

УДК 577.352.4:612.419.014

Выбор эффективной невирусной системы доставки siРНК в культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток

© 2020 Е.В. ГАЛИЦЫНА^{1*}, Т.Б. БУХАРОВА¹, А.А. БУЯНОВА¹, К.С. ДАВЫГОРА¹,
Д.В. ГОЛЬДШТЕЙН¹

¹ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова» (МГНЦ), Москва, 115522

*e-mail: galitsyna.ev@gmail.com

Поступила в редакцию 03.03.2020 г.

После доработки 25.03.2020 г.

Принята к публикации 06.07.2020 г.

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) могут служить как моделью для разработки методик в области генно-клеточных технологий, так и средством доставки нуклеиновых кислот в организм, в том числе в составе тканеинженерных конструкций. Молекулы коротких интерферирующих РНК (siРНК), действующие по механизму РНК-интерференции, являются высокоточным инструментом для генетического сайленсинга их мишеней – мРНК-транскриптов целевых генов. Поиск трансфекционных агентов, обладающих низкой токсичностью и в то же время высокой эффективностью доставки молекул siРНК и других нуклеиновых кислот в ММСК, является актуальной задачей для разработки терапии на основе данных молекул. Сравнительная оценка эффективности и цитотоксичности пяти трансфекционных агентов для доставки молекул siРНК показала, что агенты на основе катионных полимеров более эффективны, чем липосомы, тогда как цитотоксичность не зависит от химического класса агента. Для двух из трех трансфекционных агентов, выбранных по эффективности и относящихся к разным классам – TurboFect и Lipofectamine® 3000, – выявлено умеренное влияние на жизнеспособность клеток, что позволяет рекомендовать их в качестве высокоэффективных и относительно низкотоксичных агентов для трансфекции культур ММСК.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, короткие интерферирующие РНК, трансфекция, липофекция, катионные липиды, катионные полимеры, полиэтиленимин

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-4-74-79

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) являются одной из основных моделей для разработки методик в области генно-клеточных технологий для лечения множества заболеваний благодаря легкому получению из разных тканей, от пациентов разных возрастных групп, высокому пролиферативному и дифференцировочному потенциалам. Кроме того, изменения, происходящие с ММСК *in vitro*, наиболее полно отражают их поведение в моделях *in vivo* – в отличие от иммортализованных клеточных линий. Сложность в работе с этим типом клеток состоит

в том, что ММСК, как и многие первичные культуры, трудно трансфицировать, что связано с их более медленной пролиферацией по сравнению с иммортализованными клеточными линиями [1, 2].

Основные задачи, требующие решения при доставке нуклеиновых кислот в клетки, – достижение высокой эффективности и безопасности. Вирусная трансдукция высокоэффективна, но не безопасна – из-за возможности возникновения инсерционного мутагенеза в случае интеграции вирусных векторов в геном и нежелательной иммуногенности. Кроме того, вирусные системы доставки

Список сокращений: ММСК – мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки; ЭТС – эмбриональная сыворотка теленка; 6-FAM (6-carboxyfluorescein) – 6-карбоксихлорофлуоресцеин; siРНК (small interfering RNA) – короткие интерферирующие РНК; N/P (nitrogen/phosphate ratio) – соотношение азот/фосфат (соответствует соотношению siРНК в мкг: трансфекционный агент в мкл); PEI (polyethylenimine) – полиэтиленимин.

ограничены относительно небольшой вместимостью последовательности трансгена, а также сложностями их производства и масштабирования [2].

Методы невирусной доставки нуклеиновых кислот (трансфекции) более безопасны, как правило, не индуцируют иммунный ответ и хорошо воспроизводимы, что важно для технологий модификации ММСК. Но, согласно данным многих авторов, большинство из них характеризуется низкой эффективностью и высокой токсичностью [2–4].

Методы трансфекции клеточных культур могут быть основаны на повышении проницаемости клеточных мембран за счет нарушения их целостности – это микроинъекция, электропорация, нуклеофекция, сонопорация. Такие методы доставки достаточно эффективны, но их использование ограничено токсичностью за счет механического повреждения клеточной мембраны, поэтому они не могут быть применены *in vivo* из соображений безопасности [2]. Химические трансфекционные агенты, включая липиды, полимеры различной структуры, фосфаты кальция, наночастицы, способны переносить нуклеиновые кислоты в клетки посредством естественных механизмов транспорта через мембрану, таких как макропиноцитоз, клатринзависимый или кавеоларный эндоцитоз [2, 5]. Выбор механизма обусловлен преимущественно размером и зарядом макромолекулы трансфекционного агента [6]. Показано, что поглощение липоплексов происходит только за счет клатринопосредованного эндоцитоза, в то время как захват полиплексов происходит одновременно с помощью двух механизмов – клатринзависимого и кавеоларного эндоцитоза [4].

