

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2022.12.4-9>

Влияние ибупрофена на аденовирусную трансдукцию культур мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток

Бухарова Т.Б.¹, Недорубова И.А.¹, Мокроусова В.О.^{1,2}, Меглей А.Ю.^{1,2}, Васильев А.В.^{1,2}, Гольдштейн Д.В.¹

1 – ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»
115478, г. Москва, ул. Москворечье, д. 1

2 – ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» Министерства здравоохранения Российской Федерации
119021, г. Москва, ул. Тимура Фрунзе, д. 16

При разработке методов генной терапии на основе аденовирусных конструкций одной из основных проблем является иммунный ответ на введение вирусных частиц. Для снижения иммунной реакции предлагается использовать нестероидный противовоспалительный препарат ибупрофен. Установлено, что ибупрофен в высоких концентрациях оказывает дозозависимое токсическое действие на культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. Определено, что в концентрации 0,125 мг/мл ибупрофен не вызывает гибели клеток, а также оказывает положительное влияние на аденовирусную трансдукцию культур ММСК: через 3 суток после заражения Ad-GFP в дозе 320 TCID₅₀/мл выявлено 48,47±2,06% трансдуцированных клеток, а при добавлении в среду 0,125 мг/мл ибупрофена – 60,07±1,64% ($p < 0,05$). Ибупрофен может быть использован в генной терапии, основанной на аденовирусной трансдукции, для снижения иммунного ответа при локальном воздействии высоких доз вирусных векторов.

Ключевые слова: аденовирусная трансдукция, ибупрофен, генная терапия.

Для цитирования: Бухарова Т.Б., Недорубова И.А., Мокроусова В.О., Меглей А.Ю., Васильев А.В., Гольдштейн Д.В. Влияние ибупрофена на аденовирусную трансдукцию культур мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. *Медицинская генетика* 2022; 21(12): 4-9.

Автор для корреспонденции: Бухарова Т.Б.; e-mail: bukharova-rmt@yandex.ru

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 21-75-10147.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 19.11.2022

Influence of ibuprofen on adenoviral transduction of multipotent mesenchymal stromal cells

Bukharova T.B.¹, Nedorubova I.A.¹, Mokrousova V.O.^{1,2}, Meglei A.Yu.^{1,2}, Vasilyev A.V.^{1,2}, Goldstein D.V.¹

1 – Research Centre for Medical Genetics
1, Moskvorechye str., Moscow, 115522, Russian Federation

2 – Central Research Institute of Dental and Maxillofacial Surgery
16, Timura Frunze str., Moscow, 119021, Russian Federation

One of the main problems in the development of gene therapy methods based on adenovirus constructs is the immune response to the introduction of viral particles. It is proposed to use the non-steroidal anti-inflammatory drug ibuprofen to reduce the immune response. Ibuprofen at high concentrations has a dose-dependent toxic effect on cultures of multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs). It was determined that at concentration of 0,125 mg/ml ibuprofen does not cause cell death, and also has a positive effect on adenovirus transduction of MSCs: 48,47±2,06% of transduced cells were detected 3 days after infection with 320 TCID₅₀/ml Ad-GFP, and when 0,125 mg/ml Ibu was added – 60,07±1,64% ($p < 0,05$). Ibuprofen can be used in gene therapy based on adenoviral transduction to reduce the immune response to local exposure high doses of viral vectors.

Keywords: adenoviral transduction, ibuprofen, gene therapy.

For citation: Bukharova T.B., Nedorubova I.A., Mokrousova V.O., Meglei A.Yu., Vasilyev A.V., Goldstein D.V. Influence of ibuprofen on adenoviral transduction of multipotent mesenchymal stromal cells. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]* 2022; 21(12): 4-9. (In Russ.)

Corresponding author: Bukharova T.B., e-mail: bukharova-rmt@yandex.ru

Funding. The research was supported by the Russian Science Foundation, grant no. 21-75-10147.

Conflict of interest. The authors declare no conflicts of interest.

