

Научная статья

УДК 616.988.5:575.113.5

doi:10.18499/2225-7357-2024-13-4-61-74

3.3.2 – патологическая анатомия



## Периимплантационное таргетирование с помощью модифицированных аденовирусных векторов

Н. Б. Серезжникова<sup>✉</sup>, А. Л. Файзуллин, А. А. Антошин, А. А. Тимакова,  
Е. И. Иванова, Б. П. Ершов, Н. М. Файзуллина, И. В. Уласов,  
А. С. Малоголовкин, С. Л. Котова, П. С. Тимашев

Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова  
(Сеченовский Университет), Москва, Россия

**Аннотация.** Цель исследования – провести сравнительный морфологический анализ влияния имплантации и модифицированного аденовируса Ad 5/3 на эффективность локальной доставки генов в клетки периимплантационной ниши *in vivo*. **Материал и методы.** Эксперименты проводились на лабораторных крысах, которым были имплантированы коллагеновые мембраны сроком на 2 недели. Через 3 и 7 дней после введения аденовирусов (wt, Ad 5/3) ткани фиксировали для гистологического исследования и анализа трансдуцированных клеток методом *in situ* ПЦР. **Результаты.** Установлено, что наличие коллагенового имплантата улучшало биораспределение вирусных частиц, а модификация Ad 5/3 значительно повышала эффективность трансдукции фибробластов и макрофагов в периимплантационной зоне. При отсутствии имплантата эффективность трансдукции снижалась для обоих типов аденовирусов. Морфометрический анализ выявил, что основными трансдуцированными клетками были фибробласты соединительнотканной капсулы, окружающей имплантат. **Заключение.** На основании сравнительного морфологического и молекулярно-биологического исследования был определен оптимальный протокол локальной доставки генов с помощью аденовирусных векторов для задач периимплантационного таргетирования. Было охарактеризовано влияние модификации аденовируса на тропность и эффективность доставки гена в клеточные компоненты периимплантационной ниши, и установлено, что Ad 5/3 по этим параметрам значительно превосходит Ad wt. Развитие и дальнейшее применение предлагаемого нами метода периимплантационного таргетирования способно обеспечить локальную, эффективную и безопасную доставку генов, что позволит значительно расширить показания к генной терапии и ее доступность для врачей и пациентов. Кроме того, данный метод может быть адаптирован для использования в различных органах и при различных заболеваниях.

**Ключевые слова:** периимплантационная ниша; имплантируемые биоматериалы; репаративная регенерация; биораспределение; аденовирус; локальная доставка генов; генная терапия; ПЦР *in situ*

**Финансирование:** исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-15-00467.

**Конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Для цитирования:** Серезжникова Н.Б., Файзуллин А.Л., Антошин А.А., Тимакова А.А., Иванова Е.И., Ершов Б.П., Файзуллина Н.М., Уласов И.В., Малоголовкин А.С., Котова С.Л., Тимашев П.С. Периимплантационное таргетирование с помощью модифицированных аденовирусных векторов // Журнал анатомии и гистопатологии. 2024. Т. 13, №4. С. 61–74. <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2024-13-4-61-74>

### ORIGINAL ARTICLES

Original article

## Peri-Implantation Targeting Using Modified Adenoviral Vectors

N. B. Serezhnikova<sup>✉</sup>, A. L. Faizullin, A. A. Antoshin, A. A. Timakova, E. I. Ivanova,  
B. P. Ershov, N. M. Faizullina, I. V. Ulasov, A. S. Malogolovkin,  
S. L. Kotova, P. S. Timashev

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

**Abstract.** The aim was to conduct a comparative morphological analysis of the effect of implantation and modified adenovirus Ad 5/3 on the efficiency of local gene delivery to cells of the peri-implantation niche *in vivo*. **Material and methods.** The experiments were carried out on laboratory rats, which were implanted with collagen membranes for a period of 2 weeks. Three and seven days after the introduction of adenoviruses (wt, Ad 5/3), the tissues were fixed for histological examination and analysis of transduced cells by *in situ* PCR. **Results.** The results showed that the presence of a collagen implant improved the biodistribution of viral particles, and the modification of Ad 5/3 significantly increased the efficiency of transduction of fibroblasts and macrophages in

© Серезжникова Н.Б., Файзуллин А.Л., Антошин А.А., Тимакова А.А., Иванова Е.И., Ершов Б.П., Файзуллина Н.М., Уласов И.В., Малоголовкин А.С., Котова С.Л., Тимашев П.С., 2024

the peri-implantation zone. In the absence of an implant, the transduction efficiency decreased for both types of adenoviruses. Morphometric analysis revealed that the main transduced cells were fibroblasts of the connective tissue capsule surrounding the implant. **Conclusion.** Based on comparative morphological and molecular biological studies, an optimal protocol for local gene delivery using adenoviral vectors for peri-implantation targeting was determined. The effect of adenovirus modification on the tropism and efficiency of gene delivery to the cellular components of the PIN was characterized, and it was found that Ad 5/3 significantly exceeds AD wt in these parameters. The development and further application of the peri-implantation targeting method proposed by us can ensure local, effective and safe gene delivery, which will significantly expand the indications for gene therapy and its availability to doctors and patients. In addition, this method can be adapted for use in various organs and for various diseases.

**Keywords:** peri-implantation niche; implantable biomaterials; reparative regeneration; biodistribution; adenovirus; local gene delivery; gene therapy; in situ PCR

**Funding:** the study was supported by grant No. 22-15-00467 from the Russian Science Foundation.

**Conflict of interests:** the authors declare no conflict of interests.

**For citation:** Serezhnikova N.B., Faizullin A.L., Antoshin A.A., Timakova A.A., Ivanova E.I., Ershov B.P., Faizullina N.M., Ulasov I.V., Malogolovkin A.S., Kotova S.L., Timashev P.S. Peri-implantation targeting using modified adenoviral vectors. Journal of Anatomy and Histopathology. 2024. V. 13, №4. P. 61–74. <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2024-13-4-61-74>

## Введение

Генная терапия представляет собой передовую медицинскую технологию, направленную на коррекцию патологических процессов или стимуляцию репарации и регенерации. Это наиболее специфичный и патогенетически обоснованный метод лечения в современной медицине [6]. Суть генной терапии заключается во введении в соматические клетки пациента генетической информации в виде фрагментов ДНК, РНК или других молекул, способных кодировать пептиды и белки. Клетки-мишени, получив новые генные фрагменты, приобретают способность синтезировать белковые факторы, такие как ферменты, гормоны, цитокины, факторы роста или антитела. Таким образом, вместо внешнего получения лекарств, клетки организма «обучаются» самостоятельно их производить.

Введение генетического материала может осуществляться *ex vivo* – с предварительной обработкой клеток пациента вне организма и последующим возвращением их в нужный участок тела или кровотока [18], или *in situ* – непосредственно на месте, либо системно через кровоток [12]. Несмотря на многочисленные биомедицинские и экономические преимущества генной терапии, ключевой проблемой остается доставка генетических материалов в строго определенные органы, ткани и клетки-мишени, а также обеспечение локальной экспрессии генов без разрушения введенного материала эндогенными системами защиты организма [19]. Использование имплантатов открывает перспективы решения этой проблемы, обеспечивая адресную доставку генетического материала в определенные клетки и ткани для эффективной и безопасной трансдукции в пределах заданной анатомической области без утечки генов в другие участки тела.

Первый шаг в решении задачи доставки – упаковка генетических материалов в специальные носители, называемые векторами. Векторы могут быть вирусными (способными самостоятельно проникать в клетки через свя-

зывание с определенными рецепторами) или невирусными (проникающими в клетки через повреждения мембран или связывание лигандов с рецепторами). В нашем проекте используются специально модифицированные аденовирусные векторы, которые способны проникать в клетки, но не реплицироваться и не интегрироваться в геном клетки-мишени, что обеспечивает временную экспрессию закодированных белков [7]. Исходные аденовирусы обладают низкой патогенностью для человека и обычно вызывают симптомы легкой простуды.

