

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТРАНСФЕКЦИИ МЕЗЕНХИМНЫХ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК (ММСК) В КАЧЕСТВЕ СИСТЕМЫ МОДИФИКАЦИИ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ДЛЯ ДАЛЬНЕЙШЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРИ ЗАМЕЩЕНИИ ДЕФЕКТОВ ГИАЛИНОВОГО ХРЯЩА

Божокин М.С.^{1,2}, Божкова С.А.¹, Нащёкина Ю.А.², Сопова Ю.В.^{3,4}, Рубель А.А.³, Хотин М.Г.²

¹ФГБУ «НМИЦ ТО им. Р.Р. Вредена» Минздрава России, Санкт-Петербург, e-mail: writeback@mail.ru;

²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

³Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург;

⁴Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва

Для тканевой инженерии гиалинового хряща требуется эффективная модификация клеток для увеличенного синтеза белков внеклеточного матрикса после имплантации. Одним из наиболее распространённых методов изменения пролиферации клеток является трансфекция с помощью липофекции благодаря своей простоте, эффективности, безопасности и экономической доступности для исследователей. Была изучена эффективность трансфекции клеточной культуры мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток сконструированной оригинальной экспрессионной плазмидой pEGFP-N3-tgfb3 методом липофекции реагентом Lipofectamin3000. Анализ жизнеспособности клеток и эффективности модификации проводился методом проточной цитометрии на 3, 5 и 7 пассажах на 3-й и 7-й дни наблюдения. Результаты трансфекции мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток костного мозга крысы показывают низкую эффективность, а также большую цитотоксичность, что в целом свидетельствует о неоптимальности применения трансфекции в целом и липофекции в частности при модификации первичной культуры клеток для их применения в тканевой инженерии гиалинового хряща. Было выявлено, что анализ эффективности такой модификации должен обязательно включать не только данные флуоресцентной микроскопии, но и данные проточной цитометрии, так как при этом исключены ложноположительные результаты.

Ключевые слова: трансфекция, эффективность, цитотоксичность, тканевая инженерия, гиалиновый хрящ.

TRANSFECTION OF MESENCHYMAL STEM CELLS (MSC) FOR MODIFYING CELL CULTURE FOR RECOVERY HYALINE CARTILAGE DEFECTS

Bozhokin M.S.^{1,2}, Bozhkova S.A.¹, Nashekina Y.A.², Sopova Y.V.^{3,4}, Rubel A.A.³, Khotin M.G.²

¹Russian Scientific Research Institute of Traumatology and Orthopedics named after R.R. Vreden, St. Petersburg, e-mail: writeback@mail.ru;

²Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg;

³Saint-Petersburg State University, St. Petersburg;

⁴Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Sciences, Moscow

Tissue engineering of hyaline cartilage requires efficient cell modification for increased synthesis of extracellular matrix proteins after implantation. One of the most common methods of altering cell proliferation is transfection with lipofection, as it is simple, effective, safe and cost-effective for researchers. The efficiency of transfection of mesenchymal multipotent stromal cell culture with the constructed original expression plasmid pEGFP-N3-tgfb3 by lipofection with the Lipofectamin3000 reagent was studied. Analysis of cell viability and modification efficiency was carried out by flow cytometry at 3, 5 and 7 passages on 3 and 7 days of observation. The results of transfection of rat bone marrow mesenchymal multipotent stromal cells show low efficiency, as well as high cytotoxicity, which generally indicates the non-optimal use of transfection in general and lipofection in particular when modifying the primary cell culture for their use in tissue engineering of hyaline cartilage. It was found that the analysis of the effectiveness of such a modification must necessarily include not only fluorescence microscopy data, but also flow cytometry data, since this excludes false positive results.

Keywords: transfection, efficiency, cytotoxicity, tissue engineering, hyaline cartilage.

