

DOI: <https://doi.org/10.23868/gc375315>

Оценка свойств остеогенных ген-активированных матриц на основе гидрогелей, импрегнированных полиплексами с геном *BMP2*

А.Ю. Меглей^{1, 2}, И.А. Недорубова¹, В.О. Мокроусова^{1, 2}, В.П. Басина¹, А.В. Васильев^{1, 2}, О.В. Махнач¹, Д.В. Гольдштейн¹, Т.Б. Бухарова¹

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

² Национальный медицинский исследовательский центр стоматологии и челюстно-лицевой хирургии, Москва, Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Обоснование. В настоящее время для эффективной регенерации костной ткани разрабатываются биосовместимые матрицы, содержащие плазмидные конструкции с генами остеоиндукторов.

Цель — *in vitro* исследование свойств ген-активированных матриц на основе коллагена и обогащённой тромбоцитами плазмы, импрегнированных полиплексами с геном костного морфогенетического белка 2.

Методы. В исследовании использованы методы флуоресцентной микроскопии, проточной цитофлуориметрии, иммуноферментного анализа, ПЦР в режиме реального времени и МТТ-тест.

Результаты. С помощью МТТ-теста и флуоресцентной микроскопии по выявлению живых и мёртвых клеток показано, что полученные матрицы обладают высокой цитосовместимостью. Включение плазмидных конструкций в гидрогелевые матрицы на основе коллагена и фибрина обеспечивает их пролонгированное высвобождение в течение 25 сут. Методами проточной цитофлуориметрии и флуоресцентной микроскопии установлено, что полиплексы, высвободившиеся из матриц, способны эффективно трансфицировать мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани крыс. Через 3 нед инкубации клеток с матрицами, импрегнированными полиплексами с геном *BMP2*, методом иммуноферментного анализа выявлено 25-кратное увеличение продукции белка BMP-2. Секретируемый трансфицированными клетками белок BMP-2 индуцирует остеогенную дифференцировку мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, что подтверждается повышением экспрессии гена остеопонтинина и минерализацией внеклеточного матрикса.

Заключение. Разработанные матрицы в перспективе могут быть использованы в генной терапии при повреждениях костной ткани.

Ключевые слова: ген-активированные матрицы; коллаген; обогащённая тромбоцитами плазма; трансфекция; костный морфогенетический белок 2.

Для цитирования:

Меглей А.Ю., Недорубова И.А., Мокроусова В.О., Басина В.П., Васильев А.В., Махнач О.В., Гольдштейн Д.В., Бухарова Т.Б. Оценка свойств остеогенных ген-активированных матриц на основе гидрогелей, импрегнированных полиплексами с геном *BMP2* // Гены и клетки. 2022. Т. 17, № 4. С. 133–141. DOI: <https://doi.org/10.23868/gc375315>

DOI: <https://doi.org/10.23868/gc375315>

Evaluation of the properties of osteogenic gene-activated matrices based on hydrogels impregnated with polyplexes with the *BMP2* gene

Anastasija Yu. Meglei^{1,2}, Irina A. Nedorubova¹, Victoria O. Mokrousova^{1,2}, Victoria P. Basina¹, Andrey V. Vasilyev^{1,2}, Oleg V. Makhnach¹, Dmitry V. Goldshtein¹, Tatiana B. Bukharova¹

¹ Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation;

² Central Research Institute of Dental and Maxillofacial Surgery, Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

BACKGROUND: Currently, to effective bone regeneration, biocompatible matrices containing plasmid constructs with osteoinductor genes are developed.

AIM: To study *in vitro* the properties of gene-activated matrices based on collagen and platelet-rich plasma impregnated with polyplexes with the bone morphogenetic protein 2 gene.

METHODS: The methods of fluorescence microscopy, flow cytometry, ELISA, real-time PCR and MTT test were used in the study.

RESULTS: Using the MTT test and fluorescence microscopy to detect live and dead cells, it was shown that the obtained matrices have high cytocompatibility. Impregnation of plasmid constructs in hydrogel matrices based on collagen and fibrin ensures their prolonged release within 25 days. Using flow cytometry and fluorescence microscopy it was shown that polyplexes released from matrices are able to effectively transfect multipotent mesenchymal stromal cells derived from rat adipose tissue. 3 weeks after incubation of cells with matrices impregnated with polyplexes with *BMP2* gene, it was shown a 25-fold increase in BMP-2 protein production by enzyme-linked immunosorbent assay. BMP-2 secreted by transfected cells induced osteogenic differentiation of multipotent mesenchymal stromal cells, as evidenced by increased expression of the osteopontin gene and extracellular matrix mineralization.

CONCLUSION: The developed matrices in the future can be used in gene therapy for damaged bone.

Keywords: gene-activated matrices; collagen; platelet-rich plasma; transfection; bone morphogenetic protein 2.

