

УДК 612.753, 617-089.844

Р.В. Деев¹, И.Я. Бозо^{1,2*}, А.Ю. Дробышев², А.А. Исаев¹

Эффективность ген-активированного остеопластического материала с плазмидными ДНК, содержащими ген VEGF, в замещении костных дефектов[#]

UDC 612.753, 617-089.844

R.V. Deev¹, I.Ya. Bozo^{1,2*}, A.Yu. Drobyshev², A.A. Isaev¹

Efficiency of Gene-Activated Osteoplastic Material with Plasmid DNA Containing VEGF Gene for Bone Defects Healing[#]

Ключевые слова: репаративный остеогенез, генная индукция, ДНК-плазмиды, ген *vegf*, краниальные дефекты.

Ключові слова: репаративний остеогенез, гена індукція, ДНК-плазміді, ген *vegf*, краніальні дефекти.

Key words: reparative osteogenesis, gene induction, plasmid DNA, *vegf* gene, cranial defects.

Детальное понимание механизмов регуляции репаративной регенерации тканей имеет высокое прикладное значение, так как служит теоретической основой для разработок новых лекарственных средств, медицинских изделий и способов лечения пациентов с повреждениями тканей и (или) органов. Применительно к костным тканям подробно описаны факторы регуляции остеогенеза, действующие на разных уровнях – генном, локальном и системном – в разные периоды онтогенеза (как в пре-, так и в постнатальном) [1]. В связи с этим, адекватное использование основных остеогенных факторов может позволить добиться более высокой выраженности восстановительного процесса в области костного дефекта (или атрофии костной ткани), что крайне востребовано в клинической практике – в травматологии и ортопедии, хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии [2–4].

В зависимости от природы остеогенных факторов, исследуемых в качестве индукторов репаративного процесса, в рамках биомедицинских технологий сформировались три подхода: постгеномный, клеточный и генный. Генная индукция репаративного остеогенеза является наименее изученной, все исследования находятся лишь на доклиническом этапе, в связи с чем разрешенных для клинического применения медицинских изделий, содержащих генные конструкции, нет.

Определенные предпосылки для внедрения результатов исследований в рамках генного подхода в клиническую практику были сформированы в России

Comprehensive understanding of the mechanisms regulating reparative regeneration of tissues is of high practical value, since this could serve as a theoretical basis to develop new medications, medical devices and methods for treating patients suffering tissue and/or organ injuries. Concerning bone tissue, there is a detailed information about osteogenesis regulating factors, which act at different levels, *i.e.* genetic, local and systemic ones, and at different periods of ontogenesis (both pre- and postnatal) [1]. In this regard, a proper application of basic osteogenic factors may stimulate the recovery processes in the area of bone injury (or atrophy of bone tissue), which is extremely demanded in clinics: in traumatology, orthopedics, dental surgery, and maxillofacial surgery [2–4].

Depending on the nature of osteogenic factors, being a potential inducers of reparative process, biomedical technologies have three approaches: post-genomic, cellular and genetic ones. Gene induction of reparative osteogenesis is the least explored, all the studies are only at the preclinical stage, and therefore there no medical devices containing gene constructs allowed for the clinical use.

Certain prerequisites for the implementation in clinical practice of research results obtained within the genetic approach have been formed in Russia by our research group. In particular, we have developed and registered in Russia and Ukraine the world's first gene drug (Neovaskulgen), which expressed angiogenic activity and could be used in clinics for treatment of patients with chronic lower limb ischemia [5]. The main active substance of the drug is plasmid DNA with the gene encoding vascular endothelial growth factor (VEGF165).

¹Институт стволовых клеток человека, г. Москва

²Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова

***Адрес для корреспонденции:**

ул. Губкина, д. 3, стр. 2, Москва, Россия 119333;
электронная почта: llya-bozo-1989@yandex.ru

[#]Данное исследование было представлено на минисимпозиуме «День стволовой клетки», проходившем 24 мая 2013 года в г. Киеве.

Поступила 15.06.2013

Принята в печать 01.12.2013

¹Human Stem Cells Institute, Moscow, Russia

²A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia

***Address for correspondence:**

3 Bld. 2, Gubkina str., Moscow, Russia 119333;
e-mail: llya-bozo-1989@yandex.ru

[#]This research was presented at minisymposium Stem Cell Day, held in Kiev, Ukraine, on the 24th of May, 2013.

