

## РЕГЕНЕРАЦИОННЫЙ ГИСТОГЕНЕЗ В ОБЛАСТИ ДЕФЕКТА СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ ПРИ МЕСТНОМ ВВЕДЕНИИ ГЕН-АКТИВИРОВАННОГО ГИДРОГЕЛЯ НА ОСНОВЕ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Р.В. Деев<sup>1-3</sup>, И.Я. Бозо<sup>3-5</sup>, М.О. Мавликеев<sup>6</sup>, А.И. Билялов<sup>6</sup>, А.А. Титова<sup>6</sup>, Ф.А. Индейкин<sup>7</sup>, А.Р. Бабкова<sup>6</sup>, Е.В. Пресняков<sup>8</sup>, М.И. Ясиновский<sup>4</sup>, В.О. Трофимов<sup>3,5</sup>, О.В. Баранов<sup>9</sup>, И.А. Одинцова<sup>10</sup>, В.С. Комлев<sup>9</sup>, А.А. Исаев<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> ПАО «Институт Стволовых Клеток Человека», Москва, Россия

<sup>3</sup> ООО «Гистографт», Москва, Россия

<sup>4</sup> Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия

<sup>5</sup> Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия

<sup>6</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

<sup>7</sup> Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

<sup>8</sup> Рязанский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова, Рязань, Россия

<sup>9</sup> Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова, Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>10</sup> Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

Поступила: 02.03.2020

Принята к печати: 05.05.2020

Опубликована on-line: 13.05.2020

## REGENERATIVE HISTOGENESIS IN A SKELETAL MUSCLE DEFECT WITH LOCAL IMPLANTATION OF GENE-ACTIVATED HYDROGEL BASED ON HYALURONIC ACID IN THE EXPERIMENT

R.V. Deev<sup>1-3</sup>, I.Y. Bozo<sup>3-5</sup>, M.O. Mavlikeev<sup>6</sup>, A.I. Bilyalov<sup>6</sup>, A.A. Titova<sup>6</sup>, F.A. Indeykin<sup>7</sup>, A.R. Babkova<sup>6</sup>, E.V. Presnyakov<sup>8</sup>, M.I. Yasinovsky<sup>4</sup>, V.O. Trofimov<sup>5</sup>, O.V. Baranov<sup>9</sup>, I.A. Odintsova<sup>10</sup>, V.S. Komlev<sup>9</sup>, A.A. Isaev<sup>2</sup>

<sup>1</sup> I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, Saint Petersburg, Russia

<sup>2</sup> Institute of Human Stem Cells, PJSC, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Histograft, LLC, Moscow, Russia

<sup>4</sup> Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia

<sup>5</sup> A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, FMBA of Russia, Moscow, Russia

<sup>6</sup> Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

<sup>7</sup> Kazan Federal Medical University, Kazan, Russia

<sup>8</sup> I.P. Pavlov Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia

<sup>9</sup> A.A. Baikov Institute of Metallurgy and Materials Science, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

<sup>10</sup> S.M. Kirov Military Medical Academy, Saint-Petersburg, Russia

e-mail: romdey@gmail.com

Проблема оптимизации репаративной регенерации поперечно-полосатой скелетной мышечной ткани представляет большой фундаментальный интерес и является актуальной для клинической практики. При объемных повреждениях скелетных мышц заживление происходит путем формирования соединительнотканного рубца (плотная соединительная ткань). В связи с этим разрабатываются способы индукции репаративного миогенеза. Один из перспективных подходов в этой области связан с применением ген-активированных материалов, в частности, в виде гидрогелей.

Мы разработали ген-активированный гидрогель на основе гиалуроновой кислоты и плазмидной ДНК с геном сосудистого эндотелиального фактора роста А (VEGF-A). В подкожном тесте у мышей была показана биосовместимость изделия. При использовании маркерной плазмидной ДНК, несущей ген люциферазы, была подтверждена пролонгированная доставка генных конструкций в клетки *in vivo* с пиком экспрессии трансгена на 7 сут. после введения, в отличие от введения той же плазмидной ДНК в водном растворе с максимальным уровнем доставки на 1 сут. После имплантации в объемный дефект передней большеберцовой мышцы у крыс ген-активированный гидрогель обеспечивал активный ангиогенез на сроке 2 нед. после повреждения и формирование молодых MYH7B<sup>+</sup>-мышечных волокон в центральной зоне дефекта в количестве 50,0±16,1 и 21,8±10,5 в поле зрения на сроках 2 и 4 нед., соответственно, тогда как гидрогель без плазмидной ДНК миогенным эффектом не обладал.

Таким образом, ген-активированный гидрогель на основе гиалуроновой кислоты за счет плазмидной ДНК с геном VEGFA индуцировал ангиогенез и репаративный рабдомиогенез в модели объемного повреждения скелетной мышцы, что может быть использовано для дальнейшей разработки изделий, эффективных в лечении пациентов с патологией мышц.

**Ключевые слова:** регенерационный миогистогенез, ген-активированный гидрогель, сосудистый эндотелиальный фактор роста, плазмидная ДНК, гиалуроновая кислота, объемный дефект мышцы.

Optimization of the reparative regeneration of striated skeletal muscle tissue is actual for clinical practice. Volumetric muscle loss usually heals through the fibrous scar formation. Herein, there are numerous of methods under developed focused on reparative myogenesis induction. One of the promising approaches in this area is formed by gene-activated materials, particularly, in the hydrogel form.