Молекулы коротких интерферирующих РНК (siРНК), действующие по механизму РНК-интерференции, являются точным инструментом для генетического сайленсинга их мишеней – мРНК-транскриптов целевых генов. По сравнению с другими классами малых молекул действие siРНК отличается высокой специфичностью и эффективностью.

Повышение эффективности доставки молекул siРНК или других нуклеиновых кислот в клетки важно при разработке терапии на основе ММСК, тканеинженерных конструкций или биосовместимых материалов. Импрегнированные в такие конструкции или материалы молекулы могут влиять на процессы дифференцировки и перепрограммирования как отдельных клеток, так и клеточных популяций, тем самым снижая риск отторжения трансплантата или направляя секрецию терапевтических средств [2]. В связи с этим возникает по-

требность в поиске новых агентов и методик для повышения эффективности трансфекции ММСК.

Цель исследования – сравнительная оценка цитотоксичности и эффективности доставки молекул siРНК в культуры ММСК с помощью пяти различных трансфекционных агентов:

- 1) на основе липосом METAFECTENE® PRO (Biontex, США), Lipofectamine® 2000 и Lipofectamine® 3000 (Thermo Fisher Scientific, США);
- 2) на основе катионных полимеров TurboFect (Thermo Fisher Scientific) и PEI 25 кДа (Cat. No 23966-1; Polyscience, США).

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Трансфекция

В работе использовали ММСК жировой ткани человека на третьем пассаже. Культуры были получены из тканей здоровых доноров, подписавших добровольное информированное согласие, после получения разрешения этического комитета ФГБНУ «МГНЦ».

ММСК трансфицировали липоплексами/полиплексами, состоящими из siРНК (50 пмоль/мкл) с флуоресцентной меткой 6-карбоксифлуоресцеином (6-FAM), не нацеленными ни на один известный ген человека (табл. 1), и METAFECTENE® PRO, Lipofectamine® 2000, Lipofectamine® 3000 или TurboFect в соотношении азот/фосфат (N/P) 1:2 или PEI в соотношении N/P 1:3. Количества/соотношения siРНК и трансфекционных агентов были определены после предварительной оптимизации методики согласно рекомендациям производителей. Липоплексы/полиплексы формировали в натрий-фосфатном буфере Дульбекко (DPBS) или в среде Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) в течение 20 мин. Трансфекцию проводили в 24-луночном культуральном планшете при достижении клеточными культурами 70–80%-ного конфлюэнтного монослоя в 1 мл среды Opti-MEM с 5% эмбриональной сыворотки теленка (ЭТС) (РАА Laboratories, США) в течение 24 ч. В качестве контроля использовали ММСК, которые инкубировали в эквивалентных количествах среды Opti-MEM с 5% ЭТС и добавлением DPBS или Opti-MEM, а также в присутствии трансфекционных агентов. Последовательности молекул siРНК были взяты из работы Ногова и соавт. [7].

Сразу после трансфекции и каждые третьи сутки культурам заменяли среду на DMEM («Панэко», Россия), содержащую 10% ЭТС, 4 mM L-глутамин («Панэко»), 100 мг/л амикацина (ОАО «Синтез», Россия).

Таблица 1

Используемая в работе siРНК**The siRNA used**

Цепь siРНК	Последовательность 5'→3'
Прямая	FAM-AGGUCGAACUACGGGUCAAdTdc
Обратная	FAM-UUGACCCGUAGUUCGACCUdAdG

Проточная цитофлуориметрия

Эффективность трансфекции ММСК в суспензии оценивали при помощи проточного цитофлуориметра CyFlow® Space (Partec, США) и пакета программ FloMax® Software (Partec).

