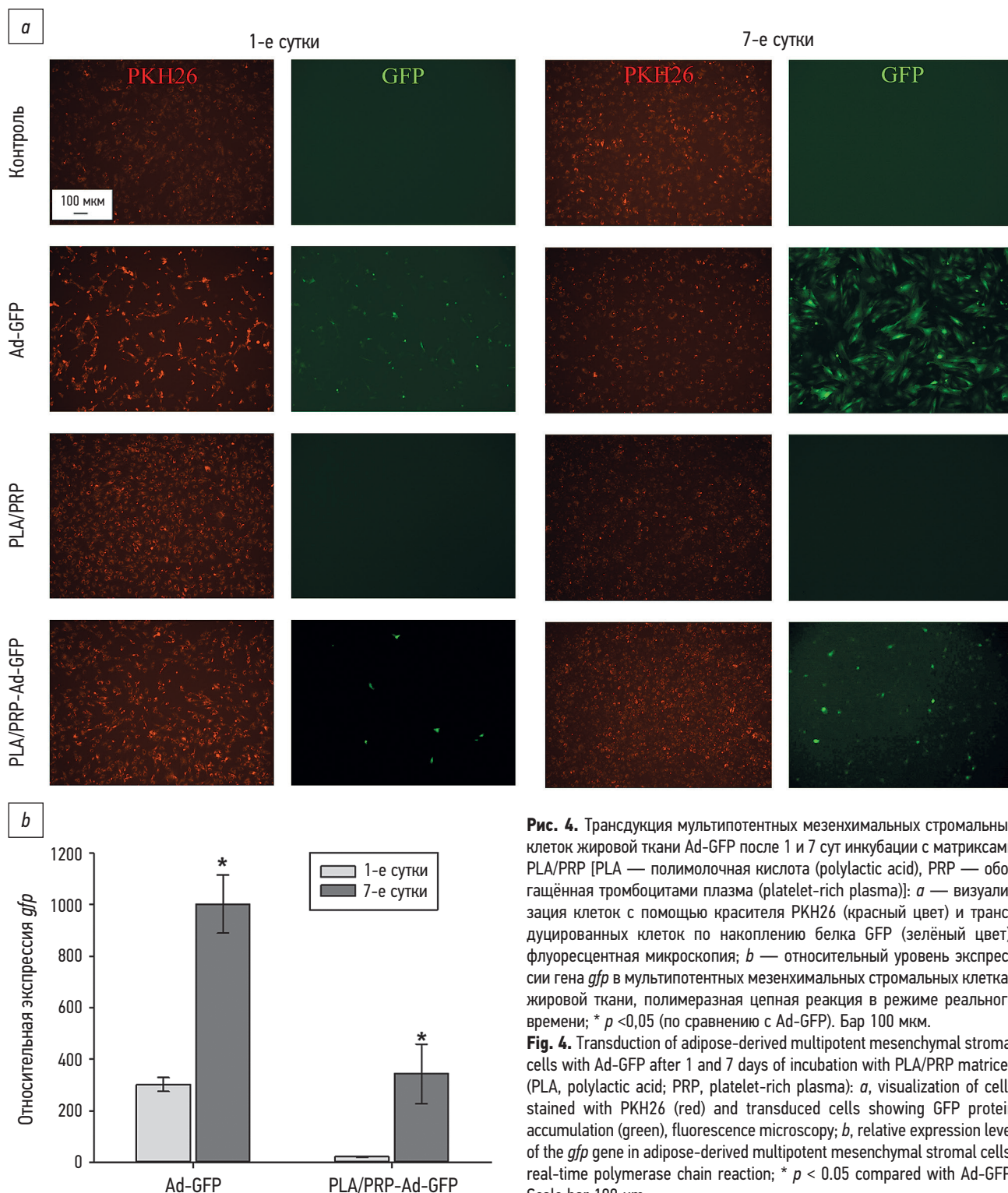


Рис. 4. Трансдукция мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани Ad-GFP после 1 и 7 сут инкубации с матриксами PLA/PRP [PLA — полимолочная кислота (polylactic acid), PRP — обогащённая тромбоцитами плазма (platelet-rich plasma)]: *a* — визуализация клеток с помощью красителя PKH26 (красный цвет) и трансдуцированных клеток по накоплению белка GFP (зелёный цвет), флуоресцентная микроскопия; *b* — относительный уровень экспрессии гена *gfp* в мультипотентных мезенхимальных стромальных клетках жировой ткани, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени; * $p < 0,05$ (по сравнению с Ad-GFP). Бар 100 мкм.

Fig. 4. Transduction of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells with Ad-GFP after 1 and 7 days of incubation with PLA/PRP matrices (PLA, polylactic acid; PRP, platelet-rich plasma): *a*, visualization of cells stained with PKH26 (red) and transduced cells showing GFP protein accumulation (green), fluorescence microscopy; *b*, relative expression level of the *gfp* gene in adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells, real-time polymerase chain reaction; * $p < 0.05$ compared with Ad-GFP. Scale bar 100 μ m.

