

Введение нуклеиновых кислот в скэффолды: изготовление, исследование свойств и эффективности трансфекции культивируемых на них клеток

Черноносова В.^{1*}, Хлебникова М.¹, Попова В.¹, Челобанов Б.¹, Киселева Е.²,
Байборodin С.², Дмитриенко Е.¹, Лактионов П.¹

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

² Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

* vera_mal@niboch.nsc.ru

Ключевые слова: электроспиннинг; скэффолды; нуклеиновые кислоты; наночастицы диоксида кремния; ДНК доставка; трансфекция клеток

Мотивация и цель: После имплантации тканеинженерные конструкции неизбежно контактируют с окружающими клетками. Для успешного функционирования такие импланты должны ингибировать реакцию на чужеродное тело (воспаление) и инициировать заселение конструкции клетками требуемого фенотипа, то есть управлять фенотипом близлежащих клеток. Для ингибирования воспаления может быть использовано введение в скэффолд низкомолекулярных лекарственных препаратов, в то время как модификация фенотипа требует локальной доставки в клетки не только низкомолекулярных соединений (например, вальпроевой кислоты), но и высокомолекулярных факторов роста, и/или нуклеиновых кислот кодирующих транскрипционные или ростовые факторы. Доставка в клетки кодирующих нуклеиновых кислот позволяет непосредственно влиять на фенотип трансфецируемых клеток и индуцировать экспрессию цитокинов и хемоаттрактантов и т. д. [1, 2].

В связи с этим задачей представленного исследования являлась разработка и исследование скэффолдов, нагруженных комплексами плазмидной ДНК (пДНК) с наночастицами диоксида кремния, которые предназначены для трансфекции ДНК в клетки, культивируемые на таких скэффолдах.

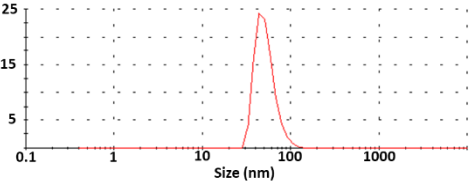
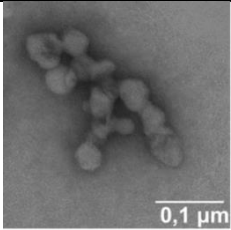
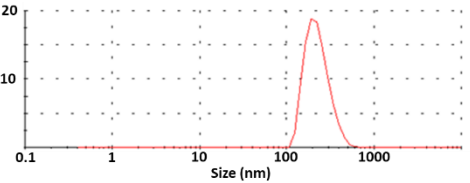
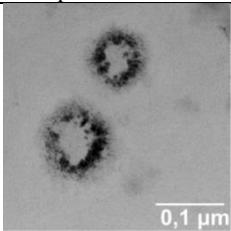
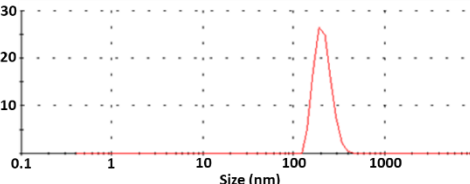
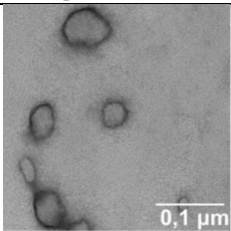
Методы и алгоритмы: Методом электроспиннинга были изготовлены двухслойные скэффолды. Основной слой скэффолда изготавливали из смеси 5 % поликапролактона (ПКЛ) (вес/объем) с 10 % желатина (жел) (вес/вес) в гексафторизопропанол, а поверхностный слой изготавливали из аналогичной композиции с пДНК-наночастицами. ДНК-наночастицы представляли собой кремниевые наночастицы, на которые была сорбирована пДНК (КН-пДНК) или комплексы пДНК с полиэтиленгликолем в различной концентрации (КН-пДНК+ПЭГ). В качестве пДНК была использована rhMGFP, свободная от ЛПС (менее 0.0125 Е/мг по данным LAL-теста). Размер пДНК-наночастиц был охарактеризован с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (JEOL1400, Япония) и метода динамического рассеяния света (ДРС) (Zetasizer nano, Великобритания).

