

**Бартов Михаил Сергеевич**

**Новые биотехнологические подходы к созданию остеоиндуктивных материалов на основе белка rhBMP-2, полученного микробиологическим синтезом в *Escherichia coli***

Специальность 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Москва – 2015**

Работа выполнена в лаборатории биологически активных наноструктур федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель: Карягина-Жулина Анна Станиславовна,**

доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории биологически активных наноструктур федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Официальные оппоненты:**

**Патрушев Лев Иванович,** доктор биологических наук, профессор,

ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,

**Самойленко Владимир Александрович,** кандидат биологических наук,

старший научный сотрудник, заведующий центром экспериментальной биотехнологии в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН

**Ведущая организация:** Федеральное Государственное Бюджетное Научное Учреждение «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности»

Защита диссертации состоится 24 декабря 2015 г. в 12-00 часов на заседании диссертационного совета Д 006.027.01 при Федеральном Государственном бюджетном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» по адресу 127550, Москва, Тимирязевская, 42; тел.: (499) 976-65-44, факс: (499) 977-09-47; e-mail: iab@iab.ac.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального Государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» и на Интернет-сайте [www.vniisb.ru](http://www.vniisb.ru)

Автореферат разослан «\_\_»\_\_\_\_\_ 2015 года

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Халилуев М.Р.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Ежегодное увеличение количества случаев заболеваний опорно-двигательного аппарата по всему миру привело к тому, что первое десятилетие XXI века было объявлено ВОЗ декадой по лечению костей и суставов (Tsou et al., 2002). Согласно данным официальной статистики по травматизму в России переломы костей занимают второе место среди случаев обращения населения за медицинской помощью, составляя 21,5% от общего числа зарегистрированных травм (Андреева, 2010). Длительные сроки восстановления функциональности опорно-двигательного аппарата оказывают существенное влияние на качество и продолжительность жизни пациентов, а также имеют большое экономическое значение, поскольку являются причиной временной нетрудоспособности и/или инвалидности людей.

Проблема травматизма опорно-двигательного аппарата актуальна также в ветеринарии сельскохозяйственных, домашних и спортивных животных (Innes et al., 2010). Содержание крупного и мелкого рогатого скота, лошадей, а также их транспортировка часто сопряжены с переломами и вывихами конечностей (Mulon, 2013; Nunamaker, 2002), при этом возможность проведения оперативного лечения сильно зависит от его экономической эффективности в каждом конкретном клиническом случае.

Консолидация костных отломков при потерях значительных объемов костной ткани невозможна без применения трансплантационного материала. По данным статистики, ежегодно в мире в медицинской практике проводится около 4 миллионов операций, связанных с трансплантацией костной ткани или с применением остеопластических материалов в качестве заместителей (Brydone et al., 2010).

В настоящее время для восполнения объема костной ткани широко используются аутотрансплантаты, принятые в качестве «золотого стандарта» в трансплантологии (Beaman et al., 2006; Bhatt et al., 2012; Brydone et al., 2010; Finkemeier, 2002). Однако процедура забора аутогенного материала увеличивает время основной операции из-за необходимости дополнительного оперативного вмешательства, несет риск развития осложнений и имеет ограничения по допустимому объему аутотрансплантата (Brydone et al., 2010; Cricchio et al., 2003). В качестве альтернативы аутологичной кости широко применяются материалы на основе деминерализованного костного матрикса (ДКМ) как аллогенного, так и ксеногенного происхождения (Barneveld et al., 1994; Gruskin et al., 2012; Nandi et al., 2010; Wang et al., 2007). Использование остеопластических материалов на основе ДКМ, содержащих факторы роста и регенерации костной ткани, мультипотентные стромальные клетки и другие компоненты, обеспечивающие направленное стимулирование остеогенеза, признается в настоящее время одной из наиболее перспективных стратегий в лечении переломов (Albrektsson et al., 2001; Vertenten et al., 2010; Wilson-Hench, 1987).

Среди известных факторов роста и регенерации костной ткани одним из наиболее эффективных и хорошо изученных стимуляторов остеогенеза является костный морфогенетический белок 2 (Bone Morphogenetic Protein-2, BMP-2), принадлежащий к суперсемейству трансформирующего фактора роста бета (Transforming Growth Factor beta, TGF- $\beta$ ) (Bessa et al., 2008; Massagué, 1998). Остеоиндуктивные материалы с добавлением рекомбинантного человеческого BMP-2 (rhBMP-2), получившие название «INFUSE Bone Graft», одобрены к ограниченному клиническому использованию Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration, FDA) и Европейским агентством лекарственных средств (European Medicines Agency, EMEA) в 2002 году.

Помимо использования данных материалов в медицине (Govender et al., 2002; McKay et al., 2007), они могут найти свое применение и в ветеринарной практике, особенно при лечении мелких домашних животных (Pinel et al., 2012). Мировой опыт лечения сельскохозяйственных животных с помощью материалов с факторами роста насчитывает пока лишь единичные случаи из-за высокой стоимости (Lippold et al., 2004).

Стоимость зарубежных остеоиндуктивных материалов, содержащих rhBMP-2, на порядок превышает рыночную стоимость синтетических и аллогенных трансплантатов и достигает нескольких тысяч долларов за единицу, что ограничивает их широкое применение в России. Однако по данным некоторых исследователей, лечение с применением BMP-содержащих материалов в ряде случаев позволяет существенно сократить суммарные затраты на реабилитацию пациентов (Garrison et al., 2007).

Высокая стоимость таких материалов обусловлена тем, что входящий в их состав фактор роста синтезируется в эукариотической экспрессионной системе – культуре овариоцитов китайского хомячка (Chinese hamster ovary, CHO). Однако при использовании rhBMP-2, полученного с помощью более дешевого микробиологического синтеза в *Escherichia coli*, были продемонстрированы схожие показатели остеоиндуктивности (Bessho et al., 2000; Lee et al., 2013).

В клетках *E. coli* rhBMP-2 синтезируется в виде смеси мономерной, димерной и олигомерной форм и накапливается в тельцах включения, при этом биологической активностью обладает только димерная форма белка. Обогащение остеопластических материалов димерной формой rhBMP-2 может повысить их остеоиндуктивные свойства и эффективность. Благодаря способности димера rhBMP-2 специфически связываться со своими клеточными рецепторами (Keller et al., 2004; Kirsch et al., 2000a; Kirsch et al., 2000b), для обогащения препарата белка биологически активной димерной формой можно использовать аффинную хроматографию на сорбенте, представляющем собой иммобилизованный на носителе рецептор rhBMP-2. Heinecke et al. показали, что наиболее устойчивый лиганд-рецепторный комплекс образуется при взаимодействии димера с рецептором BMPRIA (Bone Morphogenetic Protein Receptor IA) (Heinecke et al., 2009). Таким образом, аффинный сорбент может быть получен на основе рекомбинантного белка BMPRIA. В свою очередь, эффективное связывание этого белка с хроматографической матрицей-носителем, например, целлюлозой, не требующее применения сшивающих агентов, может достигаться за счет использования BMPRIA, слитого с белковым доменом, обладающим высокой аффинностью к целлюлозе, например, целлюлозосвязывающим доменом из *Caldicellulosiruptor bescii* (Tomme et al., 1998).

Использование на финальном этапе очистки вышеупомянутого аффинного сорбента позволит увеличить выход димера, получить препарат rhBMP-2 с большей удельной активностью и, следовательно, остеопластические материалы для трансплантации с высокими остеоиндуктивными свойствами. Также, разработка остеоиндуктивных материалов российского производства, содержащих rhBMP-2, сделает возможным их внедрение в клиническую практику в РФ и ветеринарию сельскохозяйственных, домашних и спортивных животных, где такого рода материалы пока используются в очень ограниченном масштабе.

**Цели и задачи исследования.** Целью диссертационной работы являлась разработка новых биотехнологических подходов к выделению биологически активной димерной формы rhBMP-2, а также оценка эффективности применения остеоиндуктивных материалов на основе rhBMP-2 *in vivo*.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- Получить остеопластические материалы из деминерализованного костного матрикса с добавлением rhBMP-2;
- Адаптировать методики оценки регенеративного потенциала для разработанных материалов и провести с их помощью тестирование остеопластических материалов с добавлением rhBMP-2 *in vivo*;
- Создать штамм-продуцент химерного рекомбинантного белка BMPRIA-CBD, представляющего собой рецептор фактора роста и регенерации костной ткани BMP-2 в комплексе с целлюлозосвязывающим доменом (CBD);

- Подобрать условия культивирования штамма-продуцента для повышения выхода BMPRIA-CBD;
- Разработать способ выделения и очистки димерной формы rhBMP-2 с помощью аффинной хроматографии на носителе с иммобилизованным BMPRIA-CBD;
- Доказать биологическую активность выделенного димера rhBMP-2 *in vitro*.

**Научная новизна.** На экспериментальной модели эктопического остеогенеза для оценки эффективности остеоиндуктивных материалов впервые исследован регенеративный потенциал материалов из ДКМ в виде крошки с иммобилизованным rhBMP-2 при их применении в комбинации с обогащенной тромбоцитами плазмой крови (ОТП). На модели регенерации краниальных дефектов критического размера впервые показана перспективность применения материалов из ДКМ в виде губчатых пористых мембран с иммобилизованным rhBMP-2.

Экспериментально доказаны остеоиндуктивные свойства разработанных материалов из коллагенового матрикса в виде костной крошки и губчатых пористых мембран с иммобилизованным на них белком rhBMP-2 на модели эктопического остеогенеза на крысах, на модели регенерации дефектов критического размера после краниотомии на крысах, а также при применении материалов в сочетании с титановыми имплантатами на кроликах.

Разработан эффективный подход для обогащения препаратов rhBMP-2 димерной формой белка, основанный на его специфическом взаимодействии со своим клеточным рецептором BMPRIA. В ходе разработки подхода впервые была сконструирована плазида pBMPRIA-CBD, обеспечивающая экспрессию химерного рекомбинантного белка BMPRIA-CBD, который состоит из сигнала L-аспарагиназы *E. coli*, эктодомена рецептора BMPRIA человека, спейсера из остатков глицина и серина и целлюлозосвязывающего домена CBD из *Caldicellulosiruptor bescii* (ранее – *Anaerocellum thermophilum*) с высокой константой связывания с целлюлозосодержащим сорбентом.