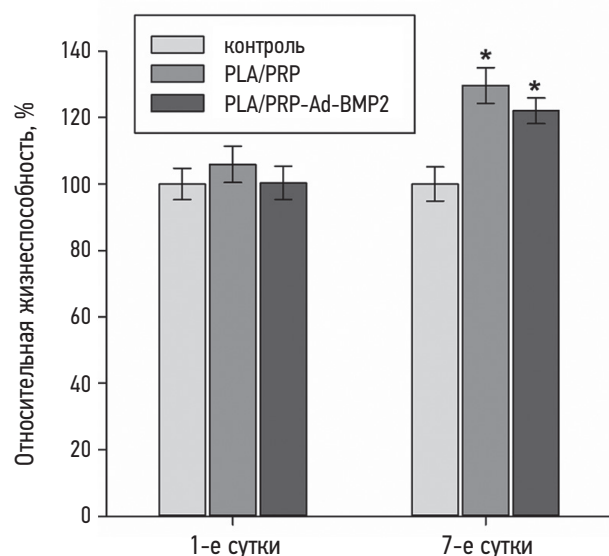


Рис. 5. Относительное количество живых мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани через 1 и 7 сут после инкубации с матриксами PLA/PRP и PLA/PRP, импрегнированными Ad-BMP2, МТТ-тест; * $p < 0,05$ (по сравнению с контролем). PLA — полимолочная кислота (polylactic acid), PRP — обогащённая тромбоцитами плазма (platelet-rich plasma).

Fig. 5. Relative number of viable adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells after 1 and 7 days of incubation with PLA/PRP matrices and PLA/PRP matrices impregnated with Ad-BMP2, MTT assay; * $p < 0.05$ compared with control. PLA, polylactic acid; PRP, platelet-rich plasma.

клеток с матриксами PLA/PRP-Ad-GFP по сравнению с 1-ми сутками (рис. 4, b). Значительно эффективнее происходила трансдукция ММСК ЖТ Ad-GFP без матриксов. А клетки из контрольных образцов и после инкубации с матриксами PLA/PRP не синтезировали GFP.

С помощью МТТ-теста установлено, что матриксы PLA/PRP и PLA/PRP, импрегнированные Ad-BMP2, не оказывают цитотоксического действия на ММСК ЖТ через 1 и 7 сут после инкубации (рис. 5). При этом число жизнеспособных клеток через 7 сут инкубации ММСК ЖТ в присутствии матриксов PLA/PRP и PLA/PRP-Ad-BMP2 статистически значимо превышало данный показатель для контрольных клеток без матриксов.

Через 28 сут после внутримышечной имплантации исследуемых матриксов наблюдалось образование грануляционной ткани с молодыми фибробластами и сосудами (рис. 6). Микрочастицы PLA были окружены гигантскими многоядерными клетками инородных тел. Не выявлено экссудативной воспалительной реакции.

Проведена также оценка количества гигантских многоядерных клеток инородных тел после имплантации матриксов (рис. 7). Данные свидетельствуют

Рис. 7. Количество гигантских многоядерных клеток инородных тел после имплантации через 28 сут, гистоморфометрический анализ. PLA — полимолочная кислота (polylactic acid), PRP — обогащённая тромбоцитами плазма (platelet-rich plasma).

Fig. 7. Number of foreign body multinucleated giant cells 28 days after implantation, histomorphometric analysis. PLA, polylactic acid; PRP, platelet-rich plasma.

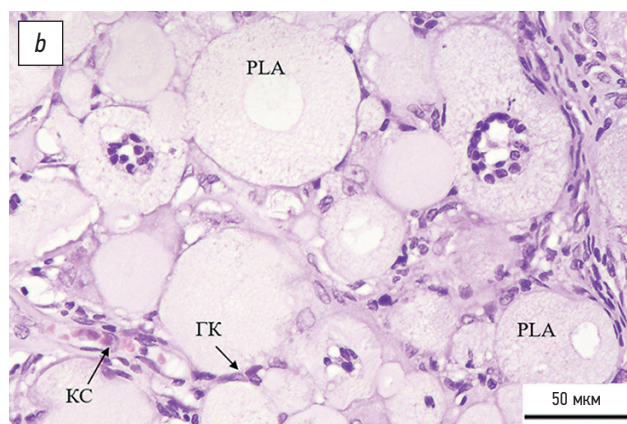
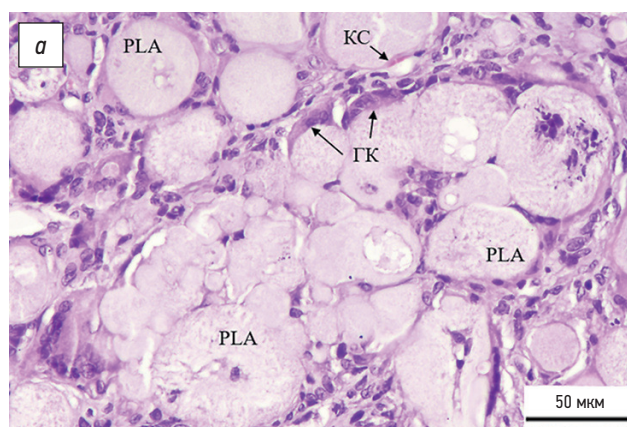
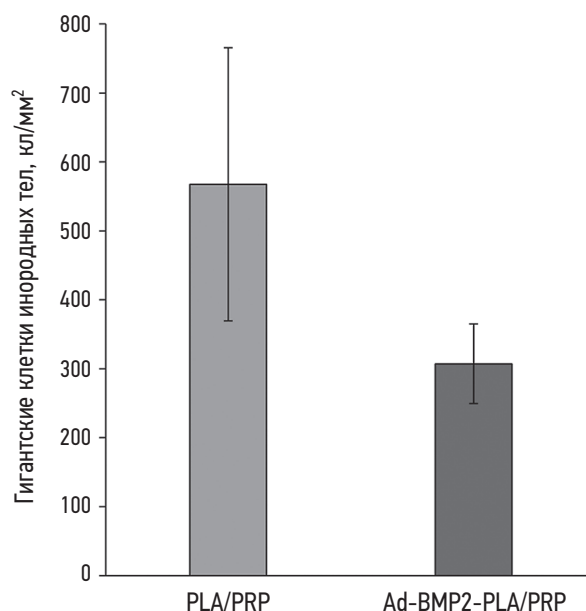