Второй шаг – преодоление циркуляторных и тканевых барьеров для доставки векторов в заданные ткани и клетки-мишени. Решением стало введение векторов непосредственно в ткани с помощью имплантатов, что позволяет доставить высокую концентрацию векторов прямо к клеткам-мишеням и избежать нецелевых эффектов. Однако не все клетки вокруг имплантата способны эффективно поглощать вектор без ущерба для собственного выживания. Оптимальным решением является использование векторов, способных связываться с клетками через специфические рецепторы [14, 17]. Аденовирусные векторы обладают такой способностью, но не все клетки организма экспрессируют рецепторы аденовирусов. Клетки в зонах воспаления, регенерации, ран и опухолей имеют высокую экспрессию этих рецепторов и могут служить мишенями для аденовирусных векторов.

В данном проекте мы предлагаем новый метод локальной доставки генетических материалов, универсально применимый для любых клеток, тканей и органов человека, который мы назвали периимплантационным таргетированием. Учитывая, что рецепторы аденовирусов присутствуют на клетках в зонах репаративного воспаления, мы предлагаем искусственно создавать такие области путем введения небольших имплантатов. Одновременно с имплантатом в ткань вводятся аденовирусные векторы.

Целью данной работы было оценить эффективность и специфичность трансдукции

клеток периимплантационной ниши у крыс с имплантированными подкожно коллагеновыми мембранами на 3-и и 7-е сутки после инъекции модифицированных аденовирусных векторов Ad5/3 и AD wt.

### Материал и методы исследования

*Получение свиных коллагеновых мембран для имплантации.* Для исследования коллагеновые мембраны получали с помощью электрофоретического осаждения [2]. Полученные таким образом мембраны обладали высокой стабильностью, что обеспечивало контролируемые условия тканевого ответа. Для создания коллагеновых мембран использовали коллагеновый материал, полученный из децеллюляризованных тканей животных. Для экстракции коллагена свежезамороженные сухожилия крупного рогатого скота размораживали и разрезали на фрагменты толщиной 1 см, затем подвергали обработке в 0,5 М NaCl, гомогенизировали в 0,5 М уксусной кислоте (12 ч) и осуществляли гидролиз с 0,1% пепсином (12 ч). Останавливали гидролиз, доводя 1 М NaOH pH суспензии до 7,5, а затем пересаждали 2 М NaCl. Образовавшийся коллагеновый осадок повторно растворяли в 0,5 М уксусной кислоте и диализировали против 0,5 М уксусной кислоты в течение 3 дней с ежедневной сменой диализирующего раствора. Конечную концентрацию коллагена в суспензии анализировали гравиметрическим методом. Затем получали коллагеновые мембраны путем последовательного электрофоретического осаждения (3 цикла по 20 мин) суспензии коллагена (в концентрации 5 мг/мл). Осаждение проводили в электрохимической ячейке, разделенной на две части полупроницаемым барьером из регенерированной целлюлозы (Sigma-Aldrich, США) и содержащей пластинчатые электроды с подключенным к ним источником постоянного тока с напряжением 60 В. Полученные мембраны отслаивали от поверхности полупроницаемого барьера и обрабатывали в изопропиловом спирте, а затем высушивали внутри ламинарного шкафа. Сшивку коллагеновых мембран проводили 0,625% раствором генипина (FUJIFILM Wako Pure Chemicals, Япония) в 80% этаноле (12 ч, 37°C).

*Получение аденовирусных векторов Ad 5/3 и AD wt.* Шаттл-вектор pShuttle-IRES-LacZ был рекомбинирован в электрокомпетентных клетках *E. coli* штамма BJ5183 (Agilent) с плазмидными векторами (Ad5-deltaE1/deltaE3) и (Ad3-deltaE1/deltaE3), соответствующими полноразмерному геному аденовируса человека 2.5 серотипа, но содержащие делеции в геноме в областях E1 и E3 (Ad3-deltaE1/deltaE3) с получением дефектного по репликации аденовирусных вектора (AdLacZ), содержащих замену белка фибер серотипа человека типа 5 на 3. Для электропорации мы

взяли аликвоту компетентных клеток в объеме 40 мкл на льду, в которую добавили 1 мкг Ad5-deltaE1/deltaE3 и Ad3-deltaE1/deltaE3 вектора и смешали их с 300 нг плазмидой (pShuttle-IRES-LacZ). Затем клетки переместили в кювету для электропорации в следующих условиях: 200  $\Omega$ , 2,5 kV, 25  $\mu$ F. После чего к клеткам в кювете добавили 1 мл SOC стерильной бактериальной среды, перенесли клетки в эппендорф и оставили восстанавливаться после электрошока еще 1 час при температуре 37°C. Бактериальные культуры сеяли в объеме 100–200 мкл в чашку Петри с агаром, содержащим Канамицин. На следующий день отбирали единичные клоны. Полученные бактериальные клоны (всего 15 различных клонов на рекомбинацию, выросших на агаре, содержащем канамицин) были нарощены в 4 мл LB среды, содержащего Канамицин. Из пула бактерий была выделена ДНК, и размер ДНК выделенных рекомбинантных клонов был исследован с контролем в виде циркулярной формы плазмиды Ad3-deltaE1/deltaE3 (Ad5-deltaE1/deltaE3). Наши данные говорят, что все 15 выбранных клонов имели ДНК с высоким молекулярным весом и, в дальнейшем, они взяты в реакцию рестрикции с рестриктазой Pac1. Такую реакцию ставили в объеме 10 мкл на образец в течение 2 часов. Результаты рестрикции были также исследованы в агарозном геле (1% гель) против контроля Ad3-deltaE1/deltaE3 (Ad5-deltaE1/deltaE3), также обработанного Pac1. Перед трансфекцией HEK293 клеток мы препаративно нарастили по одному бактериальному клону в объеме 200 мл LB, выделили тотальную бактериальную ДНК набором кампании Евроген (миди набор). Измерили качество и количество выделенной ДНК спектрофотометрически, затем 30 мкг мы порезали рестриктазой Pac1 в присутствии избыточного количества фермента в течение ночи при температуре 37°C в объеме 50 мкл. На следующий день препаративно высокомолекулярный плазмидный фрагмент ДНК был вырезан из агарозного геля с помощью набора кампании Евроген и растворен в пределах концентрации 200–300 нг на 1 мкл деионизированной воды и заморожен при -20°C. Для наращивания вируса мы взяли 5 мкг полученного фрагмента и провели трансдукцию HEK293 (80% монослой, T25 матрас,  $2 \times 10^6$  клеток) с использованием липосом. После трансфекции клеткам меняли среду каждые 3 дня до появления повреждений монослоя клеток, вызванных цитопатическим действием аденовируса. Затем вирус наращивали по стандартной технологии и титровали на клетках линии HEK293. Инфекционный титр для Ad5/3 и Ad wt составлял  $10^{12}$  инфекционных частиц на клетку. Аликвоты вирусов были заморожены при минус 80°C.

*Манипуляции с животными.* Для имплантации *in vivo* коллагеновые мембраны

были предварительно стерилизованы этанолом. Имплантацию проводили крысам линии Wistar, весившим  $210 \pm 20$  г.

Эксперимент был одобрен локальным этическим комитетом Сеченовского Университета.

Животных содержали в стандартных условиях вивария: по 3–4 самца в клетке. Анестезию проводили препаратами Золетил 1,5 мг/кг и Ксила 0,2 мг/кг внутривенно. Предварительно на спине в месте инъекции сбривали шерсть. У каждого животного тупым разрезом скальпеля было сделано два подкожных имплантационных кармана. Сформированные карманы промывали 0,05% водным раствором хлоргексидина. Стерильные мембраны размером  $10 \times 10 \times 1$  мм помещали в карманы. Хирургическую рану плотно ушивали прерывистыми швами. Для профилактики гнойно-септических осложнений животные получали энрофлоксацин перорально в течение 7 дней. Через 2 недели после имплантации мембран в область импланта при помощи инсулинового шприца были введены 200 мкл раствора, содержащего аденовирусные векторы в трех дозах: 1011 (высокой), 1010 (средней) и 109 (низкой) в.ч./мл. В правый подкожный карман инъецировали аденовирусный вектор Ad 5/3, в левый подкожный карман – Ad wt. Для доказательства, что формирование капсулы способствует более эффективной трансдукции клеток были введены контрольные группы без имплантата, но с инъекцией вирусных частиц в разной концентрации.