Accepted: 19.11.2022

Введение

Генная терапия является одним из наиболее перспективных направлений медицины будущего. В настоящее время ведется разработка эффективных и безопасных систем доставки генных конструкций в клетки с использованием вирусных и невирусных методов [1, 2]. Наиболее эффективны подходы с использованием вирусных векторов, основанные на их природной способности проникать в клетки. Для клинического применения в генотерапии наиболее безопасны конструкции, лишенные способности встраиваться в геном клетки-хозяина, что исключает риск инсерционного мутагенеза. Одними из таких векторов являются аденовирусные конструкции. К преимуществам этих векторов также относятся большая пакующая емкость генома, способность инфицировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки и возможность получения вирусных препаратов с высоким титром [2]. Однако одним из основных недостатков аденовирусных систем является гуморальный и клеточный иммунный ответ на высокие дозы вектора [3]. Добиться снижения иммунной реакции на аденовирусные векторы можно за счет применения нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВС). В клинической практике широко используется ибупрофен (Ibu), как один из наиболее эффективных и безопасных [4]. Ibu оказывает выраженное противовоспалительное действие за счет неселективного ингибирования ферментов циклооксигеназ 1 и 2 типа [5], что приводит к снижению уровня цитокинов IL-6 и TNF- α и позволяет уменьшить иммунный ответ на введение аденовирусных векторов. Кроме того, было показано, что применение Ibu в составе тканеинженерных конструкций способствует снижению иммунного ответа при аллогенной трансплантации клеток [6].

Целью данной работы является исследование влияния Ibu на эффективность аденовирусной трансдукции и жизнеспособность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК).

Методы

Клеточные культуры. Культуры ММСК получали из жировой ткани крыс по ранее разработанной методике [7]. Клетки культивировали в ростовой среде ДМЕМ/F12 (ПанЭко, Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, РАА laboratories, Канада), 0,584 мг/мл L-глутамин (ПанЭко), 5000 ед./мл пенициллина (ПанЭко) и 5000 мкг/мл

стрептомицина (ПанЭко) при стандартных условиях 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Аденовирусная трансдукция. В работе использовали аденовирусные векторы с геном зеленого флуоресцентного белка (GFP). Трансдукцию проводили по ранее разработанной методике [8]. Клетки ММСК трансдуцировали в среде ДМЕМ/F12 с антибиотиками и 2% ЭТС в течение 6, 16 и 24 ч с вирусной нагрузкой 80, 160 и 320 TCID₅₀/мл. Ibu добавляли в концентрациях 0,5 мг/мл, 0,25 мг/мл и 0,125 мг/мл на протяжении всего периода. Эффективность трансдукции оценивали через 1 и 3 суток визуально по наличию флуоресцентного белка GFP на микроскопе AxioObserver. Z1 (CarlZeiss) с камерой AxioCamMRc 5 и на проточном цитофлуориметре CyFlow ML.

Оценка жизнеспособности. К клеткам добавляли 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ, ПанЭко) в концентрации 0,5 мг/мл и инкубировали 2 ч при 37°C. Кристаллы формазана экстрагировали из клеток с помощью ДМСО (ПанЭко) и измеряли оптическую плотность элюата при длине волны 570 нм, вычитая фоновое значение при 620 нм. Измерения проводили на планшетном ридере BioRad Reader xMark (Bio-Rad Laboratories, США).

Статистический анализ. Статистический анализ результатов и построение графиков выполняли в программе SigmaPlot 12.0 (Германия). Группы сравнивались с использованием *t*-критерия Стьюдента. Статистически значимыми считали различия при уровне ниже 5% ($p < 0,05$).

Результаты

Подбор условий для эффективной аденовирусной трансдукции ММСК

Было показано, что за время инкубации (6, 16 и 24 ч) при различной вирусной нагрузке (80, 160 и 320 TCID₅₀/мл) аденовирусные конструкции не оказывают выраженного цитотоксического действия на ММСК (рис. 1). Через 3 суток при максимальной вирусной нагрузке 320 TCID₅₀/мл и инкубации на протяжении 24 ч жизнеспособность клеток составляла 86,35±2,85%.

Условия аденовирусной трансдукции влияют на эффективность трансдукции (рис. 2). Инкубация с 80 TCID₅₀/мл в течение 24 ч приводила к трансдукции 9,74% клеток через 1 сутки и 34,09% клеток через 3 суток. А при использовании 320 TCID₅₀/мл наблюдается трансдукции 60,14% клеток уже через 1 сутки и 84,38% через 3 суток. Таким образом, наиболее эффективная ви-