Дефекты гиалинового слоя крупных суставов обладают ограниченной способностью к регенерации [1]. В настоящее время современным хирургам доступен большой спектр

различных методов, позволяющих приостановить дегенеративные процессы, однако в полном объёме данная проблема до сих пор не решена [2-4]. Перспективным направлением является использование клеточно-инженерных конструкций (КИК), представляющих собой биodeградируемый полимер (скаффолд), покрытый модифицированной культурой клеток [5]. Модификацию клеток проводят с целью придания им дополнительных свойств. К примеру, увеличенный синтез белков внеклеточного матрикса или изменение экспрессии ключевых генов хондрогенеза способствует более эффективной и специфической пролиферации культуры и формированию устойчивого к нагрузкам гиалиноподобного регенерата.

Наряду с трансдукцией и белковой стимуляцией одним из часто используемых методов модификации клеточной культуры является липофекция [1; 6; 7]. Липофекция - это невирусный метод внесения генетической информации с помощью рекомбинантной плазмиды и липосомных частиц. Этот известный с середины 60-х годов XX века метод получил широкую популярность в наше время благодаря простоте использования и относительной эффективности. Его применение не вносит изменения в геном клеточной культуры, не требует при проведении экспериментальных работ использования особых мер предосторожности и в случае положительного результата не накладывает ограничений на использование модифицированной культуры в клинической практике. Для маркирования клеточной культуры обычно используется встроенный в плазмиду ген флюоресцентного зеленого белка (GFP), который позволяет отследить эффективность проведённой модификации. В качестве клеточной культуры для тканевой инженерии гиалинового хряща применяют стволовые клетки мезенхимного происхождения по причине их повышенного пролиферативного потенциала, способности дифференцироваться в зрелые (терминально дифференцированные) клеточные элементы гиалиновой ткани – хондроциты [1; 8; 9]. Таким образом, липофекция клеточной культуры мезенхимальных стволовых клеток в первом приближении является логичным выбором метода модификации в клеточной инженерии гиалинового хряща.

Целью данного исследования была оценка эффективности трансфекции первичной культуры мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток (ММСК) с помощью созданной плазмиды *rEGFP-N3-tgfb3* и возможности дальнейшего использования модифицированной культуры клеток в составе клеточно-инженерной конструкции для замещения дефекта гиалинового хряща.

Материалы и методы исследования

Культивирование клеточной культуры

В качестве клеток использовалась первичная культура мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток, выделенная из костного мозга бедренной кости половозрелой крысы. Клеточную суспензию забирали в стерильных условиях и

культивировали до 3-го пассажа с использованием адгезионного пластика TPP (Швейцария). Принадлежность к данной популяции определяли с помощью методики проточной цитометрии (Cytotflex. Beckman coulter).

Создание экспрессионной плазмиды

Экспрессионную плазмиду получили на основе вектора pEGFP-N3. Целевой участок гена *tgfb3* был амплифицирован с плазмиды pLVE-hTGFB3-IRES-Red (Addgene) с использованием точной полимеразы Deep Vent (NEB,USA). Встраивание гена *tgfb3* производили по сайтам *Bam*HI и *Hind*III. Лигирование производили с помощью T4 лигазы (NEB, USA). Наличие целевой вставки в плазмиде подтверждали с помощью секвенирования и гельэлектрофореза в 1,2%-ном агарозном геле.

Трансфекцирование клеточной культуры

Трансфекцирование клеточной культуры ММСК производили методом липофекции с помощью набора Lipofectamin 3000 (Thermofisher, USA) согласно протоколу производителя на 3, 5 и 7 пассажах. Подготовку клеточной культуры также проводили согласно этому протоколу. В качестве вектора использовали созданную экспрессионную плазмиду, содержащую ген *tgfb3*. Эффективность трансфекцирования клеток оценивали методом проточной цитометрии на 3-и и 7-е сутки после липофекции. В качестве контроля для исследования жизнеспособности и эффективности трансфекции использовали аналогичную культуру клеток без процедуры модификации, так как необходимо было учесть собственную флуоресценцию немодифицированных клеток. Критерием отнесения к трансфекцированной субкультуре являлось превышение уровня сигнала флуоресценции на порядок и выше от значения флуоресценции пика нетрансфекцированной культуры. Дополнительным контролем эффективности являлась оценка флуоресценции на микроскопе EVOS FL. Выживаемость клеток оценивали с помощью проточной цитометрии с дополнительным использованием бромида этидия, который проникает в клетки с повреждённой мембраной и не проникает в живые клетки. После получения данных по эффективности трансфекции и выживаемости клеток высчитывали средние результаты получившихся экспериментов по трём повторностям.