Физико-химические свойства скэффолдов были исследованы при помощи сканирующей электронной микроскопии (EVO 10, Германия) и разрывной машины Zwick/Roell Z10. Жизнеспособность клеток линии HEK293T определяли,

культивируя клетки на поверхности исследуемых скэффолдов в течение 2 и 5 суток с последующей оценкой количества живых клеток при помощи Alamar blue теста (Termo Fisher, США). Эффективность трансфекции клеток НЕК293Т плазмидой pHMGFP оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии (LSM 780 NLO, Германия) и количественной ПЦР (Bio-Rad, США).

Результаты: Для введения пДНК в скэффолды были использованы кремневые частицы, полученные по ранее описанной методике [3]. В предварительных экспериментах было обнаружено, что сорбционная емкость 1 мг КН составляет 1.4–1.5 мкг пДНК. Средний размер КН-пДНК полученный при помощи различных методов представлен в Таблице 1. Увеличение размеров КН-пДНК относительно исходных КН, свидетельствует о сорбции ДНК на их поверхности, а уменьшение их размеров после добавления ПЭИ указывает на конденсацию ДНК на поверхности КН.

Таблица 1. Характеризация КН различного состава с помощью ДСР и ТЭМ

	ДСР	ТЭМ
Исходные КН	 Диаметр = 52 ± 5 нм, ζ-потенциал = -2.26 ± 0.02 мВ	 Размер = 56.3 ± 14.6 нм
КН-пДНК	 Диаметр = 252 ± 45 нм, ζ-потенциал = -10.7 ± 0.2 мВ	 Размер= 77.9 ± 17.1 нм
КН-пДНК+ПЭИ9	 Диаметр = 205 ± 73 нм, ζ-потенциал = -4.55 ± 0.3 мВ	 Размер = 63.0 ± 9.7 нм

По данным СЭМ полученные скэффолды представляли собой волокнистые материалы с диаметром волокон $192 \div 356$ нм и размером пор 5.0–7.2 мкм. Скэффолды с КН имели более шероховатую поверхность и наименьший диаметр волокон, по сравнению с контрольным скэффолдом ПКЛ-жел. Данные

механического теста указывают, что введение НК в состав полимерных волокон приводит к снижению их максимального удлинения до разрыва в 2 раза с 280 ± 32 до 132 ± 27 %, но не оказывает влияния на прочность скэффолдов, которая варьировалась от 4.18 ± 0.3 до 4.7 ± 0.48 МПа.

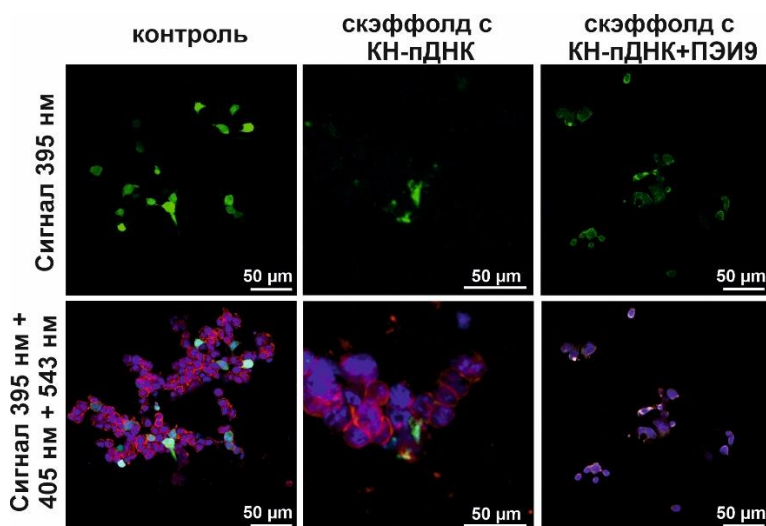


Рис. 1. Данные флуоресцентной микроскопии клеток HEK293T культивируемых на различных скэффолдах в течение 5 дней. Положительный контроль – клетки после трансфекции пДНК с использованием реагента TurboFect. Клетки окрашены Hoechst 33342 и Phalloidin-TRITC