МТТ-тест

Цитотоксичность липоплексов/полиплексов анализировали на первые и седьмые сутки после проведения трансфекции с помощью МТТ-теста по стандартной методике [8], определяя количество живых клеток в лунке планшета. Измерения поглощения кристаллов формазана проводили на многофункциональном планшетном ридере EnSpire® Multimode Plate Reader (PerkinElmer, США) при длине волны 570 нм и вычитали фоновое значение при 620 нм.

Статистический анализ

Статистическую обработку полученных данных и построение диаграмм выполняли в программе GraphPad Prism 8.00 (США). Межгрупповые различия определяли с помощью критерия Даннета при сравнении трех и более групп. Статистически значимыми считали различия при значениях $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для доставки молекул siРНК в ММСК наиболее эффективными оказались трансфекционные агенты на основе катионных полимеров: TurboFect и PEI (87,53±9,92% и 97,67±0,67% трансфицированных клеток соответственно). Из трансфекционных агентов на основе липосом самым эффективным был Lipofectamine® 3 000, при использовании которого удалось достичь содержания трансфицированных клеток в культуре на уровне 78,02±18,44% (табл. 2).

Ранее нами была исследована [9,10] эффективность трансфекции культур ММСК, полученных из жировой ткани и пульпы зубов человека, и показано, что доставка молекул siРНК более эффективно происходила с помощью TurboFect (97,2% и 98,5% трансфицированных клеток соответственно), чем при использовании Lipofectamine® 2000 (менее 13%) и METAFECTENE® PRO

(менее 5%). По эффективности трансфекции ММСК с помощью TurboFect полученные нами результаты сопоставимы с опубликованными; а при использовании METAFECTENE® PRO и Lipofectamine® 2000, благодаря оптимизации методики, нам удалось повысить долю трансфици-

Таблица 2

Эффективность трансфекции ММСК липоплексами/полиплексами, образованными с помощью различных трансфекционных агентов**The efficiency of MSC transfection by lipopolyplexes/polyplexes formed by different transfection reagents**

Трансфекционный агент	Эффективность трансфекции, %
METAFECTENE® PRO	19,52 ± 1,82
Lipofectamine® 2000	20,15 ± 0,78
Lipofectamine® 3000	78,02 ± 18,44
TurboFect	87,53 ± 9,92
PEI	97,67 ± 0,67

Примечание: Эффективность трансфекции оценивали методом проточной цитофлуориметрии.

Note: Transfection efficiency was evaluated by flow cytometry.

рованных клеток до 19,52±1,82% и 20,15±0,78% соответственно (табл. 2).

В предыдущих исследованиях нами показано, что Lipofectamine® 2000 достаточно эффективен при трансфекции клеточной линии НЕК-293 – более 65% [10]. На той же линии клеток, НЕК-293, Shi и соавт. [5] показали, что при использовании Lipofectamine® 3000 трансфекция и трансдукция клеток проходят намного эффективнее, чем с Lipofectamine® 2000.

В исследовании Ноаге и др. [11], проведенном на ММСК из костного мозга человека, при трансфекции плазмидной ДНК с помощью Lipofectamine® 2000 в концентрациях, в несколько раз превышающих рекомендованные производителем и использованных нами в этом исследовании, наибольшая эффективность трансфекции составила 39,08%. Увеличение количества/изменение соотношения трансфекционного агента и плазмидной ДНК приводило к повышению эффективности трансфекции, но одновременно значительно снижало жизнеспособность клеток в культуре – с 78,64% до 53,3% через 48 ч после трансфекции. В работе de Carvalho и соавт. [1], проведенной на ММСК, полученных из костного мозга человека, использование Lipofectamine® 3000 в концентрациях, рекомендованных производителем, приводило к трансфекции плазмидной ДНК только 26% клеток. Сравнив полученные нами результаты с вышеприведенными данными других

ВЫБОР ЭФФЕКТИВНОЙ НЕВИРУСНОЙ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ siРНК