Результаты исследования и их обсуждение

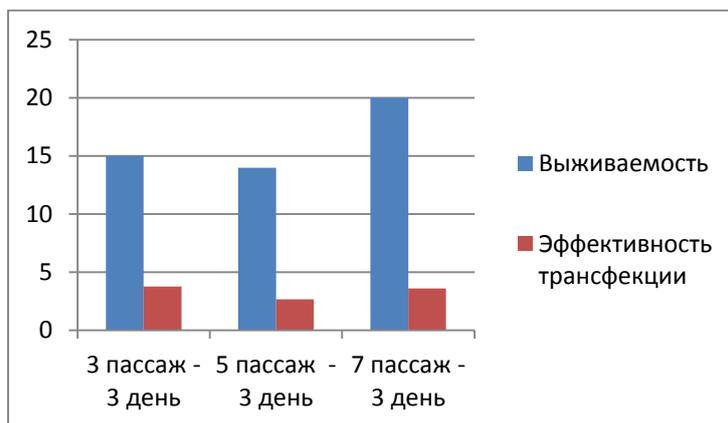
В результате выделения клеток из костного мозга половозрелой крысы и их последующего культивирования до третьего пассажа была получена культура мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток костного мозга (ММСК), которые, по данным проточной цитометрии, стабильно экспрессировали поверхностные маркеры CD90 и одновременно не экспрессировали маркеры CD45.

С помощью гельэлектрофореграммы была установлена правильность лигирования вставки внутрь вектора и получения искомой рекомбинантной плазмиды. Последовательность

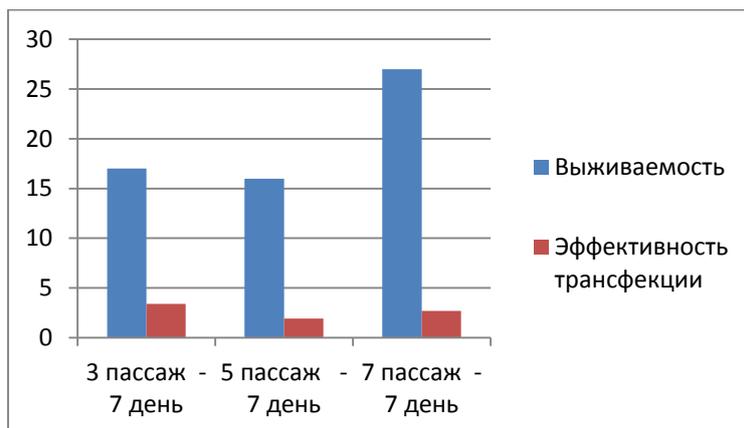
полученной рекомбинантной плазмиды pEGFP-N3-*tgfb3* на заключительном этапе была подтверждена с помощью секвенирования.

Липофекция культуры ММСК

По результатам проведённых исследований установлено, что трансфекцирование снижало долю жизнеспособных клеток в культуре в сравнении с контролем до 14–27% в зависимости от срока наблюдения и пассажа (рис. 1). При этом среди выживших клеток доля трансфицированных клеток составляла 10–25%.