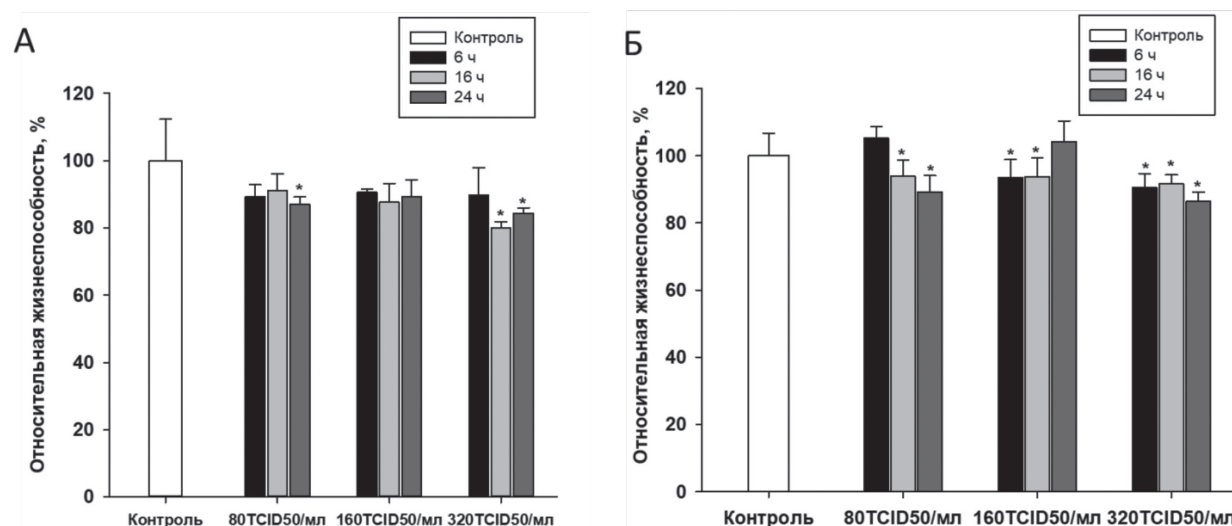
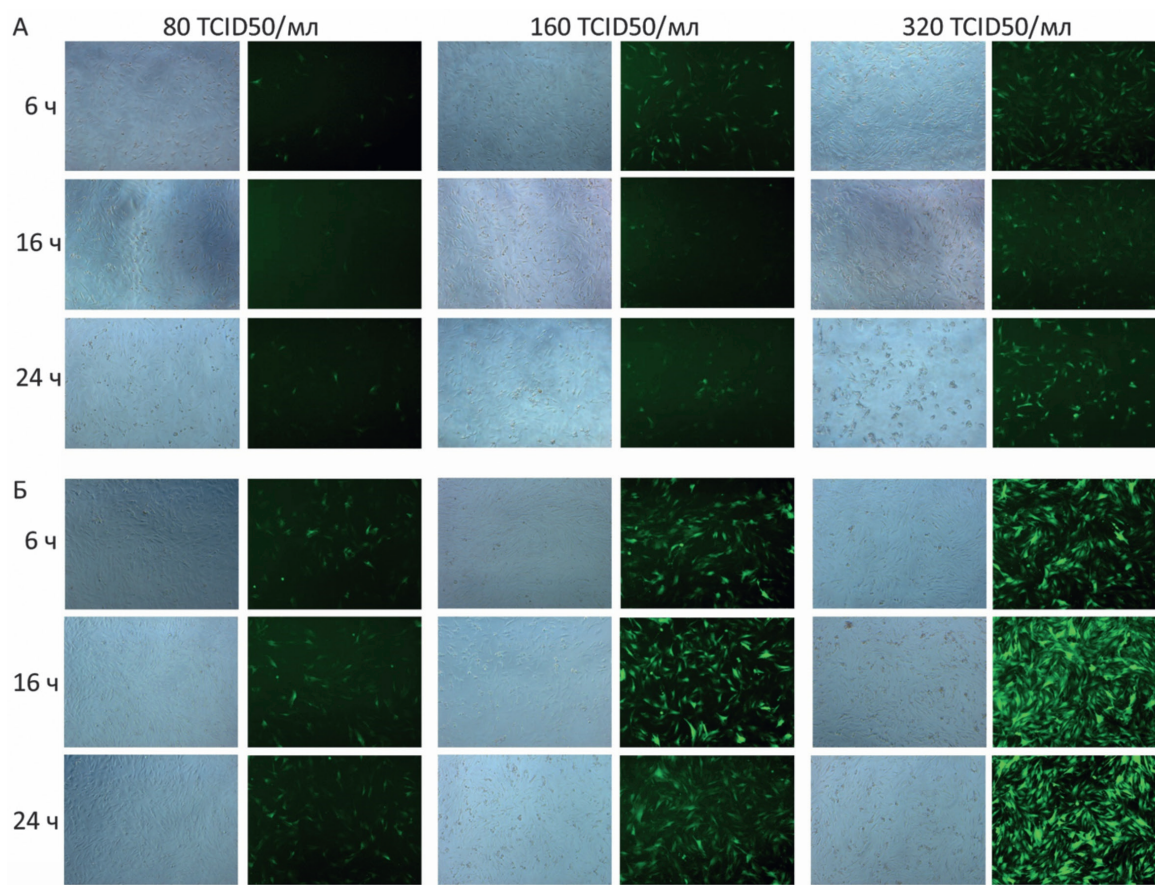