Получен эффективный микробиологический штамм-продуцент *E. coli* M15 [pREP4, pBMPRIA-CBD] и оптимизированы условия экспрессии белка BMPRIA-CBD. Получен новый целлюлозосодержащий сорбент с иммобилизованным белком BMPRIA-CBD, обеспечивающий эффективную сорбцию димерной формы rhBMP-2.

**Практическая значимость работы.** По результатам работы получены остеоиндуктивные материалы на основе ДКМ с добавлением rhBMP-2, которые могут применяться в медицине и ветеринарии в таких областях, как травматология, ортопедия, спинальная хирургия, стоматология и т.д. (Бартов и др., 2012; Лунин и др., 2012). В зависимости от клинического случая материалы могут применяться как в самостоятельном виде, так и в сочетании с металлофиксаторами.

Новый подход, разработанный для выделения rhBMP-2, обеспечивает получение препарата белка в биологически активной димерной форме высокой степени чистоты, благодаря чему он может использоваться на финальной стадии выделения белка. Разработанный подход может быть адаптирован для выделения других факторов роста за счет их аффинного связывания со своими клеточными рецепторами, иммобилизованными на носителе.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения и глав «Обзор литературы», «Экспериментальная часть», «Результаты и обсуждение» и «Выводы», списка сокращений, списка литературы, включающего 199 названий, и одного приложения. Работа изложена на 138 машинописных страницах, содержит 46 рисунков и 11 таблиц.

**Публикации.** По материалам диссертационной работы опубликовано 4 научных статьи, в том числе 3 в рекомендованных ВАК журналах, 7 работ в сборниках тезисов всероссийских и международных конференций, получено 3 патента.

**Апробация работы.** Результаты диссертационной работы были представлены на всероссийской научно-практической конференции с международным участием

«Илизаровские чтения» (г. Курган, 2011), научно-практической конференции с международным участием «Чаклинские чтения» (г. Екатеринбург, 2011), международной научно-практической конференции «Фармацевтические и Медицинские Биотехнологии» (г. Москва, 2012), всероссийской научно-практической конференции «Технологии оптимизации процесса репаративной регенерации в травматологии, ортопедии и нейрохирургии» (г. Саратов, 2013), XVI съезде ортопедов-травматологов Украины (г. Харьков, 2013), XIV молодежной научной конференции «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (г. Москва, 2014), IV Международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (г. Казань, 2014).

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для проведения генно-инженерных работ использовали плазмидный вектор pQE6 (Qiagen, США) и вектор ptt10, кодирующий глицин-сериновый спейсер, соединенный с целлюлозосвязывающим доменом из *Caldicellulosiruptor bescii*. Для создания штамма-продуцента белка BMPRIA-CBD использовали бактериальный штамм *E. coli* M15 [Rep4]. Трансформацию плазмидной ДНК в клетки *E. coli* осуществляли методом электропорации согласно инструкции к прибору для электропорации фирмы Bio-Rad (США). Проверку штамма-продуцента на экспрессию рекомбинантного белка проводили согласно стандартным протоколам фирмы Qiagen (США). Ферментацию штамма-продуцента проводили при параметрах: T=+37°C, pH 7,2 – 7,4, начальное число оборотов мешалки 250 об./мин, количество подаваемого воздуха 1 объем на объем среды в мин. Процесс ферментации контролировали по показаниям датчиков, а также анализируя пробы, отбираемые каждый час, в которых определяли оптическую плотность, pH, уровень экспрессии белка после внесения индуктора. Электрофорез белков проводили в денатурирующих условиях в полиакриламидном геле в присутствии ДСН (ДСН-ПААГ) по методу Лэммли (Laemmli, 1970). Выделение и предварительную очистку rhBMP-2 от примесей липополисахаридов, балластных белков, ДНК и РНК штаммов-продуцентов проводили по методике, описанной Шараповой и соавторами (Шарапова и др., 2010). При проверке биологической активности белка использовали культуру эукариотических клеток C2C12 (мышцы конечности мыши линии СЗН) из Российской коллекции клеточных культур позвоночных (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург), культуры клеток костного мозга и селезенки мышей. Стерилизацию опытных образцов остеопластических материалов осуществляли методом радиационной стерилизации (поглощенная доза 15,0±0,5 кГр) в Федеральном государственном унитарном предприятии «Научно-Исследовательский Институт Приборов», контроль стерильности проводили в соответствии с ГОСТ 28085-89 «Препараты биологические. Метод бактериологического контроля стерильности». Для тестирования эффективности регенерации костной ткани *in vivo* использовали самцов лабораторных крыс стока Wistar, кроликов обоих полов стадного разведения. Животных содержали в условиях конвенционального вивария, воду и комбикорм полнорационный для лабораторных животных (Лабораторкорм, Россия) давали *ad libitum*. Для введения животных в общий наркоз использовали смесь анестетиков «Золетил 100» (Virbac С.А., Франция) и «Рометар» (Bioveta, Чехия), в качестве местного анестетика использовали 0,25% раствор новокаина. Эвтаназию животных проводили с использованием CO<sub>2</sub>-камеры (ООО «НПК Открытая Наука», Россия) или передозировкой эфирным наркозом. Томографическое исследование проводили с помощью микрокомпьютерного томографа SkyScan 1178 (Bruker, США) и штатного программного обеспечения SkyScan. Гистологическое исследование образцов осуществляли на аппаратно-программном комплексе NIS-Elements D (микроскоп Nikon Eclipse E200), оценку соединительнотканых структур проводили с помощью

полуколичественного метода оценки (Григорьян, 2007). Анализ шлифов тканей проводили на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе Nikon DIGITAL ECLIPSE C1 plus с использованием лазера 488 нм, скорость аппозиции новообразованной костной ткани рассчитывали по формуле  $v_{\text{аппозиции}}=S/\tau$  ( $v_{\text{аппозиции}}$  – скорость аппозиции новообразованной костной ткани, мкм/сут;  $S$  – расстояние между флуоресцентными метками, мкм;  $\tau$  – время, сут). Статистическую обработку данных проводили с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни в программном пакете Statistica 6.0 (StatSoft, Inc). Данные представляли в табличном и графическом виде. На графиках и диаграммах приведены средние значения показателей, в качестве планок погрешностей использованы стандартные ошибки среднего, достоверность обозначена звездочкой («\*» –  $p<0,05$ ; «\*\*» –  $p<0,01$ ) и измерена по отношению к контрольной группе животных.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 1 Получение остеоиндуктивных материалов на коллагеновом носителе с добавлением rhBMP-2

Технология получения остеопластических материалов из ДКМ включает в себя несколько этапов: фрагментацию кости с последующей очисткой, обезжиривание, деминерализацию, отмывку и высушивание материала, придание ДКМ формы материала для конечного применения, стерилизацию полученных материалов (Громов, 2012а, 2012b; Лунин, 2012).

На этапе фрагментации крупные бедренные кости крупного рогатого скота нарезали на пластины с помощью ленточной пилы C/E165 (La Minerva, Испания) для удобства и качественной обработки фрагментов. Пластины очищали от загрязнений, остатков мягких тканей организма, сгустков крови и т.д., после чего проводили первичное обезжиривание на протяжении 72 часов и вторичное обезжиривание в течение 48 часов смесью растворителей этанол-диэтиловый эфир в соотношении 1:2 до достижения остаточного содержания жира  $\leq 1\%$ . Остатки растворителя удаляли высушиванием в сушильном шкафу ED53 (Binder, Германия). На стадии деминерализации фрагменты костной ткани обрабатывались соляной кислотой в концентрации 0,6 М и времени экспозиции 1 час. Для нейтрализации соляной кислоты, оставшейся после деминерализации, образцы несколько раз промывали дистиллированной водой, после чего высушивали в сушильном шкафу в течение 14 часов при температуре 24°C до остаточного содержания влаги не более 3%.

В зависимости от вида хирургической операции, размера, типа и локализации костной патологии, предполагающей применение остеоиндуктивных материалов для усиления регенеративного потенциала пациента и скорейшего сращения переломов, целесообразно использовать ДКМ в наиболее подходящей для каждого конкретного клинического случая форме исполнения (рисунок 1).

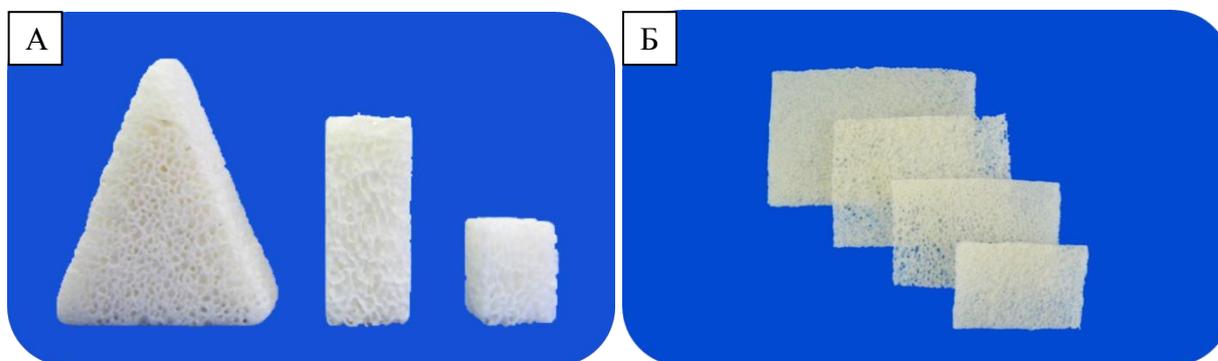




Рисунок 1. Фотографии образцов ДКМ в разных формах исполнения: А – клинья и блоки, Б – губчатые пористые мембраны, В-Ж – фракции крошки с частицами различного диаметра (В – 40-125 мкм, Г – 125-250 мкм, Д – 250-500 мкм, Е – 500-1000 мкм, Ж – 1-2 мм).