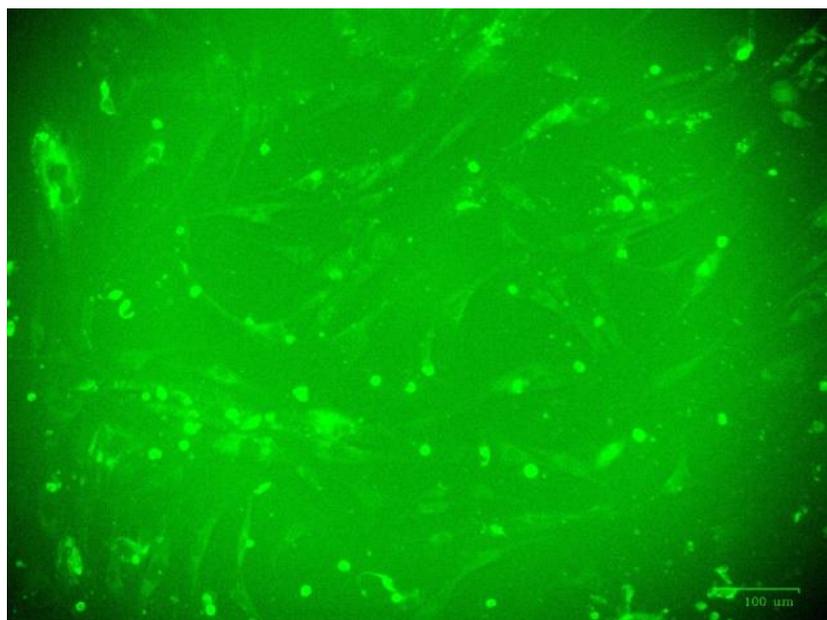
А



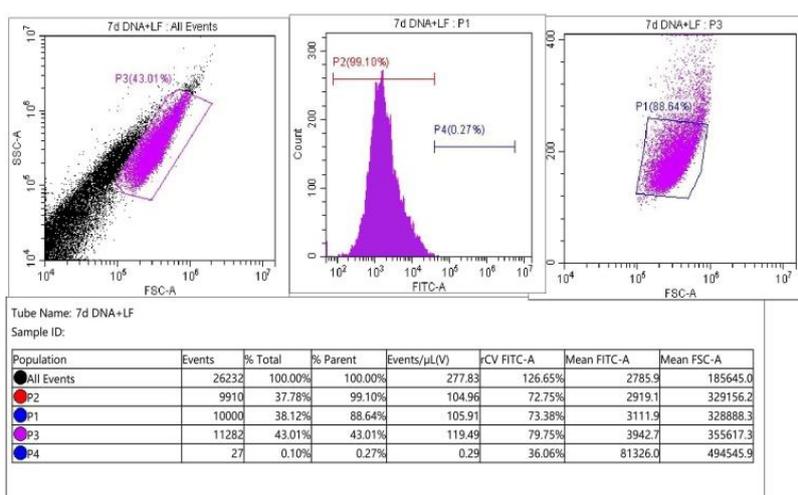
Б

Рис. 1. Средняя доля жизнеспособных и модифицированных клеток в культуре в зависимости от пассажа (3, 5 и 7-й пассажи) на 3-й день наблюдения (А) и средняя доля жизнеспособных и модифицированных клеток в культуре в зависимости от пассажа (3, 5 и 7-й пассажи) на 7-й день наблюдения (Б)

Несмотря на очень низкую долю модифицированных жизнеспособных клеток, к 7-му дню культивирования (0,27% к контролю), по данным флуоресцентной микроскопии, определялось интенсивное свечение, что, по-видимому, необходимо оценивать как «ложноположительный результат» оценки эффективности трансфекции (рис. 2).



А



Б

Рис. 2. А – микрофотография клеточной культуры после трансфекции на 7-е сутки наблюдения, полученная при флуоресцентной микроскопии. Контрольный штрих указан на рисунке. Б – результаты цитофлуорометрического анализа культуры клеток после трансфекции на 7-е сутки наблюдения. P3 – анализируемые события. P1 - анализируемые клеточные элементы. P2 – нетрансфицированные клетки. P4 – трансфицированные клетки

Необходимо отметить, что по результатам проведённых исследований было установлено, что на всех пассажах наблюдения на 7-е сутки доля трансфицированных клеток уменьшалась, по сравнению с 3-ми сутками наблюдения (рис. 1).