Животных выводили из эксперимента на 3-и и 7-е дни после инъекционного введения аденовирусных векторов. Таким образом, общая продолжительность эксперимента составляла 17 и 21 день. В день выведения из эксперимента с помощью передозировки Золетила у самцов крыс забирали имплант с кожей и окружающими мягкими тканями. Образцы тканей помещали в 10% нейтральный забуференный формалин (Биовитрум, Россия) и отправляли на гистологическое исследование.

**Гистологический анализ.** В эксперименте было исследовано 72 образца мягких тканей в участке имплантации коллагеновых мембран (кожа, мембрана, соединительнотканная капсула) от лабораторных крыс, которым инъекционно были введены аденовирусные векторы, а также 24 образца мягких тканей контрольных групп с инъецированными вирусными частицами, но без имплантированных коллагеновых мембран. Образцы тканей фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине (Биовитрум, Россия) в течение суток. После чего проводили стандартную проводку в изопропанол и заливали в парафин (Биовитрум, Россия). На микротоме Leica RM 2125RTS (Leica Microsystems, Germany) изготавливали срезы толщиной 4 мкм, окрашивали гематоксилином и эози-

ном (Биовитрум, Россия) и по Маллори (Биовитрум, Россия) по стандартным протоколам. Гистопрепараты исследовали с помощью универсального светового микроскопа Leica DM 4000 B LED (Leica Microsystems, Германия) с камерой Leica DFC 7000 (Leica Microsystems, Германия) под управлением программного обеспечения LAS V4.8 (Leica Microsystems, Германия). Также гистопрепараты были оцифрованы на гистосканере NanoZoomer S20MD (Hamamatsu, Япония) для проведения морфологического анализа. На гистопрепаратах оценивали состояние и степень биодеградации коллагеновой мембраны, воспалительные и фибротические изменения в соединительнотканной капсуле, состояние окружающих тканей.

**Полимеразная цепная реакция (ПЦР) in situ.** Образцы тканей подготавливали для проведения полимеразной цепной реакции in situ с помощью антигенной демаскировки, проводимой при  $70^\circ\text{C}$  в течение 30 мин в демаскирующем буфере (Antigen retrieval buffer 100x Tris-EDTA, pH 9) (Abcam, Великобритания). Амплификацию аденовирусной ДНК осуществляли на амплификаторе для ПЦР in situ (Eppendorf, Германия). Использовали праймеры к гену pVI, кодирующему гексон-ассоциированный белок (AAA92214.1), имеющийся у аденовирусов Ad 5/3 и Ad wt. Для конструирования праймеров был использован онлайн-блок Primer-BLAST, интегрированный в базу данных NCBI. Прямой праймер 5'-3': TCAACTTTGCGTCTCTGGCC, обратный праймер 5'-3': GCGGGGATCAAGCTTACTGT с концентрацией  $1 \mu\text{M}$ . В смесь для амплификации входили флуоресцеин-12-dUTP 1/3 (Sileks, Россия), Taq-полимераза, Taq-буфер, деионизированная вода (Евроген, Россия). Режим амплификации 30 циклов (денатурация  $95^\circ\text{C}$ , 2 мин, денатурация  $95^\circ\text{C}$ , 15 с, отжиг  $60^\circ\text{C}$ , 15 с, элонгация  $72^\circ\text{C}$ , 30 с). Нарботанный меченный амплификат фиксировали на срезе ткани инкубацией в 96% этаноле в течение 10 мин. На следующем этапе контрастировали ядра, добавив к срезу ткани DAPI (NucBlue, LifeTechnologies, США) и закрыв срез покровным стеклом. Анализировали результаты проведения ПЦР in situ на конфокальном микроскопе Olympus FV3000 (Olympus, Япония).

**Морфометрический анализ.** В программах NDP.view2 (Hamamatsu, Япония) на гистосканах при увеличении  $\times 200$  измеряли толщину имплантированной коллагеновой мембраны, толщину фиброзной капсулы, плотность макрофагов, гигантских многоядерных клеток, лимфоцитов, капилляров на  $1 \text{ мм}^2$  площади фиброзной капсулы. В программе ImageJv1.54j (GraphPadSoftware, США) на микрофотографиях конфокального микроскопа при увеличении  $\times 100$  оценивали относительную интенсивность флуоресценции трансдуцированных клеток.

**Статистический анализ.** Статистический анализ экспериментальных данных проводился с использованием программного обеспечения GraphPadPrism 10.00. Нормальность распределения определяли с помощью теста Шапиро–Уилка ( $\alpha > 0,05$ ). Достоверность различий оценивали с помощью двухфакторного анализа ANOVA с тестом множественного сравнения. Значения  $p < 0,05$  считались статистически значимыми. Результаты статистического анализа были представлены в виде гистограмм медиан и интерквартильного размаха (для результатов балльного анализа) или средних значений и ошибок среднего (для результатов измерений).

### Результаты и обсуждение

При исследовании с помощью светлой и флуоресцентной микроскопией образцов мягких тканей в участках имплантации коллагеновых мембран после инъекции аденовирусов в 3 разных концентрациях ( $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$  в.ч./мл), наиболее информативная картина биораспределения была получена при использовании высокой дозы аденовирусных векторов, а именно  $10^{11}$  в.ч./мл. На этих экспериментальных и контрольных группах в дальнейшем и был сделан акцент при морфологическом описании.

Состояние дермальной части кожи в участке имплантации через 3 и 7 суток после инъекции аденовирусов в высокой концентрации было без признаков атипичии и представлено эпидермисом с подлежащей дермой, фиброзно-жировой и мышечной тканями (рис. 1, 3). В эпидермисе выявлялся незначительный акантоз, сосочковый и сетчатый слой дермы имели нормальную структуру с характерным для дермы переплетением пучков коллагеновых волокон. Кровеносные сосуды были не изменены, периваскулярная лимфомакрофагальная инфильтрация отсутствовала. В дерме содержались многочисленные волосяные фолликулы нормальной структуры. Через 3 суток после инъекции аденовирусы обоих типов трансдуцировали, главным образом, клетки волосяных фолликулов и фибробласты в дерме (рис. 1, с–1). Сравнительный анализ интенсивности флуоресценции показал, что на этом сроке эффективность трансдукции клеток в дермальной части кожи вирусом AD 5/3 в несколько раз превышала этот параметр для вируса AD wt (рис. 2, а). Через 7 суток после инъекции аденовирусов экспрессия вирусного белка в дерме снижалась для обоих типов вирусов и выявлялась только в клетках волосяных фолликулов дермы (рис. 3, с–1). Разницы по интенсивности трансдукции между аденовирусами на данном временном сроке выявлено не было. Следует отметить, что в образцах с подкожной имплантацией интенсивность экспрессии вирусного белка клетками дермы на всех времен-

ных сроках значительно превышала данный параметр для контрольных образцов (с инъекцией аденовирусов, но без имплантации) (рис. 1–3).

В периимплантационной области через 3 суток после инъекции аденовирусов обоих типов выявлялась имплантированная коллагеновая мембрана разной толщины, состоявшая из плотно упакованных и параллельно ориентированных коллагеновых волокон, окрашивающихся по Маллори в голубой цвет (рис. 4). Коллагеновая мембрана была окружена фиброзной соединительнотканной капсулой, состоящей из продольно расположенных коллагеновых волокон и находящимися между ними многочисленными фибробластами. Соединительнотканная капсула была инфильтрирована макрофагами, единичными гигантскими многоядерными клетками и лимфоцитами, а также пронизана новообразованными тонкостенными капиллярами. Коллагеновая мембрана на данном временном сроке интенсивно инфильтрировалась макрофагами, подвергалась активной резорбции и прорастала клетками из окружающих тканей. Хотя в отдельных участках оставались еще достаточно крупные фрагменты имплантата нативной структуры, не подвергшиеся инфильтрации, резорбции и прорастанию. Морфометрический анализ показал, что при использовании вектора Ad 5/3 по сравнению с Ad wt толщина коллагеновой мембраны и фиброзной капсулы были значительно меньше (рис. 5). В режиме флуоресцентной микроскопии выраженная экспрессия вирусного белка выявлялась только в фибробластах соединительно-тканной капсулы, окружающей имплантат (рис. 4 с–1). При этом интенсивность трансдукции фибробластов капсулы аденовирусным вектором Ad 5/3 значительно превышала данный параметр для вектора Ad wt (рис. 2 б, 4).