Рис. 6. Область имплантации через 28 сут после внутримышечного введения матриксов: PLA/PRP (a), PLA/PRP-Ad-BMP2 (b). Окраска гематоксилином и эозином, световая микроскопия. КС — кровеносные сосуды, ГК — гигантские многоядерные клетки инородных тел, PLA — полимолочная кислота (polylactic acid), PRP — обогащённая тромбоцитами плазма (platelet-rich plasma).

Fig. 6. Implantation site 28 days after intramuscular administration of matrices: PLA/PRP (a), PLA/PRP-Ad-BMP2 (b). Hematoxylin-eosin staining, light microscopy. KC, blood vessels; ГК, foreign body multinucleated giant cells; PLA, polylactic acid; PRP, platelet-rich plasma.



о том, что добавление аденовирусных конструкций к PLA/PRP не оказывает значительного влияния на степень их резорбции. Наблюдаемая реакция соответствовала физиологическому ответу на имплантацию, что говорит о хорошей биосовместимости разработанных материалов.

На 14-е сутки после инкубации ММСЖ ЖТ с матриксами PLA/PRP-Ad-BMP2 обнаружено увеличение уровня экспрессии генов маркёров остеогенной дифференцировки *Bglap*, *Spp1* и *Alpl* в 5,3 и 6 раз по сравнению

с контрольной группой (рис. 8, а). Активность щелочной фосфатазы также возрастала в исследуемой группе в 2 раза. Кроме того, при инкубации ММСЖ ЖТ с ГАМ PLA/PRP-Ad-BMP2 были обнаружены минеральные отложения во внеклеточном матриксе, чего не наблюдалось в контрольной группе и группе клеток, культивируемых с материалами PLA/PRP без генетических конструкций (рис. 8, б). Эти данные свидетельствуют о том, что ГАМ имеют остеоиндуктивные свойства *in vitro*.

