

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ТРАНСФЕКЦИИ КУЛЬТИВИРОВАННЫХ МСК И ФИБРОБЛАСТОВ ДЕРМЫ МЕТОДАМИ ЛИПОФЕКЦИИ И ЭЛЕКТРОПОРАЦИИ

А. Ю. Мисюкевич, А. Г. Полешко

*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

В настоящее время в клеточной инженерии актуально направление, связанное с возможностью генетической модификации соматических клеток человека, биомассу которых можно получать *in vitro*. Что предполагает введение в клетки экзогенного генетического материала. Среди наиболее эффективных способов доставки трансгенов в соматические клетки человека являются трансфекция методами липофекции и электропорации, а также трансдукция. Стоит отметить, что с точки зрения биобезопасности использование трансфекции при разработке биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) на основе биомассы генетически модифицированных клеток более перспективно. В связи с этим цель данной работы – провести сравнительную оценку эффективности таких методов трансфекции как липофекция и электропорация в отношении культивированных мезенхимальных стволовых клеток (МСК) и фибробластов дермы (ФД) человека, как наиболее часто используемых клеточных объектов при разработке БМКП, и подобрать оптимальные для введения в клетки трансгена их режимы.

В работе использовали культивированные в стандартных условиях (5% CO<sub>2</sub>, 37 °С, 100% влажность) с использованием стандартных протоколов МСК жировой ткани (n=3) и ФД (n=3) человека не старше 3 пассажа. Эффективность трансфекции оценивали по проценту жизнеспособных клеток со встроенной активной экспрессионной кассетой, выступающей в качестве генетического экзогенного материала от общего количества клеток, подвергшихся трансфекции. Экспрессионная кассета включала ген зеленого флуоресцентного белка (GFP) как селективного маркера и входила в состав рекомбинантного плазмидного вектора (pX458). Электропорацию МСК и ФД проводили с использованием системы Neop<sup>TM</sup> (Invitrogene, США), согласно рекомендациям производителя. Всего было протестировано 24 режима электропорации с разными значениями напряжения, ширины импульса, его количеством для каждого типа клеток. Липофекцию проводили с использованием коммерческого набора Lipofectamine<sup>TM</sup> 3000 Reagent kit (Life Technologies, США), согласно рекомендациям производителя. Спустя 48 ч культивирования после проведения липофекции и электропорации МСК и ФД открепляли от пластика стандартным способом и оценивали количество GFP-позитивных жизнеспособных клеток с помощью проточной цитометрии. Показано, что наиболее оптимальными режимами электропорации в отношении ФД являются – 1 импульс напряжением 1600 V/1700 V и временем воздействия 20 мс, 3 импульса напряжением 1400 V и временем воздействия каждого 10 мс; в отношении МСК – 1 импульс напряжением 1700 V и временем воздействия 20 мс, 2 импульса напряжением 1300 V/1400 V и временем воздействия 20 мс. При указанных режимах электропорации эффективность трансфекции составила 16–19% – для МСК и 26–39% – для ФД. В то же время использование липофекции позволило добиться эффективности трансфекции порядка 3% – для ФД и 15% – для МСК, что значительно ниже, по сравнению с электропорацией, что свидетельствует о более высокой эффективности последней для культивированных МСК и ФД ранних пассажей. Полученные данные позволяют повысить эффективность введения трансгена в культивированные МСК и ФД и тем самым оптимизировать процесс получения на их основе генетически модифицированных клеточных продуктов.