При исследовании образцов через 7 суток после инъекции аденовирусных векторов наблюдалась схожая морфологическая картина в периимплантационной области (рис. 6). Коллагеновые мембраны, как и на более раннем сроке, были интенсивно инфильтрованы макрофагами, подвергались резорбции и прорастали фибробластами, хотя, по-прежнему, оставались еще достаточно крупные фрагменты коллагеновой мембраны нативной структуры. Окружающая имплантат соединительнотканная капсула становилось более зрелой, плотной и тонкой, в ней снижалось содержание клеток и капилляров. Следует отметить, что при использовании вектора Ad 5/3 по сравнению с Ad wt толщина фиброзной капсулы снижалась (рис. 5). На данном временном этапе экспрессия вирусного белка в клетках снижалась для обоих типов аденовирусных векторов. Однако она выявлялась теперь не только в фибробластах капсулы, но и в макрофагах, инфильтрирующих и резорбирую-

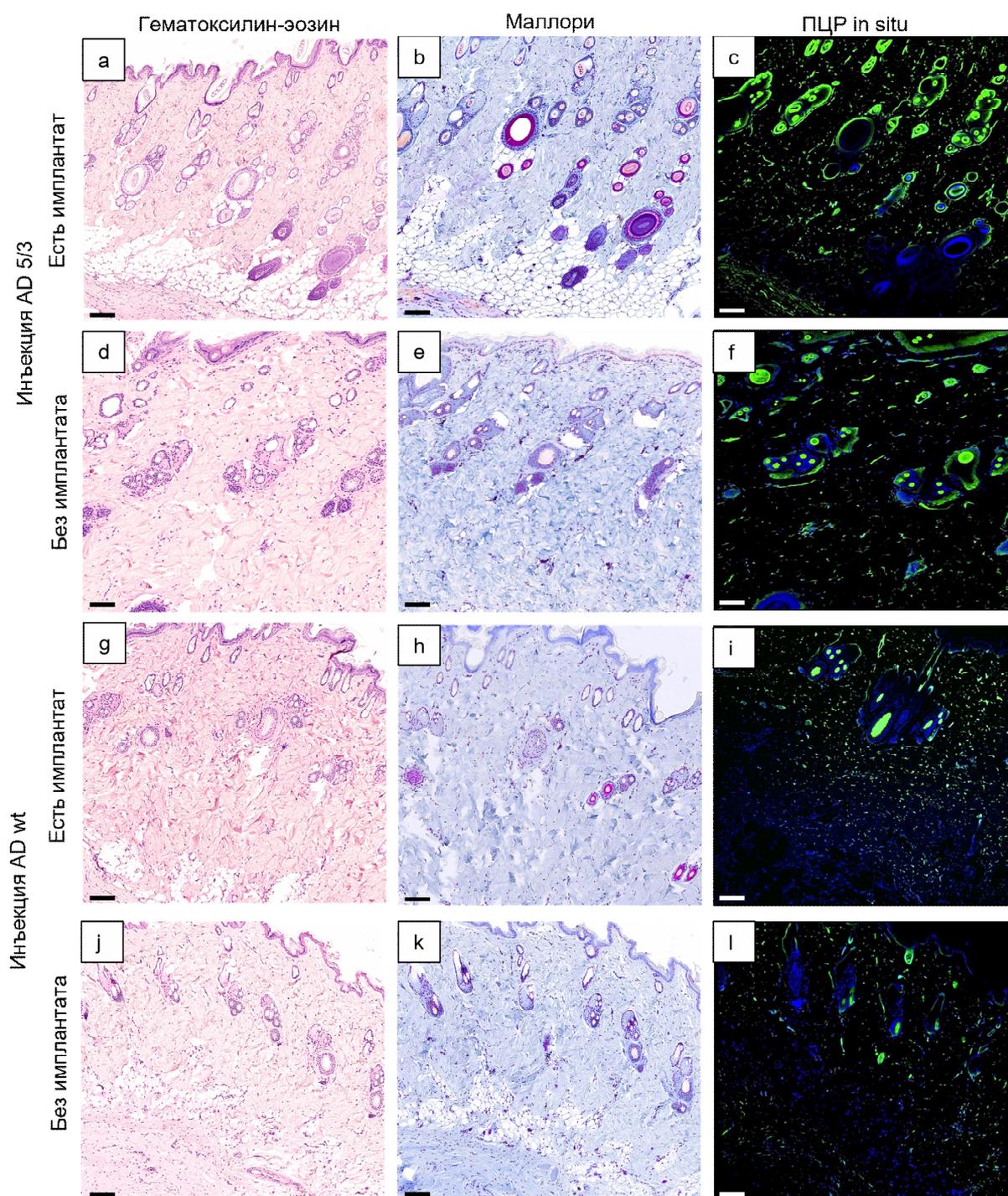


Рис. 1. Дерма кожи в участке имплантации через 3 суток после инъекции аденовирусных векторов Ad 5/3 и Ad wt. Светлопольная и конфокальная светооптическая микроскопия, масштабный отрезок соответствует 100 мкм.

Fig. 1. Skin dermis at the implantation site 3 days after injection of adenoviral vectors Ad 5/3 and Ad wt. Bright-field and confocal light-optical microscopy, scale bar corresponds to 100  $\mu$ m.

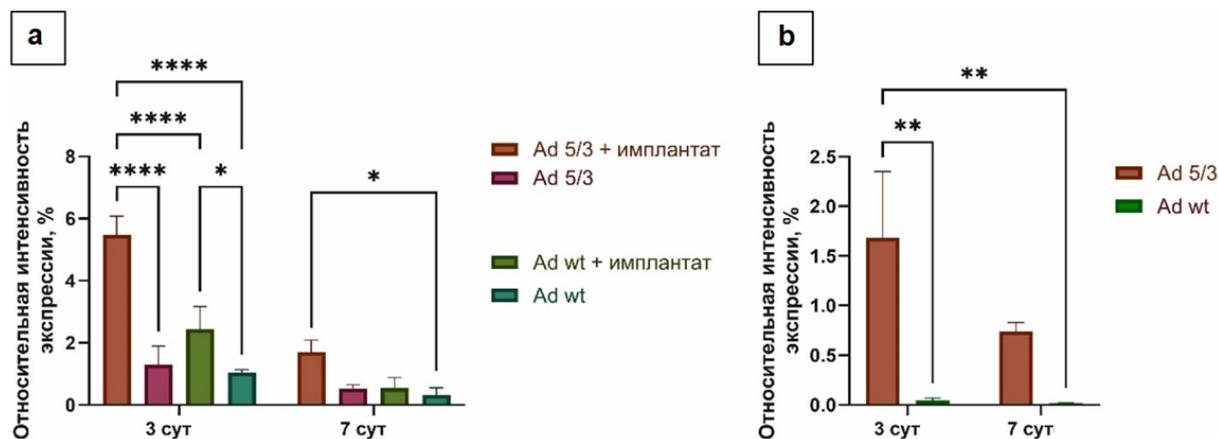


Рис. 2. Интенсивность флуоресценции трансдуцированных клеток в дерме (а) и периимплантационной области (б) через 3 и 7 суток после инъекции Ad 5/3 и Ad wt аденовирусов. Морфометрический и статистический анализ; \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\*\* –  $p < 0,0001$ .  
 Fig. 2. Fluorescence intensity of transduced cells in the dermis (a) and peri-implantation area (b) 3 and 7 days after injection of Ad 5/3 and Ad wt adenoviruses. Morphometric and statistical analysis; \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\*\* –  $p < 0,0001$ .

щих коллагеновую мембрану (рис. 6 с–l). При этом интенсивность трансдукции этих клеток Ad 5/3 по-прежнему превышала данный параметр для вирусного вектора Ad wt (рис. 2).

Современные достижения молекулярной медицины существенно расширили наше понимание возможностей генной терапии. На сегодняшний день более 80% заболеваний человека связаны с генетическими нарушениями или отклонениями в составе клеточного протеома [6]. Среди таких заболеваний – социально значимые патологии, как рак, диабет и атеросклероз. Развитие технологий секвенирования генома человека позволило идентифицировать множество генов, которые могут быть использованы в качестве мишеней для лечения генетических и инфекционных заболеваний. Однако ключевым вызовом, стоящим перед генной терапией, остается создание безопасных и эффективных систем доставки генетических материалов [19].