Received June, 15, 2013

Accepted December, 1, 2013

нашей исследовательской группой. В частности, разработан и зарегистрирован на территории России и Украины первый в мире генный препарат («Неоваскулген»), обладающий выраженной ангиогенной активностью и показанный для лечения пациентов с хронической ишемией нижних конечностей [5]. Основное действующее вещество препарата – плазмидные ДНК с геном, кодирующим сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF165). Если учитывать, что ангиогенез за счет повышения парциального давления кислорода и привнесения камбиальных клеток в зону костного дефекта является критически значимым фактором, индуцирующим репаративный остеогенез [7], то использование плазмидных ДНК с *vegf* в качестве биологически активных компонентов ген-активированных остеопластических материалов теоретически оправдано.

В этой связи наше исследование было нацелено на разработку частного варианта технологии генной индукции репаративного остеогенеза плазмидными ДНК с *vegf*, а также оценку эффективности реализации их терапевтического действия.

В ходе лабораторного этапа выполнено совмещение плазмидных ДНК с носителями различной природы, в том числе аллогенным деминерализованным костным матриксом, композиционным материалом из коллагена и гидроксиапатита, ксеногенным депротенизированным костным матриксом, синтетическим β -трикальцийфосфатом и др. С помощью флуоресцентной спектрофотометрии определяли максимальные концентрации плазмидных ДНК, которые могли быть совмещены с каждым из исследуемых носителей, выбирали два варианта с наибольшей емкостью для нуклеиновых кислот.

Выбранные варианты матриц использовали для создания ген-активированных костных графтов (ГАКГ). В ряде случаев в качестве биологически активного компонента материалов применяли двухкассетные ДНК-плазмиды, которые наряду с *vegf* содержали ген зеленого флуоресцентного белка (GFP) для идентификации трансфекции клеток *in vivo*. Полученные материалы были исследованы в эксперименте на кроликах ($n = 34$), каждому из которых выполняли двусторонние симметричные дефекты (диаметром 10 мм) теменных костей: дефекты правых теменных костей заполняли ГАКГ (экспериментальные группы 1 и 2), а левых – носителем без ДНК-плазмид (соответствующие контрольные группы 1 и 2). Результаты оценивали через 15, 30, 45, 60, 90 суток с использованием компьютерной томографии (КТ), гистологического, иммуногистохимического и гистоморфометрического исследований. Данные гистоморфометрии обрабатывали статистически и значимость различий между группами определяли с помощью U-критерия Манна-Уитни (для межгрупповых сравнений) и критерия Вилкоксона (при сравнении показателей одной группы на разных сроках). Для детекции

Taking into consideration that angiogenesis contributes to increasing of oxygen partial pressure and delivery of cambial cells into bone injury area and therefore is a critical factor in reparative osteogenesis induction [7], using of plasmid DNA vectors with *vegf* as active components of gene activated osteoplastic materials is theoretically justified.

In this regard, our study was directed to develop a particular case of the technology of gene induction of reparative osteogenesis using plasmid DNA with *vegf*, as well as to evaluate their therapeutic effect.

At the first laboratory step we performed the embedding of plasmid DNA into scaffolds of different nature, including allogenic demineralized bone matrix, collagen and hydroxyapatite composite, deproteinized xenogenic bone matrix, synthetic β -tricalcium phosphate *etc.* Thereafter fluorescence spectrophotometry was used to estimate maximum concentration of plasmid DNA uptaken by each of the investigated carriers and two types of scaffolds with the largest capacity for the nucleic acids were chosen.