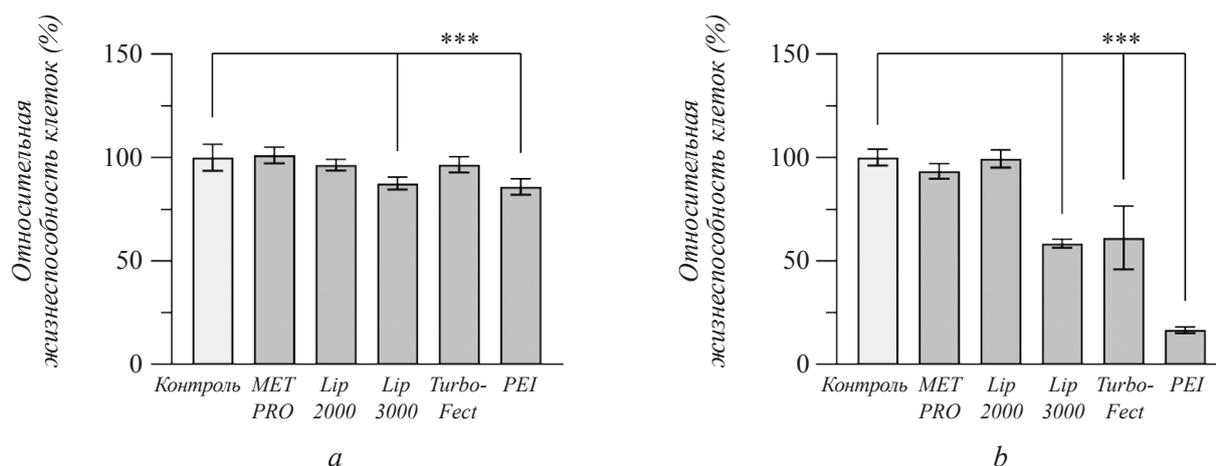


Рис. 1. Относительная жизнеспособность ММСК в присутствии липоплексов/полиплексов, образованных с помощью различных трансфекционных агентов, на первые (а) и седьмые (б) сутки после проведения трансфекции (МТТ-тест). *** $p < 0,001$ для экспериментальных групп относительно контрольной; MET PRO – METAFECTENE® PRO; Lip 2000 – Lipofectamine® 2000; Lip 3000 – Lipofectamine® 3000.

Fig. 1. Relative viability of MSCs incubated with lipopolyplexes/polyplexes, formed by different transfection reagents on the 1st (a) and 7th (b) day after transfection (MTT assay). *** $p < 0,001$; MET PRO – METAFECTENE® PRO; Lip 2000 – Lipofectamine® 2000; Lip 3000 – Lipofectamine® 3000.

авторов, можно сделать вывод, что нам удалось выполнить более эффективную трансфекцию ММСК с помощью Lipofectamine® 3000. Это может быть связано с различиями как в типах ММСК, так и в размерах трансфицируемых молекул – siРНК гораздо меньше, чем плазмидная ДНК.

По результатам МТТ-теста на первые сутки эксперимента все трансфекционные агенты в составе липоплексов/полиплексов незначительно снижали жизнеспособность клеток относительно контрольной группы. Наибольшую цитотоксичность проявляли липоплексы/полиплексы, образованные с помощью Lipofectamine® 3000 и PEI: $85,2 \pm 4,38\%$ и $86 \pm 3,4\%$ жизнеспособных клеток соответственно. Количество жизнеспособных клеток в присутствии липоплексов/полиплексов, образованных с помощью остальных трех трансфекционных агентов, составило более 95%.

На седьмые сутки эксперимента наибольшую цитотоксичность показали липоплексы/полиплексы, образованные с помощью PEI ($16,54 \pm 1,53\%$ жизнеспособных клеток от значений контрольной группы), и в меньшей степени – TurboFect и Lipofectamine® 3000 ($61,15 \pm 15,36\%$ и $58,37 \pm 2\%$ соответственно). Статистически незначимое снижение жизнеспособности клеток наблюдали только в присутствии липоплексов/полиплексов с METAFECTENE® PRO и Lipofectamine® 2000 – не менее $93,36 \pm 3,6\%$ (рис. 1).

Известно, что при формировании полиплексов на основе PEI значительная часть полимера остается в свободной форме, что частично

может быть причиной цитотоксичности в клеточных культурах [12]. В проведенном нами исследовании добавление PEI отдельно к культурам ММСК незначительно влияло на количество жизнеспособных клеток, которое составляло $95,15 \pm 2,7\%$ на первые сутки эксперимента и $93,48 \pm 3,4\%$ на седьмые сутки и статистически отличалось от значений контрольной группы. Уменьшение соотношения N/P для siРНК/PEI до 1:2 статистически незначимо снижало показатели эффективности трансфекции и цитотоксичности (данные не приведены). Относительная жизнеспособность клеток в присутствии остальных трансфекционных агентов без добавления к ним молекул siРНК статистически значимо отличалась от контрольной только в группах с добавлением TurboFect и Lipofectamine® 3000 и составила более $94,8 \pm 2,37\%$ на первые сутки и более $92,78 \pm 5,13\%$ на седьмые сутки после проведения трансфекции, что свидетельствует об их низкой цитотоксичности (рис. 2).