Генная терапия открывает возможности для создания терапевтических белков непосредственно в клетках пациента. Прогресс в разработке генетических конструкций позволяет значительно снизить риски, традиционно связанные с этой технологией, что ранее вызывало настороженность в ее применении [4]. Основные опасения касались использования вирусных векторов, способных интегрироваться в геном клетки-хозяина, что могло приводить к мутагенезу и развитию опухолей. Однако применение аденовирусных векторов, которые не интегрируются в геном, позволяет существенно минимизировать эти риски [3].

Ключевым результатом эксперимента стало то, что имплантация материала перед введением вирусного вектора способствовала его локальной задержке и интенсивной экспрессии. Наибольшая экспрессия наблюдалась в фибробластах, формирующих соединительнотканную капсулу вокруг имплантата. Специфичность доставки была достигнута

благодаря биологической особенности аденовирусных векторов, которые проникают в различные типы клеток в результате взаимодействия с мембранными рецепторами, такими как рецепторы Коксаки-аденовирусов (CAR), интегрины и CD46 [14, 17]. В отличие от невирусных векторов, которые, как правило, не обладают специфичностью и могут повреждать клеточные мембраны, аденовирусные векторы обеспечивают более точную доставку генетического материала в клетки-мишени [19]. Тем не менее, важно отметить, что в группе с использованием модифицированного вируса активная экспрессия также отмечалась в макрофагах, участвующих в резорбции коллагенового материала. Это наблюдение указывает на вероятность осложнений, связанных с миграцией генетически активированных макрофагов в лимфатическую систему.

Тем не менее, проблема адресной доставки генетических материалов остается главным препятствием для широкого внедрения генной терапии [15]. Основные барьеры включают быстрое удаление векторов из кровотока, разрушение внеклеточно локализованных фрагментов ДНК и органоспецифические барьеры, такие как гематоэнцефалический. Размер вирусных векторов позволяет использовать как пассивное биораспределение, так и активное таргетирование через рецепторы клеток, что делает их сходными с наночастицами по механизму доставки [8].

Одним из перспективных решений является использование имплантатов для локальной доставки векторов прямо в ткани [16]. Имплантаты служат локальными депо для векторов, защищая их от биодеградации и обеспечивая постепенное высвобождение в окружающие ткани. Это позволяет создать локальный терапевтический эффект, минимизируя системные побочные действия и необходимость многократных инъекций. Более

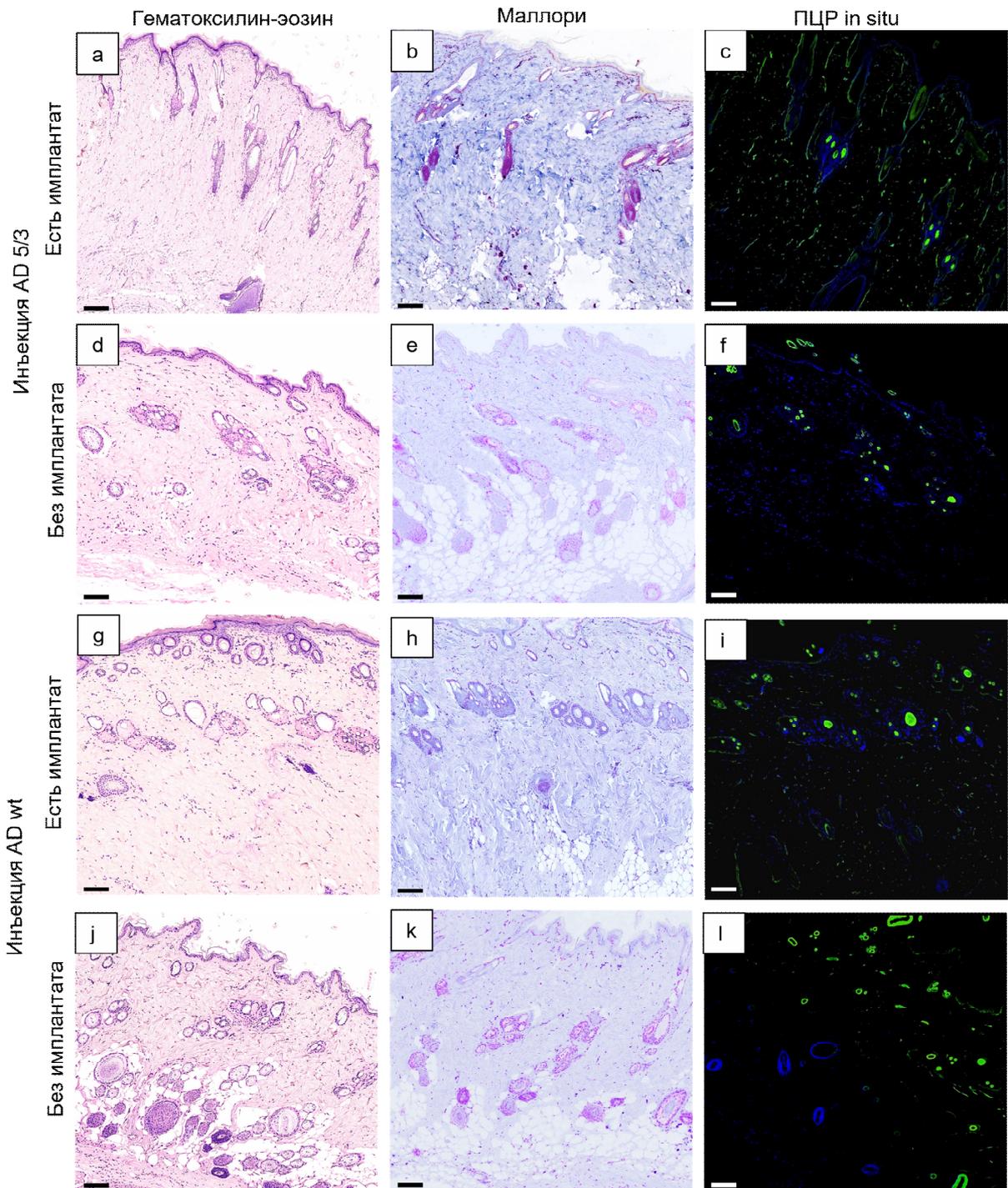


Рис. 3. Дерма кожи в участке имплантации через 7 суток после инъекции аденовирусных векторов Ad 5/3 (a–f) и Ad wt (g–l). Светлопольная и конфокальная светооптическая микроскопия. Масштабный отрезок – 100 мкм.

Fig. 3. Skin dermis at the implantation site 7 days after injection of adenoviral vectors Ad 5/3 (a–f) and Ad wt (g–l). Bright-field and confocal light-optical microscopy. Scale bar – 100  $\mu$ m.