We developed a gene-activated hydrogel based on hyaluronic acid and plasmid DNA with the gene of vascular endothelial growth factor A (VEGF-A). Firstly, we showed a biocompatibility of the product in the subcutaneous test in mice. Using marker plasmid DNA carrying the luciferase gene, prolonged delivery of gene constructs to cells *in vivo* with a peak in transgene expression at day 7 was confirmed, while the same plasmid DNA in an aqueous solution provided a maximum level of delivery at day 1. Being implanted into a volumetric defect of the anterior tibial muscle in rats the gene-activated hydrogel activated angiogenesis in 2 weeks after surgery and induced MYH7B<sup>+</sup>-muscle fibers formation in the central zone of the defect at average number 50,0±16,1 and 21,8±10,5 in 2 and 4 weeks, respectively, whereas a hydrogel without plasmid DNA did not have any myogenic effects.

Thus, plasmid DNA with VEGFA in the sodium alginate-based hydrogel induced angiogenesis in the volumetric muscle loss model and stimulated reparative myogenesis that could be used for further development of products effective for treatment of patients with muscle pathology.

**Keywords:** regenerative myohistogenesis, gene-activated hydrogel, vascular endothelial growth factor, plasmid DNA, hyaluronic acid, volumetric muscle loss.

## Введение

Поперечно-полосатая скелетная мышечная ткань обладает способностью к гистотипической репаративной регенерации в форме образования новых структурно-функциональных единиц — мышечных волокон. При повреждении мышцы запускается стадийный репаративный процесс — регенерационный миогенез, включающий активацию клеток местного камбиального резерва — миосателлитоцитов, их миграцию из состава мышечных волокон, пролиферацию, дифференцировку и последующее слияние с формированием симпластов. Эти процессы происходят под влиянием факторов микроокружения, продуцируемых элементами клеточных ниш миосателлитоцитов, и завершаются фазой ремоделирования — адаптационной перестройки вновь образованной ткани [1]. Оценка вовлечения в гистогенез миосателлитоцитов и анализ их последующей дифференцировки является центральным вопросом регенерации мышечной ткани в ходе раневого процесса [2]. Маркером большей части клеток дифферона миосателлитов является фактор транскрипции с парным доменом Pax7, который вовлечен в регуляцию пролиферации и самообновление мышечных клеток-спутников [3]. В физиологических условиях миосателлитоциты обеспечивают увеличение размеров уже сформированных мышечных волокон, количество которых в постнатальном периоде онтогенеза считается неизменным [4]. На клеточном уровне активация миосателлитоцитов проявляется увеличением объема цитоплазмы, усложнением ультраструктуры клеток: в ядре преобладает хроматин, увеличивается количество рибосом и полисом [1]. В первые 3 ч. после повреждения активация миосателлитоцитов сопровождается повышением экспрессии гена миогенетического фактора 5 (*Myf5*) [5]. Затем детектируются белок детерминации миобластов 1 (*MyoD*) и миогенин (*MyoG*), причем последний — как поздний фактор их дифференцировки и прекращения пролиферативной активности [6]. С момента слияния миобластов в миосимпласты повышается экспрессия миогенного регуляторного фактора 4 (*MRF4*) и сократительных белков [7, 8].

Поперечно-полосатая скелетная мышечная ткань является метаболически активной тканью, она характеризуется богатым кровоснабжением с хорошо организованной капиллярной сетью. Установлено, что между 3–4 смежными мышечными волокнами проходят 5–10 капилляров [8]. Описаны регуляторные взаимодействия между клеточными элементами сосудов и мышечных волокон, отличающиеся корреляцией числа капилляров и миосателлитоцитов. Показано, что малодифференцированные клетки скелетной мышечной ткани (клеточный камбий) стимулируют ангиогенез, а эндотелиальные клетки — пролиферацию миобластов [9]. Эти регуляторные влияния опосредованы факторами роста, существенное значение среди которых принадлежит сосудистому эндотелиальному фактору роста (*vascular endothelial growth factor, VEGF*) [10]. Миосателлитоциты экспрессируют рецепторы к VEGF-A, который препятствует их апоптозу, стимулирует пролиферацию [11] и дифференцировку [12]. Кроме того, ангиогенный эффект VEGF-A обеспечивает не только оксигенацию и снабжение тканей в зоне регенерации нутриентами, но и способствует миграции в нее других клеточных элементов раневого процесса — перicyтов и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток [13]. Учитывая многовекторное влияние VEGF-A на регенерационный гистогенез, он рассматривается в качестве одной из точек приложения терапевтических влияний для индукции рабдомиогенеза [11, 14].

Однако среди многообразия подходов, направленных на достижение контролируемого пролонгированного увеличения концентрации VEGF в зоне восстановления целостности скелетной мышцы, все еще нет однозначно эффективных в случае объемного повреждения. Отчасти это обусловлено тем, что, как и при костной пластике [15], для полной гистотипической регенерации в случае дефекта мышцы (объемное повреждение) с биотехнологических позиций требуется не только компенсировать сниженные влияния факторов локальной регуляции и (или) утраченные камбиальные клеточные источники («миоиндукция»), но и воссоздать матрикс-опосредованные условия для реализации процесса («миокондукция»). Одним из перспективных подходов для этого является использование биорезорбируемых гидрогелей, способных временно заполнить трехмерный дефект мышцы, создать условия для формирования мышечных волокон и доставить факторы локальной регуляции миогенеза и (или) камбиальные клетки [16]. Среди наиболее исследованных вариантов гидрогелей, уже нашедших свое применение в регенеративной медицине, активное внимание привлекают варианты на основе гиалуроновой кислоты. Выявлено, что гиалуроновая кислота как один из компонентов межклеточного матрикса поперечно-полосатой скелетной мышечной ткани вовлечена в индукцию пролиферации и миграции малодифференцированных клеток в эмбриогенезе [17]. В ряде работ показано оптимизирующее влияние гидрогелей на основе гиалуроновой кислоты на репаративный рабдомиогенез, в том числе при ее использовании в качестве матрикса-носителя для доставки биологически активных компонентов в зону повреждения мышечной ткани [18–20].

В связи с этим, целью настоящего исследования стала оценка ранних этапов регенерационного миогенеза в дефекте скелетной мышцы при местном введении разработанного нами ген-активированного гидрогеля на основе гиалуроновой кислоты, содержащей плазмидную ДНК с геном *VEGFA*.