To cite this article:

Meglei AY, Nedorubova IA, Mokrousova VO, Basina VP, Vasilyev AV, Makhnach OV, Goldshtein DV, Bukharova TB. 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: <https://doi.org/10.23868/gc375315>

Received: 19.09.2022

Accepted: 06.12.2022

Published: 24.05.2023

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время для эффективной регенерации костной ткани разрабатываются подходы генной терапии, направленные на достижение терапевтических концентраций остеогенных индукторов за счёт высокого уровня экспрессии их генов в резидентных клетках в зоне костного дефекта [1, 2]. В качестве целевого гена перспективно использование эффективного индуктора остеогенеза — костного морфогенетического белка 2 (bone morphogenetic protein 2, BMP-2) [3]. Доставка генов с помощью невирусных векторов является наиболее безопасным способом, который исключает риск возникновения иммунного ответа и инсерционного мутагенеза [4]. Для обеспечения направленной доставки целевых генов в зону костного повреждения и их пролонгированного высвобождения генетические конструкции импрегнируют в биорезорбируемые биосовместимые материалы, получая ген-активированные матриксы [5]. В качестве матриц-носителей векторов для генной терапии костной ткани многообещающим является применение гидрогелей на основе природных полимеров, в том числе белков внеклеточного матрикса [6–8]. Коллаген I типа — основной компонент нативной костной ткани, продукты его деградации могут участвовать в синтезе нового костного матрикса [9]. Материалы на основе коллагена, хотя и имеют хорошую биосовместимость и адгезивные свойства, но обладают недостаточной механической прочностью и высокой скоростью резорбции, что обуславливает введение дополнительных компонентов в состав матрикса [10]. Для формирования более плотного гидрогеля, способного сохранять форму в течение нескольких недель, к коллагену может быть добавлена обогащённая тромбоцитами плазма (platelet-rich plasma, PRP), широко используемая в регенеративной медицине. Активация тромбоцитов PRP приводит к высвобождению факторов роста (TGF- β , VEGF, PDGF и т.д.), цитокинов и к формированию плотного фибринового сгустка. Волокна фибрина участвуют в поддержании остеокондукции. Продуктируемые тромбоцитами факторы роста стимулируют ангиогенез, миграцию стволовых клеток и способствуют регенерации ткани в месте дефекта [11, 12].

Цель работы — *in vitro* исследование свойств ген-активированных матриксов на основе коллагена и PRP, импрегнированных полиплексами с геном *BMP2*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Клеточные культуры

Культуру мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) выделяли из подкожной жировой ткани крыс по ранее разработанной методике [13]. Клетки культивировали в ростовой среде DMEM/F12 («ПанЭко», Россия), содержащей 10% эмбриональной

телячьей сыворотки — ЭТС (PAA Laboratories, США), а также 0,584 мг/мл L-глутамин, 5000 ед./мл пенициллина и 5000 мкг/мл стрептомицина («ПанЭко», Россия), при 37 °C и 5% CO₂. Ростовую среду меняли каждые 3 сут.

Для оценки остеогенных свойств матриксов ММСК культивировали в остеогенной среде DMEM («ПанЭко», Россия), содержащей 10% ЭТС, 0,584 мг/мл L-глутамин; 0,05 мг/мл L-аскорбиновой кислоты и 2,16 мг/мл β -глицерофосфата (Sigma-Aldrich, США); 5000 ед./мл пенициллина и 5000 мкг/мл стрептомицина — при 37 °C и 5% CO₂ в течение 21 сут, заменяя половину объёма среды на свежую каждые 3 сут.

Во всех экспериментах ММСК 3–4-го пассажа инкубировали в присутствии матриксов в 24-луночных планшетах с системой Transwell (диаметр пор — 8 мкм) (SPL Lifesciences, Корея), что позволяет исключить травмирование монослоя клеток при соприкосновении с матриксом. На дно лунок высевали клеточные культуры и через 24 ч в фильтры помещали исследуемый материал.

Получение полиплексов

Для получения полиплексов использовали плазмиды, несущие целевой ген *BMP2* (pBMP2; TagRFP-N-BMP2; «Евроген», Россия) и ген зелёного флуоресцентного белка *EGFP* с высокой интенсивностью эмиссии (pEGFP; pEGFP-C1; Clontech, США). Плазмиды наращивали в клетках *Escherichia coli* в среде LB Broth (Sigma-Aldrich, США) с 50 мкг/мл канамицина (GRiSP, Португалия) и выделяли с помощью набора реактивов Plasmid Midiprep («Евроген», Россия) по протоколу фирмы-производителя. Затем 40 мкл трансфицирующего агента TurboFect — TF (Thermo Fisher Scientific, США) смешивали с 20 мкг плазмиды, добавляли DPBS («ПанЭко», Россия) до конечного объёма 50 мкл и инкубировали 20 мин при 37 °C для образования полиплексов (TF/pEGFP или TF/pBMP2).

Получение матриксов

Были получены два типа матриксов: матриксы на основе коллагена I типа с добавлением PRP (коллаген/PRP) и матриксы коллаген/PRP, импрегнированные полиплексами (ген-активированные матриксы).

Для выделения PRP кровь крыс собирали в пробирки с цитратом натрия (Greiner Bio-One, Австрия), перемешивали, центрифугировали при 1100 об./мин в течение 10 мин при комнатной температуре, отбирали супернатант, в котором содержится плазма с тромбоцитами и лейкоцитами, центрифугировали при 3600 об./мин в течение 15 мин при комнатной температуре, удаляли половину объёма супернатанта, бедного тромбоцитами, а в оставшемся объёме ресуспендировали осадок. Полученную PRP использовали сразу или хранили при –80 °C в криобирке без добавления криопротектора.

Для получения матриксов коллаген/PRP-гидрогель на основе коллагена I типа (Intense; «Биофармахолдинг», Россия) смешивали с PRP и по каплям добавляли

раствор тромбина (100 NIH; PZ Cormay, Польша) в 10% растворе хлорида кальция («Славянская аптека», Россия) для полимеризации. Соотношение коллагена I типа и PRP составляло 1:2 по объёмным долям.