Для заполнения небольших по размеру дефектов костной ткани можно использовать материал в виде крошки. Для заполнения мелких трещин костей можно использовать малоинвазивные формы остеопластических материалов, подразумевающие минимальное хирургическое вмешательство в организм в процессе их имплантации. Малоинвазивные формы готовили на основе фракции крошки диаметром  $\leq 125$  мкм (рисунок 3, В). Для улучшения формообразования материалов добавляли 10% (по массе) натриевой соли гиалуроновой кислоты. Крупные объемы утерянной костной ткани необходимо заполнять ДКМ в виде блоков/клиньев, обеспечивающих в первую очередь остеокондуктивную и механическую функцию, с дальнейшим введением крошки в промежутки между ними.

Для придания материалам дополнительных остеоиндуктивных свойств на их поверхности иммобилизовали белок rhBMP-2, синтезированный в лаборатории биологически активных наноструктур ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России (Шарапова, 2010). Для этого предварительно готовили буферный раствор состава 0,5 М NaCl, 50 мМ CaCl<sub>2</sub>, 25 мМ Трис-HCl pH 7,5. Концентрацию rhBMP-2 в растворе довели до  $\leq 1$  мг/мл (оптимальное значение 0,6 мг/мл), после чего проводили диализ против буферного раствора описанного выше состава в соотношении 1:500 при температуре +4°C в течение ночи при постоянном перемешивании. Образцы ДКМ определенного вида исполнения уравнивали буфером, в случае присутствия взвеси над ними смесь декантировали. После промывания в буфере измеряли pH в надосадочной жидкости (оптимальное значение pH=7,5). Для достижения насыщения носителя белком к нему добавляли раствор rhBMP-2, диализованный против буфера, в соотношении 100 мг сухого носителя на 1,3-1,5 мл буфера, содержащего  $\leq 1$  мг/мл rhBMP-2. После этого носитель инкубировали на шейкере при постоянном слабом перемешивании (40-60 об./мин) при +4°C в течение от 1 до 3 суток.

## 2 Тестирование остеопластических материалов на основе rhBMP-2 на экспериментальных моделях *in vivo*

В рамках диссертационной работы проводилось исследование биологической активности разработанных остеопластических материалов на основе rhBMP-2 на адаптированных экспериментальных моделях *in vivo* (Бартов, 2014):

- На модели индукции эктопического остеогенеза при внутримышечной имплантации ДКМ в виде крошки;
- На модели индукции остеогенеза при применении малоинвазивной формы материалов в комбинации с металлоконструкциями, а именно пористыми титановыми имплантатами;
- На модели имплантации в краниальные дефекты критического размера материала в виде пористой губчатой мембраны.

### **Проверка активности крошки ДКМ с rhBMP-2 на модели индукции эктопического остеогенеза**

На данной модели проводили тестирование материалов из ДКМ, представляющих собой фракцию костной крошки с размером частиц 1-2 мм, на способность индуцировать эктопический остеогенез. Существенным отличием нашей модели от модели классической внутримышечной имплантации (Urist, 1965) является сочетанное применение тестируемого материала и обогащенной тромбоцитами плазмы крови (ОТП). При добавлении к остеопластическому материалу смеси ОТП, тромбина и хлорида кальция становится возможным сформировать из крошки плотный сгусток, что достигается за счет активации факторов свертывания и запуска каскада реакций тромбообразования. Благодаря этому удается избежать нежелательного распространения крошки по межмышечному пространству, что в дальнейшем облегчает анализ свойств имплантированного материала.

Для приготовления ОТП в пробирки с антикоагулянтom  $\text{Na}_2\text{-ЭДТА}$  отбирали цельную кровь из расчета конечной концентрации ЭДТА 1,5-2,2 мг/мл крови, центрифугировали в течение 10 мин со скоростью 1500 об./мин, отделяли плазму. Каждую навеску остеопластического материала смешивали с 0,5 мл ОТП, добавляли 100 мкл хлорида кальция (концентрация 100 мг/мл) и 100 мкл бычьего тромбина (концентрация 100 мг/мл), формировали из смеси плотный сгусток.

Для проведения экспериментов использовали 10 самцов лабораторных крыс стока Wistar весом  $350 \pm 50$  г (2 группы по 5 голов). Животным опытной группы в пространство между пучками икроножной мышцы каждой конечности имплантировали навеску крошки с размером частиц 1-2 мм с иммобилизованным на ней rhBMP-2, контрольной группы – навеску крошки такой же фракции, но без rhBMP-2. По достижении крысами конечной точки эксперимента (45 суток после операции) животных подвергали эвтаназии в  $\text{CO}_2$ -камере, проводили некропсию имплантированных образцов и их морфологическое и гистологическое исследование.

По результатам морфологического исследования (рисунок 2) установлено, что все имплантируемые материалы интегрируются с мышечной тканью, покрываясь соединительнотканной оболочкой. В 20% образцов, полученных от животных контрольной группы, наблюдалась фрагментация введенного материала, которую можно объяснить индивидуально различающейся степенью двигательной активности крыс в послеоперационном периоде.

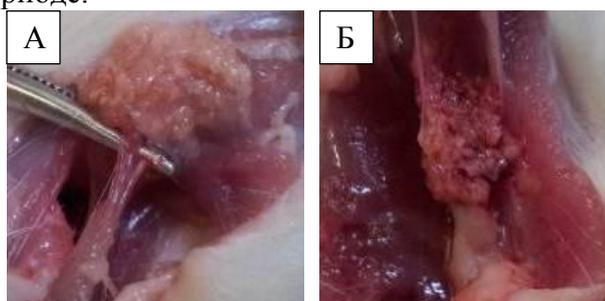


Рисунок 2. Изображения имплантированных образцов материалов через 45 дней после имплантации: А – крошка на основе ДКМ, Б – крошка на основе ДКМ с добавлением rhBMP-2.

В образцах крошки, полученных от животных опытной группы, видно, что за время имплантации они подверглись активной васкуляризации, о чем свидетельствуют многочисленные сосуды, пронизывающие имплантат по всему объему. Данное наблюдение коррелирует с литературными данными об ангиогенных свойствах rhBMP-2 (Deckers et al., 2002). В образцах контрольной группы васкуляризация также наблюдается, но менее выражено.

Гистологическое исследование имплантированных образцов было выполнено в сотрудничестве с научным сотрудником кафедры анатомии и физиологии живых организмов Национального Исследовательского «Белгородского Государственного Университета» к.б.н., доцентом Надеждиным С. В. При исследовании гистологических препаратов опытной и контрольной групп установлено, что в обеих группах в зоне эктопического остеогенеза сформировались трабекулы костной ткани (рисунок 3), причем при имплантации образцов крошки с rhBMP-2 наблюдались более обширные очаги регенератов.

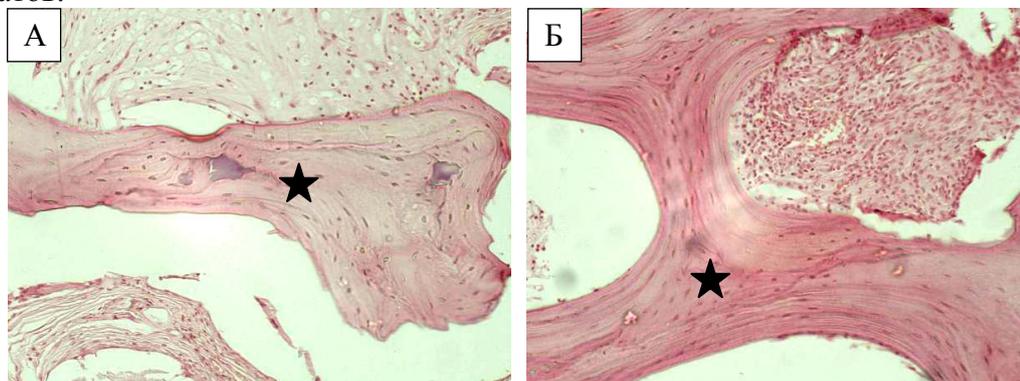


Рисунок 3. Гистологические препараты контрольной (А) и опытной групп (Б). Видны трабекулы костной ткани (звездочка) с компактизацией костного матрикса. Окр. гематоксилином и эозином, X40.

При подсчете в гистологических препаратах регенератов количества остеоцитов и остеонов показано, что в образцах опытной группы количество остеоцитов более чем в 2 раза превысило их количество в контрольной и составило  $12,5 \pm 0,5$  шт. по сравнению с  $6,0 \pm 0,3$  шт. в контроле. Количество остеонов в образцах опытной группы оказалось в 3 раза больше, чем в контроле ( $6,5 \pm 0,4$  шт. против  $2,0 \pm 0,3$  шт.) (рисунок 4).

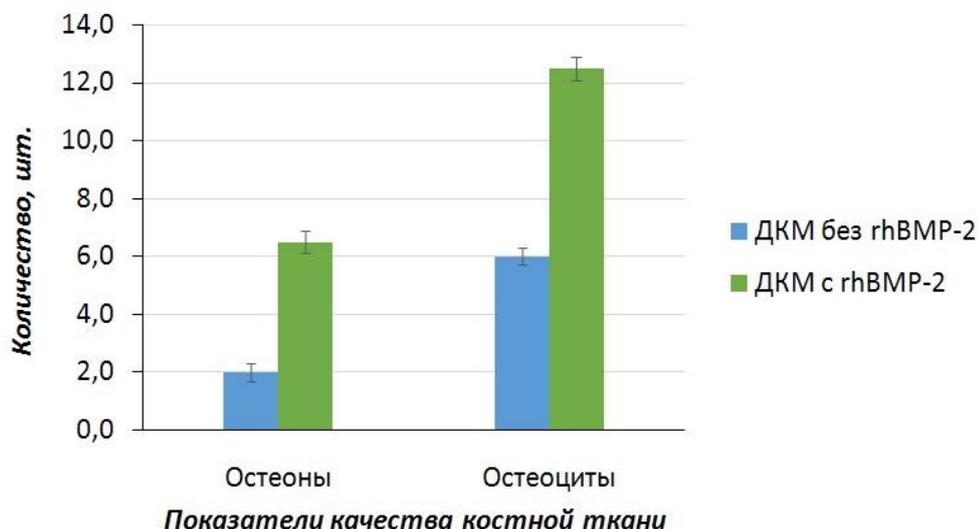


Рисунок 4. Сравнение гистоморфологических показателей качества новообразованной костной ткани в опытной и контрольной группах.