The chosen samples were used to create gene activated bone grafts (GABG). In some cases, the biologically active component of the graft was double cassette DNA vector, where *vegf* gene was accompanied with the green fluorescent protein gene (GFP) to detect the transfection of cells *in vivo*. The resulted samples were used in an experiment in rabbits ($n = 34$): parietal bones of each animal were subjected to a bilateral symmetrical injuries (of 10 mm diameter): the right parietal bone defects were filled with GABG (experimental groups 1 and 2) and left ones were grafted with carriers without plasmid DNA (corresponding control groups 1 and 2). The outcomes were evaluated in 15, 30, 45, 60, and 90 days using computed tomography (CT), histological, immunohistochemical and histomorphometric studies. Histomorphometry data were statistically processed and significance of the differences between groups was determined by Mann-Whitney U-test (for intergroup comparisons) and Wilcoxon test (comparison of the data within one group at different stages). Cell transfection with plasmid DNA of grafted GABG was identified immuno-histochemically using antibodies for GFP, and for the visualization of vessels the reaction with antibodies for α -SMA was performed. All the experiments were conducted in compliance with the bioethical principles and biosafety regulations.

The studies allowed to select two types of carriers presented the maximum capacity for plasmid DNA which was thereafter used to create GABG: collagen and hydroxyapatite composite (GABG1; experimental and control groups 1) and deproteinized xenogenic bone matrix (GABG2; experimental and control groups 2) with DNA uptake of 176 and 116.4 ng/mg, respectively.

In 15 days after grafting no significant differences according CT data between regenerates of the right and



трансфекции клеток плазмидами ГАКГ использовали иммуногистохимический анализ с антителами к GFP, для визуализации сосудов – реакцию с антителами к α -SMA. Все эксперименты выполнены с соблюдением принципов биоэтики и норм биологической безопасности.

В результате проведенных исследований выбрали два типа носителей с максимальной емкостью для плазмидных ДНК, которые затем использовали для создания ГАКГ: композиционный материал из коллагена и гидроксиапатита (ГАКГ1; экспериментальная и контрольная группы 1), а также ксеногенный депротенинизированный костный матрикс (ГАКГ2; экспериментальная и контрольная группы 2) с емкостями 176 и 116,4 нг/мг соответственно.

Через 15 суток существенной разницы по данным КТ между регенератами правой и левой теменных костей не выявлено; плотность регенерата соответствовала плотности рыхлой волокнистой соединительной ткани; в ткани регенерата наблюдали частицы с повышенной рентгенконтрастностью – фрагменты носителей. Через 30 суток после использования ГАКГ1 размеры дефектов уменьшались в среднем на 1–3 мм, их контуры были неровными. В контрольной группе 1 границы дефектов также становились менее четкими, в сравнении со сроком наблюдения 15 суток; начальная округлая форма и размеры сохранялись. В целом, на всех сроках наблюдения в экспериментальных группах рентгенконтрастность регенерата была выше, а размеры видимого дефекта теменной кости меньше, чем в контрольных группах.

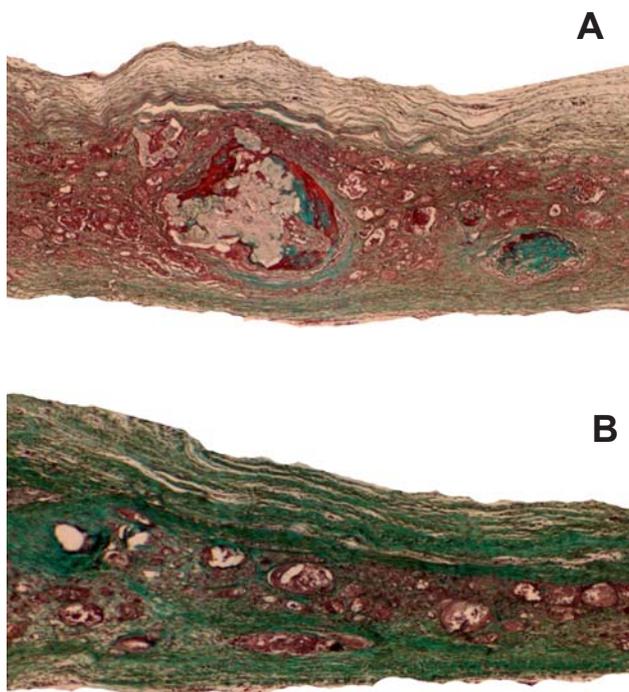
Результаты КТ подтверждены гистологическими данными. Через 15 суток во всех группах дефекты были заполнены реактивно измененной волокнистой соединительной тканью, включавшей фрагменты носителей. Со стороны костных опилов наблюдали тонкий слой регенерата из ретикулофиброзной костной ткани. В зоне репаративного остеогенеза экспериментальной группы выявлены GFP⁺-клетки, что подтверждало высвобождение плазмидных ДНК из структуры материалов, поступление в клетки-мишени и экспрессию в них. В экспериментальных группах наблюдался более выраженный ангиогенез, что может быть обусловлено повышенной экспрессией VEGF в экспериментальных группах за счет плазмидных ДНК.