Для получения ген-активированных матриц TF/pEGFP-коллаген/PRP или TF/pBMP2-коллаген/PRP полиплексы в объеме 50 мкл смешивали с 50 мкл гидрогеля на основе коллагена I типа и инкубировали в течение 2 ч, затем добавляли 80 мкл PRP и 20 мкл раствора тромбина для гелеобразования.

Оценка цитосовместимости матрикса и его компонентов

Цитотоксичность матрикса коллаген/PRP и его компонентов оценивали через 1 и 7 сут инкубации с ММСК в ростовой среде с помощью МТТ-теста методом флуоресцентной микроскопии. В качестве контроля использовали ММСК, культивируемые в ростовой среде без добавления матрикса и его компонентов.

Для проведения МТТ-теста в лунки планшета добавляли 0,5 мг/мл 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолий бромид (МТТ; «ПанЭко», Россия) и инкубировали 2 ч при 37 °С, визуальную интенсивность окраски. Затем кристаллы формазана элюировали из клеток с помощью ДМСО («ПанЭко», Россия), перемешивая на шейкере в течение 20 мин. Поглощение формазана оценивали, измеряя оптическую плотность элюата на планшетном спектрофотометре xMark (Bio-Rad, США) при длине волны 570 нм и вычитая фоновое значение при 620 нм.

Для визуализации живых и мёртвых клеток ММСК перед инкубацией с исследуемыми материалами окрашивали PKH26 (red fluorescent cell linker kit; Sigma-Aldrich, США) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя, а затем — флуоресцентным красителем DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole; Biotium, США) в концентрации 5 мкг/мл в течение 10 мин при комнатной температуре для выявления мёртвых клеток и 0,5 мкМ кальцеином АМ (Biotium, США) в течение 35 мин при 37 °С — для выявления живых клеток. Анализ проводили с помощью люминесцентного инвертированного микроскопа Axio Observer D1 с камерой AxioCam HRc (Zeiss, Германия).

Анализ трансфицирующей способности полиплексов в составе матриц

Для оценки кинетики высвобождения плазмидной ДНК матрицы TF/pEGFP-коллаген/PRP инкубировали в физиологическом растворе («ПанЭко», Россия) в течение 25 сут. Концентрацию ДНК определяли методом спектрофотометрии при длине волны 260 нм с помощью спектрофотометра NanoDrop OneC (Thermo Fisher Scientific, США).

Матрицы TF/pEGFP-коллаген/PRP добавляли в лунки с ММСК, культивируемыми в ростовой среде,

и каждые 3 сут переносили в новые лунки с клетками для оценки трансфицирующей способности полиплексов в составе матриц на протяжении 14 сут. Клетки, синтезирующие EGFP, выявляли методом флуоресцентной микроскопии с помощью люминесцентного инвертированного микроскопа Axio Observer D1 с камерой AxioCam HRc.

Для количественной оценки эффективности трансфекции клетки снимали с планшетов раствором Версена с добавлением 0,25% трипсина, осаждали центрифугированием при 1200 об./мин в течение 5 мин, исследовали на проточном цитофлуориметре CyFlow Space (Partec, США) и анализировали количество клеток, синтезирующих EGFP, с помощью программы FloMax.

Анализ остеогенных свойств матриц

Остеогенные свойства матриц, импрегнированных полиплексами TF/pBMP2 (TF/pBMP2-коллаген/PRP), оценивали через 21 сут культивирования ММСК с матриксами TF/pBMP2-коллаген/PRP по сравнению с ММСК, которые культивировали в присутствии полиплексов TF/pBMP2 без матриц. В группе контроля ММСК культивировали в остеогенной среде без добавления матриц и полиплексов.

Экспрессию гена *BMP2* и остеогенного маркера *Opn* оценивали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green («Евроген», Россия), с предварительным проведением реакции обратной транскрипции. Общую РНК выделяли из клеток по протоколу RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN, США), кДНК синтезировали с помощью набора для синтеза первой цепи кДНК с обратной транскриптазой RevertAid (Thermo Fisher Scientific, США) и полученные значения нормировали относительно генов сравнения *Gapdh* и *Actβ*. Праймеры к исследуемым генам приведены в табл. 1.

Для оценки продукции белка BMP-2, секретируемого ММСК, среду собирали на протяжении всего срока инкубации клеток с исследуемыми матриксами

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

Ген	Последовательность праймера, 5'→3'
<i>Actβ</i>	For: GAGATTACTGCCCTGGCTCC Rev: GCTCAGTAACAGTCCGCTTA
<i>BMP2</i>	For: ACTACCAGAAACGAGTGGGAA Rev: GCATCTGTCTCGGAAAACCT
<i>Opn</i>	For: GACGATGACGACGGAGACC Rev: TGGCAGTGAAGGACTCATCA
<i>Gapdh</i>	For: GCGAGATCCCGCTAACATCA Rev: CCTTCCACGATGCCAAAGT

Примечание: For — прямой праймер, Rev — обратный праймер.

и хранили при -80°C . Затем все фракции объединяли, белок концентрировали на центрифужных фильтрах Amicon (Merck Millipore, США) и исследовали методом иммуноферментного анализа с использованием набора реактивов Quantikine ELISA kit (R&D Systems, США) согласно инструкции производителя. Измерения проводили на планшетном спектрофотометре xMark (Bio-Rad, США).

Для анализа минерализации внеклеточного матрикса клетки фиксировали охлаждённым 70% этанолом в течение 30 мин при 4°C , окрашивали 2% водным раствором ализаринового красного (Sigma-Aldrich, США) при $\text{pH}=4,1$ в течение 5 мин, дважды промывали дистиллированной водой от несвязавшегося красителя и с помощью световой микроскопии получали изображения клеток.