Рис. 1. Жизнеспособность ММСК в зависимости от времени инкубации и вирусной нагрузки через 1 сут (А) и 3 сут (Б) после аденовирусной трансдукции, МТТ-тест. * $p < 0,05$ (по сравнению с контролем).

Fig. 1. Viability of MSCs depending on the incubation time and viral load 1 day (A) and 3 days (Б) after adenoviral transduction, MTT test. * $p < 0.05$ (compared to control).



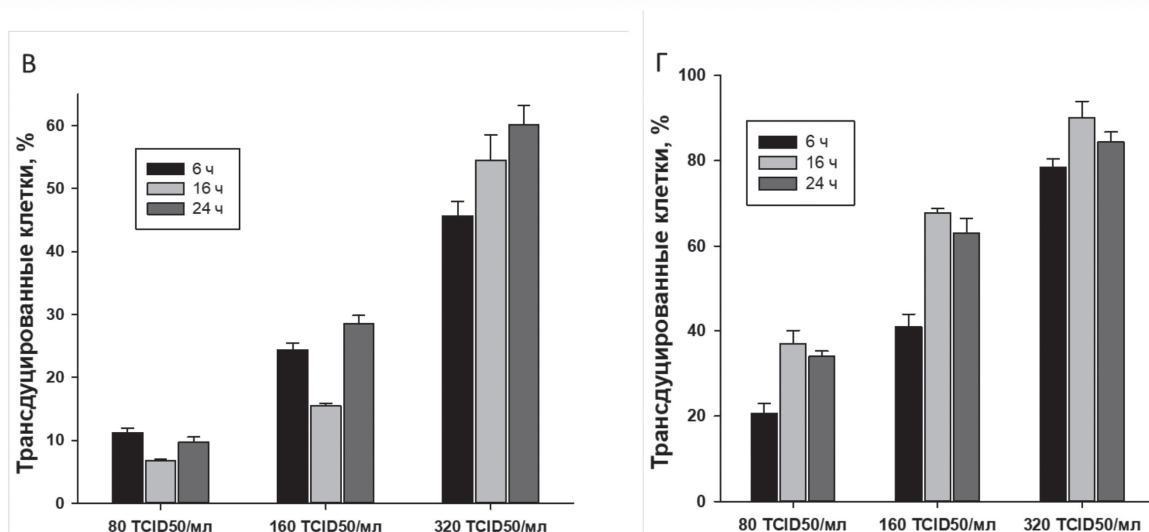


Рис. 2. Эффективность аденовирусной трансдукции ММСК в зависимости от времени инкубации и вирусной нагрузки через 1 сут (А,В) и 3 сут (Б, Г). А, Б – флуоресцентная микроскопия, 10х. В,Г – процент трансдуцированных клеток, проточная цитометрия.

Fig. 2. Efficiency of adenovirus transduction of MMSCs depending on the incubation time and viral load after 1 day (A, B) and 3 days (B, D). A, Б – fluorescence microscopy, 10x. В, Г – percentage of transduced cells, flow cytometry.