Начиная с 30-х суток, на всех сроках наблюдения при использовании ГАКГ определялся более выраженный репаративный остеогенез (т.е. больший объем костного регенерата) со стороны костных опилов, по сравнению с контролем. Примечательно, что фрагменты ГАКГ, расположенные в центральной части дефектов, были окружены новообразованной костной тканью, что являлось прямым подтверждением остеоиндуктивного действия материала (рисунок). При использовании материалов без плазмидных ДНК остеоиндуктивного действия не наблюдалось, регенерат образовывался только со стороны костных опи-

left parietal bones were found; density of regenerate was similar to the one of loose fibrous connective tissue; inside the regenerate tissue we observed highly radiopaque particles, considered as fragments of the carriers. In 30 days after implantation of GABG1 the dimensions of injuries were decreased by 1–3 mm in average, their outlines became jagged. In the control group 1, the edges of the injuries also become less distinct if compared with day 15; initial rounded shape and size were preserved. Generally, during whole observation term radiopacity of regenerates in the experimental groups was higher and the dimensions of the visible injury of the parietal bone were less than that in the control groups.

Computed tomography data were confirmed histologically. In 15 days after grafting the defects in all the groups were filled with fibrous connective tissue with reactive changes, which included the fragments of carriers. Along the bonesaw-line we observed the thin layer of regenerate bone consisted of reticular fibrous bone tissue. In the areas of reparative osteogenesis in experimental group we found GFP⁺ cells, that confirmed the release of plasmid DNA from the scaffold, its delivery into target cells and expression therein. The experimental groups were characterized with more evident angiogenesis, which may be caused by increased expression of VEGF in the experimental groups due to the presence of plasmid DNA.

Starting from day 30 after grafting all the observation terms were characterized by more pronounced reparative



Регенерат в области костных дефектов на 30-е сутки после имплантации: **А** – экспериментальная группа 1 (ГАКГ1), **В** – контрольная группа 1 (носитель без плазмид); $\times 100$; окраска по Массону-Голднеру.

Regenerate in bone injury area on day 30 after grafting: **A** – experimental group 1 (GABG1), **B** – 1 control group (carrier without plasmid DNA); $\times 100$; staining according to Masson-Goldner.

лов. Необходимо отметить, что, начиная с 45-х суток, наибольший объем костного регенерата выявляли в экспериментальной группе 2, т. е. ксеногенный депро-теинизированный костный матрикс, выбранный в качестве носителя для плазмидных ДНК, обладал большим остеокондуктивным действием, по сравнению с композиционным матриксом из коллагена и гидроксиапатита.

Проведенный гистоморфометрический анализ подтвердил данные гистологических наблюдений: объем костного регенерата в группах с ГАКГ был значимо выше ($p < 0,05$) по сравнению с контрольными группами. Полученные нами данные согласуются с результатами других исследований в рамках генной индукции репаративного остеогенеза [6].

Таким образом, экспериментально показана возможность успешной генной индукции репаративного остеогенеза с помощью плазмидных ДНК с геном *vegf*, введенных в область дефекта. Степень восстановления целостности костной ткани в зоне дефекта зависела не только от воздействия биологически активных компонентов – генных конструкций, но и от выраженности остеокондуктивных свойств носителя. Успешные результаты экспериментов закладывают основу для будущих клинических исследований.