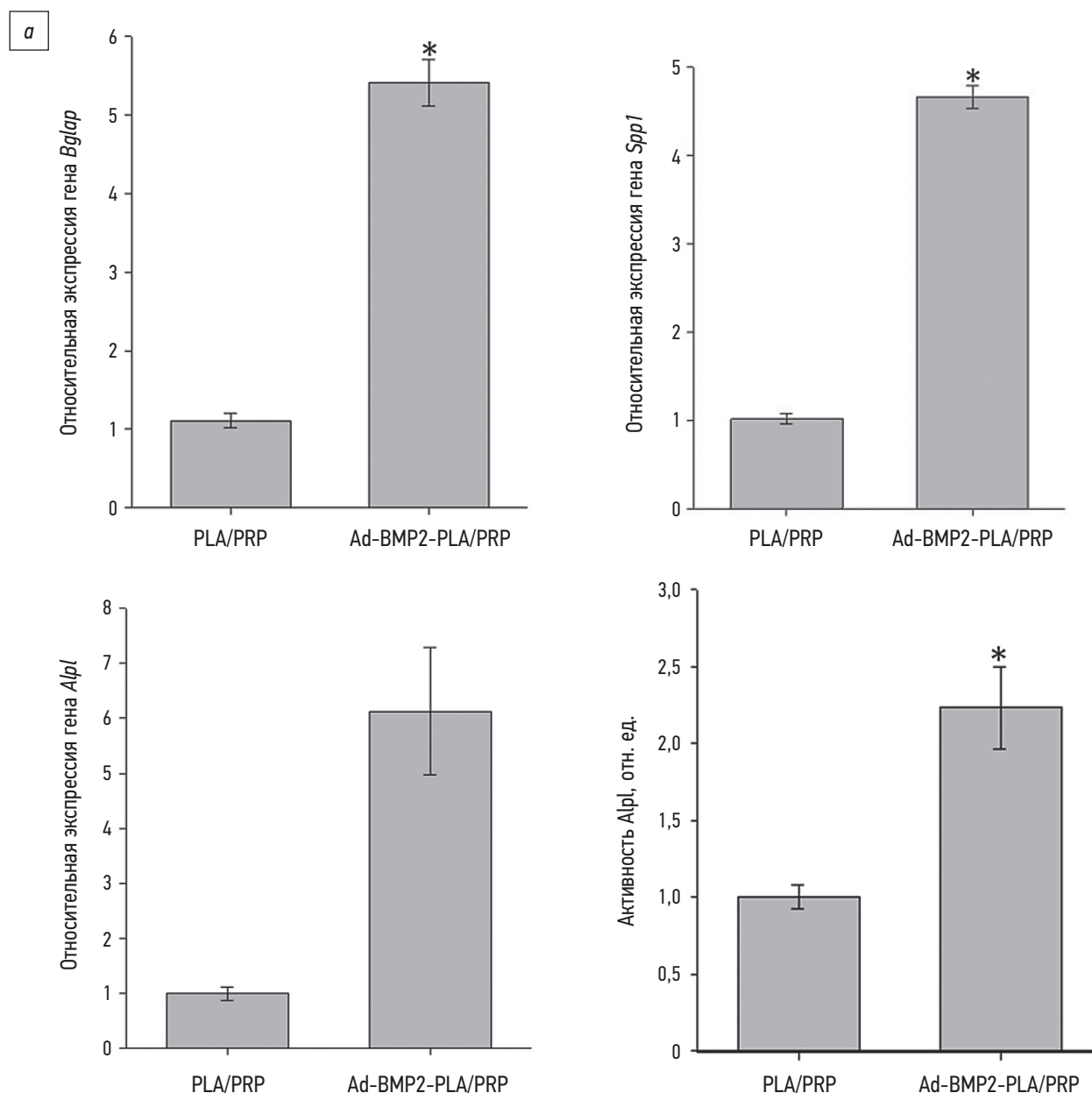
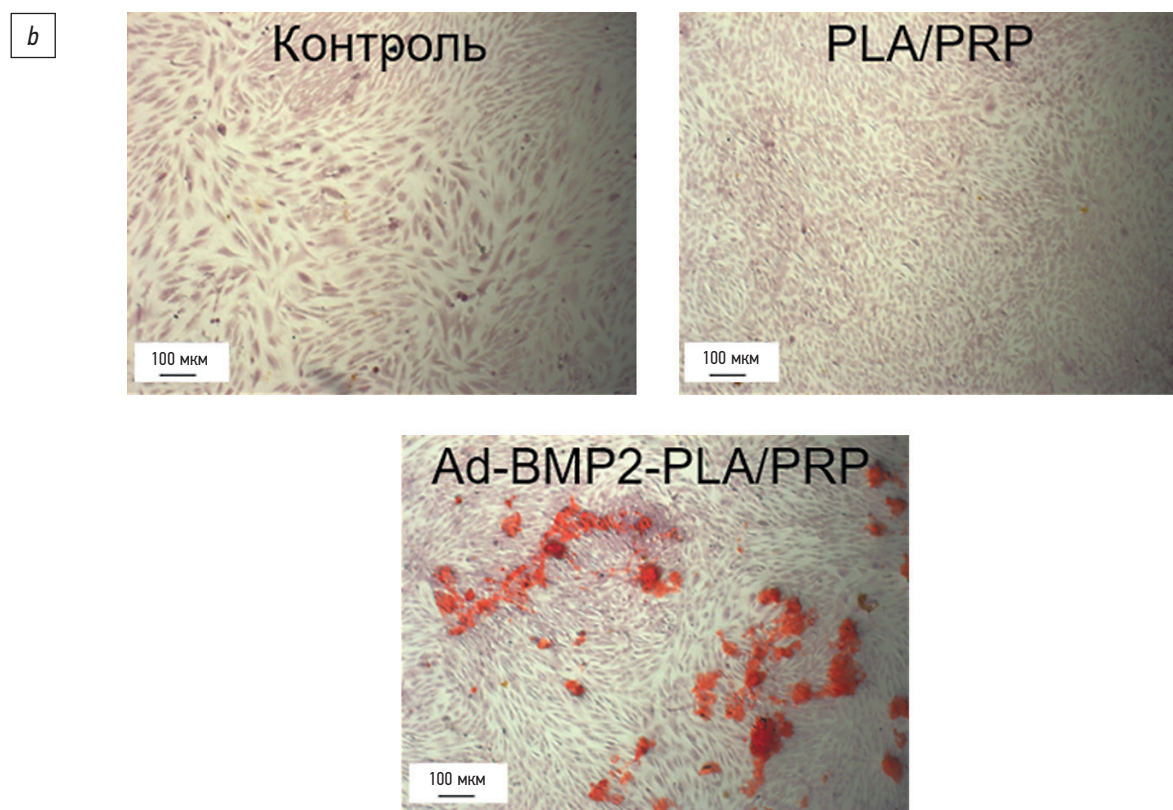


Рис. 8. Остеогенная дифференцировка мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани (ММСЖ ЖТ) после инкубации с матриксами PLA/PRP-Ad-BMP2 на 14-е сутки: *а* — относительный уровень экспрессии генов маркёров остеогенной дифференцировки (*Bglap*, *Spp1* и *Alpl*) и активность щелочной фосфатазы *Alpl* после 14 сут инкубации ММСЖ ЖТ с матриксами, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени; * $p < 0,05$ (по сравнению с PLA/PRP); *б* — очаги минерализованного внеклеточного матрикса в культурах ММСЖ ЖТ, окрашивание ализариновым красным, $10\times$. PLA — полимолочная кислота (polylactic acid), PRP — обогащённая тромбоцитами плазма (platelet-rich plasma). **Fig. 8.** Osteogenic differentiation of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells (AD-MSCs) after incubation with PLA/PRP-Ad-BMP2 matrices for 14 days: *a*, relative expression levels of osteogenic differentiation marker genes (*Bglap*, *Spp1*, and *Alpl*) and alkaline phosphatase (*Alpl*) activity after 14 days of AD-MSC incubation with matrices, real-time polymerase chain reaction; * $p < 0.05$ compared with PLA/PRP; *b*, areas of mineralized extracellular matrix in AD-MSC cultures, Alizarin Red staining, $10\times$. PLA, polylactic acid; PRP, platelet-rich plasma.

**Рис. 8.** Окончание.**Fig. 8.** The End.

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате работы получены матриксы PLA/PRP-Ad-BMP2, которые могут являться перспективными остеопластическими материалами в генной терапии костной ткани для заживления дефектов.