Статистический анализ

Построение графиков и статистический анализ выполняли в программе SigmaPlot 12.0 (Германия). Все данные представлены как $M \pm SD$. Группы сравнивали с использованием t -критерия Стьюдента или U -критерия Манна–Уитни. Статистически значимыми считали различия при вероятности ошибки отклонения от нулевой гипотезы или уровне статистической значимости ниже 5% ($p < 0,05$). При построении столбчатых диаграмм значения, отличавшиеся от контрольных, помечали знаком

«*» в соответствии с рекомендациями Американской ассоциации физиологов (APA).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Цитосовместимость матрикса и его компонентов

При оценке цитотоксичности матрикса коллаген/PRP, а также каждого его компонента на культуре ММСК показано, что все исследуемые материалы обладают высокой цитосовместимостью: большинство клеток окрашивались кальцеином АМ, а мёртвых клеток, окрашенных DAPI, практически не наблюдалось (рис. 1, а). Количество жизнеспособных клеток через 7 сут инкубации в присутствии PRP и матрикса коллаген/PRP значительно увеличилось по сравнению с контролем и составило $153,5 \pm 13,3$ и $153,2 \pm 16,6\%$ соответственно. При этом для коллагена не выявлено статистически значимых отличий по сравнению с контролем (рис. 1, б). Добавление PRP в состав коллагеновых матриксов позволило повысить прочность гидрогеля и способствовало увеличению пролиферации ММСК за счёт входящих в неё факторов роста. Данные результаты обуславливают преимущество использования матрикса на основе коллаген/PRP для регенеративной медицины.

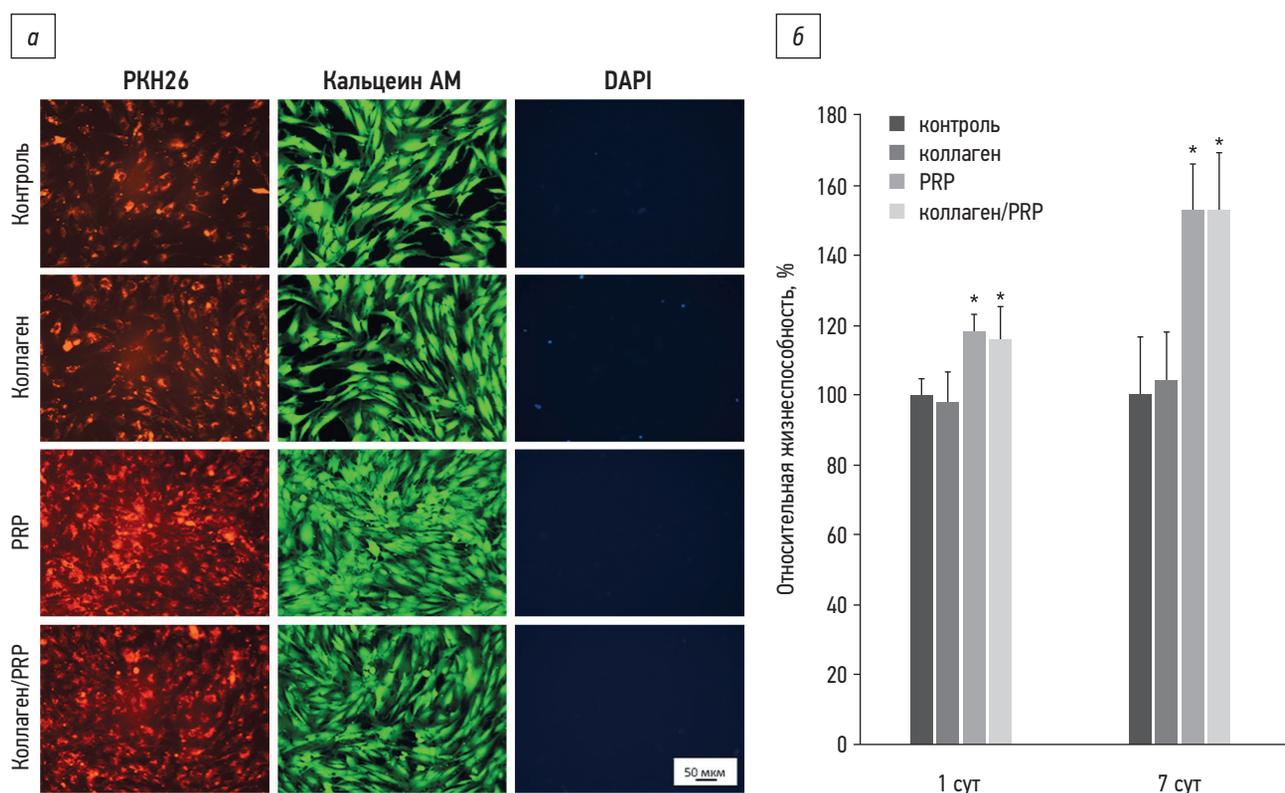


Рис. 1. Оценка цитотоксичности матрикса коллаген/PRP и его компонентов на культуре мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток: а — окрашенных РКН26 (красный цвет); живых клеток, окрашенных кальцеином АМ (зелёный цвет); мёртвых клеток, окрашенных DAPI (синий цвет). Флуоресцентная микроскопия: б — относительная жизнеспособность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, МТТ-тест. * $p < 0,05$ (по сравнению с контролем).