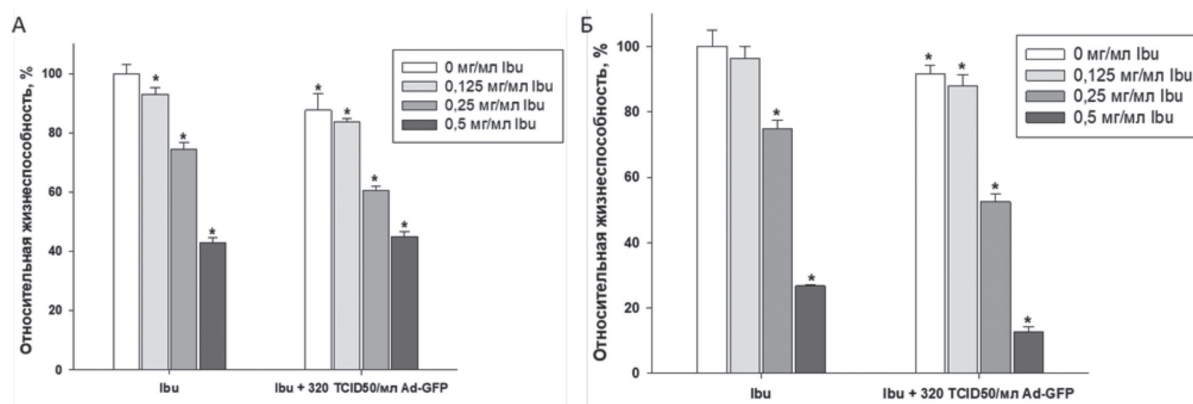


Рис. 3. Влияние различных концентраций Ibu на жизнеспособность ММСК через 1 сут (А) и 3 сут (Б) инкубации, МТТ-тест. * $p < 0,05$ (по сравнению с контролем).

Fig. 3. Effect of various Ibu concentrations on the viability of MSCs after 1 day (A) and 3 days (Б) of incubation, MTT test. * $p < 0.05$ (compared to control).

русная трансдукция наблюдалась при инкубации ММСК с 320 TCID50/мл в течение 16 ч. Такие условия обеспечивали трансдукцию 90,8% клеток через 3 суток.

Влияние Ibu на эффективность аденовирусной трансдукции ММСК

Исследовали влияние различных концентраций Ibu (0,5 мг/мл, 0,25 мг/мл и 0,125 мг/мл) на жизнеспособность ММСК и на эффективность аденови-

русной трансдукции. ММСК инкубировали в среде в присутствии Ibu, в том числе с добавлением Ad-GFP в дозе 320 TCID50/мл. Через 24 ч Ad-GFP удаляли и вносили новую порцию Ibu. Анализ проводили через 1 и 3 суток после трансдукции. Было показано, что Ibu вызывает дозозависимое цитотоксическое действие на ММСК (рис. 3). Инкубация клеток с 0,5 мг/мл Ibu в течение 3 суток приводила к снижению жизнеспособности клеток