Несмотря на то, что использование аденовирусных векторов вызывает опасения в связи с возможной реакцией со стороны иммунной системы, эффективность переноса генетического материала с помощью вирусных конструкций превышает во много раз эффективность невирусных методов доставки, что даёт возможность создавать ГАМ с меньшей концентрацией векторов для достижения терапевтического эффекта [33, 34]. Кроме того, ДНК аденовирусов не встраивается в геном клетки-хозяина, а находится в ядре в виде эписомы, что ограничивает по времени экспрессию гена остеогенных белков, тем самым позволяя снизить возможные нежелательные побочные эффекты, так как чрезмерный синтез остеогенных факторов может приводить к избыточному росту кости за пределами повреждения [35, 36].

Использование микрочастиц PLA и PRP позволило сформировать биосовместимые матриксы, которые импрегнировали аденовирусными конструкциями с геном *BMP2*. Микрочастицы из PLA играли роль депо для векторов, а гидрогель, полученный из PRP, обеспечивал удержание микрочастиц и пролонгированное высвобождение генетических конструкций за счёт формирования плотного

сгустка. В ранее опубликованном исследовании показано, что выход векторов из матриксов на основе нановолокон PLGA (поли(D,L-лактид-со-гликолида) составлял 50% за первый час [37], а в полученных в данной работе ГАМ PLA/PRP-Ad-BMP2 способствовали постепенному высвобождению генетических конструкций в течении 15 сут, что может в дальнейшем (при имплантации матрикса в область костного дефекта) обеспечить пролонгированное высвобождение векторов на протяжении нескольких недель. Скорость выхода векторов является важным показателем, поскольку для достижения эффективной регенерации костной ткани синтез BMP2 в результате трансдукции должен начаться после окончания ранней стадии воспаления в месте имплантации, так как воздействие на протекание данной фазы может нарушить формирование кости и повысить риск осложнений [38, 39]. Кроме того, благодаря применению биоматериалов может осуществляться экранирование иммуногенных эпитопов аденовирусных векторов от клеток врождённого иммунитета, что помогает снизить продукцию провоспалительных цитокинов и повысить эффективность использования ГАМ [40].

Разработанные в настоящей работе ГАМ показали себя как биосовместимые материалы, в отличие от матриксов на основе PLGA, которые вызвали воспалительную реакцию *in vivo* [37]. Они не оказывали цитотоксического действия, а использование PRP способствовало повышению числа жизнеспособных клеток, что может быть вызвано стимуляцией пролиферации клеток ростовыми факторами

[41]. В дополнение можно утверждать, что в отличие от матриксов на основе биоактивного стекла [42] доказано наличие остеоиндуктивных свойств разработанных матриксов *in vitro*. PLA/PRP-Ad-BMP2 способствовали увеличению экспрессии маркеров остеогенной дифференцировки в ММСК ЖТ, а также минерализации внеклеточного матрикса.

Таким образом, можно сделать вывод, что ГАМ на основе микрочастиц PLA и PRP, импрегнированные Ad-BMP2, обладают биосовместимостью и показывают остеогенный потенциал в экспериментах *in vitro*, что позволяет предположить перспективы их применения в клинике после проведения исследований на моделях *in vivo*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе были разработаны ГАМ на основе микрочастиц PLA и PRP, импрегнированных аденовирусными конструкциями с геном *BMP2*. Данные ГАМ являются биосовместимыми, что продемонстрировано в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Микрочастицы PLA с добавлением гидрогеля PRP способствуют пролонгированному высвобождению аденовирусных конструкций и постепенной трансдукции ММСК ЖТ. Кроме того, ГАМ имеют остеоиндуктивные свойства и стимулируют *in vitro* остеогенную дифференцировку ММСК ЖТ. Таким образом, полученные остеопластические материалы PLA/PRP-Ad-BMP2 являются перспективными для регенерации костной ткани за счёт целенаправленной доставки генов-остеоиндукторов и стимуляции остеогенеза.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. И.А. Недорубова, Т.Б. Бухарова — концептуализация; В.П. Басина, В.О. Черномырдина, А.Ю. Меглей, Ю.Д. Загоскин, А.В. Миронов — осуществление научно-исследовательского процесса, включая выполнение экспериментов и сбор данных; В.П. Басина, И.А. Недорубова — написание текста; Т.Б. Бухарова, Т.Е. Григорьев — редактирование статьи; О.В. Махнач, Д.В. Гольдштейн, Т.Б. Бухарова — административное управление планированием и проведением исследования. Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты работы, гарантируя надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой её части.

Благодарности. Неприменимо.

Этическая экспертиза. Проведение исследования и использование лабораторных животных одобрено локальным этическим комитетом Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова (№ PRC-079 от 6 апреля 2021 г.).

Согласие на публикацию. Неприменимо.

Источники финансирования. Исследование выполнено в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова» в части биологических исследований и государственного задания Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» в части создания полилактидных микрочастиц и проведения сканирующей электронной микроскопии.

Раскрытие интересов. Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Оригинальность. При создании настоящей работы авторы не использовали ранее опубликованные сведения (текст, иллюстрации, данные).

Доступ к данным. Все данные, полученные в настоящем исследовании, доступны в статье.

Генеративный искусственный интеллект. При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовались.

Рассмотрение и рецензирование. Настоящая работа подана в журнал в инициативном порядке и рассмотрена по обычной процедуре. В рецензировании участвовали один внешний рецензент, два члена редакционной коллегии и научный редактор издания.