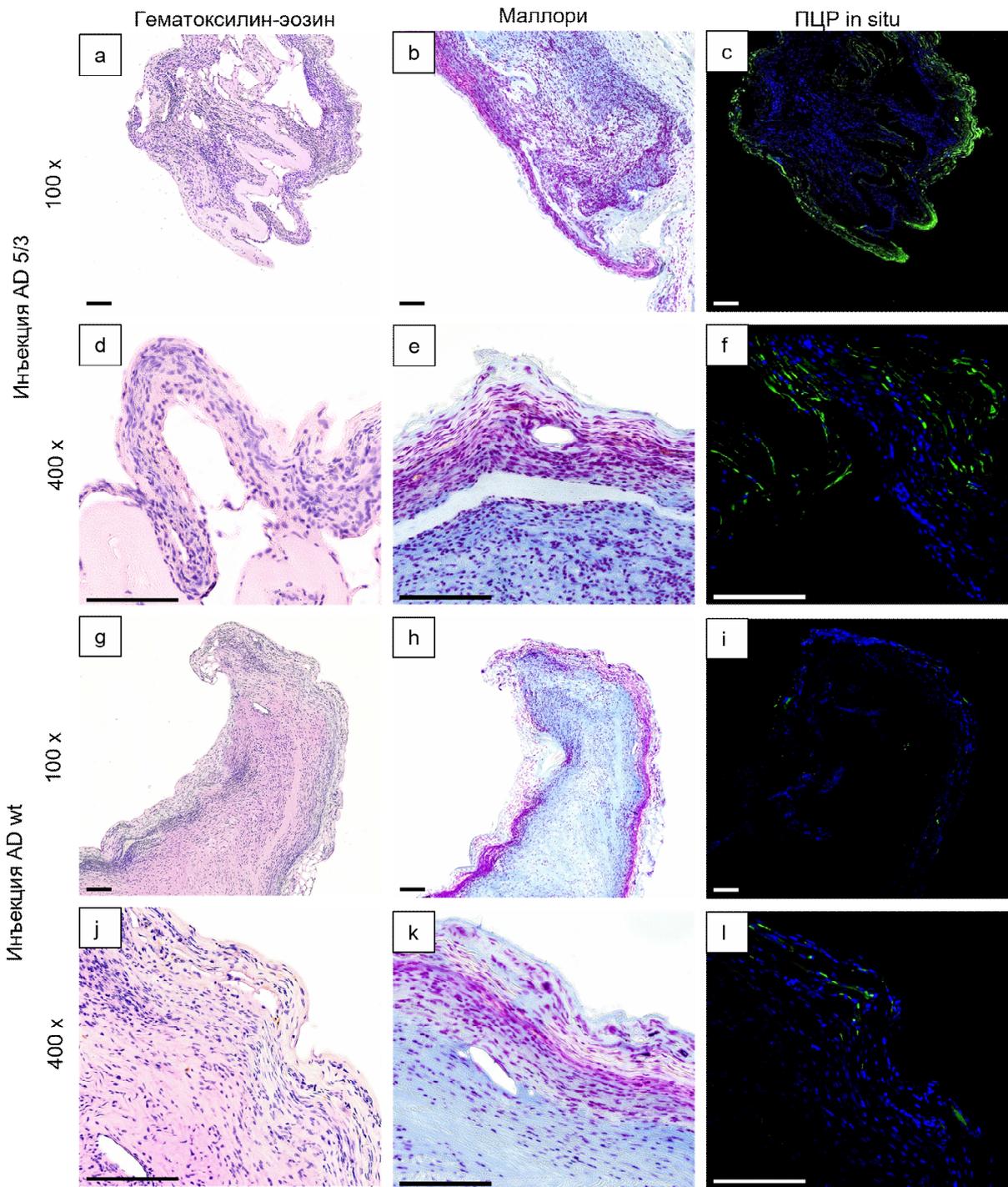


Рис. 4. Перимплантационная область через 3 суток после инъекции аденовирусных векторов Ad 5/3 (a–f) и Ad wt (g–l). Светлопольная и конфокальная светооптическая микроскопия. Масштабный отрезок – 100 мкм.

Fig. 4. Peri-implantation area 3 days after injection of adenoviral vectors Ad 5/3 (a–f) and Ad wt (g–l). Bright-field and confocal light-optical microscopy. Scale bar – 100  $\mu$ m.

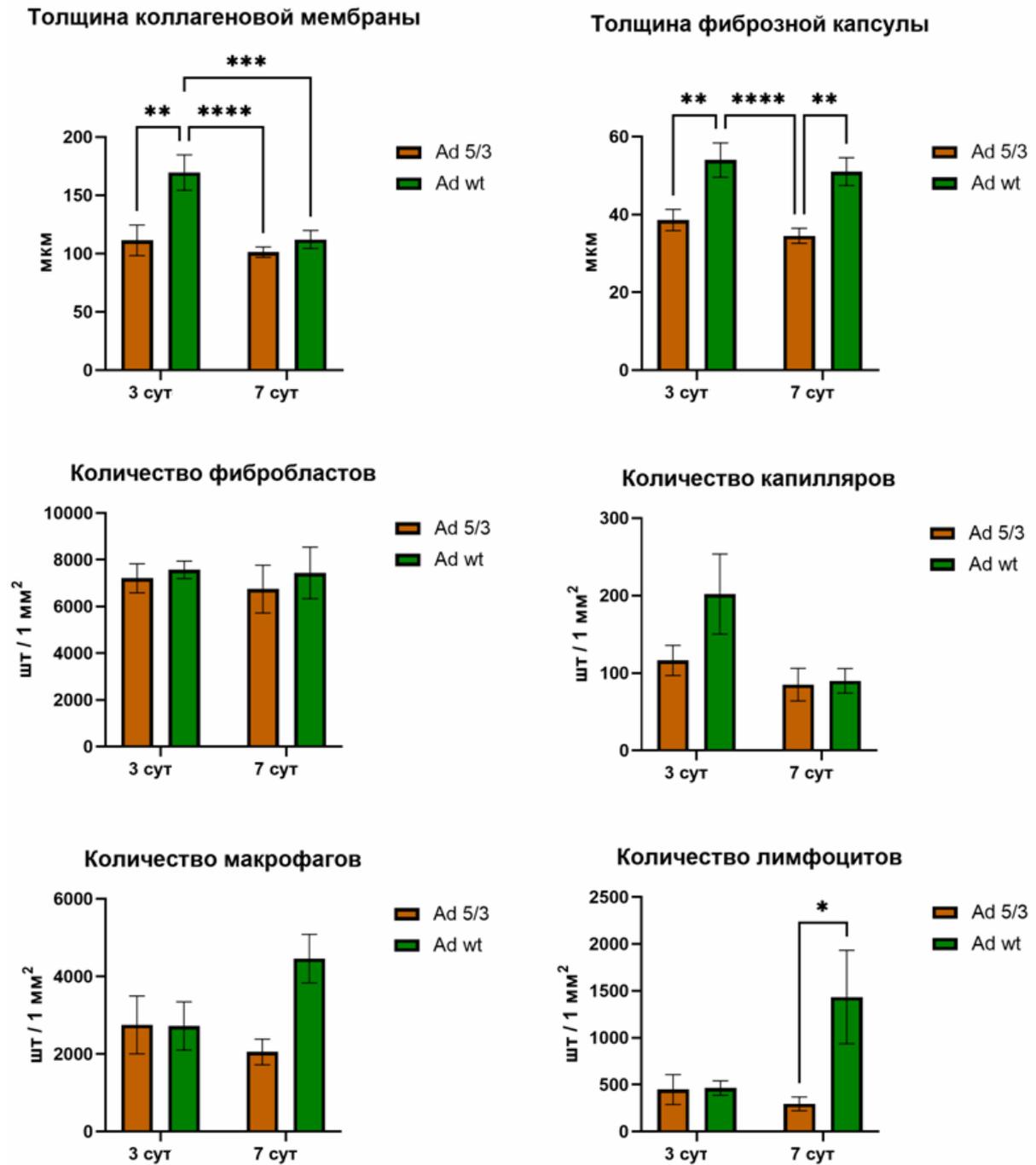


Рис. 5. Изменение морфологических параметров фиброзных капсул вокруг имплантатов через 3 и 7 суток после инъекции Ad 5/3 и Ad wt аденовирусов. Морфометрический и статистический анализ; \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$ , \*\*\*\* –  $p < 0,0001$ .

Fig. 5. Changes in the morphological parameters of fibrous capsules around implants 3 and 7 days after injection of Ad 5/3 and Ad wt adenoviruses. Morphometric and statistical analysis; \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$ , \*\*\*\* –  $p < 0,0001$ .