#### ***Проверка активности малоинвазивных форм остеопластических материалов с rhBMP-2 в комбинации с титановыми имплантатами***

На данной модели исследована активность разработанных малоинвазивных форм материалов в зависимости от количества rhBMP-2, иммобилизованного на поверхности носителя, а также интенсивность протекания остеогенеза во внутреннем пространстве имплантатов и в области контакта имплантатов с костным ложем (Макарова, 2013а;

Макарова 2013b). Работа выполнена в сотрудничестве с научным сотрудником ФГБУ «УНИИТО им. В.Д. Чаклина» Минздрава России к.б.н. Макаровой Э. Б.

Для проведения экспериментов использовали 7 половозрелых кроликов обоих полов весом 3-4 кг. В каждой задней конечности животных создавали по 2 дефекта (диаметр 5 мм) – в проксимальных метафизах большеберцовых костей и в дистальных метафизах бедренных костей. Для имплантации использовали пористую титановую матрицу с алмазоподобным покрытием (Макарова и др., 2011), насыщенную разными материалами (таблица 1). Контроль имплантации проводили рентгенографически.

Таблица 1 – Распределение животных по группам

Группа животных	Титановый имплантат	Материал, насыщающий имплантат	Концентрация rhBMP-2, мкг/имплантат
1	–	–	–
2	+	Клетки костного мозга	–
3	+	малоинвазивная форма ДКМ	–
4	+	малоинвазивная форма ДКМ	33,5±2,5
5	+	малоинвазивная форма ДКМ	65,5±2,5
6	+	малоинвазивная форма ДКМ	162,5±30,5

По достижении животными конечной точки эксперимента через 4 недели проводили эвтаназию с помощью передозировки наркоза, некропсию имплантатов и их гистологическое исследование (рисунок 5).

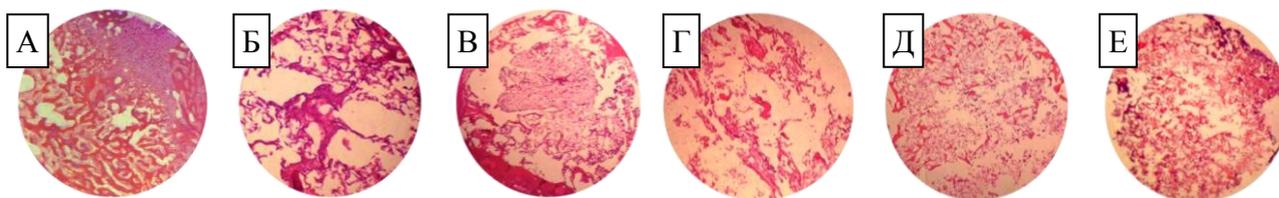


Рисунок 5. Гистологические препараты костной ткани, образованной в титановых имплантатах через 4 недели после имплантации: А – группа 1 (отрицательный контроль); Б – группа 2; В – группа 3; Г – группа 4; Д – группа 5; Е – группа 6. Окр. гематоксилином и эозином, X40.

По данным анализа площади зрелой новообразованной костной ткани в имплантатах показано, что среди исследованных концентраций rhBMP-2 наибольшую активность показал материал с белком в концентрации 65,5±2,5 мкг. Показатель площади в данном случае превысил даже показатели, полученные при использовании препарата клеток костного мозга (51,5% против 41,6%). Установлено, что разное содержание белка в образцах остеопластических материалов оказывало эффект различной степени выраженности, при этом максимальная из исследованных концентраций белка приводила к наименее выраженному остеогенезу, вероятно, за счет более быстрого высвобождения иммобилизованного белка с поверхности коллагеновой крошки в первые дни после ее имплантации. В случае применения материалов со средней и максимальной концентрациями rhBMP-2 процесс остеогенеза протекал от периферии (зоны контакта с материнской костью) к центральной части, что свидетельствует об остеоинтеграции имплантатов и согласуется с наблюдениями других исследователей (Albrektsson et al., 1982).

#### **Проверка активности остеоиндуктивных материалов в виде мембраны на модели создания краниальных дефектов критического размера**

Использование модели создания краниальных дефектов критического размера обладает перед остальными моделями рядом существенных преимуществ – это высокая

стандартизированность и воспроизводимость операций, отсутствие необходимости в дополнительной фиксации материала, благодаря оказанию твердой оболочкой головного мозга достаточной механической поддержки, и, наконец, минимизация миграции имплантированного материала за пределы дефекта. Все вышеперечисленные особенности делают эту модель чрезвычайно удобной для оценки остеоиндуктивных качеств материалов.

На данной модели тестировали остеоиндуктивный потенциал губчатых пористых мембран на основе ДКМ. Работа проводилась в сотрудничестве с научным сотрудником кафедры анатомии и физиологии живых организмов Национального Исследовательского «Белгородского Государственного Университета» к.б.н., доцентом Надеждиным С. В.

Для проведения экспериментов использовали 15 половозрелых самцов лабораторных крыс стока Wistar весом  $350 \pm 50$  г. Дефект критического размера диаметром 8 мм создавали путем трепанации при постоянном охлаждении места контакта трепана и кости физиологическим раствором. В опытной группе животных дефект заполняли мембраной из ДКМ с фактором роста rhBMP-2; в качестве положительного контроля выступала группа животных с дефектами, заполненными мембраной без белка, отрицательного – животные с незаполненным дефектом (таблица 2).

Таблица 2 – Распределение животных по группам в эксперименте.

Группа животных	Наличие мембраны	Наличие rhBMP-2
1	–	–
2	+	–
3	+	+

Для изучения аппозиции образующейся *de novo* костной ткани крысам вводили флуоресцентные метки: тетрациклина гидрохлорид (25 мг/кг веса) однократно сразу после операции, ализарин красный S (35 мг/кг веса) двукратно на 40 и 50 сутки (Van Gaalen et al., 2010). На 60 сутки после имплантации материалов животных подвергали эвтаназии с некропсией фрагмента свода черепа с дефектом. Далее проводили рентгенологический и томографический анализ образцов, гистоморфологическое исследование срезов и конфокальную микроскопию шлифов тканей (рисунки 6-8).

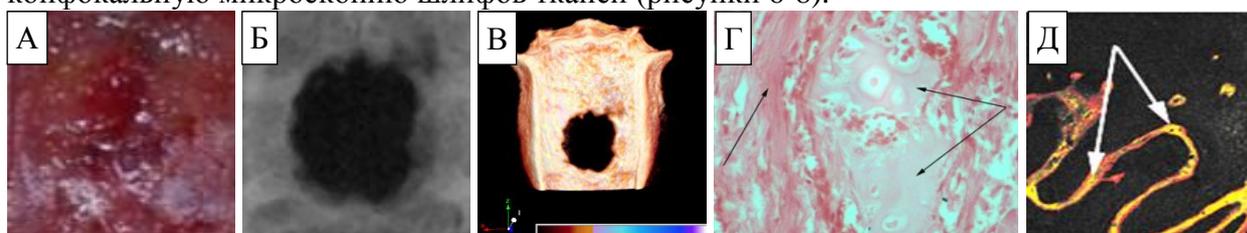


Рисунок 6. Группа 1 (Ничем не заполненный дефект): А – макрофотограмма, Б – рентгенограмма, В – микротомограмма, Г – микрофотограмма, Д – конфокальная микроскопия шлифов тканей.

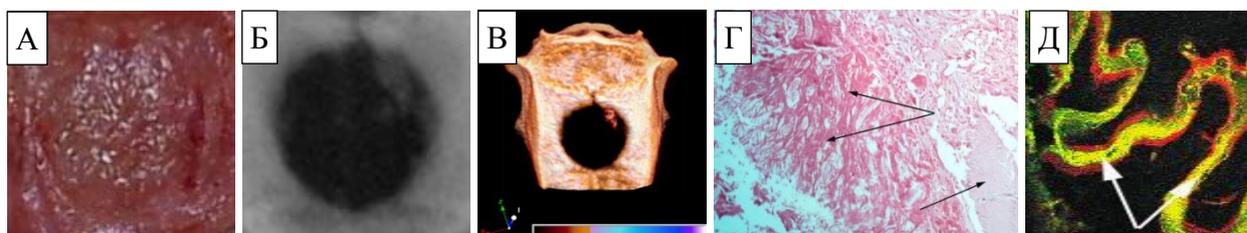


Рисунок 7. Группа 2 (Дефект, заполненный мембраной из ДКМ без rhBMP-2): А – макрофотограмма, Б – рентгенограмма, В – микротомограмма, Г – микрофотограмма, Д – конфокальная микроскопия шлифов тканей.

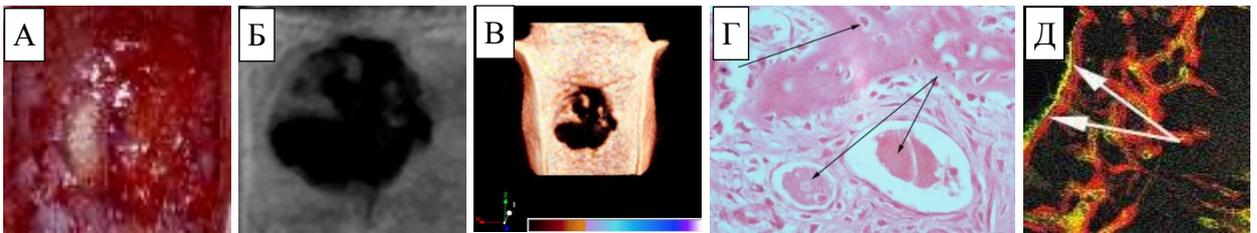


Рисунок 8. Группа 3 (Дефект, заполненный мембраной из ДКМ с rhBMP-2): А – макрофотограмма, Б – рентгенограмма, В – микротомограмма, Г – микрофотограмма, Д – конфокальная микроскопия шлифов тканей.