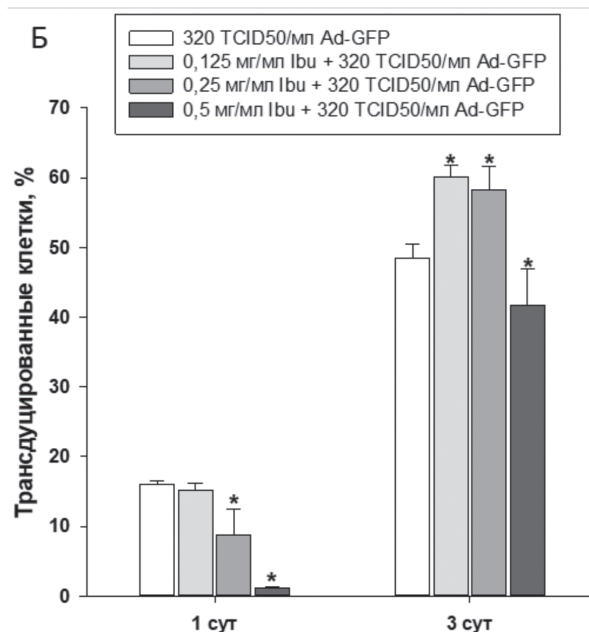
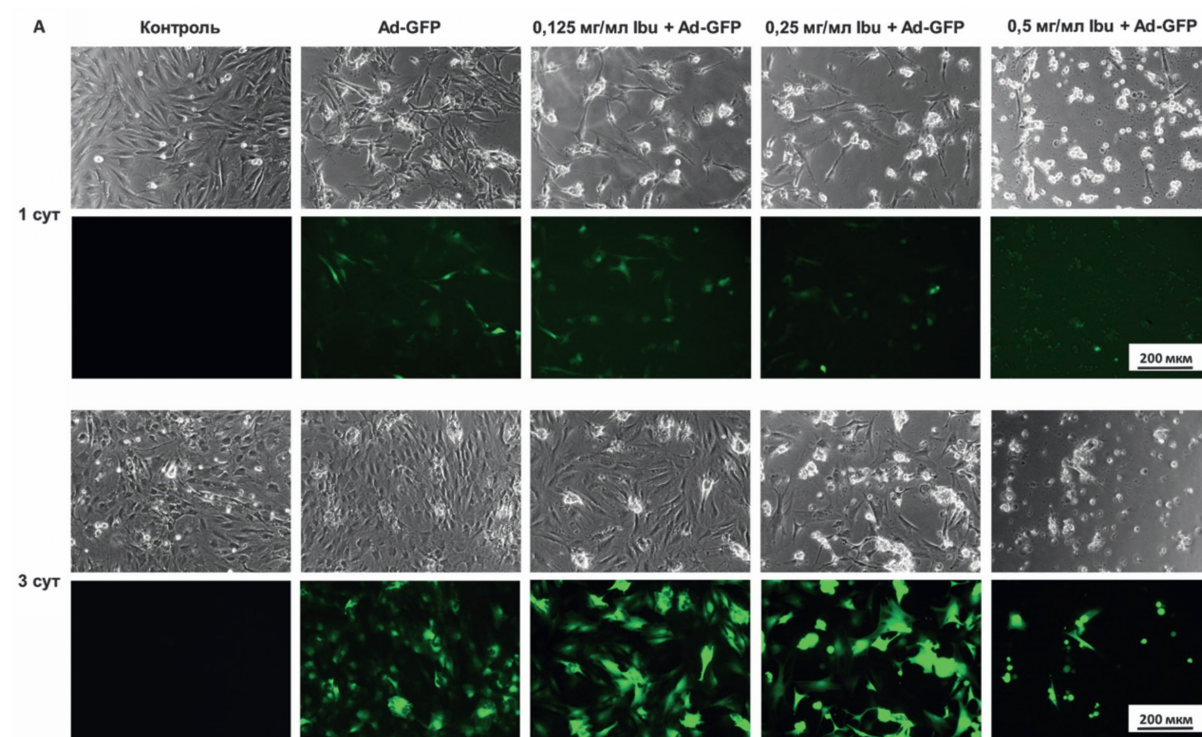


Рис. 4. Влияние различных концентраций Ibu на эффективность аденовирусной трансдукции ММСК через 1 сутки и 3 сутки инкубации. А – флуоресцентная микроскопия. Б – проточная цитофлуориметрия. * $p < 0,05$ (по сравнению с Ad-GFP).

Fig. 4. Effect of different Ibu concentrations on the efficiency of MSCs adenovirus transduction after 1 day and 3 days of incubation. А – fluorescence microscopy. Б – flow cytometry. * $p < 0.05$ (compared to Ad-GFP).

до $26,75 \pm 0,22\%$, а в концентрации $0,125$ мг/мл Ibu практически не оказывал цитотоксического воздействия на клетки (доля живых клеток — $96,33 \pm 3,76\%$). При этом добавление Ad-GFP еще больше снижает жизнеспособность клеток при соответствующей концентрации Ibu: до $12,73 \pm 1,48\%$ и $88,06 \pm 3,29\%$ соответственно для $0,5$ мг/мл Ibu и $0,125$ мг/мл Ibu через 3 суток (рис. 3Б).

Методом флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуориметрии оценили влияние Ibu на эффективность аденовирусной трансдукции (рис. 4). Показано, что добавление Ibu в концентрации $0,125$ мг/мл способствует повышению доли трансдуцированных клеток: на 3 сутки после заражения 320 TCID₅₀/мл Ad-GFP — $48,47 \pm 2,06\%$, а в присутствии Ibu — $60,07 \pm 1,64\%$ ($p < 0,05$).

Выводы

Таким образом, $0,125$ мг/мл Ibu — наиболее эффективная концентрация, не оказывающая цитотоксического действия на ММСК и не препятствующая аденовирусной трансдукции.

Полученные в результате исследования условий для аденовирусной трансдукции ММСК в присутствии ибупрофена (320 TCID₅₀/мл в течение 16 ч и $0,125$ мг/мл Ibu) могут быть использованы при разработке методов генной терапии для снижения иммунного ответа при локальном воздействии высоких доз вирусных векторов, включая разработку ген-активированных материалов и тканеинженерных конструкций для восполнения костных дефектов.