Жизнеспособность клеток была значимо ($p < 0,001$) ниже в группах с наибольшей эффективностью трансфекции, из чего можно сделать заключение об обратной зависимости между этими параметрами.

Поиск трансфекционных агентов, обладающих высокой эффективностью доставки молекул siРНК или других нуклеиновых кислот в ММСК и в тоже время не снижающих жизнеспособность клеток, необходим для разработки терапевтических средств на основе этих молекул.

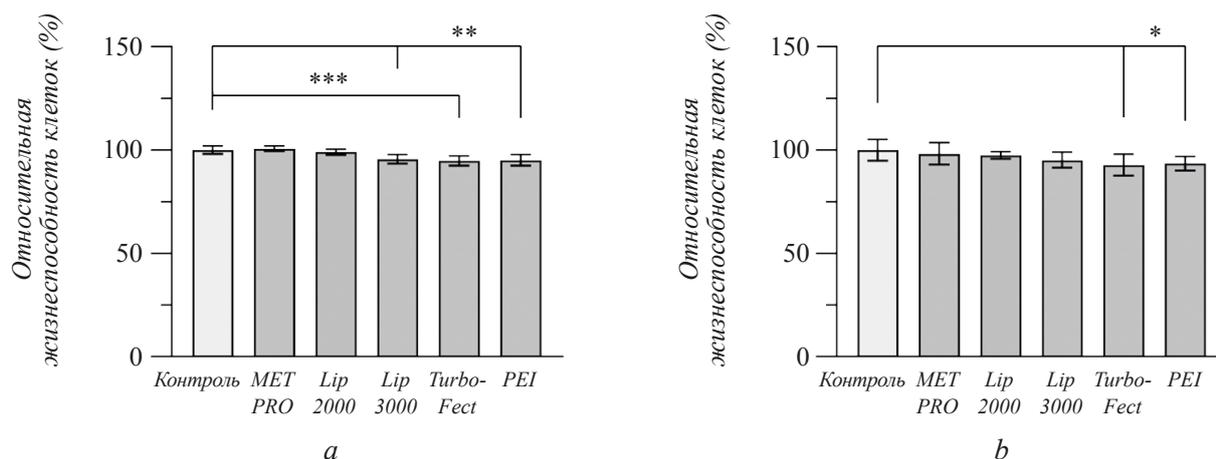


Рис. 2. Относительная жизнеспособность ММСК в присутствии различных трансфекционных агентов на первые (а) и седьмые (б) сутки после проведения трансфекции (МТТ-тест). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ для экспериментальных групп относительно контрольной; MET PRO – METAFECTENE® PRO; Lip 2000 – Lipofectamine® 2000; Lip 3000 – Lipofectamine® 3000.

Fig. 2. Relative viability of MSCs incubated with different transfection reagents on the 1st (a) and 7th (b) day after transfection (MTT assay). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; MET PRO – METAFECTENE® PRO; Lip 2000 – Lipofectamine® 2000; Lip 3000 – Lipofectamine® 3000.

В данном исследовании продемонстрировано, что полиплексы/липоплексы, образованные с помощью TurboFect и Lipofectamine® 3000, могут быть использованы для эффективной доставки молекул siРНК в ММСК. Незначительное влияние на жизнеспособность клеток через 7 сут после проведения трансфекции позволяет рекомендовать TurboFect и Lipofectamine® 3000 как высокоэффективные и относительно низкотоксичные агенты для трансфекции культур ММСК.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят сотрудников лаборатории функциональной геномики ФГБНУ «МГНЦ» Скоблова М.Ю. и Кривошееву И.А. за техническую и методическую помощь.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