ADDITIONAL INFORMATION

Author contributions: I.A. Nedorubova, T.B. Bukharova: conceptualization; V.P. Basina, V.O. Chernomyrdina, A.Yu. Meglei, Yu.D. Zagoskin, A.V. Mironov: investigation, data curation; V.P. Basina, I.A. Nedorubova: writing—original draft; T.B. Bukharova, T.E. Grigoriev: writing—review & editing; O.V. Makhnach, D.V. Goldstein, T.B. Bukharova: project administration, investigation. All the authors approved the version of the manuscript to be published and agreed to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Acknowledgments: Not applicable.

Ethics approval: The study and the use of laboratory animals were approved by the Local Ethics Committee of First Sechenov Moscow State Medical University (Minutes No. PRC-079, dated April 6, 2021).

Consent for publication: Not applicable.

Funding sources: The study was carried out as part of the state assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation for the Research Center for Medical Genetics (biological research) and the state assignment of the National Research Center Kurchatov Institute (production of polylactide microparticles and scanning electron microscopy).

Disclosure of interests: The authors have no relationships, activities, or interests for the last three years related to for-profit or not-for-profit third parties whose interests may be affected by the content of the article.

Statement of originality: No previously obtained or published material (text, images, or data) was used in this study or article.

Data availability statement: All data obtained in this study are available in this article.

Generative AI: No generative artificial intelligence technologies were used to prepare this article.

Provenance and peer review: This paper was submitted unsolicited and reviewed following the standard procedure. The peer review process involved one external reviewers, two members of the Editorial Board, and the in-house scientific editor.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Xue N, Ding X, Huang R, et al. Bone tissue engineering in the treatment of bone defects. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022;15(7):879. doi: 10.3390/ph15070879 EDN: XSCCJQ
2. Vantucci CE, Krishan L, Cheng A, et al. BMP-2 delivery strategy modulates local bone regeneration and systemic immune responses

to complex extremity trauma. *Biomater Sci*. 2021;9(5):1668–1682. doi: 10.1039/d0bm01728k EDN: PYEJBW

3. Ball JR, Shelby T, Hernandez F, et al. Delivery of growth factors to enhance bone repair. *Bioengineering (Basel)*. 2023;10(11):1252. doi: 10.3390/bioengineering10111252 EDN: FOWHOY