По данным морфологического исследования, подтвержденным рентгенографически и томографически, в области дефекта во всех группах животных к конечной точке эксперимента обнаруживаются фрагменты новообразованной костной ткани, при этом, в группе животных с мембраной с иммобилизованным rhBMP-2 очаги регенерации костной ткани наиболее крупные, локализуются как в центральной, так и в краевой зоне дефекта (рисунки 6, А-В; 7, А-В; 8, А-В).

По результатам исследования гистологических препаратов установлено, что в зоне дефекта регенерация идет по механизму непрямого остеогенеза. Так, в группе 1 область дефекта заполнена рыхлой и грубоволокнистой соединительными тканями с диффузно распределенными очагами хрящевой ткани, на границе с материнской костью определяется ретикулофиброзная костная ткань (рисунок 6, Г). При этом в группе 2 в зоне дефекта обнаружено значительное количество неизмененного имплантированного материала, содержащего по периферии остеогенные клетки (рисунок 7, Г). В группе 3 в зоне дефекта встречаются немногочисленные фрагменты мембраны с мультифокальными депозитами трабекулярной костной ткани и остеогенными клетками-предшественниками (рисунок 8, Г). При оценке эффективности процесса регенерации с помощью полуколичественного метода (Григорьян, 2007) показано, что наибольшей остеоиндуктивной активностью обладает материал в виде мембраны на основе ДКМ с добавлением rhBMP-2 (таблица 3).

Таблица 3 – Суммарная эффективность процесса регенерации.

Критерии оценки эффективности процесса регенерации, баллы	Группа животных		
	1	2	3
Состояние соединительнотканной прослойки между имплантатом и костью	-2	-1	1
Состояние структуры материнской кости	3	3	3
Состояние структуры новообразованной кости	1	2	3
Суммарная эффективность процесса регенерации	2	4	7

При анализе площади минерализованного костного матрикса в области дефекта и скорости аппозиции новообразованной костной ткани выявлено, что максимальными показателями обладают образцы в группе животных с применением rhBMP-2 (рисунки 6, Д; 7, Д; 8, Д; таблица 4).

Таблица 4 – Количественные показатели остеоиндуктивности материалов, имплантированных в дефекты свода черепа критического размера.

Показатель остеоиндуктивности	Группа животных		
	1	2	3
Площадь минерализованного костного матрикса, % от поля зрения	30	50	70
Скорость аппозиции новообразованной костной ткани, мкм/день	0,5±0,2	0,8±0,4	1,2±0,1

Также, при использовании метода микрокомпьютерной томографии были рассчитаны объемы и площади костной ткани и всех других тканей в зоне дефекта (рисунок 9). По результатам статистической обработки данных с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни показано, что значения объемов и площадей костной ткани, а также всех тканей в исследованной области интереса во всех опытных группах достоверно выше, чем в контрольной группе, при этом максимальных значений достигают показатели в группе с добавлением rhBMP-2.

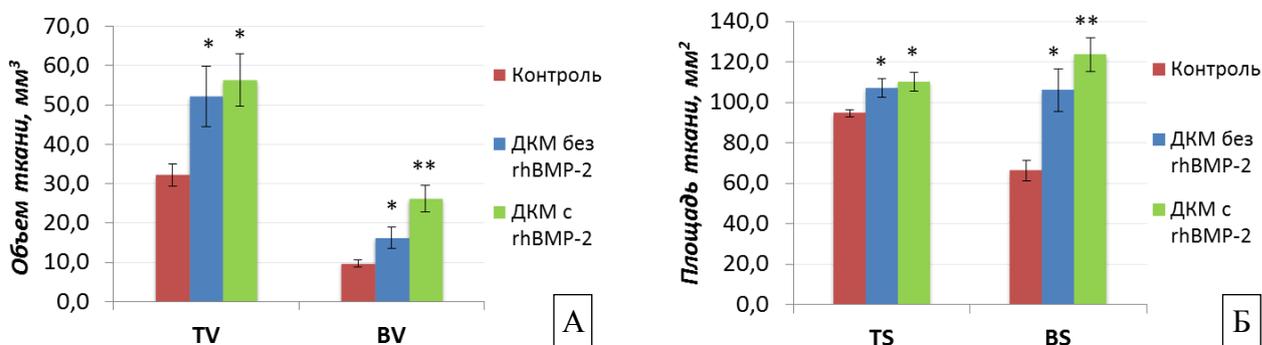


Рисунок 9. Количественные показатели регенерации в зоне дефекта: А – объемы костной ткани (BV) и всех тканей (TV) в области дефекта, Б – площади костной ткани (BS) и всех тканей (TS) в области дефекта. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  по отношению к контрольной группе животных.

Приведенные выше данные экспериментов *in vivo* свидетельствуют о высокой остеоиндуктивной и ангиогенной активности фактора роста и регенерации rhBMP-2, полученного с помощью микробиологического синтеза. В сравнении с контрольными группами животных при тестировании материалов, содержащих rhBMP-2, во всех случаях наблюдался более выраженный остеоиндуктивный эффект применения.

### 3 Создание штамма-продуцента химерного белка BMPRIA-CBD

Описанные в предыдущих разделах остеопластические материалы включают в себя рекомбинантный фактор роста и регенерации костной ткани человека rhBMP-2, полученный по методике, включающей хроматографическую очистку на стандартных сорбентах. Данный препарат обладает достаточно высокой степенью очистки и специфической активностью *in vitro* и *in vivo*. Однако имеется проблема, связанная с тем, что при микробиологическом синтезе в клетках *E. coli* с последующей очисткой по ранее разработанной методике (Шарапова и др., 2010) препарат, помимо функционально-активной димерной формы, включает в себя целый ряд других форм – мономерную, тетрамерную и др. С целью разработки подхода для обогащения препарата белка биологически активной димерной формой в нативной конформации в диссертационной работе был отработан метод очистки с использованием аффинного сорбента на основе рекомбинантного химерного белка – рецептора BMP-2, соединенного с целлюлозосвязывающим доменом (Шарапова и др., 2013).

Генно-инженерные работы проводились в сотрудничестве с с.н.с. лаборатории биологически активных наноструктур ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России к.б.н. Сергиенко О.В. Фрагмент гена, кодирующий эктодомен рецептора BMPRIA, получали синтетически и клонировали в ранее полученный в лаборатории плазмидный вектор ptt10.

Строение целевого химерного рекомбинантного белка BMPRIA-CBD было спланировано таким образом, чтобы в его структуре присутствовали аминокислотные последовательности сигнала L-аспарагиназы *E. coli* (28 а.о.), рецептора BMPRIA человека (86 а.о.), глицин-серинового спейсера (11 а.о.) и целлюлозосвязывающего домена CBD (181 а.о.). Наличие сигнального пептида L-аспарагиназы обеспечивает секрецию белка в

периплазматическое пространство клетки *E. coli*, где он переводится в растворимое состояние. За счет эктодомена рецептора BMPRIA человека обеспечивается аффинное связывание только димерной молекулы rhBMP-2, что позволяет использовать химерный белок для эффективной финальной очистки биологически активной димерной формы белка. Присутствие домена CBD в структуре белка обеспечивает его иммобилизацию на целлюлозосодержащем сорбенте, а спейсер из остатков глицина и серина между функциональными доменами BMPRIA и CBD сохраняет возможность каждого домена связываться со своим лигандом. Таким образом, целевой белок одновременно обладает способностью BMPRIA связываться со своим лигандом rhBMP-2 в форме димера и способностью CBD взаимодействовать с целлюлозосодержащим сорбентом.

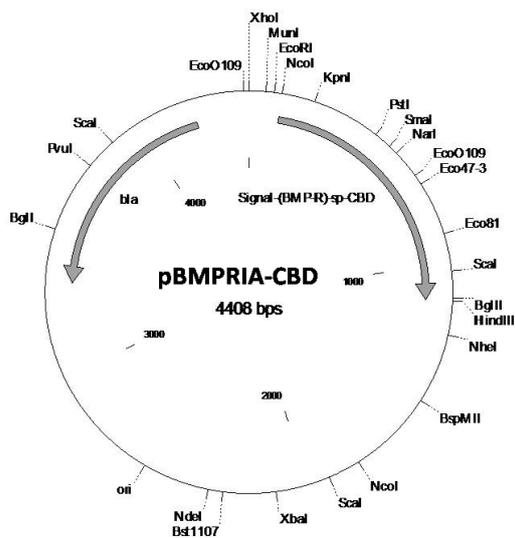


Рисунок 10. Схема плазмиды pBMPRIA-CBD.

Для получения штамма *E. coli* - продуцента рекомбинантного белка BMPRIA-CBD, клетки штамма *E. coli* M15 [pREP4] ( $\text{Nal}^s$ ,  $\text{Str}^s$ ,  $\text{rif}^s$ ,  $\text{lac}^-$ ,  $\text{ara}^-$ ,  $\text{gal}^-$ ,  $\text{mtl}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{recA}^+$ ,  $\text{uvr}^+$ ) трансформировали плазмидой pBMPRIA-CBD (рисунок 10) методом электропорации. Трансформированные клетки выращивали в колбах с 500 мл среды LB при 37°C до оптической плотности, соответствующей 1 единице поглощения ( $\lambda=600$  нм), после чего индуцировали синтез BMPRIA-CBD путем добавления в среду 150 мкл 0,1 М раствора индуктора – изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ). Затем культуру

выращивали в течение 4 часов. Для подтверждения экспрессии целевого белка анализировали уровень его продукции с помощью электрофореза в 15% полиакриламидном геле в присутствии ДСН по методу Лэммли в денатурирующих условиях; экспрессия в трансформированных клонах составила 15-20% от общего белка клетки.

#### 4 Оптимизация экспрессии BMPRIA-CBD в штамме-продуценте и условий его культивирования в ферментере

Оптимизацию условий культивирования штамма-продуцента химерного белка BMPRIA-CBD проводили по следующим параметрам:

1. Время внесения и концентрация индуктора;
2. Среда для выращивания – компоненты среды и их соотношение;
3. Условия выращивания – температура, аэрация.