## Материал и методы

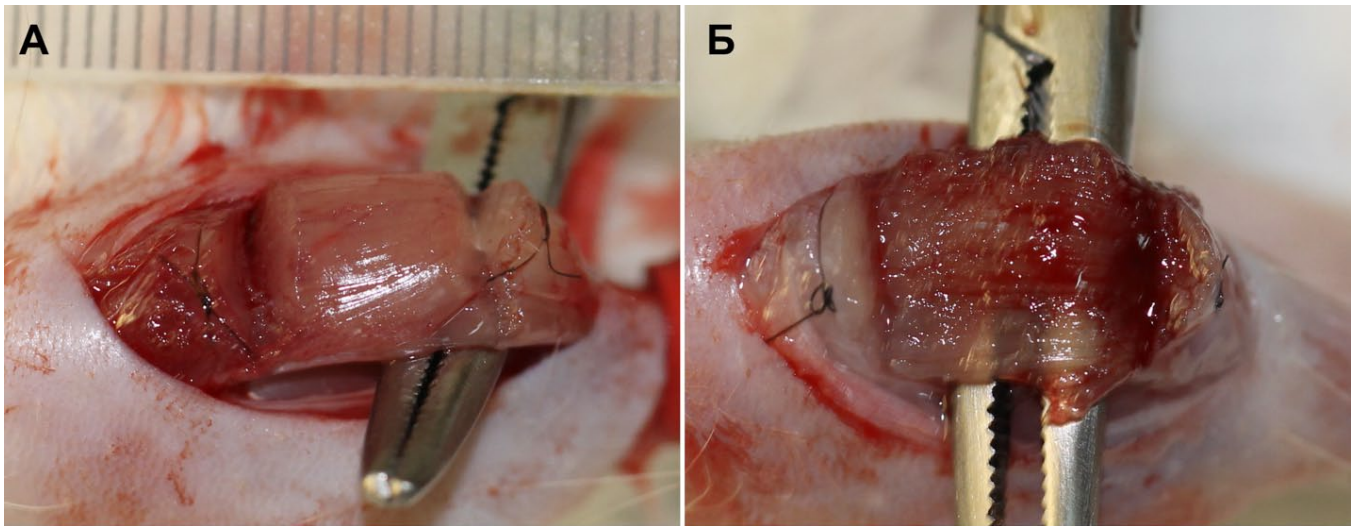
### Дизайн исследования

Исследование состояло из двух этапов. В ходе первого оценивалась биосовместимость, а также эффективность доставки плазмидной ДНК в клетки *in vivo* в подкожном тесте на мышцах с биоломинисцентной оценкой уровня трансфекции, для чего были изготовлены ген-активированные гидрогели из гиалуроновой кислоты, содержащие плазмидную ДНК, несущую либо ген *VEGFA*, либо «маркерный» ген люциферазы светлячка (*Luc*). В качестве дополнительных контролей были использованы гиалуроновая кислота без генных конструкций и водный раствор плазмидной ДНК с *Luc*.

На втором этапе исследовали биологический эффект ген-активированного гидрогеля на основе гиалуроновой кислоты в модели объемного дефекта скелетной мышцы у крысы. Результаты оценивали с использованием гистологических и иммуногистохимических методов через 2 и 4 нед. после операций. Все манипуляции с лабораторными животными осуществляли в соответствии с международными правилами гуманного обращения.

### Изготовление ген-активированных гидрогелей

В качестве генной конструкции для изготовления исследуемого материала применяли сверхскрученную голую плазмидную ДНК, несущую *VEGFA*, — действующее



**Рис. 1.** Экспериментальная модель с объемным дефектом передней большеберцовой мышцы крысы: А — выполнены дистальный и проксимальный разрезы после предварительной разметки прошиванием; Б — фрагмент мышцы резецирован с сохранением задней порции

вещество лекарственного препарата «Неоваскулген» (Институт Стволовых Клеток Человека, Россия) [21]. Разведение лиофилизированного препарата осуществляли согласно инструкции компании-производителя. Маркерную плазмидную ДНК с геном *Luc* предоставил П.И. Макаревич (МГУ им. М.В. Ломоносова).

В качестве гидрогелевого матрикса-носителя было выбрано зарегистрированное и разрешенное для клинической практики на территории России медицинское изделие «Osteril» 20 мг/2 мл (TRB Chemedica AG, Германия), показанное для лечения дегенеративно-дистрофической патологии суставов.

Гидрогель на основе гиалуроновой кислоты и раствор плазмидной ДНК смешивали с получением гидрогеля с концентрацией плазмидной ДНК — 400 мг в 1 мл.

#### Подкожный тест

Эксперимент выполнен на мышах линии Balb/c массой 30 г (n=20). Каждому животному подкожно в предварительно выбрившую лопаточную область вводили 100 мкл исследуемых материалов: 1 — ген-активированный гель с плазмидной ДНК, несущей *Luc* (экспериментальная группа); 2 — ген-активированный гель с плазмидной ДНК, несущей *VEGFA* (контроль 1); 3 — водный раствор плазмидной ДНК с геном *Luc* (контроль 2); 4 — гидрогель на основе гиалуроновой кислоты без плазмидной ДНК (контроль 3).

*Оценка уровня доставки плазмидной ДНК в подкожном тесте.* На сроках 1, 7, 14, 28 сут. животным после предварительной внутримышечной сессии Sol. Zoletili 100 — 10 mg/kg внутривенно вводили D-люциферина натриевую соль (Люмтек, Россия) и через 10 мин. экспозиции помещали в камеру биOLUMИНОметра IVIS Spectrum (PerkinElmer, Inc., USA) с регистрацией люминисцентного сигнала в течение 1 мин.