пДНК-содержащие скэффолды не цитотоксичны в отношении культивируемых на них клеток линии HEK293T, но влияют на скорость пролиферации клеток. По данным флуоресцентной микроскопии достоверная трансфекция клеток HEK293T наблюдается при их культивировании на скэффолдах, содержащих КН-пДНК+ПЭИ, в отличие от скэффолдов, содержащих КН-пДНК (рис. 1). Данные флуоресцентной микроскопии коррелируют с данными количественной ПЦР экспрессии GFP мРНК (в качестве референтных генов использованы гены домашнего хозяйства 18S и GAPDH).

Выводы: Результаты работы свидетельствуют о возможности получения полимерных скэффолдов, изготовленных методом электроспиннинга и доставляющих нуклеиновые кислоты в культивируемые на них клетки с целью модификации их фенотипа/прямого репрограммирования.

Финансирование: Исследование поддержано государственным бюджетным проектом ИХБФМ СО РАН № 121031300042-1.

Introduction of nucleic acids into scaffolds: manufacturing, study of the properties and efficiency of cell transfection

Chernonosova V.^{1*}, Khlebnikova M.¹, Popova V.¹, Chelobanov B.¹, Kiseleva E.², Baiborodin S.², Dmitrienko E.¹, Laktionov P.¹

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

* vera_mal@niboch.nsc.ru

Key words: electrospinning; scaffolds; nucleic acids; nanoparticles of silicon dioxide; DNA delivery; cell transfection

Motivation and Aim: After implantation, tissue-engineered devices inevitably come into contact with surrounding cells. To function successfully, such implants must inhibit the reaction to a foreign body (inflammation) and initiate the population of the structure with cells of the required phenotype, i.e. control the phenotype of nearby cells. Low molecular weight drugs can be used to inhibit inflammation, while modification of the phenotype requires local delivery into cells of not only low molecular weight compounds (for example, valproic acid), but also high molecular weight growth factors, and/or nucleic acids encoding transcription or growth factors. Delivery of encoding nucleic acids into cells allows one to directly influence the phenotype of transfected cells and induce the expression of cytokines and chemoattractants, etc. [1, 2].

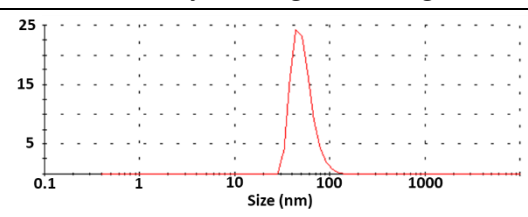
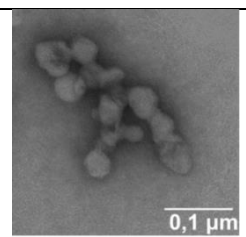
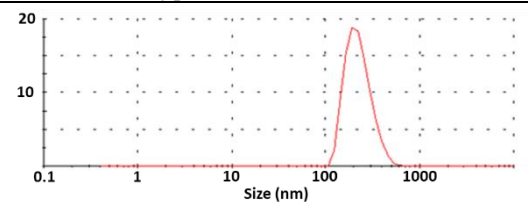
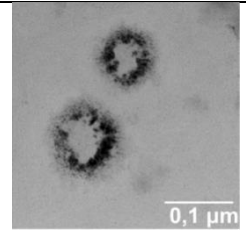
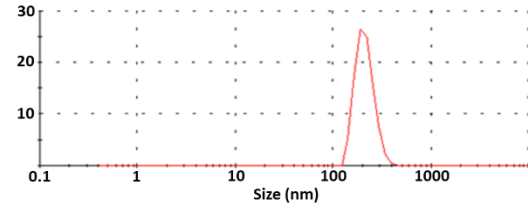
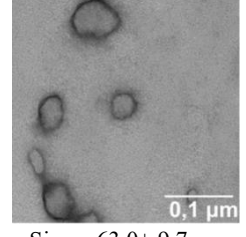
In this regard, the goal of the presented work was to develop and study scaffolds containing silica nanoparticles-associated plasmid DNA (pDNA) and intended for DNA transfection into cells cultured on such materials.