Изучение времени выращивания культуры до внесения индуктора и времени выращивания индуцированной культуры проводили на среде LB в колбах. ИПТГ вносили в начале, середине и конце логарифмической фазы роста, т.е. через 1,5, 3,0 и 4,5 часа, контролируя время его внесения по показателю оптической плотности (ОП). Уровень экспрессии гена, кодирующего BMPRIA-CBD, при внесении ИПТГ в середине и конце фазы логарифмического роста составлял 15-20% от суммарного белка клетки. Время экспрессии белка после внесения ИПТГ определяли в ферментере. Показано, что для наработки максимального количества белка в ферментере достаточно 2-х часов после индукции. Концентрацию ИПТГ в среде варьировали от 0,1 мМ до 1,0 мМ. Увеличение концентрации в этом диапазоне не приводило к увеличению количества наработанного белка, поэтому в дальнейшем использовали ИПТГ в оптимальной концентрации 0,2 мМ.

Подбор параметров среды для наращивания биомассы проводили в колбах в несколько этапов, варьируя содержание дрожжевого экстракта и триптона. Дрожжевой экстракт заменяли на дрожжевой автолизат, триптон – на бактопептон, дрожжевой пептон и гидролизат казеина СМ7. Также сумму дрожжевого экстракта и триптона заменяли сухим дрожжевым автолизатом. Экспрессия белков во всех указанных случаях сохранялась на том же уровне, что и в исходной среде LB, однако конечный объем биомассы, и, как следствие, накопление белка снижалось на 20-30%. Увеличение концентрации триптона и гидролизата казеина в среде до 2% приводило к увеличению накопления биомассы. Буферность среды поддерживали с помощью внесения гидро- и дигидрофосфатов калия, уровень глюкозы увеличили до 0,3% от общего объема, что позволило дополнительно повысить уровень накопления биомассы в среднем в 1,5 раза.

Температуру выращивания культуры варьировали в диапазоне 25-37°C. При снижении температуры время после индукции увеличивалось, не сказываясь при этом на уровне экспрессии белков. При соблюдении подобранных оптимальных условий (обогащение среды LB глюкозой, увеличение содержания триптона, внесение гидро- и дигидрофосфатов калия, температура выращивания 37°C, время выращивания 2 часа после индукции, концентрация ИПТГ 0,2 мМ) при выращивании культуры в колбах удалось увеличить выход белка с 1,8 до 2,6 г, т.е. приблизительно в 1,5 раза. Изменения аэрации в колбах достигали варьированием количества среды в диапазоне от 50 до 250 мл. Показано, что при минимальном содержании среды накопление биомассы было максимальное, что в дальнейшем было подтверждено при помощи культивирования в ферментере с помощью изменения оборотов мешалки.

Все эти результаты были учтены при выращивании культуры в ферментере (рисунок 11).

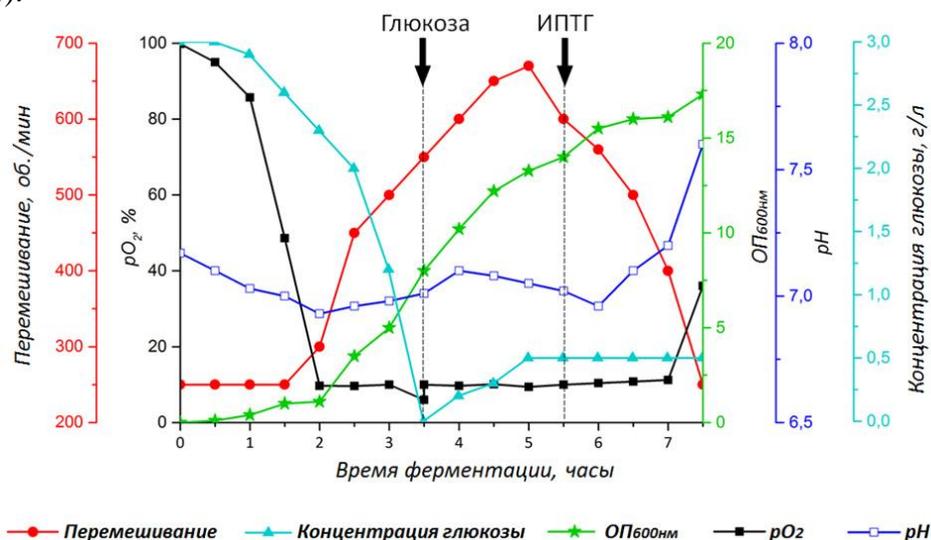


Рисунок 11. Изменение показателей в процессе культивирования с подпиткой глюкозой.

После засева культура начала расти, о чем судили по увеличению ОП, количество растворенного кислорода и глюкозы снижалось. Для предотвращения лимита по кислороду значение рО<sub>2</sub> поддерживали на уровне 10% за счет увеличения количества оборотов мешалки. Через 3,5 часа роста наблюдался резкий подъем рО<sub>2</sub>, что свидетельствовало об исчерпании глюкозы в среде (ОП=8,2 опт.ед.). После этого начинали вносить 10% раствор глюкозы со скоростью 1,5 мл/мин. Глюкозу добавляли еще 2 часа до достижения ОП=14 опт. ед, затем добавляли ИПТГ. Ферментацию продолжали еще 2 часа, пока накопление биомассы не останавливалось (ОП=18,2 опт. ед.). Таким образом, показано, что ведение процесса с добавлением глюкозы дает возможность получить большее количество биомассы, а, следовательно, и белка.

На рисунке 12 представлен электрофорез в полиакриламидном геле, на котором показана индукция BMPRIA-CBD при культивировании культуры штамма-продуцента в ферментере.

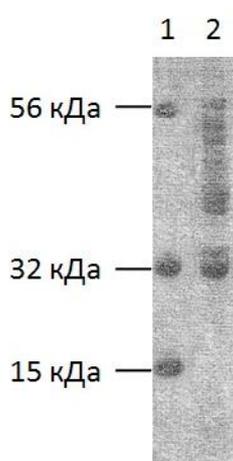


Рисунок 12. Окрашенный Кумасси R250 полиакриламидный гель после электрофореза по Лэмбли белков биомассы продуцента BMPRIA-CBD, растворенных в буфере для лизиса клеток. Дорожки: 1 – маркеры молекулярного веса; 2 – препарат белков биомассы через 2 часа после индукции синтеза белка в ферментере.

Проведенная оптимизация условий культивирования штаммов в колбах и ферментере, а именно, обогащение среды LB глюкозой, увеличение содержания в ней триптона, внесение гидро- и дигидрофосфатов калия, автоматическое поддержание значения pH среды (7,2-7,4), поддержание значения  $pO_2$  на уровне 10%, выращивание при температуре 37°C, ферментация в течение 2 часов после индукции экспрессии ИПТГ (0,2 мМ), позволила увеличить суммарный выход BMPRIA-CBD до уровня 30% от всех белков штамма.

Из наработанной в процессе культивирования биомассы проводилось выделение белка BMPRIA-CBD с целью получения на его основе целлюлозосодержащего сорбента и использования полученного сорбента для обогащения препаратов rhBMP-2 димерной формой в нативной конформации.

## 5 Разработка метода очистки димерной формы rhBMP-2 с помощью аффинного сорбента на основе BMPRIA-CBD

Процесс получения целлюлозосодержащего сорбента с иммобилизованным на нем BMPRIA-CBD состоит из нескольких этапов: разрушение биомассы клеток, центрифугирование клеточного лизата, отделение супернатанта BMPRIA-CBD, инкубирование с суспензией целлюлозосодержащего сорбента, отмывка сорбента от несвязавшегося белка.

Наработанную в результате ферментирования культуры биомассу клеток (1,5 г) суспендировали в 50 мл буфера (1% тритона X-100, 100 мМ NaCl, 25 мМ Трис-HCl, pH 8,0), инкубировали в течение 15-30 минут смесь с лизоцимом в концентрации 10 мкг/мл, и разрушали бактериальные клетки под действием ультразвука с амплитудой 45% дважды по 1,5 мин с перерывом в 10 мин. После этого лизат осветляли центрифугированием при 13000 g в течение 30 минут, отделяли осадок фрагментов клеточных мембран и субклеточных фракций и получали супернатант, содержащий растворимый рекомбинантный белок BMPRIA-CBD. Раствор BMPRIA-CBD инкубировали с суспензией целлюлозосодержащего сорбента (perloza MT 200, Iontosorb, Чехия) в течение 4-18 часов. Затем сорбент тщательно и многократно отмывали от несвязавшегося белка раствором, содержащим 1% тритона X-100, 100 мМ NaCl, 25 мМ Трис-HCl, pH 8,0, путем суспендирования сорбента в буфере и последующего центрифугирования. Полученный таким образом сорбент содержал в качестве аффинного лиганда иммобилизованный BMPRIA-CBD в количестве ~1 мг белка на 1 мл сорбента.

Выделение и предварительную очистку rhBMP-2 проводили в соответствии с описанной методикой (Шарапова и др., 2010). Для выделения rhBMP-2 из телец включения, в которых он синтезируется, их растворяли в растворе мочевины (4 М в 50 мМ Трис-HCl, pH 8,0) с последующим осаждением центрифугированием и отделением нерастворившегося осадка. Для увеличения соотношения долей димерной/мономерной формы rhBMP-2 проводили рефолдинг белка в присутствии L-аргинина. К раствору белка добавляли двойной объем 1 М раствора L-аргинин-HCl, pH 8,9, инкубировали в течение ночи, диализовали против 50 мМ Трис-HCl, pH 8,0. На рисунке 13 представлены фракции

до (дорожки 2, 3) и после (дорожки 4, 5) инкубации с L-аргинином: видно увеличение содержания димера.

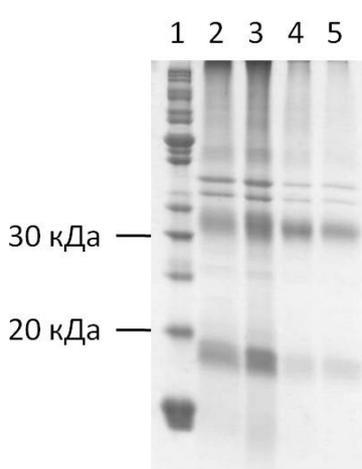


Рисунок 13. Электрофореграмма rhBMP-2 до и после рефолдинга: 1 – маркер молекулярной массы; 2, 3 – препараты до рефолдинга; 4, 5 – препараты после рефолдинга.