Трансфицирующая способность полиплексов в составе матриц TF/pEGFP-коллаген/PRP

Одна из основных проблем терапии с помощью плазмидных конструкций — низкая эффективность трансфекции клеток. Она может быть существенно повышена при использовании поликатионных трансфицирующих агентов, действие которых направлено на снижение удельного заряда плазмиды и её компактизацию [14]. Ранее нами показано, что трансфицирующий агент TF обеспечивает лучшую трансфекцию ММСК жировой ткани по сравнению с Polyethylenimine [15].

Для оценки трансфицирующей способности матрицы импрегнировали полиплексами TF/pEGFP и обнаружили,

что включение плазмидных конструкций в гидрогелевые матрицы на основе коллаген/PRP обеспечивает их пролонгированное высвобождение (рис. 2, а). Плазмидные ДНК высвобождались постепенно: 20% выходило в первые 14 сут, а полное высвобождение происходило к 25 сут. Следует отметить, что полиплексы, высвободившиеся из матриц, способны эффективно трансфицировать ММСК на протяжении всего исследуемого периода (рис. 2, б, в). По результатам проточной цитофлуориметрии и флуоресцентной микроскопии показано, что через 14 сут количество трансфицированных клеток увеличилось в 4,7 раза по сравнению с 3 сут. При этом трансфицирующая способность полиплексов TF/pEGFP, импрегнированных в матрикс, сопоставима по количеству трансфицированных клеток с полиплексами без скаффолдов для ММСК жировой ткани [16].

Остеогенные свойства матриц TF/pBMP2-коллаген/PRP

При культивировании ММСК в присутствии ген-активированных матриц TF/pBMP2-коллаген/PRP было выявлено 25-кратное увеличение продукции BMP-2 по сравнению с контролем через 21 сут. Следует отметить, что эти показатели в 2,4 раза выше, чем в группе, в которой полиплексы TF/pBMP2 добавляли непосредственно к клеткам (рис. 3, а). Полученные результаты свидетельствуют об эффективной трансфекции культуры ММСК и высоком уровне экспрессии целевого

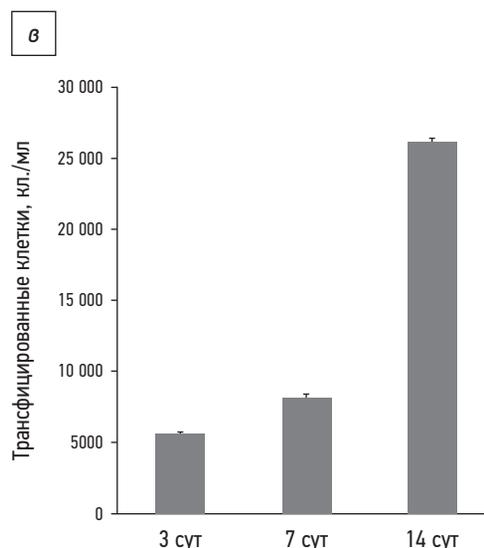
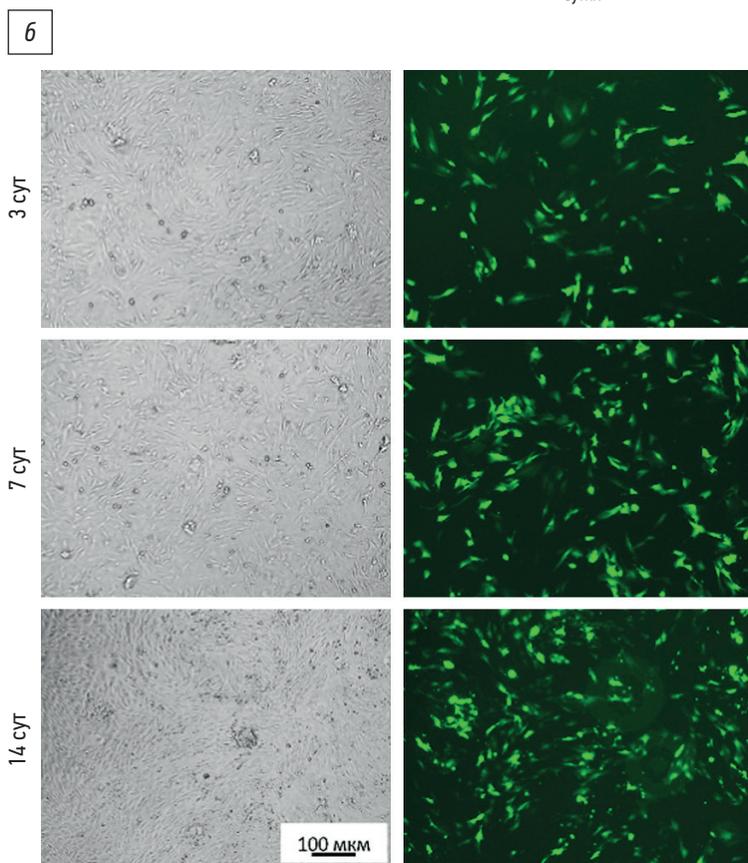
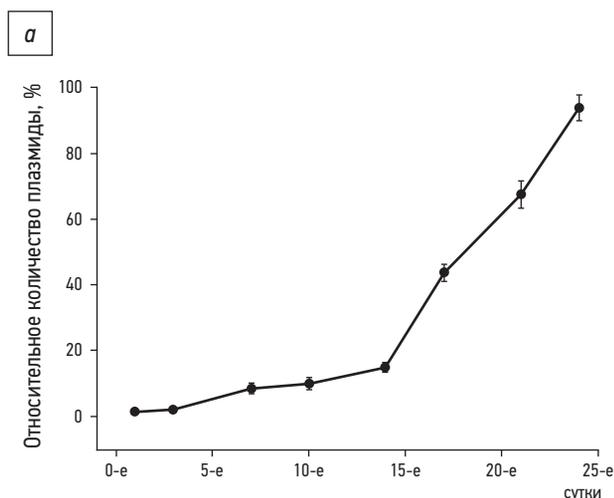


Рис. 2. Оценка трансфицирующей способности полиплексов TF/pEGFP в составе матриц на культуре мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток: а — кинетика высвобождения плазмидной ДНК, спектрофотометрический анализ; б — клетки, трансфицированные TF/pEGFP, фазово-контрастная микроскопия (левый столбик) и флуоресцентная микроскопия (правый столбик); в — количество трансфицированных клеток, проточная цитофлуориметрия.