*Оценка биосовместимости.* На сроках 1, 7 и 14 сут. выводили по 1 животному каждой группы из эксперимента, вырезали область имплантации гидрогелей, фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина в течение 5 дней, после чего изготавливали гистологические препараты по стандартной методике и окрашивали гематоксилином и эозином. На препаратах оценивали структуру введенных материалов, а также признаки патоморфогенетических

процессов — выраженность некроза, воспаления, маркеры регенерационного миогистогенеза.

#### Оценка ген-активированного гидрогеля в модели объемного дефекта скелетной мышцы

##### *Имплантация исследуемых гидрогелей.*

Исследование было выполнено на крысах-самцах линии Wistar массой 250 г (n=18). Животные были разделены на 3 группы: 1 (экспериментальная) — имплантация ген-активированного гидрогеля на основе гиалуроновой кислоты и плазмидной ДНК с *VEGFA*; 2 (контрольная 1) — введение гидрогеля на основе гиалуроновой кислоты без генных конструкций; 3 (контрольная 2) — заживление мышцы без применения исследуемых материалов.

В ходе стандартного оперативного вмешательства каждому животному формировали дефект передней большеберцовой мышцы в средней трети на всю ее ширину длиной 10 мм и шириной 2–3 мм с сохранением фасциального футляра и непрерывности мышцы за счет задней ее порции (рис. 1). Область резекции заполняли исследуемыми материалами в объеме 250 мкл. Фасциальный футляр мышцы и кожу герметично ушивали узловыми швами Monosyn 6/0. Животных выводили из эксперимента передозировкой Sol. Zoletili 100 на сроках 2 и 4 нед. после операции, резецировали голень прооперированной конечности, фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина в течение 24 ч.

*Гистологическое исследование.* Гистологические препараты изготавливали по стандартной методике, окрашивали гематоксилином и эозином, а также проводили иммуногистохимические реакции с антителами к MyoG (кроличьи моноклональные EPR4789, Abcam, Великобритания), тяжелым цепям фетального миозина 7B (MYH7B, кроличьи моноклональные EPR12290, Abcam, Великобритания) и CD31 (кроличьи моноклональные EPR17259, Abcam, Великобритания). Срезы производили через середину мышцы параллельно ходу волокон. Все препараты сканировали в микроскопе Aperio CS2 (Leica, Германия) с получением цифровых изображений. При качественном анализе оценивали структуру имплантированных материалов, характер и интенсивность воспалительной реакции, особенности репаративного процесса. Морфометрический анализ проводили с использованием программы Aperio

ImageScope (Leica, Германия) отдельно в трех зонах: центральная, периферическая (проксимальная и дистальная краевые — т.е. перинекротическая на ранних сроках) и область интактной мышцы. В 10 полях зрения в каждой из зон подсчитывали количество сосудов,  $\text{MyoG}^+$ -клеток, участвующих в регенерации,  $\text{MyH7B}^+$ -мышечных волокон.

### Статистический анализ

Для описания количественных признаков рассчитывали среднее значение, медиану, стандартное отклонение, верхний и нижний квартили. Для определения вида распределения количественных признаков использовали критерий Шапиро-Уилка. Для сравнения групп использовали непараметрические методы (U-критерий Манна-Уитни для межгрупповых сравнений, критерий Вилкоксона — для внутригрупповых). Уровень статистической значимости различий ( $p$ ) принимали за 0,05.

## Результаты

### Доставка плазмидной ДНК в клетки *in vivo*

Люминесцентный сигнал, интенсивность которого соответствует уровню продукции люциферазы, кодируемой *Luc*, определялся только в двух группах — с введением раствора плазмидной ДНК с *Luc* и ген-активированного гидрогеля с этой генной конструкцией. При этом люминесценция детектировалась только в зоне введения материалов.

В контрольной группе пиковый уровень люминесценции выявлялся уже на 1 сут., тогда как в экспериментальной к этому сроку определялся сигнал меньшей интенсивности ( $p=0,042$ ). В дальнейшем в контрольной группе интенсивность сигнала постепенно снижалась, тогда как в экспериментальной достигала пиковых значений к сроку 7 сут. с последующим плавным снижением (рис. 2). При этом при сравнении пиковых значений интенсивности люминесценции статистически значимо больший уровень выявлялся в контрольной группе ( $p=0,017$ ).

### Биосовместимость в подкожном тесте

Через 1 сут. гидрогели на основе гиалуроновой кислоты визуализировались в области введения в жировой ткани между кожей мышцей и глубже лежащими мышцами спины, в виде аморфных масс, умеренно инфильтрированных нейтрофилами и макрофагами. Выше лежащие слои кожи не имели особенностей. К сроку 7 сут. материал не определялся, в зоне его введения была выявлена дифференцирующаяся грануляционная ткань с большим количеством плотноупакованных однонаправленных коллагеновых волокон и миогенных клеточных элементов без воспалительной инфильтрации (рис. 3).

### Влияние ген-активированного гидрогеля на репаративный гистогенез

В области дефекта скелетной мышцы имплантированные материалы выявлены на всех сроках наблюдения в виде аморфных фрагментированных масс, разделенных прослойками из грануляционной ткани. Выраженной воспалительной инфильтрации не наблюдали. Только в случае ген-активированного гидрогеля в центральной зоне дефекта через 2 и 4 нед. после операции обнаружены вновь образованные мышечные волокна, тогда как в контрольных группах признаков миогенеза в этой зоне

не выявлено — единичные мышечные волокна детектировались только в краевых областях.

По данным иммуногистохимического исследования, в капсуле вокруг ген-активированного гидрогеля определялось статистически значимо большее количество сосудов, чем в контрольных группах (рис. 4).