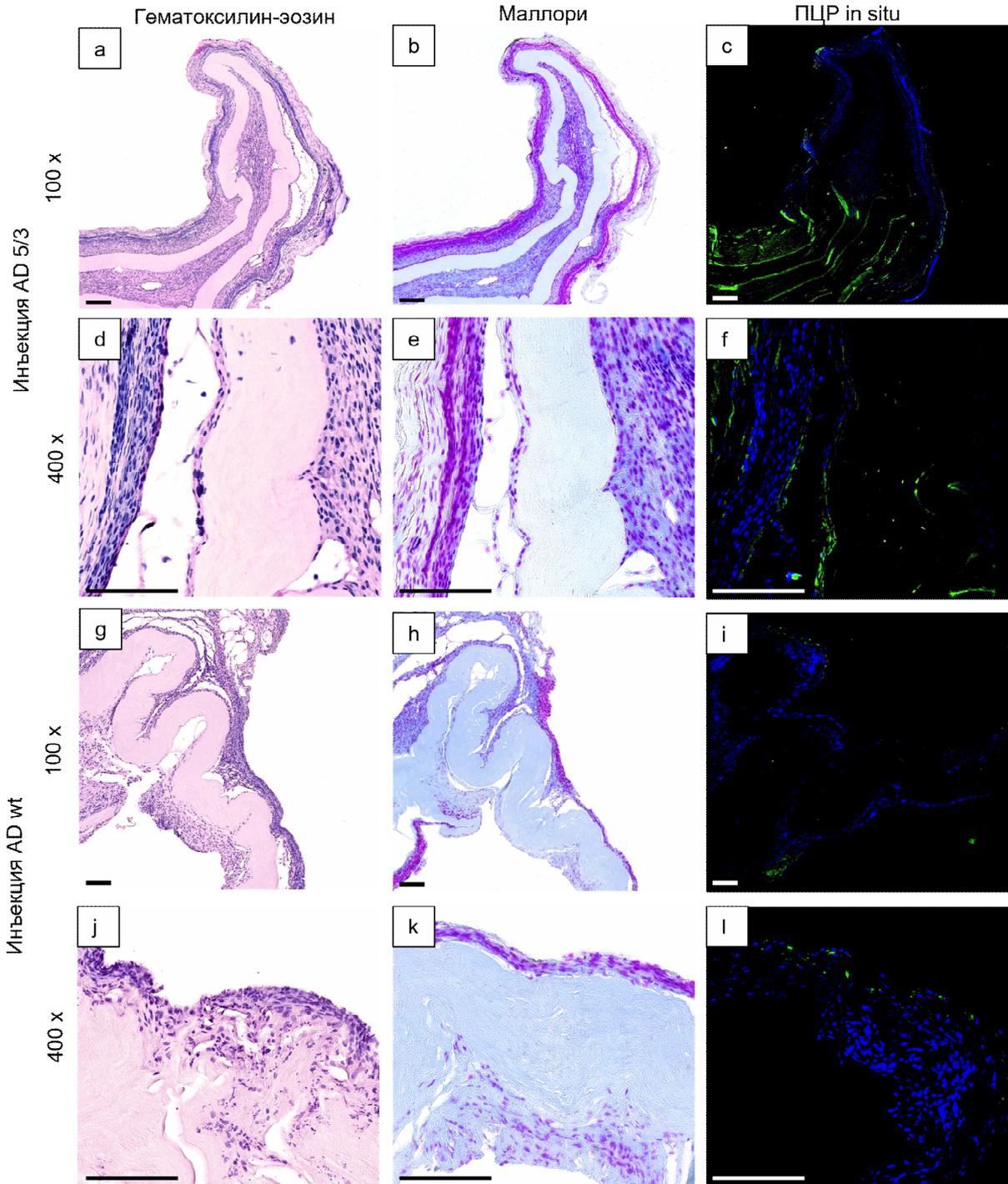


Рис. 6. Перимплантационная область через 7 суток после инъекции аденовирусных векторов Ad 5/3 (a–f) и Ad wt (g–l). Светлопольная и конфокальная светооптическая микроскопия. Масштабный отрезок – 100 мкм.

Fig. 6. Peri-implantation area 7 days after injection of adenoviral vectors Ad 5/3 (a–f) and Ad wt (g–l). Bright-field and confocal light-optical microscopy. Scale bar – 100  $\mu$ m.

того, в настоящем эксперименте было показано, что применение коллагеновых мембран способствовало не только экспрессии вируса в новообразованных тканях, но и повышало интенсивность экспрессии в клетках дермы кожи. Это может объясняться тем, что перимплантационная ниша (ПИН) не только конкурирует с окружающими тканями за вирусный вектор, но и удерживает его локально,

обеспечивая более равномерное и эффективное распределение вирусных частиц.

Однако имплантация неизбежно вызывает локальный иммунный ответ, известный как «реакция на инородное тело» [1, 9]. Эта реакция может развиваться по трем основным сценариям: разрушение имплантата с последующим воспалением, формирование фиброзной капсулы или прорастание имплантата

тканевыми элементами с регенерацией. В ПИН всегда присутствуют различные типы клеток – фибробласты, эндотелиальные клетки сосудов и иммунные клетки, такие как макрофаги и лимфоциты. Характер и интенсивность этой реакции зависят от свойств имплантата – его состава, пористости, гидрофильности и биорезорбируемости [10].

Одной из целей настоящего эксперимента была проверка гипотезы о возможности направленного тканевого ответа через доставку генетического вектора в определенные клетки ПИН. Модификация вируса усилила трансдукцию клеток в ПИН. Уже на третьи сутки после инъекции наблюдалась активная трансдукция большинства фибробластов соединительнотканной капсулы. Этот эффект открывает возможность функционализации периимплантационной капсулы, что позволит, используя генную терапию, создавать условия для продолжительной экспрессии терапевтических белков. Например, имплантаты, содержащие генные конструкции, кодирующие цитокины, могут превращать клетки ПИН в локальные эффекторы иммунотерапии, что полезно в регенеративной медицине и реконструктивной хирургии. Управление воспалением и фиброзом в периимплантационной зоне может способствовать успешной интеграции имплантатов, что особенно важно при предотвращении рубцовых деформаций в пластической хирургии [5, 13]. А локальная доставка плазмид с генами факторов роста уже зарекомендовали себя для ускорения регенерации мягких тканей в стоматологии [11].

Таким образом, предложенная стратегия сочетания имплантатов с генетическими конструкциями не только решает проблему адресной доставки генов, но и позволяет эффективно управлять локальной иммунной средой, открывая новые перспективы для регенеративной медицины и локальной иммунотерапии опухолей.

### Заключение

На основании сравнительного морфологического и молекулярно-биологического исследования был определен оптимальный протокол локальной доставки генов с помощью аденовирусных векторов для задач периимплантационного таргетирования. Было охарактеризовано влияние модификации аденовируса на тропность и эффективность доставки гена в клеточные компоненты периимплантационной ниши и установлено, что Ad 5/3 по этим параметрам значительно превосходит AD wt. При этом было показано, что в отсутствие коллагенового имплантата эффективность трансдукции клеток-мишеней обоими аденовирусными векторами снижалась. Морфометрический анализ локализации трансдуцированных клеток выявил преимущественно фибробласты соединительноткан-

ной капсулы, окружающей имплантат. Развитие и дальнейшее применение предлагаемого нами метода периимплантационного таргетирования способно обеспечить локальную, эффективную и безопасную доставку генов, что позволит значительно расширить показания к генной терапии и ее доступность для врачей и пациентов. Кроме того, данный метод может быть адаптирован для использования в различных органах и при различных заболеваниях.

### Список источников / References

1. Amani H., Alipour M., Shahriari E., Taboas J. Immunomodulatory Biomaterials: Tailoring Surface Properties to Mitigate Foreign Body Reaction and Enhance Tissue Regeneration. *Advanced Healthcare Materials*. 2024;2401253.
2. Antoshin A., Gostev M., Khristidis Y., Giliazova A., Voloshin S., Blagushina N., et al. Electrophoretically Co-Deposited Collagen-Lactoferrin Membranes with Enhanced Pro-Regenerative Properties for Oral Soft Tissue Regeneration. *Int J Mol Sci*. 2023;24(24):17330.
3. Athanasopoulos T., Munye M.M., Yanez-Munoz R.J. Nonintegrating Gene Therapy Vectors. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2017;31(5):753-70.
4. Dunbar C.E., High K.A., Joung J.K., Kohn D.B., Ozawa K., Sadelain M. Gene therapy comes of age. *Science*. 2018;359(6372):eaan4672.
5. Foroushani F., Dzobo K., Khumalo N., Mora V., de Mezerville R., Bayat A. Advances in surface modifications of the silicone breast implant and impact on its biocompatibility and biointegration. *Biomaterials Research*. 2022;26(1):80.
6. Goswami R., Subramanian G., Silayeva L., Newkirk I., Doctor D., Chawla K., et al. Gene Therapy Leaves a Vicious Cycle. *Front Oncol*. 2019;9:297.
7. Greber U.F., Gomez-Gonzalez A. Adenovirus - a blueprint for gene delivery. *Curr Opin Virol*. 2021;48:49-56.
8. Ikeda-Imafuku M., Wang L., Rodrigues D., Shaha S., Zhao Z., Mitragotri S. Strategies to improve the EPR effect: A mechanistic perspective and clinical translation. *Journal of Controlled Release*. 2022;345:512-536.
9. Ivanova E., Fayzullin A., Minaev N., Dolganova I., Serejnikova N., Gafarova E., Tokarev M., Minaeva E., Aleksandrova P., Reshetov I., Timashev P., Shekhter A. Surface Topography of PLA Implants Defines the Outcome of Foreign Body Reaction: An In Vivo Study. *Polymers*. 2023;15(20):4119.
10. Ji Z., Wan Y., Wang H., Yu M., Zhao Z., Wang T. et al. Effects of surface morphology and composition of titanium implants on osteogenesis and inflammatory responses: a review. *Biomedical Materials*. 2023;18(4):042002.
11. Koteneva P., Kosheleva N., Fayzullin A., Khristidis Y., Rasulov T., Kulova A., et al. Gene Therapeutic Drug pCMV-VEGF165 Plasmid ('Neovasculgen') Promotes Gingiva Soft Tissue Augmentation in Rabbits. *Int J Mol Sci*. 2024;25(18):10013.
12. Madry H., Gao L., Rey-Rico A., Venkatesan J.K., Muller-Brandt K., Cai X., et al. Thermosensitive Hydrogel Based on PEO-PPO-PEO Poloxamers for a Controlled In Situ Release of Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors for Effective Gene