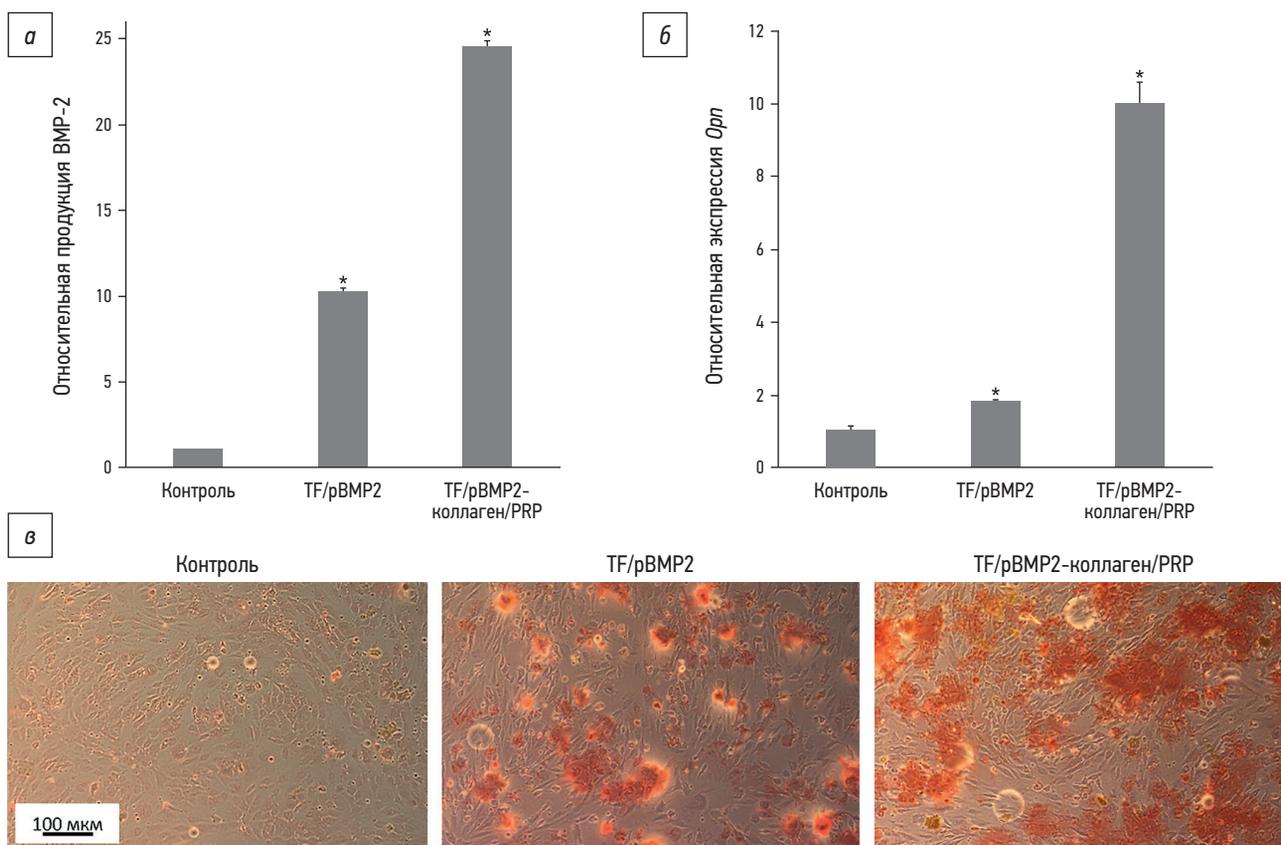


Рис. 3. Оценка остеогенных свойств матриц TF/pBMP2-коллаген/PRP через 21 сут инкубации с мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками: *а* — уровень продукции BMP-2, иммуноферментный анализ; *б* — уровень экспрессии гена *Orp*, ПЦР в режиме реального времени; * $p < 0,05$ (по сравнению с контролем); *в* — минерализация внеклеточного матрикса мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, окрашивание ализариновым красным.

гена в клетках. Методом ПЦР-РВ показано значительное (в 9,95 раза) увеличение относительной экспрессии гена *Orp* в культурах ММСК, культивируемых с матриксами TF/pBMP2-коллаген/PRP по сравнению с контролем (рис. 3, б). Кроме того, наблюдалось значительное увеличение минерализации внеклеточного матрикса в присутствии матрикса TF/pBMP2-коллаген/PRP, которая также была выше, чем при добавлении полиплексов TF/pBMP2 (рис. 3, в). Эти данные подтверждают, что в результате трансфекции ММСК инициируется продукция BMP-2 в дозах, достаточных для индукции остеогенной дифференцировки культур клеток, что определяет эффективность разработанных матриц *in vitro*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенного исследования можно с уверенностью заключить, что разработанные матрицы на основе гидрогеля из коллагена I типа и PRP, импрегнированные полиплексами с геном *BMP2*, обладают высокой биосовместимостью, способствуют пролонгированному высвобождению плазмидных конструкций и эффективной трансфекции мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, обеспечивая высокий уровень продукции целевого белка

BMP-2. Секретируемый трансфицированными клетками BMP-2 индуцирует остеогенную дифференцировку клеток, что подтверждается повышением экспрессии гена остеогенного маркера *Orp* и уровня минерализации внеклеточного матрикса. Такие ген-активированные матрицы в перспективе могут быть использованы для генной терапии костной ткани.