На финальном этапе очистки димерной формы rhBMP-2 из смеси его мономеров, димеров и олигомеров использовали свойство его специфического взаимодействия со своим клеточным рецептором BMPRIA, домен которого входит в состав синтезированного химерного белка BMPRIA-CBD. Хроматографическую колонку заполняли полученным целлюлозосодержащим сорбентом с BMPRIA-CBD (5 мл раствора) и уравнивали, пропуская через колонку десятикратный объем буферного раствора (100 мМ NaCl, 25 мМ Трис-НСl, рН 8,0). Раствор rhBMP-2, содержащий мономерные, димерные и олигомерные формы белка, пропускали через подготовленную колонку со скоростью 1 мл/мин (рисунок 14, дорожка 1). Димерная форма rhBMP-2 связывалась с иммобилизованным на сорбенте белком BMPRIA-CBD (рисунок 14, дорожка 2), образуя лиганд-рецепторный комплекс (рисунок 14, дорожка 3). Колонку со связавшимся димером rhBMP-2 промывали пятикратным объемом буфера, содержащего 100 мМ NaCl, 25 мМ трис-НСl, рН 8,0. Далее через колонку пропускали 20 мл элюирующего буферного раствора (1,5 М NaCl в 25 мМ Трис-НСl, рН 8,0) со скоростью 1 мл/мин (рисунок 14, дорожка 4). Анализ собранных фракций rhBMP-2 проводили методом электрофореза в ПААГ в неденатурирующих условиях по Лэммли.

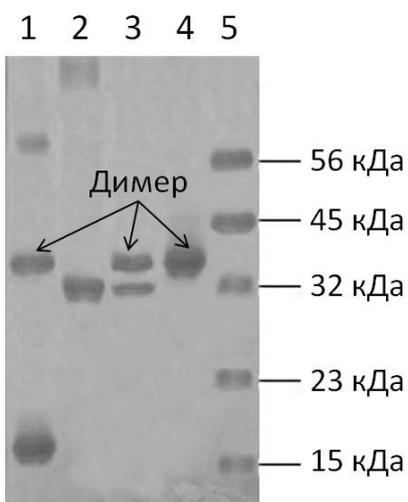


Рисунок 14. Электрофореграмма анализа собранных фракций белка rhBMP-2 методом электрофореза в ПААГ в неденатурирующих условиях по Лэммли: 1 – препарат rhBMP-2 до очистки; 2 – рекомбинантный химерный белок BMPRIA-CBD; 3 – сорбированный белок rhBMP-2 в комплексе с BMPRIA-CBD и целлюлозосодержащим сорбентом; 4 – препарат димерной формы rhBMP-2 после элюирования с сорбента; 5 – маркер молекулярной массы.

Как видно из данных, приведенных на электрофореграмме (рисунок 14), в результате хроматографии на сорбенте с иммобилизованным рецептором rhBMP-2 весь элюированный с сорбента белок находится в димерной форме. Концентрация полученного препарата белка составляет 1,5 мг/мл.

## 6 Проверка биологической активности выделенного rhBMP-2 *in vitro*

Проверку биологической активности rhBMP-2, очищенного с использованием аффинного сорбента на основе рецептора BMP-2, оценивали в два этапа. На первом этапе оценивали его способность индуцировать синтез щелочной фосфатазы в культуре эукариотических клеток C2C12 в сравнении с rhBMP-2, очищенным по ранее разработанной методике и содержавшем ~80% димерной формы белка (Шарапова и др., 2010). На данной модели тестировали выделения белков в четырех концентрациях: 0,05, 0,5, 5,0 и 50 мкг/мл (рисунок 15). В качестве контроля использовали физиологический раствор.

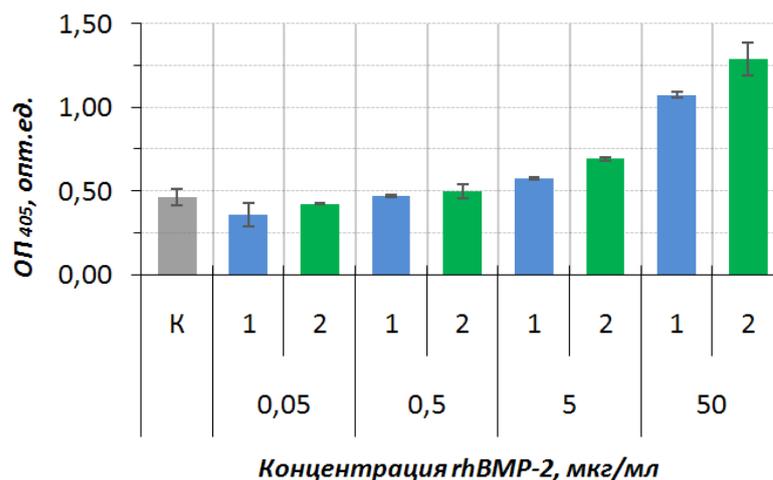


Рисунок 15. График зависимости индукции синтеза щелочной фосфатазы в культуре клеток C2C12 от концентрации белка rhBMP-2. К – контроль; 1 – препарат rhBMP-2, очищенный по ранее разработанной методике; 2 – препарат rhBMP-2, очищенный с помощью разработанного нами подхода.

Из диаграммы видно, что при увеличении концентрации rhBMP-2 наблюдается дозозависимое увеличение его биологической активности. В максимальной из исследованных концентраций (50 мкг/мл) удельная активность rhBMP-2, очищенного с помощью аффинного сорбента на основе рецептора BMP-2 и состоящего полностью из димерной формы, превысила активность препарата белка, очищенного по ранее разработанной методике, на 19,8%.

На втором этапе работы оценивали влияние rhBMP-2, очищенного с использованием аффинного сорбента на основе рецептора BMP-2, на пролиферацию и остеогенную дифференцировку мультипотентных стромальных клеток (МСК) костного мозга и селезенки мышей (Горская и др., 2013). Работа проводилась в сотрудничестве со старшим научным сотрудником лаборатории регуляции иммунитета ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, д.б.н. Горской Ю.Ф. Культуры костного мозга и селезенки на 9-10 день культивирования состояли из колоний стромальных фибробластов с макрофагами, расположенными внутри колоний МСК и между ними. Культуры клеток также содержали небольшое количество кроветворных и лимфоидных клеток. Нами было установлено, что при внесении в культуральную среду rhBMP-2 количество колоний и численность в них фибробластов увеличивается (таблицы 5, 6).

Таблица 5 – Численность МСК-колоний и макрофагов в культурах костного мозга мышей линии СВА в присутствии rhBMP-2 в культуральной среде.

Оцениваемый параметр	Концентрация rhBMP-2, мкг/мл		
	0	1	10
Число МСК колоний	72±2	113±13	100±21
Число фосфатазоположительных колоний МСК, шт.	9±1	23±3	20±5
Доля фосфатазоположительных колоний, %	12,5	20,4	20
Эффективность клонирования МСК (ЭКО-МСК), $\times 10^5$	1,4±0,1	2,3±0,2	2,0±0,4
Увеличение ЭКО-МСК, разы	–	1,6	1,4
Число макрофагов в 10 полях зрения, шт.	89±14	35±6	25±5
Снижение числа макрофагов, разы	–	2,5	3,6

Таблица 6 – Численность МСК-колоний и макрофагов в культурах селезенки мышей линии СВА в присутствии rhBMP-2 в культуральной среде.

Оцениваемый параметр	Концентрация rhBMP-2, мкг/мл			
	0	1	10	100
Число МСК колоний	14±2	30±5	39±9	46±6
Число фосфатазоположительных колоний МСК	0	3±1	4±1	6±1
Доля фосфатазоположительных колоний, %	0	10,0	10,2	13,0
ЭКО-МСК ( $\times 10^5$ )	0,14±0,02	0,30±0,06	0,38±0,09	0,46±0,06
Увеличение ЭКО-МСК, разы	–	2,1	2,7	3,3
Число макрофагов в 10 полях зрения	192±9	75±5	52±10	32±8
Снижение числа макрофагов, разы	–	2,6	3,7	6,4

При внесении rhBMP-2 в культуру клеток костного мозга эффективность клонирования стромальных клеток-предшественников увеличивалась уже при минимальной концентрации белка 1 мкг/мл в 1,6 раза. При этом стоит отметить, что при дальнейшем увеличении концентрации белка до 10 мкг/мл эффективность клонирования МСК сохранилась на том же уровне, но в 3,6 раза снизилось количество макрофагов (Таблица 5). Добавление rhBMP-2 в культуру клеток селезенки мышей в концентрации 1, 10 и 100 мкг/мл значительно увеличивало количество стромальных фибробластов в колониях (размер колоний возрастал более чем вдвое), а также увеличивало ЭКО-МСК в 2,1, 2,7 и 3,3 раза, соответственно (Таблица 6). В нормальных условиях в клетках селезенки не наблюдается остеогенной дифференцировки, однако при появлении индуктора (например, rhBMP-2) примерно 10% колоний способны к ее осуществлению. При увеличении концентрации белка было установлено, что происходит индукция остеогенной дифференцировки не только клеток, способных к остеогенезу, но и тех, которые этой способностью, видимо, не обладали. Это следует из увеличения количества фосфатазоположительных колоний с 10 до 13% при доведении концентрации rhBMP-2 до 100 мкг/мл. Также было установлено дозозависимое ингибирующее действие белка rhBMP-2 на макрофаги: при повышении содержания фактора роста в культуре клеток и костного мозга, и селезенки, наблюдалось снижение количества макрофагов от 2,5 до 6,4 раз в зависимости от концентрации белка. Таким образом, при тестировании *in vitro* димерной формы белка, нами было показано, что он обладает выраженной биологической активностью и перспективен для создания остеоиндуктивных материалов на его основе.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам работы были получены остеоиндуктивные материалы российского производства на основе ДКМ, содержащие rhBMP-2.