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

ЛИТЕРАТУРА

- de Carvalho T.G., Pellenz F.M., Laureano A., et al. A simple protocol for transfecting human mesenchymal stem cells. *Biotechnol. Lett.*, 2018, 40(3), 617–622. doi: 10.1007/s10529-018-2505-8
- Hamann A., Nguyen A., Pannier A.K. Nucleic acid delivery to mesenchymal stem cells: a review of nonviral methods and applications. *J. Biol. Eng.*, 2019, 13:7. doi: 10.1186/s13036-019-0140-0
- Wei X., Shao B., He Z., et al. Cationic nanocarriers induce cell necrosis through impairment of Na(+)/K(+)-ATPase and cause subsequent inflammatory response. *Cell Res.*, 2015, 25(2), 237–253. doi: 10.1038/cr.2015.9
- Rejman J., Bragonzi A., Conese M. Role of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo- and polyplexes. *Mol. Ther.*, 2005, 12(3), 468–474. doi: 10.1016/j.ythm.2005.03.038
- Shi B., Xue M., Wang Y., et al. An improved method for increasing the efficiency of gene transfection and transduction. *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.*, 2018, 10(2), 95–104.
- Xiang S., Tong H., Shi Q., et al. Uptake mechanisms of non-viral gene delivery. *J. Control. Release*, 2012, 158(3), 371–378. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.09.093
- Horova V., Hradilova N., Jelinkova I., et al. Inhibition of vacuolar ATPase attenuates the TRAIL-induced activation of caspase-8 and modulates the trafficking of TRAIL receptors. *FEBS J.*, 2013, 280(14), 3436–3450. doi: 10.1111/febs.12347
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 1983, 65(1–2), 55–63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4
- Galitsyna E.V., Bukharova T.B., Krivosheeva I.A., et al. Regulation of osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells by glycogen synthase kinase-3 β gene knockdown. 3rd Sechenov international biomedical summit (SIBS 2019). *Biomed. Hub.*, 2019, 4(3), 14–15. doi: 10.1159/000502594

10. Галицына Е.В., Бухарова Т.Б., Гольдштейн Д.В. Сравнительный анализ эффективности трансфицирующих систем для доставки siRNA в культуры HEK-293 и ММСК. Сборник тезисов 23-й Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», 2019, 85.
11. Hoare M., Greiser U., Schu S., et al. Enhanced lipoplex-mediated gene expression in mesenchymal stem cells using reiterated nuclear localization sequence peptides. *J. Gene Med.*, 2010, 12, 207–218. doi: 10.1002/jgm.1426
12. Hunter A.C. Molecular hurdles in polyfectin design and mechanistic background to polycation induced cytotoxicity. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2006, 58(14), 1523–1531. doi: 10.1016/j.addr.2006.09.008

Choice of an Effective Non-Viral System for the Delivery of siRNA to Multipotent Mesenchymal Stromal Cells

E.V. GALITSYNA¹*, T.B. BUKHAROVA¹, A.A. BUIANOVA¹, K.S. DAVYGORA¹, and D.V. GOLDSHTEIN¹

¹ *Research Centre for Medical Genetics, Moscow, 115522, Russia*

**e-mail*: galitsyna.ev@gmail.com

Received March 3, 2020

Revised March 25, 2020

Accepted July 6, 2020

Abstract—Multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) can be used as a model for the development of gene and cell technologies and as a means of delivering nucleic acids to the body, including as part of tissue-engineering constructs. Small interfering RNA (siRNA) molecules acting by the RNA interference mechanism are a high-precision tool for genetic silencing of target mRNA transcripts. The search for low toxic and highly efficient transfection agents for delivery of siRNA or other nucleic acids to MSCs is an urgent task for the development of therapy based on these molecules. A comparative evaluation of five transfection agents showed that compounds based on cationic polymers were more efficient in delivering siRNA molecules than liposomes, while the cytotoxicity of all tested reagents was independent of their chemical structure. For two of the three transfection agents selected according to their efficiency and belonging to different classes, TurboFect and Lipofectamine® 3000, a moderate effect on cell viability was revealed. The results obtained allow us to recommend TurboFect and Lipofectamine® 3000 as highly efficient and relatively low-toxic agents for transfection of MSCs cultures.

Key words: multipotent mesenchymal stromal cells, siRNA, transfection, lipofection, cationic lipids, cationic polymers, polyethyleneimine.

Acknowledgments—The authors are grateful to staff of functional genomics laboratory of Research Centre for Medical Genetics Skoblova M.Yu. and Krivosheeva I.A., for technical and methodological assistance.

Funding—The work was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the state assignment for Research Centre for Medical Genetics.

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-4-74-79