

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ И УНИПОТЕНТНЫХ КЛЕТОК К ЛЕНТИВИРУСНОЙ ТРАНСДУКЦИИ С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ ИПСК

Полешко А.Г., Волотовский И.Д.

ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», Минск, Беларусь

В настоящее время в рутинной лабораторной практике для получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) используют различные протоколы, основанные как на интеграционных, так и неинтеграционных методах репрограммирования различных типов клеток. Несмотря на разнообразие подходов к процессу дедифференцировки, на данный момент максимальная эффективность репрограммирования, которой удалось добиться, составляет не более 1%. Чаще в протоколах дедифференцировки для получения ИПСК используют фибробласты и кератиноциты, что определяется их доступностью и положительным опытом репрограммирования. Установлено, что более дифференцированные клетки и клетки на поздних пассажах хуже поддаются репрограммированию. Показано, что обладающие высокой жизнеспособностью и пролиферативной активностью мезенхимальные стволовые клетки (МСК), также могут быть успешно использованы в качестве источника ИПСК [1]. В связи с этим актуальным является оценить чувствительность МСК к одному из наиболее эффективных способов доставки генетического материала в клетку при проведении дедифференцировки – лентивирусной трансдукции, которая обеспечивает стабильную и длительную экспрессию трансгена.

Цель данной работы – сравнить чувствительность МСК ЖТ и фибробластов кожи человека к заражению рекомбинантными лентивирусами, содержащими вектор лентивируса и кассету экспрессии гена белка GFP. Лентивирусный вектор с трансгеном *gfp* получали и титровали на клеточной линии НЕК293Т. Для этого клетки НЕК293Т котрансфецировали плазмидами, кодирующими структурные компоненты лентивирусов 3-го поколения: pRSV-Rev, pMDLg/pRRE, pHCMVC-VSV-G – и плазмидой с геном *gfp* в соотношении 19%:37%:7%:37%, соответственно, с использованием реагента Lipofectamine 3000 (Invitrogen) согласно рекомендациям производителя. Собранный вирусный супернатант центрифугировали и осветляли фильтрацией. Чувствительность МСК ЖТ и фибробластов к трансдукции полученными вирусными векторами оценивали методом проточной цитофлуориметрии (SZe, Bio-Rad) по количеству GFP-позитивных клеток после их заражения рекомбинантными лентивирусами в разведениях 1:200, 1:40, 1:20, 1:10, 1:4, 1:2, используемых и при титровании, в 3-х повторностях каждое. Для этого фибробласты и МСК ЖТ заранее рассаживали в количестве 6×10^4 клеток на 35 мм чашку Петри, за час до инфекции лентивирусами к клеткам добавляли 8 мкг/мл Polybrene (Sigma-Aldrich). Спустя 48 ч после инфекции считали среднее количество GFP-позитивных событий для каждого типа клеток и при каждом разведении.

В результате было показано, что между относительным количеством подвергшихся трансдукции МСК ЖТ и фибробластов кожи человека статистически значимых отличий не наблюдается. Таким образом, полученные предварительные данные свидетельствуют о том, что собранный лентивирусный рекомбинантный вектор на основе лентивирусов 3-го поколения с одинаковым титром в одинаковой степени тропен как к фибробластам кожи, так и к МСК ЖТ человека, что доказывает целесообразность использования МСК в протоколах получения ИПСК на основе лентивирусной трансдукции.

Библиографические ссылки

1. Oda Y., Yoshimura Y., Ohnishi H. et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Human Third Molar Mesenchymal Stromal Cells // J. Biol. Chem. 2010. Vol. 285. P. 29270–29278.