Проведенное исследование показало, что трансфекция методом липофекции является цитотоксичной процедурой, что согласуется с результатами Li-Ming Li и соавт., которые также подтвердили гибель до половины клеток в течение первых 24 часов [10] при использовании липофектамина. В наших экспериментах средняя выживаемость трансфецированных клеток находилась в пределах от 12 до 26% от количества клеток в контроле в зависимости от времени наблюдения и пассажа, причем количество жизнеспособных клеток уже через сутки после трансфекции уменьшилось в среднем в 4 раза. В экспериментах McMillan A. и соавт. [11] были представлены данные с трансфекцией ММСК, однако анализ её эффективности проводился по флюоресценции клеточного супернатанта, причем также отмечалась цитотоксичность трансфецирования. Более того, с помощью метода проточной цитометрии в наших исследованиях было зафиксировано, что часть клеток, которые при проведении флюоресцентной микроскопии были отнесены к живым клеткам, находились в предапоптотическом состоянии и в дальнейшем, возможно, погибли.

По данным проточной цитометрии, доля модифицированных клеток среди выживших составила 10-25% (рис. 1). Применяемый нами набор для липофекции (Lipofectamin 3000) широко используется исследователями для аналогичных экспериментов по трансфецированию ММСК. При этом Fernanda Borges Duarte с соавт. [12] в своей работе применяли аналогичный реагент для трансфекции, но проточную цитометрию использовали только для анализа изменения медианы флюоресцентной светимости опытной группы в сравнении с контролем и не оценивали долю живых трансфецированных клеток. В ряде исследований авторы указывают сходные результаты по эффективности трансфекции, однако Zhonghua Yi Xue Za Zhi в своей работе вообще не пользовался проточной цитометрией [13]. S. Kim и соавт. для анализа эффективности трансфекции применяли Western Blot анализ и не оценивали выживаемость клеток и эффективность трансфецирования с помощью проточной цитометрии [14]. Manish Kumar и соавт. вообще не оценивали жизнеспособность клеток, а эффективность трансфекции измеряли только с помощью флюоресцентного микроскопа, что, на наш взгляд, может давать ложноположительные результаты [15]. В работе Xia Cao и соавт. проводили анализ эффективности трансфекции косвенным методом по увеличению синтезированного рекомбинантного белка, кодируемого геном в плазмиде, что, на наш взгляд, является неверным подходом при анализе и интерпретации промежуточных этапов, так как при этом не анализировались многие промежуточные результаты, связанные с количеством жизнеспособных клеток, количеством трансфецированных клеток и т.д. [16]. В целом анализ научных публикаций свидетельствует о низкой эффективности метода трансфецирования. К примеру, P. Díaz и соавт. [17] показали эффективность трансфекции на уровне 15%. Кроме того, Melissa Hoare и соавт. показали, что эффективность трансфекции первичной культуры

ММСК зависит от видовой принадлежности [18]. В исследовании данных авторов трансфекция клеток кроликов происходила с более низкой эффективностью, чем ММСК крысы и человека.

В нашем исследовании во всех исследуемых пассажах (3, 5 и 7-й) доля трансфицированных клеток в динамике с 3-х по 7-е сутки снижалась. Вероятно, это обусловлено принципиальной транзистентностью генетической модификации клеточной культуры методом трансфицирования и нестабильностью плазмиды в первичной культуре клеток млекопитающих. На наш взгляд, с дальнейшим увеличением срока наблюдения доля трансфицированных клеток будет уменьшаться. Учитывая то, что для последующих экспериментов мы планируем использовать только живые трансфицированные клетки, расчетная доля пригодных клеточных элементов составляет не более 2-4% от общего количество ММСК в культуре. Это подтверждается целым рядом публикаций [8; 10; 17], в которых авторы отмечали столь же низкий процент получаемых живых трансфицированных клеток от начального количества клеточных элементов.

Проведенное исследование показало, что контроль эффективности трансфекции с помощью флюоресцентного микроскопа дает ложноположительные результаты. На 7-е сутки после трансфекции регистрировали флюоресцентное свечение, однако, по данным проточной цитометрии, доля жизнеспособных трансфицированных клеток не превышала 0,27% от контрольной культуры (рис. 2). По нашему мнению, контроль эффективности трансфекции и выживаемости клеток необходимо проводить с использованием методики проточной цитометрии, так как она является более точным и объективным методом исследования и позволяет получить количественный результат.