- Therapy of Cartilage Defects. *Adv Mater.* 2020;32(2):e1906508.
13. Mao Y., Hou X., Fu S., Luan J. Transcriptomic and machine learning analyses identify hub genes of metabolism and host immune response that are associated with the progression of breast capsular contracture. *Genes & diseases.* 2024;11(3):101087.
  14. Nestic D., Bozinovic K., Pehar I., Wallace R., Parker A., Majhen D. The revolving door of adenovirus cell entry: not all pathways are equal. *Pharmaceutics.* 2021;13(10):1585.
  15. Sharma D., Arora S., Singh J., Layek B. A review of the tortuous path of nonviral gene delivery and recent progress. *International journal of biological macromolecules.* 2021;183:2055-2073.
  16. Steinhauß D., Ghandehari H. Matrix Mediated Viral Gene Delivery: A Review. *Bioconjug Chem.* 2019;30(2):384-99.
  17. Stepanenko A., Sosnovtseva A., Valikhov M., Chernysheva A., Cherepanov S., Yusubalieva G. et al. Superior infectivity of the fiber chimeric oncolytic adenoviruses Ad5/35 and Ad5/3 over Ad5-delta-24-RGD in primary glioma cultures. *Molecular Therapy-Oncolytics.* 2022;24:230-248.
  18. Tucci F., Scaramuzza S., Aiuti A., Mortellaro A. Update on Clinical Ex Vivo Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy for Inherited Monogenic Diseases. *Mol Ther.* 2021;29(2):489-504.
  19. Xiang Y., Lee J., Li Z., Loh X. Recent development of synthetic nonviral systems for sustained gene delivery. *Drug Discovery Today.* 2017;22(9):1318-1335.

#### Информация об авторах

✉ Сerezникова Наталья Борисовна – канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории цифрового микроскопического анализа Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова; ул. ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, Москва, 119048, Россия; serezhnikova\_n\_b@staff.sechenov.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-4097-1552>  
 Файзуллин Алексей Леонидович – канд. мед. наук, заведующий лабораторией цифрового микроскопического анализа Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова;  
 fayzullin\_a\_l@staff.sechenov.ru  
<https://orcid.org/0000-0003-4137-8993>  
 Антошин Артем Анатольевич – канд. биол. наук, директор департамента передовых исследований и разработок Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова;  
 antoshin\_a\_a@staff.sechenov.ru  
<https://orcid.org/0000-0003-0575-0321>  
 Тимакова Анна Алексеевна – младший научный сотрудник лаборатории цифрового микроскопического анализа Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова;  
 timakova\_a\_a@staff.sechenov.ru  
<https://orcid.org/0000-0003-0269-4969>  
 Иванова Елена Ильинична – младший научный сотрудник лаборатории цифрового микроскопического анализа Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова;  
 ivanova\_e\_i\_1@staff.sechenov.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-5601-0465>  
 Ершов Борис Петрович – лаборант лаборатории регенеративной ветеринарии Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова;  
 erшов\_b\_p@staff.sechenov.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-3879-2424>  
 Файзуллина Нафиса Мунаваровна – канд. хим. наук, ведущий научный сотрудник отдела современных биоматериалов Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова;  
 fayzullina\_n\_m@staff.sechenov.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-6609-1123>  
 Уласов Илья Валентинович – д-р. биол. наук, ведущий научный сотрудник отдела современных биоматериалов Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова;  
 ulasov\_i\_v@staff.sechenov.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-0818-0363>  
 Малоголовкин Александр Сергеевич – канд. биол. наук, зав. лабораторией молекулярной вирусологии Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова;  
 malogolovkin\_a\_s@staff.sechenov.ru  
<https://orcid.org/0000-0003-1352-1780>

#### Information about the authors

✉ Natal'ya B. Serezhnikova – Cand. Sci. (Biol.), Professor, Leading Researcher of Digital Microscopic Analysis Laboratory of I.M. Sechenov First Moscow State Medical University; ul. Trubetskaya, d. 8, str. 2, Moscow, 119048, Russia; serezhnikova\_n\_b@staff.sechenov.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-4097-1552>  
 Aleksei A. Faizullin – Cand. Sci. (Med.), Head of Digital Microscopic Analysis Laboratory of I.M. Sechenov First Moscow State Medical University;  
 fayzullin\_a\_l@staff.sechenov.ru  
<https://orcid.org/0000-0003-4137-8993>  
 Artem A. Antoshin – Cand. Sci. (Biol.), Director of Advanced Research and Development of I.M. Sechenov First Moscow State Medical University;  
 antoshin\_a\_a@staff.sechenov.ru  
<https://orcid.org/0000-0003-0575-0321>  
 Anna A. Timakova – Junior Researcher of Digital Microscopic Analysis Laboratory of I.M. Sechenov First Moscow State Medical University;  
 timakova\_a\_a@staff.sechenov.ru  
<https://orcid.org/0000-0003-0269-4969>  
 Elena I. Ivanova – Junior Researcher of Digital Microscopic Analysis Laboratory of I.M. Sechenov First Moscow State Medical University;  
 ivanova\_e\_i\_1@staff.sechenov.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-5601-0465>  
 Boris P. Ershov – laboratory assistant of the regenerative veterinary medicine laboratory of I.M. Sechenov First Moscow State Medical University;  
 erшов\_b\_p@staff.sechenov.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-3879-2424>  
 Nafisa M. Faizullina – Cand. Sci. (Chem.), Leading Researcher of Modern Biomaterials Department of I.M. Sechenov First Moscow State Medical University;  
 fayzullina\_n\_m@staff.sechenov.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-6609-1123>  
 Il'ya V. Ulasov – Doct. Sci. (Biol.), Leading Researcher of Modern Biomaterials Department of I.M. Sechenov First Moscow State Medical University;  
 ulasov\_i\_v@staff.sechenov.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-0818-0363>  
 Aleksandr S. Malogolovkin – Cand. Sci. (Biol.), Head of Molecular Virology Laboratory of I.M. Sechenov First Moscow State Medical University;  
 malogolovkin\_a\_s@staff.sechenov.ru  
<https://orcid.org/0000-0003-1352-1780>

Котова Светлана Леонидовна – канд. хим. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории макромолекулярного дизайна Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова;  
kotova\_s\_l@staff.sechenov.ru  
<https://orcid.org/0000-0001-7011-4503>  
Тимашев Петр Сергеевич – д-р. хим. наук, доцент, научный руководитель научно-технологического парка биомедицины Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова;  
timashev\_p\_s@staff.sechenov.ru  
<https://orcid.org/0000-0001-7773-2435>

Svetlana L. Kotova – Cand. Sci. (Chem.), Leading Researcher of the Macromolecular Design Laboratory of I.M. Sechenov First Moscow State Medical University;  
kotova\_s\_l@staff.sechenov.ru  
<https://orcid.org/0000-0001-7011-4503>  
Petr S. Timashev – Doct. Sci. (Chem.), Associate Professor, Scientific Director of the Biomedical Science and Technology Park of I.M. Sechenov First Moscow State Medical University;  
timashev\_p\_s@staff.sechenov.ru  
<https://orcid.org/0000-0001-7773-2435>

---

Статья поступила в редакцию 2.08.2024; одобрена после рецензирования 13.11.2024; принята к публикации 20.12.2024.  
Submitted 2.08.2024; Revised 13.11.2024; Accepted 20.12.2024.

---