4. D'Mello S, Atluri K, Geary SM, et al. Bone regeneration using gene-activated matrices. *AAPS J.* 2017;19(1):43–53. doi: 10.1208/s12248-016-9982-2 EDN: PRGLNV
5. Idumah CI. Progress in polymer nanocomposites for bone regeneration and engineering. *Polymers and Polymer Composites.* 2020. doi: 10.1177/0967391120913658 EDN: FPVSUQ
6. Grémare A, Guduric V, Bareille R, et al. Characterization of printed PLA scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A.* 2018;106(4):887–894. doi: 10.1002/jbm.a.36289 EDN: YEAHJH
7. Singhvi MS, Jinjarde SS, Gokhale DV. Polylactic acid: synthesis and biomedical applications. *J Appl Microbiol.* 2019;127(6):1612–1626. doi: 10.1111/jam.14290
8. Zohoor S, Abolfathi N, Solati-Hashjin M. Accelerated degradation mechanism and mechanical behavior of 3D-printed PLA scaffolds for bone regeneration. *Iran Polym J.* 2023;32(10):1209–1227. doi: 10.1007/s13726-023-01191-8 EDN: UZWXDE
9. Li X, Jin Q, Xu H, et al. Effect of polylactic acid membrane on guided bone regeneration in anterior maxillary implantation. *Med Sci Monit.* 2023;29:e938566. doi: 10.12659/MSM.938566 EDN: IOBMEQ
10. Nedorubova IA, Bukharova TB, Mokrousova VO, et al. Comparative efficiency of gene-activated matrices based on chitosan hydrogel and PRP impregnated with BMP2 polyplexes for bone regeneration. *Int J Mol Sci.* 2022;23(23):14720. doi: 10.3390/ijms232314720 EDN: CHAIHO
11. Vasilyev AV, Kuznetsova VS, Bukharova TB, et al. Osteoinductive moldable and curable bone substitutes based on collagen, BMP-2 and highly porous polylactide granules, or a mix of HAP/ β -TCP. *Polymers (Basel).* 2021;13(2):3974. doi: 10.3390/polym13223974 EDN: RJJCJW
12. Bukharova TB, Nedorubova IA, Mokrousova VO, 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 EDN: MOPMZE
13. Cheng CH, Chen YW, Kai-Xing Lee A, et al. Development of mussel-inspired 3D-printed poly (lactic acid) scaffold grafted with bone morphogenetic protein-2 for stimulating osteogenesis. *J Mater Sci Mater Med.* 2019;30(7):78. doi: 10.1007/s10856-019-6279-x EDN: SARLWS
14. Buharova TB, Volkov AV, Antonov EN, et al. Tissue-engineered construction made of adipose derived multipotent mesenchymal stromal cells, polylactide scaffolds and platelet gel. *Kletsochnaja transplantologija i tkanevaja inzhenerija.* 2013;8(4):61–68. EDN: RYFPSP
15. Zhang N, Wu YP, Qian SJ, et al. Research progress in the mechanism of effect of PRP in bone deficiency healing. *ScientificWorldJournal.* 2013;2013:134582. doi: 10.1155/2013/134582
16. Park EJ, Kim ES, Weber HP, et al. Improved bone healing by angiogenic factor-enriched platelet-rich plasma and its synergistic enhancement by bone morphogenetic protein-2. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2008;23(5):818–826.
17. Meglei AY, Nedorubova IA, Basina VP, et al. Collagen-platelet-rich plasma mixed hydrogels as a pBMP2 delivery system for bone defect regeneration. *Biomedicines.* 2024;12(11):2461. doi: 10.3390/biomedicines12112461 EDN: BJUCGX
18. Meglei AY, Nedorubova IA, Mokrousova VO, et al. Evaluation of the properties of osteogenic gene-activated matrices based on hydrogels impregnated with polyplexes with the BMP2 gene. *Genes & cells.* 2022;17(4):133–141. doi: 10.23868/gc375315 EDN: IJQPBH
19. Salazar VS, Gamer LW, Rosen V. BMP signalling in skeletal development, disease and repair. *Nat Rev Endocrinol.* 2016;12(4):203–221. doi: 10.1038/nrendo.2016.12
20. Khan SN, Bostrom MP, Lane JM. Bone growth factors. *Orthop Clin North Am.* 2000;31(3):375–388. doi: 10.1016/s0030-5898(05)70157-7
21. Seeherman HJ, Li XJ, Smith E, Wozney JM. rhBMP-2/calcium phosphate matrix induces bone formation while limiting transient bone resorption in a nonhuman primate core defect model. *J Bone Joint Surg Am.* 2012;94(19):1765–1776. doi: 10.2106/JBJS.K.00523
22. Hernández A, Sánchez E, Soriano I, et al. Material-related effects of BMP-2 delivery systems on bone regeneration. *Acta Biomater.* 2012;8(2):781–791. doi: 10.1016/j.actbio.2011.10.008
23. Chung YI, Ahn KM, Jeon SH, et al. Enhanced bone regeneration with BMP-2 loaded functional nanoparticle-hydrogel complex. *J Control Release.* 2007;121(1–2):91–99. doi: 10.1016/j.jconrel.2007.05.029 EDN: KIRBFN
24. Chen B, Lin H, Wang J, et al. Homogeneous osteogenesis and bone regeneration by demineralized bone matrix loading with collagen-targeting bone morphogenetic protein-2. *Biomaterials.* 2007;28(6):1027–1035. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.10.013 EDN: KIFYFR
25. Seo JI, Lim JH, Jo WM, et al. Effects of rhBMP-2 with various carriers on maxillofacial bone regeneration through computed tomography evaluation. *Maxillofac Plast Reconstr Surg.* 2023;45(1):40. doi: 10.1186/s40902-023-00405-6 EDN: GWLCFD
26. James AW, LaChaud G, Shen J, et al. A review of the clinical side effects of bone morphogenetic protein-2. *Tissue Eng Part B Rev.* 2016;22(4):284–297. doi: 10.1089/ten.TEB.2015.0357
27. Bez M, Pelled G, Gazit D. BMP gene delivery for skeletal tissue regeneration. *Bone.* 2020;137:115449. doi: 10.1016/j.bone.2020.115449 EDN: KHVXVS
28. Syyam A, Nawaz A, Ijaz A, et al. Adenovirus vector system: construction, history and therapeutic applications. *Biotechniques.* 2022;73(6):297–305. doi: 10.2144/btn-2022-0051 EDN: ISKEQF
29. Bukharova TB, Arutyunyan IV, Shustrov SA, et al. Tissue engineering construct on the basis of multipotent stromal adipose tissue cells and Osteomatrix for regeneration of the bone tissue. *Bull Exp Biol Med.* 2011;152(1):153–158. doi: 10.1007/s10517-011-1476-8 EDN: RHBVWV
30. Vasilyev AV, Kuznetsova VS, Bukharova TB, et al. Osteoinductive potential of highly porous polylactide granules and Bio-Oss impregnated with low doses of BMP-2. *IOP Conf Ser: Earth Environ.* 2020;421(5):052035. doi: 10.1088/1755-1315/421/5/052035 EDN: JFZKWL
31. Bukharova TB, Logovskaya LV, Volkov AV, et al. Adenoviral transduction of multipotent mesenchymal stromal cells from human adipose tissue with bone morphogenetic protein BMP-2 gene. *Bull Exp Biol Med.* 2013;156(1):122–126. doi: 10.1007/s10517-013-2294-y EDN: QPLCTT
32. Köllmer M, Buhrman JS, Zhang Y, Gemeinhart RA. Markers are shared between adipogenic and osteogenic differentiated mesenchymal stem cells. *J Dev Biol Tissue Eng.* 2013;5(2):18–25. doi: 10.5897/JDBTE2013.0065
33. Kamimura K, Suda T, Zhang G, Liu D. Advances in gene delivery systems. *Pharmaceut Med.* 2011;25(5):293–306. doi: 10.2165/11594020-000000000-00000
34. Jooss K, Chirmule N. Immunity to adenovirus and adeno-associated viral vectors: implications for gene therapy. *Gene Ther.* 2003;10(11):955–963. doi: 10.1038/sj.gt.3302037
35. Hoebe RC, Uil TG. Adenovirus DNA replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(3):a013003. doi: 10.1101/cshperspect.a013003
36. Phillips JE, Gersbach CA, García AJ. Virus-based gene therapy strategies for bone regeneration. *Biomaterials.* 2007;28(2):211–229. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.07.032 EDN: MCMEXB
37. Zhu Y, Li D, Zhang K, et al. Novel synthesized nanofibrous scaffold efficiently delivered hBMP-2 encoded in adenoviral vector to promote bone regeneration. *J Biomed Nanotechnol.* 2017;13(4):437–446. doi: 10.1166/jbn.2017.2361
38. Zhao Z, Zhao Q, Gu B, et al. Minimally invasive implantation and decreased inflammation reduce osteoinduction of biomaterial. *Theranostics.* 2020;10(8):3533–3545. doi: 10.7150/thno.39507 EDN: UOBQLD
39. Yang D, Xiao J, Wang B, et al. The immune reaction and degradation fate of scaffold in cartilage/bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019;104:109927. doi: 10.1016/j.msec.2019.109927 EDN: SSCZSV
40. Wang Y, Bruggeman KF, Franks S, et al. Is viral vector gene delivery more effective using biomaterials? *Adv Healthc Mater.* 2021;10(1):e2001238. doi: 10.1002/adhm.202001238 EDN: DPMJUN
41. Baghersad S, Bolandi B, Imani R, et al. An overview of PRP-delivering scaffolds for bone and cartilage tissue engineering. *J Bionic Eng.* 2024;21:674–693; doi: 10.1007/s42235-023-00471-6 EDN: QXTJLM
42. Välimäki VV, Yrjans JJ, Vuorio E, Aro HT. Combined effect of BMP-2 gene transfer and bioactive glass microspheres on enhancement of new bone formation. *J Biomed Mater Res A.* 2005;75(3):501–509. doi: 10.1002/jbm.a.30236