В целом следует признать, что по результатам проведённых исследований добиться эффективной длительной трансфекции клеток с приемлемой выживаемостью нам не удалось. Вероятно, оптимизировав условия и приложив значительные усилия, возможно несколько увеличить эффективность модификации и снизить цитотоксичность процедуры, однако лишь в незначительных пределах, что и было показано в работе [8], однако наш выбор целевого гена *tgfb3* для модификации клеточной культуры был обусловлен тем, что именно этот ключевой цитокин отвечает за хондрогенную пролиферацию ММСК [19]. Для использования внутри скаффолда трансфицированной клеточной культуры, на наш взгляд, она должна характеризоваться стойкой жизнеспособностью, так как апоптоз клеток внутри трёхмерного полимерного объекта (в условиях ограниченной диффузии) значительно ухудшит результаты применения такой клеточно-инженерной конструкции.

Заключение

Таким образом, трансфекцирование с помощью липофекции не может рассматриваться как эффективный метод внесения изменений в первичную клеточную культуру для дальнейшего применения в области тканевой инженерии в составе биodeградируемого полимера. При этом для контроля жизнеспособности трансфицированных клеток необходимо применять объективные методы анализа, к примеру проточную цитометрию.

Список сокращений

КИК – клеточно-инженерная конструкция

ММСК - мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки

ПЦР – полимеразная цепная реакция

GFP – зеленый флюоресцентный белок

Работа выполнена при поддержке грантов СПбГУ ID: 73023349 и ID: 73024371. Работа была выполнена в «НМИЦ ТО им Р.Р. Вредена», Институте цитологии РАН и в лаборатории амилоидов СПбГУ.

Список литературы

1. Божокин М.С., Божкова С.А., Нетылько Г.И. Возможности современных клеточных технологий для восстановления поврежденного суставного хряща (аналитический обзор литературы) // Травматология и ортопедия России. 2016. № 22 (3). С. 122-133. DOI: 10.21823/2311-2905-2016-22-3-122-134.
2. Куляба Т.А., Банцер С.А., Трачук П.А., Воронцова Т.Н. КНН. Эффективность различных хирургических методик при лечении локальных повреждений хряща коленного сустава (Обзор литературы) // Травматология и ортопедия России. 2020. № 6 (3). С. 170-181. DOI: 10.21823/2311-2905-2020-26-3-170-181.
3. Александрович А.Г. Метод замещения костно-хрящевых дефектов крупных суставов (отдалённые результаты экспериментальной работы) // Уральский медицинский журнал. 2019. № 5 (173). С. 156-160. DOI: 10.25694/URMJ.2019.05.34.
4. Kwon H., Brown W.E., Lee C.A. Surgical and tissue engineering strategies for articular cartilage and meniscus repair. Nat Rev Rheumatol. 2019. № 15 (9). P. 550-570. DOI: 10.1038/s41584-019-0255-1.
5. Bozhokin M.S., Bozhkova S.A., Netylko G.I., Nakonechny D.G., Nashchekina Y.A., Blinova M.I. Experimental Replacement of the Surface Defect of Rat Hyaline Cartilage by a Cell-Engineered Construct. Regenerative Engineering and Translational Medicine. 2021. № 5 (7). DOI: 10.1007/s40883-021-00205-2.