$\text{MyoG}^+$ -клетки выявлены исключительно в группе без имплантации каких-либо материалов в количестве  $7,1 \pm 4,1$  и  $1,3 \pm 1,2$  в поле зрения через 2 и 4 нед., соответственно. Однако только при имплантации ген-активированного гидрогеля в центральной зоне дефекта имеются  $\text{MyH7B}^+$  — мышечные волокна в количестве  $50,0 \pm 16,1$  и  $21,8 \pm 10,5$  на сроках 2 и 4 нед., соответственно (рис. 5).

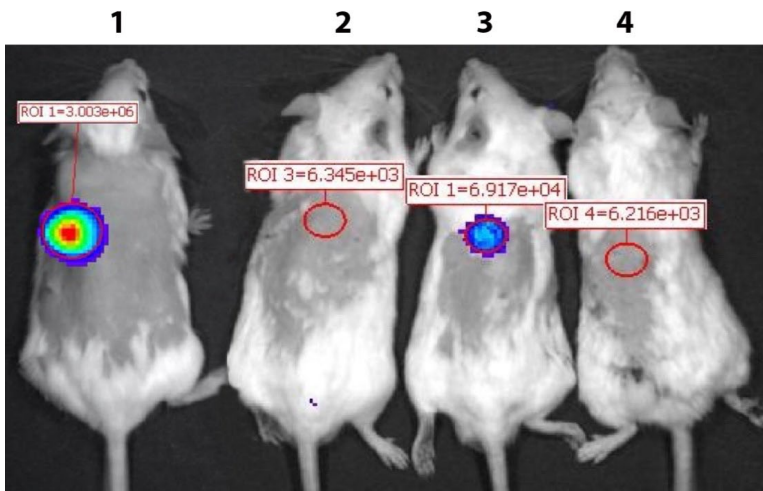
## Обсуждение

Способы индукции репаративного рабдомиогенеза как основного звена регенерационного гистогенеза чрезвычайно востребованы в клинической практике, так как заживление скелетных мышц после объемных повреждений не осуществляется по типу полной гистотипической регенерации. Это, как и в случае с костной тканью, обусловлено недостаточным количеством камбиальных клеточных резервов и сниженным уровнем факторов локальной регуляции регенерации в области объемного дефекта [14].

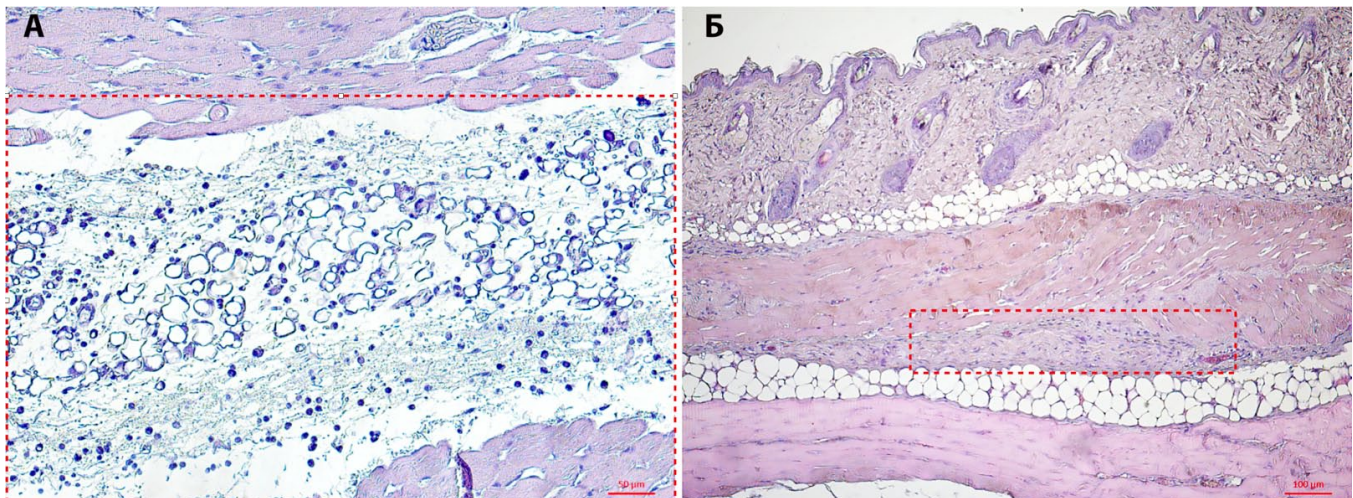
В проведенном исследовании гидрогель на основе гиалуроновой кислоты оказался эффективным матриксом-носителем для генных конструкций, который, как минимум, не препятствовал их поступлению в клетки *in vivo*, а также обеспечивал пролонгированность доставки. Продолжительная экспрессия VEGF-A необходима как для индукции всех стадий ангиогенеза, так и для индуцирующего влияния на клетки камбиального резерва мышечной ткани. Кроме того, гидрогель на основе гиалуроновой кислоты потенциально способен увеличить уровень трансфекции плазмидной ДНК *in vivo* за счет временной протекции нуклеиновых кислот от воздействия эндонуклеаз операционной раны, а также благодаря реализации рецептор-опосредованного взаимодействия с клетками, экспрессирующими CD44 (фибробласты, ММСК, перициты, по некоторым данным, миосателлиты [22]). Последнее используется в разработке наночастиц на основе гиалуроновой кислоты, формирующих комплексы с молекулами плазмидной ДНК и доставляющими их в клетки [23, 24]. Для прикладных разработок и внедрения технологий в практику также важно, что в лиофилизированном виде порошок на основе гиалуроновой кислоты и голой плазмидной ДНК может сохраняться до 12 мес. не теряя положительного эффекта на уровень трансфекции генных конструкций [25].

Гидрогели на основе гиалуроновой кислоты оказались биосовместимы в подкожном тесте и при введении в дефект скелетной мышцы. Этот результат был ожидаем, так как для изготовления ген-активированного изделия были использованы разрешенные для клинического применения компоненты — медицинское изделие «Остенил» и плазмидная ДНК лекарственного препарата «Неоваскулген». Кроме того, известно, что гиалуроновая кислота обладает противовоспалительным эффектом за счет влияния на макрофаги [26].