ДОПОЛНИТЕЛЬНО

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова».

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

Благодарности. Авторы выражают свою признательность сотрудникам компании ООО «Биофармахолдинг» за предоставление препарата коллагена для исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Shapiro G., Lieber R., Gazit D., Pelled G. Recent advances and future of gene therapy for bone regeneration // *Curr Osteoporos Rep*. 2018. Vol. 16, N 4. P. 504–511. doi: 10.1007/s11914-018-0459-3
- Balmayor E.R., van Griensven M. Gene therapy for bone engineering // *Front Bioeng Biotechnol*. 2015. Vol. 3. P. 9. doi: 10.3389/fbioe.2015.00009
- Schmidt-Bleek K., Willie B.M., Schwabe P., et al. BMPs in bone regeneration: less is more effective, a paradigm-shift // *Cytokine Growth Factor Rev*. 2016. Vol. 27. P. 141–148. doi: 10.1016/j.cytogfr.2015.11.006
- Недорунова И.А., Бухарова Т.Б., Васильев А.В., и др. Невирусная доставка гена BMP2 для регенерации костной ткани // *Гены и клетки*. 2020. Т. 15, № 4. С. 33–39. doi: 10.23868/202012005
- Деев Р.В., Дробышев А.Ю., Бозо И.Я. Обычные и активированные остеопластические материалы // *Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова*. 2015. № 1. С. 51–69. doi: 10.32414/0869-8678-2015-1-51-69
- Бозо И.Я., Пресняков Е.В., Рочев Е.С., и др. Невирусный генный трансфер в гидрогелевых матриксах с микрогранулами октакальциевого фосфата в оптимизации репаративного остеогенеза // *Гены и Клетки*. 2021. Т. 16, № 3. С. 91–96. doi: 10.23868/202110013
- Bharadwaz A., Jayasuriya A.C. Recent trends in the application of widely used natural and synthetic polymer nanocomposites in bone tissue regeneration // *Mate Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2020. Vol. 110. P. 110698. doi: 10.1016/j.msec.2020.110698
- Gibbs D.M., Black C.R., Dawson J.I., Oreffo R.O. A review of hydrogel use in fracture healing and bone regeneration // *J Tissue Eng Regen Med*. 2016. Vol. 10, N 3. P. 187–198. doi: 10.1002/term.1968
- Sorushanova A., Delgado L.M., Wu Z., et al. The collagen suprafamily: from biosynthesis to advanced biomaterial development // *Adv Mater*. 2019. Vol. 31, N 1. P. 1801651. doi: 10.1002/adma.201801651
- Vasilyev A.V., Kuznetsova V.S., Bukharova T.B., 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. Vol. 13, N 22. P. 3974. doi: 10.3390/polym13223974
- Etulain J. Platelets in wound healing and regenerative medicine // *Platelets*. 2018. Vol. 29, N 6. P. 556–568. doi: 10.1080/09537104.2018.1430357
- Desai A.P., Sahoo N., Pal A.K., Roy Chowdhury S.K. Efficacy of platelet-rich plasma in enhancing the osteogenic potential of bone graft in oral and maxillofacial region // *J Maxillofac Oral Surg*. 2021. Vol. 20, N 2. P. 282–295. doi: 10.1007/s12663-020-01378-z
- Бухарова Т.Б., Волков А.В., Антонов Е.Н., и др. Тканеинженерная конструкция на основе мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани, полилактидных носителей и тромбоцитарного геля // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2013. Т. 8, № 4. С. 61–68.
- Aggarwal R., Targhotra M., Kumar B., et al. Polyplex: a promising gene delivery system // *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology (IJPSN)*. 2019. Vol. 12, N 6. P. 4681–4686. doi: 10.37285/ijpsn.2019.12.6.1
- Nedorubova I.A., Bukharova T.B., Vasilyev A.V., Khvorostina M. Comparative study of BMP-2 gene delivery to human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells with turbofect and polyethylenimine // *IOP Conf Ser Earth Environ Sci*. 2021. Vol. 677, N 4. P. 042024. doi: 10.1088/1755-1315/677/4/042024
- Nedorubova I.A., Bukharova T.B., Vasilyev A.V., et al. Development of osteoplastic material impregnated with plasmid encoding bone morphogenetic protein-2 // *Appl Biochem Microbiol*. 2021. Vol. 57, N 7. P. 818–822. doi: 10.1134/S000368382107005X