ОБ АВТОРАХ

*** Басина Виктория Павловна;**

адрес: Россия, 115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1;
ORCID: 0009-0006-0127-6502;
eLibrary SPIN: 7315-1862;
e-mail: vika.basina12@gmail.com

Недорунова Ирина Алексеевна, канд. биол. наук;

ORCID: 0000-0001-8472-7116;
eLibrary SPIN: 1548-6998;
e-mail: nedorubova.ia@gmail.com

Черномырдина Виктория Олеговна;

ORCID: 0000-0003-3828-8495;
eLibrary SPIN: 6988-4309;
e-mail: victoria-mok@yandex.ru

Меглей Анастасия Юрьевна;

ORCID: 0000-0003-2970-7176;
eLibrary SPIN: 5569-9070;
e-mail: an.megley95@yandex.ru

Махнач Олег Владимирович, канд. хим. наук;

ORCID: 0000-0002-2707-8313;
eLibrary SPIN: 1453-9189;
e-mail: buben6@yandex.ru

Миронов Антон Владимирович, канд. хим. наук;

ORCID: 0000-0002-8173-0253;
eLibrary SPIN: 7185-9165;
e-mail: scftlab@gmail.com

Григорьев Тимофей Евгеньевич, канд. физ.-мат. наук;

ORCID: 0000-0001-8197-0188;
eLibrary SPIN: 6159-4220;
e-mail: timgrigo@yandex.ru

Загоскин Юрий Дмитриевич, канд. хим. наук;

ORCID: 0000-0002-5825-8333;
eLibrary SPIN: 8293-5020;
e-mail: zagos@inbox.ru

Гольдштейн Дмитрий Вадимович, д-р биол. наук, профессор;

ORCID: 0000-0003-2438-1605;
eLibrary SPIN: 7714-9099;
e-mail: dvgoldshtein@gmail.com

Бухарова Татьяна Борисовна, канд. биол. наук;

ORCID: 0000-0003-0481-256X;
eLibrary SPIN: 2092-5580;
e-mail: bukharova-rmt@yandex.ru

AUTHORS' INFO

*** Viktoriia P. Basina;**

address: 1 Moskvorechye st, Moscow, Russia, 115522;
ORCID: 0009-0006-0127-6502;
eLibrary SPIN: 7315-1862;
e-mail: vika.basina12@gmail.com

Irina A. Nedorubova, Cand. Sci. (Biology);

ORCID: 0000-0001-8472-7116;
eLibrary SPIN: 1548-6998;
e-mail: nedorubova.ia@gmail.com

Victoria O. Chernomyrdina;

ORCID: 0000-0003-3828-8495;
eLibrary SPIN: 6988-4309;
e-mail: victoria-mok@yandex.ru

Anastasiia Yu. Meglei;

ORCID: 0000-0003-2970-7176;
eLibrary SPIN: 5569-9070;
e-mail: an.megley95@yandex.ru

Oleg V. Makhnach, Cand. Sci. (Chemistry);

ORCID: 0000-0002-2707-8313;
eLibrary SPIN: 1453-9189;
e-mail: buben6@yandex.ru

Anton V. Mironov, Cand. Sci. (Chemistry);

ORCID: 0000-0002-8173-0253;
eLibrary SPIN: 7185-9165;
e-mail: scftlab@gmail.com

Timofei E. Grigoriev, Cand. Sci. (Physics and Mathematics);

ORCID: 0000-0001-8197-0188;
eLibrary SPIN: 6159-4220;
e-mail: timgrigo@yandex.ru

Yuriy D. Zagoskin, Cand. Sci. (Chemistry);

ORCID: 0000-0002-5825-8333;
eLibrary SPIN: 8293-5020;
e-mail: zagos@inbox.ru

Dmitry V. Goldshtein, Dr. Sci. (Biology), Professor;

ORCID: 0000-0003-2438-1605;
eLibrary SPIN: 7714-9099;
e-mail: dvgoldshtein@gmail.com

Tatiana B. Bukharova, Cand. Sci. (Biology);

ORCID: 0000-0003-0481-256X;
eLibrary SPIN: 2092-5580;
e-mail: bukharova-rmt@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author