6. Robert D., Chavez R.S. Scaffoldless tissue-engineered cartilage for studying transforming growth factor beta-mediated cartilage formation. *Biotechnol Prog.* 2020. № 36 (1). DOI: 10.1002/btpr.2897.
7. Matthew W., Grol B.H.L. Gene therapy for repair and regeneration of bone and cartilage. *Rev Curr Opin Pharmacol.* 2018. № 40. P. 59-66. DOI: 10.1016/j.coph.2018.03.005.
8. Hyung-Ho Moon, Min Kyung Joo, Hyejung Mok, Minhyung Lee, Ki-Chul Hwang, Sung Wan Kim, Ji Hoon Jeong, Donghoon Choi SHK. MSC-based VEGF gene therapy in rat myocardial infarction model using facial amphipathic bile acid-conjugated polyethyleneimine. *Biomaterials.* 2014. № 35 (5). P. 1744-1755. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.11.019.
9. Keigo Sato, Hisashi Mera, Shigeyuki Wakitani MT. Effect of epigallocatechin-3-gallate on the increase in type II collagen accumulation in cartilage-like MSC sheets. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2017. № 81 (6). P. 1241-1255. DOI: 10.1080/09168451.2017.1282809.
10. Li-Ming Li, Gui-Xin Ruan, Ming-Yi HuangFu, Zhi-Lan Chen, Hui-Na Liu, Lin-Xian Li, Yu-Lan Hu, Min Han, Gary Davidson, Pavel A Levkin J-QG. ScreenFect A: an efficient and low toxic liposome for gene delivery to mesenchymal stem cells. *Int J. Pharm.* 2015. V 488. № 1-2. P. 1-11. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.04.050.
11. Alexandra McMillan, Minh Khanh Nguyen, Tomas Gonzalez-Fernandez, Peilin Ge, Xiaohua Yu, William L. Murphy, Daniel J. Kelly E.A. Dual non-viral gene delivery from microparticles within 3D high-density stem cell constructs for enhanced bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2018. № 161. P. 240-255. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.01.006.
12. Fernanda Borges Duarte, Marcelo de Macedo Brigido, Eduardo de Oliveira Melo, Sonia Nair Bao CFM. Strategies for transfection of bovine mesenchymal stem cells with pBC1-anti-CD3 vector. *Anim Biotechnol.* 2020. № 1-11. DOI: 10.1080/10495398.2020.1862137.
13. Yun-Tao Wang, Qi-Xin Zheng X-DG. Wild-type Smad3 gene promotes osteoblastic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2004. № 84 (18). P. 1523-1527.
14. S. Kim, Y.M. Yoon, Y.-S. Han, J.H. Lee, J. Hur SHL. Administration of Cripto in GRP78 overexpressed human MSCs enhances stem cell viability and angiogenesis during human MSC transplantation therapy. *Cell Prolif.* 2018. № 51 (5). DOI: 10.1111/cpr.12463.
15. Manish Kumar, T. Yasotha, R.K. Singh, Renu Singh, Kuldeep Kumar, R. Ranjan, Chetan D. Meshram, B.C. Das S.B. Generation of transgenic mesenchymal stem cells expressing green fluorescent protein as reporter gene using no viral vector in caprine. *Indian J. Exp Biol.* 2013. № 51 (7). P. 502-509.
16. Xia Cao, Wenwen Deng, Yuan Wei, Yan Yang, Weiyan Su, Yawei Wei, Ximing Xu J.Y. Incorporating pTGF- β 1/calcium phosphate nanoparticles with fibronectin into 3-dimensional

collagen/chitosan scaffolds: efficient, sustained gene delivery to stem cells for chondrogenic differentiation. *Eur Cell Mater.* 2012. № 23. P. 81-93. DOI: 10.22203/ecm.v023a06.

17. P. Díaz, F. Cuevas OAP. GFP labelling and epigenetic enzyme expression of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from bovine foetuses. *Res Vet Sci.* 2015. № 99. P. 120-128. DOI: 10.1016/j.rvsc.2014.12.019.

18. Melissa Hoare, Udo Greiser, Sabine Schu, Kaveh Mashayekhi, Emrah Aydogan, Mary Murphy, Frank Barry, Thomas Ritter TO. Enhanced lipoplex-mediated gene expression in mesenchymal stem cells using reiterated nuclear localization sequence peptides. *J. Gene Med.* 2010. № 12 (2). P. 207-218. DOI: 10.1002/jgm.1426.

19. Bozhokin M.S., Sopova Y.V., Kachkin D., Rubel A.A. MGK. Mechanisms of TGF β 3 Action as a Therapeutic Agent for Promoting the Synthesis of Extracellular Matrix Proteins in Hyaline Cartilage. *Biochem.* 2020. № 85 (4). P. 436-447.