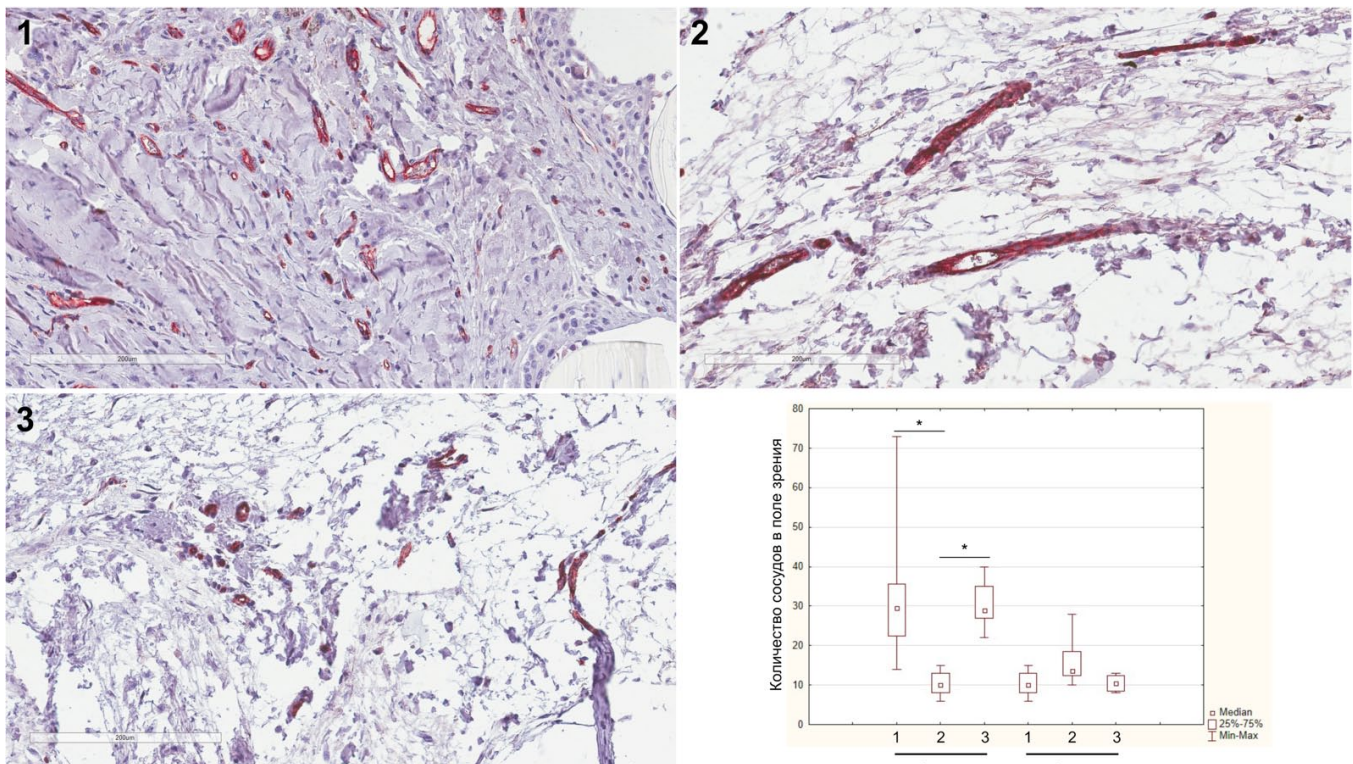
В модели объемного повреждения скелетной мышцы было показано, что плазмидная ДНК с геном *VEGFA* приводила к индукции ангиогенеза в течение 2 нед. после операции, так как определялось статистически значимо большее количество сосудов в центральной зоне дефекта при имплантации ген-активированного гидрогеля по сравнению с материалом без генных