Литература

1. Гололобов В.Г., Дулаев А.К., Деев Р.В. и др. Морфофункциональная организация, реактивность и регенерация костной ткани. – СПб, 2006. – 47 с.
2. Дробышев А.Ю. Клинико-экспериментальное обоснование применения биоконпозиционных материалов при костно-восстановительных операциях на челюстях: Дисс. ... на соиск. ст. д-ра. мед. наук. – М.: МГМСУ, 1999. – 248 с.
3. Дробышев А.Ю., Киселев А.А. Применение distractionного метода у больных при дефектах и атрофии альвеолярной части нижней челюсти. – М., 2007. – 62 с.
4. Хирургическая стоматология и челюстно-лицевая хирургия. Национальное руководство / Под ред. Л.А. Кулакова, Т.Г. Робустовой, Л.И. Неробеевой. – М.: «ГЭОТАР-Медиа», 2010. – 928 с.
5. Червяков Ю.В., Староверов И.Н., Нерсисян Е.Г. и др. Терапевтический ангиогенез в лечении больных с хроническими облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей: ближайшие и отдаленные результаты // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2012. – Т. 18, №3. – С.19–27.
6. Geiger F., Bertram H., Berger I. et al. Vascular endothelial growth factor gene-activated matrix (VEGF165-GAM) enhances osteogenesis and angiogenesis in large segmental bone defects // J. Bone Miner. Res. – 2005. – Vol. 20, №11. – P. 2028–2035.
7. Krompecher S. Reaction of tissue differentiation to various effects in granulating bone surface, particularly in callus formation // Langenbecks Arch. Klin. Chir. Ver. Dtsch. Z. Chir. – 1956. – Vol. 281, №5. – P. 472–512.

osteogenesis (in terms of bigger amount of bone regenerate) along bonesaw-line in case of GABG if compared with the control. It was noteworthy that GABG fragments located in the central part of the defects were surrounded by newly formed bone tissue, that could be a direct confirmation of osteoinductive action of the graft (Figure). Application of the grafts without plasmid DNA did not allow to see any osteoinductive action: regenerate was formed only along the bonesaw-line. It should be noted that, starting from the 45th day the greatest amount of bone regenerate was found in the experimental group 2, *i. e.* xenogenic deproteinized bone matrix selected as a carrier for the plasmid DNA possessed higher osteoinductive effect if compared with collagen and hydroxyapatite composite.

Performed histomorphometric analysis confirmed the data of histological observation: volume of bone regenerate bone in groups with GABG implantation was significantly higher ($p < 0,05$) if compared with the control groups. Our findings are consistent with the reported data of studies concerned with gene induction of reparative osteogenesis [6].

Collectively, the possibility of successful gene induction of reparative osteogenesis using plasmid DNA vectors with *vegf* gene, introduced into the injured area, was experimentally demonstrated. Amplitude of bone tissue integrity restoration in the injured zone depended both on the effect of biologically active components, *i. e.* the gene constructs, and the expression of osteoconductive properties of the carrier as well. Successful outcomes of the experiments lay the foundation for future clinical studies.

References

1. Gololobov V.G., Dulayev A.K., Deev R.V. et al. Morphofunctional organization, reactivity and regeneration of bone tissue. – St.-Petersburg, 2006. – 47 p.
2. Drobyshev A.Yu. Clinical and experimental substantiation of biocomposite material application for bone-reconstructive surgeries in jaws: Dissertation of Dr. Med. Sci. – Moscow: Moscow State University of Medicine and Dentistry, 1999. – 248 p.
3. Drobyshev A.Yu., Kiselev A.A. Application of distraction method in patients with defects and atrophies of mandibular sinus floor. – Moscow, 2007. – 62 p.
4. Dental and maxillofacial surgery. National guidelines / Ed by. L.A. Kulakov, T.G. Robustova, L.I. Nerobeeva. – Moscow: GEOTAR-Media, 2010. – 928 p.
5. Chervakov Iu.V., Staroverov I.N., Nersesyan E.G. et al. Therapeutic angiogenesis in treatment of patients with chronic obliterating diseases of lower limb arteries // Angiol. Sosud. Khir. – 2012. – Vol. 18, N3. – P. 19–27.
6. Geiger F., Bertram H., Berger I. et al. Vascular endothelial growth factor gene-activated matrix (VEGF165-GAM) enhances osteogenesis and angiogenesis in large segmental bone defects // J. Bone Miner. Res. – 2005. – Vol. 20, N11. – P. 2028–2035.
7. Krompecher S. Reaction of tissue differentiation to various effects in granulating bone surface, particularly in callus formation // Langenbecks Arch. Klin. Chir. Ver. Dtsch. Z. Chir. – 1956. – Vol. 281, N5. – P. 472–512.