Литература

1. Недорубова И.А., Бухарова Т.Б., Васильев А.В. и др. Невирусная доставка гена BMP2 для регенерации костной ткани. *Гены и Клетки*. 2020;15(4):33-39.
2. Warnock J.N., Daigre C., Al-Rubeai M. Introduction to viral vectors. *Viral vectors for gene therapy*. 2011;1-25.
3. Hartman Z.C., Appledorn D.M., Amalfitano A. Adenovirus vector induced innate immune responses: impact upon efficacy and toxicity in gene therapy and vaccine applications. *Virus res*. 2008;132(1-2):1-14.
4. Bushra R., Aslam N. An overview of clinical pharmacology of ibuprofen. *Oman Med J*. 2010;25(3):155.
5. Tolba R. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Treatment of Chronic Pain Conditions*. 2017;77-79.
6. Volkov A.V., Antonov E.N., Vasilev A.V., et al. Vliyaniye protivovospalitel'nykh preparatov na regeneratsiyu kostnoy tkani pri transplantatsii mul'tipotentnykh mezenkhimal'nykh stromal'nykh kletok [Influence of anti-inflammatory preparations on regeneration of a bone tissue at transplantation the multipotentnykh mesenchymal the stromalnykh of cages]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2014;1(4):17-24. (In Russ.)
7. Bukharova T.B., Volkov A.V., Antonov E.N. Tkaneinzhenernaya konstruktsiya na osnove mul'tipotentnykh mezenkhimal'nykh stromal'nykh kletok zhirovoy tkani, polilaktidnykh nositeley i trombositarnogo gelya [Tissue-engineered construction made of adipose derived multipotent mesenchymal stromal cells, polylactide scaffolds and platelet gel]. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya [Cell transplantation and tissue engineering]*. 2013;8(4):61-68. (In Russ.)
8. Bukharova TB, Logovskaya LV, Vikhrova EB et al. Adenoviral transduction of multipotent mesenchymal stromal cells from human adipose tissue with bone morphogenetic protein BMP-2 gene. *Bull Exp Biol Med*. 2013;156(1):122-126.

References

1. Nedorubova I.A., Bukharova T.B., Vasiliev A.V. et al. Nevirusnaya dostavka gena BMP2 dlya regeneratsii kostnoy tkani [Non-viral delivery of the BMP2 gene for bone regeneration]. *Geny i Kletki [Genes and Cells]*. 2020;15(4):33-39. (In Russ.)
2. Warnock J.N., Daigre C., Al-Rubeai M. Introduction to viral vectors. *Viral vectors for gene therapy*. 2011;1-25.
3. Hartman Z.C., Appledorn D.M., Amalfitano A. Adenovirus vector induced innate immune responses: impact upon efficacy and toxicity in gene therapy and vaccine applications. *Virus res*. 2008;132(1-2):1-14.
4. Bushra R., Aslam N. An overview of clinical pharmacology of ibuprofen. *Oman Med J*. 2010;25(3):155.
5. Tolba R. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Treatment of Chronic Pain Conditions*. 2017;77-79.
6. Volkov A.V., Antonov E.N., Vasilev A.V., et al. Vliyaniye protivovospalitel'nykh preparatov na regeneratsiyu kostnoy tkani pri transplantatsii mul'tipotentnykh mezenkhimal'nykh stromal'nykh kletok [Influence of anti-inflammatory preparations on regeneration of a bone tissue at transplantation the multipotentnykh mesenchymal the stromalnykh of cages]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2014;1(4):17-24. (In Russ.)
7. Bukharova T.B., Volkov A.V., Antonov E.N. Tkaneinzhenernaya konstruktsiya na osnove mul'tipotentnykh mezenkhimal'nykh stromal'nykh kletok zhirovoy tkani, polilaktidnykh nositeley i trombositarnogo gelya [Tissue-engineered construction made of adipose derived multipotent mesenchymal stromal cells, polylactide scaffolds and platelet gel]. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya [Cell transplantation and tissue engineering]*. 2013;8(4):61-68. (In Russ.)
8. Bukharova TB, Logovskaya LV, Vikhrova EB et al. Adenoviral transduction of multipotent mesenchymal stromal cells from human adipose tissue with bone morphogenetic protein BMP-2 gene. *Bull Exp Biol Med*. 2013;156(1):122-126.