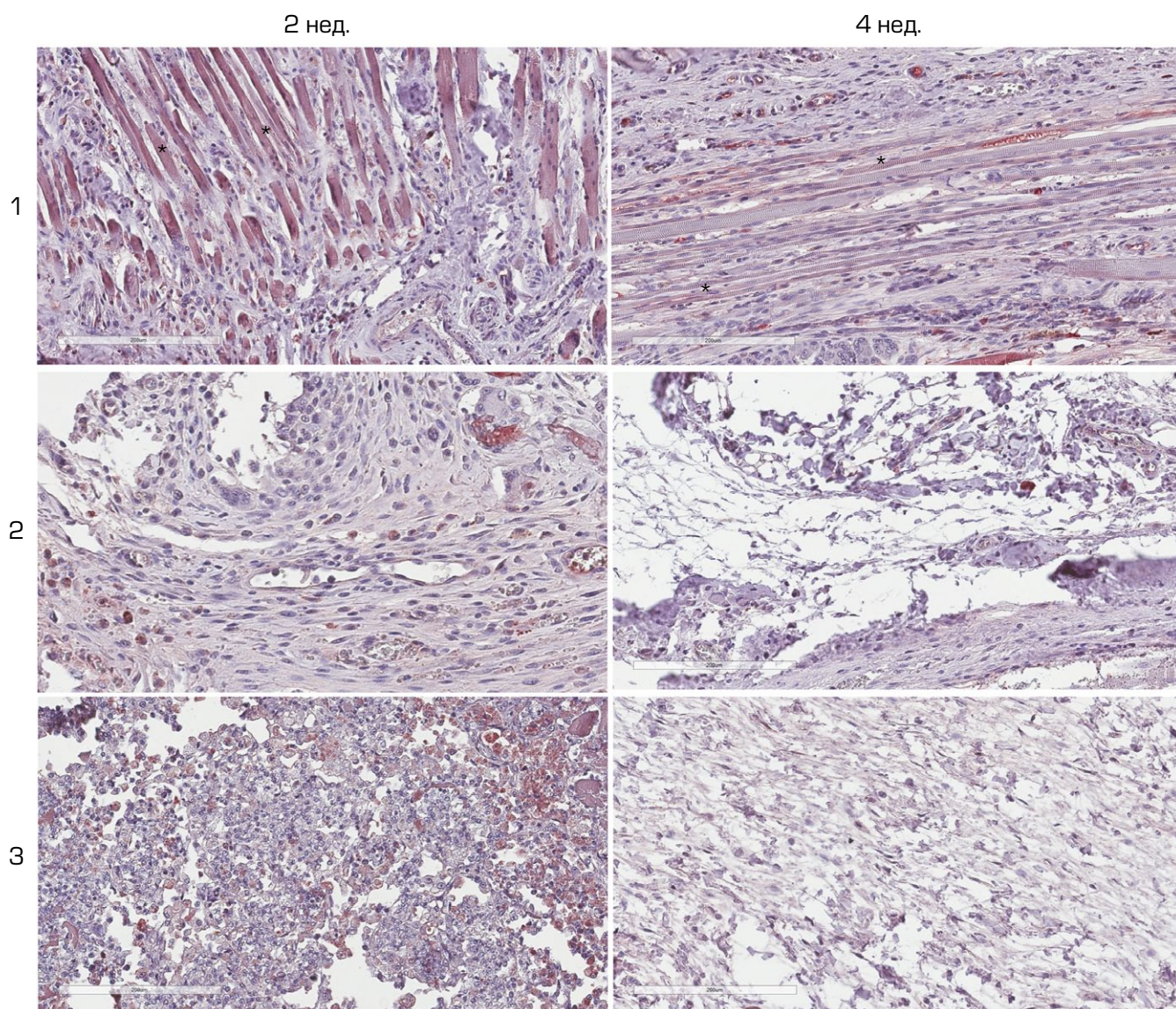
**Рис. 2.** Уровень доставки плазмидной ДНК, 7 сут. после подкожного введения: 1 — ген-активированный гель с плазмидной ДНК, несущей *Luc*; 2 — ген-активированный гель с плазмидной ДНК, несущей *VEGFA*; 3 — водный раствор плазмидной ДНК с геном *Luc*; 4 — гидрогель на основе гиалуроновой кислоты без плазмидной ДНК



**Рис. 3.** Ген-активированный гидрогель, на разных сроках после подкожного введения мышам: А — 1 сут.; Б — 7 сут. Прямоугольниками выделены области введения. Окраска: гематоксилин и эозин



**Рис. 4.** Васкуляризация тканей в области объемного дефекта передней большеберцовой мышцы, 4 нед. после имплантации исследуемых материалов: 1 — ген-активированного гидрогеля на основе гиалуроновой кислоты и плазмидной ДНК с *VEGFA*; 2 — гидрогеля на основе гиалуроновой кислоты без генных конструкций; 3 — заживление мышцы без применения исследуемых материалов. Иммуногистохимическая реакция с антителами к CD31. \* Различия между группами статистически значимы,  $p < 0,05$



**Рис. 5.** МуН7В<sup>+</sup>-мышечные волокна в центральной зоне объёмного дефекта передней большеберцовой мышцы через 2 и 4 недели после имплантации исследуемых материалов: 1 — ген-активированного гидрогеля на основе гиалуроновой кислоты и плазмидной ДНК с *VEGFA*; 2 — гидрогеля на основе гиалуроновой кислоты без генных конструкций; 3 — заживление мышцы без применения исследуемых материалов. \* — МуН7В<sup>+</sup>-мышечные волокна. Иммуногистохимическая реакция с антителами к МуН7В

конструкций. При этом различия в этом показателе не было выявлено между группами с введением ген-активированного гидрогеля и заживлением мышцы без имплантированных материалов. Вероятно, такой результат обусловлен тем, что через 2 нед. после операции гидрогели занимали до 30 % общей площади зоны дефекта, то есть уменьшали площадь полей зрения, занятых вновь образованными тканями.

Как результат ангиогенного эффекта плазмидной ДНК, несущей ген *VEGFA*, а также, возможно, прямого влияния VEGF на поперечно-полосатую скелетную мышечную ткань [11, 12], только в группе с ген-активированным гидрогелем в центральной зоне дефекта определялись достоверные признаки миогенеза — вновь образованные МуН7В<sup>+</sup> — мышечные волокна. Их максимальное количество детектировалось через 2 нед. после операции, а к 4 нед. снижалось практически в 2,4 раза, что может быть обусловлено ремоделированием тканей в условиях отсутствия полной консолидации дефекта мышцы.

Важно, что на раннем сроке наблюдения MyoG<sup>+</sup>-клетки в группе с ген-активированным гидрогелем не были обнаружены. В совокупности с выявлением

вновь образованных мышечных волокон следует предположить, что к сроку 2 нед. после операции ранние фазы репаративного миогенеза уже завершены.

Таким образом, ген-активированный гидрогель на основе гиалуроновой кислоты и плазмидной ДНК с геном *VEGFA* оказывал индуцирующее влияние на ангиогенез в капсуле, окружающей гелевый имплантат и репаративный гистогенез поперечнополосатой мышечной ткани в экспериментальной модели объёмного повреждения скелетной мышцы. Однако, для детализации влияния генного ангиогенного фактора и гидрогеля на различные клеточные элементы регенерационного процесса, особенности доставки плазмидной ДНК в клетки *in vivo* и выбора оптимальной терапевтической дозы генных конструкций дальнейшие необходимы исследования.

#### Благодарности

Авторы выражают благодарность П.И. Макаревичу за предоставленную плазмидную ДНК с геном *Luc*. Работа выполнена за счет средств гранта Российского научного фонда по контракту № 18-75-10085 от 08.08.2018 года.