Также, был разработан и запатентован новый биотехнологический подход для выделения rhBMP-2, обеспечивающий получение препарата белка в биологически активной димерной форме высокой степени чистоты. Разработанный подход может использоваться для получения препаратов rhBMP-2 в качестве финальной стадии очистки для повышения их биологической эффективности, а также может быть адаптирован для выделения других белков семейства TGF- $\beta$  за счет их аффинного связывания со своими клеточными рецепторами, иммобилизованными на носителях.

Обогащенная тромбоцитами плазма крови может быть использована в различных моделях оценки эффективности остеопластических материалов (в особенности, сыпучей консистенции) *in vivo* и при изучении влияния белковых ростовых факторов плазмы крови на остеогенную активность rhBMP-2 при их совместном применении.

## ВЫВОДЫ

1) Разработан способ получения остеоиндуктивных остеопластических материалов на основе деминерализованного костного матрикса, в том числе, содержащих иммобилизованный рекомбинантный костный морфогенетический белок 2 человека (rhBMP-2).

2) На адаптированных моделях оценки регенеративного потенциала *in vivo* на лабораторных животных (крысы, кролики) экспериментально доказаны остеоиндуктивные, остеоинтегративные и ангиогенные свойства разработанных материалов при применении их как в самостоятельном виде (модель индукции эктопического остеогенеза, модель регенерации краниальных дефектов критического размера), так и в сочетании с металлоконструкциями из титана. Показано, что максимально выраженными свойствами обладают материалы с добавлением rhBMP-2.

3) Получен новый штамм *E. coli* M15 [pREP4, pBMPRIA-CBD], обеспечивающий продукцию рекомбинантного химерного белка BMPRIA-CBD, состоящего из рецептора BMPRIA фактора роста костной ткани BMP-2, соединенного с целлюлозосвязывающим доменом из *Caldicellulosiruptor bescii*. Оптимизация условий культивирования штамма-продуцента позволила обеспечить синтез BMPRIA-CBD на уровне 30% от всех белков штамма.

4) Разработан подход для обогащения препаратов rhBMP-2 биологически активной димерной формой белка с помощью аффинной хроматографии на целлюлозном сорбенте с иммобилизованным рекомбинантным белком BMPRIA-CBD.

5) Подтверждена биологическая активность и установлено позитивное дозозависимое влияние очищенных по разработанной методике препаратов rhBMP-2 в димерной форме на синтез щелочной фосфатазы в культуре эукариотических клеток C2C12, пролиферацию и остеогенную дифференцировку МСК костного мозга и селезенки мышей, а также супрессирующее действие на макрофаги, выражающееся в снижении их числа от 2,5 до 6,4 раз в зависимости от концентрации белка.

## Список работ, опубликованных по теме диссертации

### *Статьи, опубликованные в журналах из перечня ВАК*

1. Горская, Ю. Ф. Влияние BMP-2 на численность и остеогенные свойства мультипотентных стромальных клеток и экспрессию генов цитокинов в первичных культурах клеток костного мозга и селезенки мышей СВА, иммунизированных бактериальными антигенами / Ю. Ф. Горская, Т. А. Данилова, М. В. Мезенцева, **М. С. Бартов** и др. // Бюллетень Экспериментальной Биологии И Медицины. – 2013. – Т.155. – №5. – С.602–606.

2. Громов, А. В. Разработка методики получения деминерализованного костного матрикса с максимальным остаточным содержанием нативных факторов роста костной ткани /А. В. Громов, К. Е. Никитин, Т. А. Карпова, **М. С. Бартов** и др. // Биотехнология. – 2012. – №5. – С. 66–75.

3. Федорова, М.З. Экспериментальная оценка композиционного материала на основе белково-минеральных компонентов и рекомбинантного костного морфогенетического белка-2 в качестве покрытия титановых имплантатов / М.З. Федорова, С.В. Надеждин, А.С. Семихин, М.А. Лазебная, Г.В. Храмов, Ю.Р. Колобов, А.В. Громов, **М.С. Бартов**, В.Г. Лунин, А.С. Карягина, Д.В. Гундеров // Травматология и ортопедия России. – 2011. – №2 (60). – С.101–106.

### *Статьи, опубликованные в журналах не из перечня ВАК*

1. **Бартов, М. С.** Остеопластические препараты нового поколения «Гамалант», содержащие факторы роста и регенерации костной ткани / **М. С. Бартов**, А. С. Карягина, А. В. Громов и др. // Кафедра травматологии и ортопедии. – 2012. – №2. – С.21–25.

### *Патенты*

1. Лунин В.Г., Громов А.В., Карягина-Жулина А.С., Ершова А.С., Лаврова Н.В., Семихин А.С., Соболева Л.А., Овечкина Т.А., Субботина М.Е., Грунина Т.М., Мишина Д.М., Котнова А.П., Никитин К.Е., **Бартов М.С.**, Гинцбург А.Л., Шарапова Н.Е. Способ получения деминерализованного костного матрикса в виде крошки. Заявка на патент РФ №2011108938 от 10.03.2011 г. Патент РФ №2456003 от 20 июля 2012 года. Опубликовано 20.07.2012. Бюл. №20.

2. Лунин В.Г., Миргазизов Р.М., Ткачук А.П., Карягина-Жулина А.С., Гинцбург А.Л., **Бартов М.С.**, Шарапова Н.Е., Миргазизов А.М., Миргазизов М.З., Хафизов Р.Г., Котнова А.П. Способ адресной доставки остеопластических материалов, содержащих факторы роста и регенерации костной ткани, в область дефекта альвеолярной кости. Заявка на патент РФ №2011121880 от 31.05.2011 г. Патент на изобретение №2469676. Опубликовано: 20.12.2012. Бюл. №35.

3. Шарапова Н.Е., Котнова А.П., Сергиенко О.В. Галушкина З. М., Полетаева Н. Н., Лаврова Н.В., Грунина Т.М., Лящук А.М., Семихин А.С., Громов А.В., **Бартов М.С.**, Субботина М.Е., Карпова Т.А., Ершова А.С., Лунин В.Г., Карягина-Жулина А.С., Гинцбург А.Л. Рекомбинантная плазида, рекомбинантный штамм, рекомбинантный белок BMP-2 и способ выделения рекомбинантного белка в димерной форме. Патент на изобретение №2499048. Заявка 2012140616/10 от 24.09.2012. Опубликовано: 20.11.2013. Бюл. №32.

### *Тезисы*

1. **Бартов, М. С.** Создание эффективных микробиологических продуцентов белка rhBMP-2 и экспериментальная проверка остеоиндуктивных материалов для медицины и ветеринарии на его основе / **М. С. Бартов**, А. С. Карягина, В. Г. Лунин // XIV молодежная научная конференция «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии»: мат. научно-практ. конф., г. Москва, 2014. – С. 23-26.

2. Громов, А. В. Остеопластические материалы нового поколения / А. В. Громов, **М. С. Бартов**, Л. А. Соболева и др. // Фармацевтические и медицинские биотехнологии: мат. научно-практ. конф., г. Москва, 2012. – С. 226.

3. Громов, А. В. Остеопластические материалы нового поколения на основе ксеногенного деминерализованного костного матрикса с добавлением рекомбинантных костных морфогенетических белков человека rhBMP-2 и rhBMP-7 / А. В. Громов, **М. С. Бартов**, К. Е. Никитин, Д. М. Мишина, М. Е. Субботина, Л. А. Соболева, Т. А. Овечкина, Т. М. Грунина, М. А. Сергиенков, Н. В. Лаврова, Н. Н. Полетаева, З. М. Галушкина, А. С. Семихин, А. П. Ткачук, Н. Е. Шарапова, А. С. Карягина, В. Г. Лунин // Чаплинские чтения: мат. научно-практ. конф., Екатеринбург, 2011. – С. 159-160.

4. Громов, А. В. Разработка биокompозитов нового поколения на основе ксеногенного деминерализованного костного матрикса с добавлением рекомбинантных костных морфогенетических белков человека rhBMP-2 и rhBMP-7 / А. В. Громов, **М. С. Бартов**, К. Е. Никитин, Д. М. Мишина, М. Е. Субботина, Л. А. Соболева, Т. А. Овечкина, Т. М. Грунина, М. А. Сергиенков, Н. В. Лаврова, Н. Н. Полетаева, З. М. Галушкина, А. С. Семихин, А. П. Ткачук, Н. Е. Шарапова, А. С. Карягина, В. Г. Лунин // Илизаровские чтения: мат. научно-практ. конф., г. Курган, 2011. – С. 474-475.

5. Громов, А. В. Остеопластические материалы нового поколения на основе ксеногенного деминерализованного костного матрикса с добавлением рекомбинантного костного морфогенетического белка человека rhBMP-2 / А. В. Громов, **М. С. Бартов**, У. Ф. Мухаметов, К. Е. Никитин, Д. М. Савина, Э. Б. Макарова, Е. В. Разумкина, Т. М. Грунина, Л. А. Соболева, М. Е. Субботина, А. С. Семихин, Ф. Ф. Мухаметов, В. Г. Лунин, А. С. Карягина // Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине: сборник трудов научно-практ. конф., г. Казань, 2014. – С. 173.

6. Макарова, Э. Б. Экспериментальное обоснование использования биокомпозитных имплантатов из пористого титана, модифицированных алмазоподобными покрытиями, для замещения костной ткани / Э. Б. Макарова, Ю. М. Захаров, А. П. Рубштейн, А. В. Громов, **М. С. Бартов**, А. С. Карягина-Жулина, В. Г. Лунин // Технологии оптимизации процесса репаративной регенерации в травматологии, ортопедии и нейрохирургии: мат. научно-практ. конф., г. Саратов, 2013. – С. 25-27.

7. Макарова, Э. Б. Создание и обоснование применения биоимплантатов с использованием нанотехнологий / Э.Б. Макарова, И. Л. Шлыков, Д. Г. Близнец, З. И. Горбунова, А. П. Рубштейн, И. Ш. Трахтенберг, А. В. Громов, **М. С. Бартов**, А. С. Карягина // XVI съезд ортопедов-травматологов Украины: мат. научно-практ. конф., г. Харьков, 2013. – С. 39-40.