REFERENCES

- Shapiro G, Lieber R, Gazit D, Pelled G. Recent advances and future of gene therapy for bone regeneration. *Curr Osteoporos Rep*. 2018;16(4):504–511. doi: 10.1007/s11914-018-0459-3
- Balmayor ER, van Griensven M. Gene therapy for bone engineering. *Front Bioeng Biotechnol*. 2015;3:9. doi: 10.3389/fbioe.2015.00009
- Schmidt-Bleek K, Willie BM, Schwabe P, et al. BMPs in bone regeneration: less is more effective, a paradigm-shift. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2016;27:141–148. doi: 10.1016/j.cytogfr.2015.11.006
- Nedorubova IA, Bukharova TB, Vasilyev AV, et al. Non-viral delivery of the BMP2 gene for bone regeneration. *Genes & cells*. 2020;15(4):33–39. (In Russ). doi: 10.23868/202012005
- Deev RV, Drobyshev AY, Bozo IY. Ordinary and activated osteoplastic materials. *NN Priorov Journal of Traumatology and Orthopedics*. 2015;22(1):51–69. (In Russ). doi: 10.32414/0869-8678-2015-1-51-69
- Bozo IY, Presnyakov EV, Rochev ES, et al. Non-viral gene transfer in hydrogel matrices with octacalcium phosphate microgranules in optimization of reparative osteogenesis. *Genes & cells*. 2021;16(3):91–96. (In Russ). doi: 10.23868/202110013
- Bharadwaz A, Jayasuriya AC. Recent trends in the application of widely used natural and synthetic polymer nanocomposites in bone tissue regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2020;110:110698. doi: 10.1016/j.msec.2020.110698
- Gibbs DM, Black CR, Dawson JI, Oreffo RO. A review of hydrogel use in fracture healing and bone regeneration. *J Tissue Eng Regen Med*. 2016;10(3):187–198. doi: 10.1002/term.1968
- Sorushanova A, Delgado LM, Wu Z, et al. The collagen suprafamily: from biosynthesis to advanced biomaterial development. *Adv Mater*. 2019;31(1):1801651. doi: 10.1002/adma.201801651
- 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(22):3974. doi: 10.3390/polym13223974
- Etulain J. Platelets in wound healing and regenerative medicine. *Platelets*. 2018;29(6):556–568. doi: 10.1080/09537104.2018.1430357
- Desai AP, Sahoo N, Pal AK, Roy Chowdhury SK. Efficacy of platelet-rich plasma in enhancing the osteogenic potential of bone graft in oral and maxillofacial region. *J Maxillofac Oral Surg*. 2021;20(2):282–295. doi: 10.1007/s12663-020-01378-z
- Buharova TB, Volkov AV, Antonov EN, et al. Tissue-engineered construction made of adipose derived multipotent mes-

enchymal stromal cells, polylactide scaffolds and platelet gel. *Cellular Transplantation and Tissue Engineering*. 2013;8(4):61–68. (In Russ).

14. Aggarwal R, Targhotra M, Kumar B, et al. Polyplex: a promising gene delivery system. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology (IJPSN)*. 2019;12(6):4681–4686. doi: 10.37285/ijpsn.2019.12.6.1

15. Nedorubova IA, Bukharova TB, Vasilyev AV, et al. Compara-

tive study of BMP-2 gene delivery to human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells with turbofect and polyethyl-
enimine. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci*. 2021;677(4):042024. doi: 10.1088/1755-1315/677/4/042024

16. Nedorubova IA, Bukharova TB, Vasilyev AV, et al. Development of osteoplastic material impregnated with plasmid encoding bone morphogenetic protein-2. *Appl Biochem Microbiol*. 2021;57(7):818–22. doi: 10.1134/S000368382107005X

ОБ АВТОРАХ

*** Меглей Анастасия Юрьевна;**

адрес: Россия, 115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2970-7176>;

eLibrary SPIN: 5569-9070;

e-mail: an.megley95@yandex.ru

Недорубова Ирина Алексеевна;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8472-7116>;

eLibrary SPIN: 1548-6998;

e-mail: nedorubova.ia@gmail.com

Мокроусова Виктория Олеговна;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3828-8495>;

eLibrary SPIN: 6988-4309;

e-mail: victoria-mok@yandex.ru

Басина Виктория Павловна;

e-mail: vika.basina12@gmail.com

Васильев Андрей Вячеславович, д.м.н.;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7169-2724>;

eLibrary SPIN: 8864-6279;

e-mail: vav-stom@yandex.ru

Махнач Олег Владимирович, к.х.н.;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2707-8313>;

eLibrary SPIN: 1453-9189

Гольдштейн Дмитрий Вадимович, д.б.н., профессор;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2438-1605>;

eLibrary SPIN: 7714-9099;

e-mail: dvgoldshtein@gmail.com

Бухарова Татьяна Борисовна, к.б.н.;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0481-256X>;

eLibrary SPIN: 2092-5580;

e-mail: bukharova-rmt@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

AUTHORS' INFO

*** Anastasija Yu. Meglei;**

address: 1 Moskvorechye Street, Moscow 115522, Russia;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2970-7176>;

eLibrary SPIN: 5569-9070;

e-mail: an.megley95@yandex.ru

Irina A. Nedorubova;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8472-7116>;

eLibrary SPIN: 1548-6998;

e-mail: nedorubova.ia@gmail.com

Victoria O. Mokrousova;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3828-8495>;

eLibrary SPIN: 6988-4309;

e-mail: victoria-mok@yandex.ru

Victoria P. Basina;

e-mail: vika.basina12@gmail.com

Andrey V. Vasilyev, MD, Dr. Sci. (Med.);

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7169-2724>;

eLibrary SPIN: 8864-6279;

e-mail: vav-stom@yandex.ru

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

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2707-8313>;

eLibrary SPIN: 1453-9189

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

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2438-1605>;

eLibrary SPIN: 7714-9099;

e-mail: dvgoldshtein@gmail.com

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

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0481-256X>;

eLibrary SPIN: 2092-5580;

e-mail: bukharova-rmt@yandex.ru