## ЛИТЕРАТУРА [REFERENCES]:

1. Одиноцова И.А. Проблема камбиальности скелетной мышечной ткани в регенерационном гистогенезе. Вопросы морфологии XXI века. Вып. 2. СПб.: Издательство ДЕАН; 2010; 147–52.
2. Данилов Р.К. Учение о камбиальности тканей как о гистогенетической основе познания механизмов раневого процесса. В кн.: Вопросы морфологии XXI века. Вып. 2. СПб.: Издательство ДЕАН; 2010: 34–8.
3. Одиноцова И.А., Чепурненко М.Н., Комарова А.С. Миосателлитоциты — камбиальный резерв поперечнополосатой мышечной ткани. Гены и Клетки 2014; IX(1): 6–14.
4. Yin H., Price F., Rudnicki M.A. Satellite Cells and the Muscle Stem Cell Niche. *Physiol. Rev.* 2013; 93(1): 23–67.
5. Cooper R.N., Tajbakhsh S., Mouly V. et al. In vivo satellite cell activation via Myf5 and MyoD in regenerating mouse skeletal muscle. *J. Cell Sci.* 1999; 112(Pt 17): 2895–901.
6. Rantanen J., Hurme T., Lukka R., et al. Satellite cell proliferation and the expression of myogenin and desmin in regenerating skeletal muscle: evidence for two different populations of satellite cells. *Lab. Invest.* 1995; 72: 341–7.
7. Zhou Z., Bornemann A. MRF4 protein expression in regenerating rat muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 2001; 22: 311–6.
8. Laroche C., Gitiaux C., Chretien F. et al. Skeletal muscle microvasculature: a highly dynamic lifeline. *Physiology* 2015; 30: 417–27.
9. Christov C., Chretien F., Abou-Khalil R. et al. Muscle satellite cells and endothelial cells: close neighbors and privileged partners. *Mol. Biol. Cell.* 2007; 18: 1397–409.
10. Laroche C., Weiss-Gayet M., Muller L. et al. Coupling between Myogenesis and Angiogenesis during Skeletal Muscle Regeneration Is Stimulated by Restorative Macrophages. *Stem Cell Rep.* 2017; 9(6): 2018–33.
11. Arsic N., Zacchigna S., Zentilin L. et al. Vascular endothelial growth factor stimulates skeletal muscle regeneration in vivo. *Mol. Ther.* 2004; 10: 844–54.
12. Bryan B.A., Walshe T.E., Mitchell D.C. et al. Coordinated vascular endothelial growth factor expression and signaling during skeletal myogenic differentiation. *Mol. Biol. Cell.* 2008; 19: 994–1006.
13. Dellavalle A., Sampaolesi M., Tonlorenzi R. et al. Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat. Cell Biol.* 2007; 9: 255–67.
14. Deasy B.M., Feduska J.M., Payne T.R. et al. Effect of VEGF on the Regenerative Capacity of Muscle Stem Cells in Dystrophic Skeletal Muscle. *Mol. Ther.* 2009; 17(10): 1788–98.
15. Деев Р.В., Дробышев А.Ю., Бозо И.Я. Ординарные и активированные остеопластические материалы. Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова 2015; 1: 51–69.
16. Lev R., Seliktar D. Hydrogel biomaterials and their therapeutic potential for muscle injuries and muscular dystrophies. *J.R. Soc. Interface.* 2018; 15(138): 20170380.
17. Leng Y., Abdullah A., Wendt M.K., Calve S. Hyaluronic acid, CD44 and RHAMM regulate myoblast behavior during embryogenesis. *Matrix Biol.* 2019; 78–9: 236–54.
18. Silva Garcia J.M., Panitch A., Calve S. Functionalization of hyaluronic acid hydrogels with ECM-derived peptides to control myoblast behavior. *Acta Biomater.* 2019; 84: 169–79.
19. Rossi C.A., Flaibani M., Blaauw B. et al. In vivo tissue engineering of functional skeletal muscle by freshly isolated satellite cells embedded in a photopolymerizable hydrogel. *FASEB J.* 2011; 25(7): 2296–304.
20. Prestwich G.D. Hyaluronic acid-based clinical biomaterials derived for cell and molecule delivery in regenerative medicine. *J. Control. Release* 2011; 155(2): 193–9.
21. Червяков Ю.В., Староверов И.Н., Власенко О.Н. и др. Пятилетние результаты лечения больных хронической ишемией нижних конечностей с использованием генной терапии. *Ангиология и сосудистая хирургия* 2016; 22(4): 38–45.
22. Scimeca M., Bonanno E., Piccirilli E. et al. Satellite Cells CD44 Positive Drive Muscle Regeneration in Osteoarthritis Patients. *Stem Cells Int.* 2015; 2015: 469459.
23. Lee J.E., Yin Y., Lim S.Y. et al. Enhanced Transfection of Human Mesenchymal Stem Cells Using a Hyaluronic Acid/Calcium Phosphate Hybrid Gene Delivery System. *Polymers (Basel)* 2019; 11(5): E798.
24. Lu H., Lv L., Dai Y. et al. Porous chitosan scaffolds with embedded hyaluronic acid/chitosan/plasmid-DNA nanoparticles encoding TGF- $\beta$ 1 induce DNA controlled release, transfected chondrocytes, and promoted cell proliferation. *PLoS One* 2013; 8(7): e69950.
25. Ito T., Fukuhara M., Okuda T., Okamoto H. Naked pDNA/hyaluronic acid powder shows excellent long-term storage stability and gene expression in murine lungs. *Int. J. Pharm.* 2020; 574: 118880.
26. Wang N., Liu C., Wang X. et al. Hyaluronic Acid Oligosaccharides Improve Myocardial Function Reconstruction and Angiogenesis against Myocardial Infarction by Regulation of Macrophages. *Theranostics* 2019; 9(7): 1980–92.