Methods and Algorithms: Two-layer scaffolds were fabricated using the electrospinning. The main layer of scaffold was made from a mixture of 5 % polycaprolactone (PCL) (w/v) with 10 % gelatin (gel) (w/w) in hexafluoroisopropanol, and the surface layer was made from a similar composition with different silica nanoparticles-associated pDNA (silica nanoparticles with pDNA (SiP-pDNA) or complexes of pDNA with polyethylenimine in various concentrations (SiP-pDNA + PEI)). pHMGFP free of LPS was used as pDNA. The size of studied nanoparticles was characterized using transmission electron microscopy (JEOL1400, Japan) and dynamic light scattering (Zetasizer nano, UK).

The scaffolds were characterized using scanning electron microscopy (EVO 10, Germany) and stress-loading tests by machine Zwick/Roell Z10. The viability of HEK293T cells was determined by contact cells with the surface of the scaffolds for 2 and 5 days, followed by assessing the number of living cells using the Alamar blue test (Termo Fisher, USA). The efficiency of transfection of HEK293T cells with the pHMGFP plasmid was assessed using fluorescence microscopy (LSM 780 NLO, Germany) and quantitative PCR (Bio-Rad, USA).

Results: The silica nanoparticles were prepared as described in [3]. In preliminary experiments, it was found that the sorption capacity of 1 mg of SiP is 1.4–1.5 µg of pDNA. The average size of SiP-pDNA obtained using various methods is presented in Table 1. An increase in the size of SiP-pDNA relative to the original SiP indicates the sorption of DNA on their surface, and a decrease in their size after the addition of PEI indicates DNA condensation on the surface of the nanoparticles.

Table 1. Characterization of different SiP using DLS and TEM

	Dynamic light scattering	TEM
SiP	 Diameter = 52 ± 5 nm ζ-potential = -2.26 ± 0.02 mV	 Size = 56.3 ± 14.6 nm
SiP-pDNA	 Diameter = 252 ± 45 nm ζ-potential = -10.7 ± 0.2 mV	 Size = 77.9 ± 17.1 nm
SiP-(pDNA+PEI9)	 Diameter = 205 ± 73 nm ζ-potential = -4.55 ± 0.3 mV	 Size = 63.0 ± 9.7 nm

According to SEM data, the scaffolds were fibrous materials with a fiber diameter of $192 \div 356$ nm and a pore size of $5.0\text{--}7.2$ μm . Scaffolds contained SiP had a rougher surface and a smaller fiber diameter compared to the control PCL-gel scaffold. Mechanical test data indicate that the introduction of SiP into the polymer composition leads to a decrease in their maximum elongation to break by 2 times from 280 ± 32 to 132 ± 27 %, but does not affect the strength of the scaffolds, which varied from 4.18 ± 0.3 to 4.7 ± 0.48 MPa.

pDNA-containing scaffolds are not cytotoxic to HEK293T cells cultured on them, but they do affect the rate of cell proliferation. According to fluorescence microscopy, reliable transfection of cells is observed when they are cultured on scaffolds containing SiP-(pDNA + PEI), in contrast to scaffolds containing SiP-pDNA (Fig. 1). Fluorescence microscopy data correlate with quantitative PCR data on GFP mRNA expression (housekeeping genes 18S and GAPDH were used as reference genes).

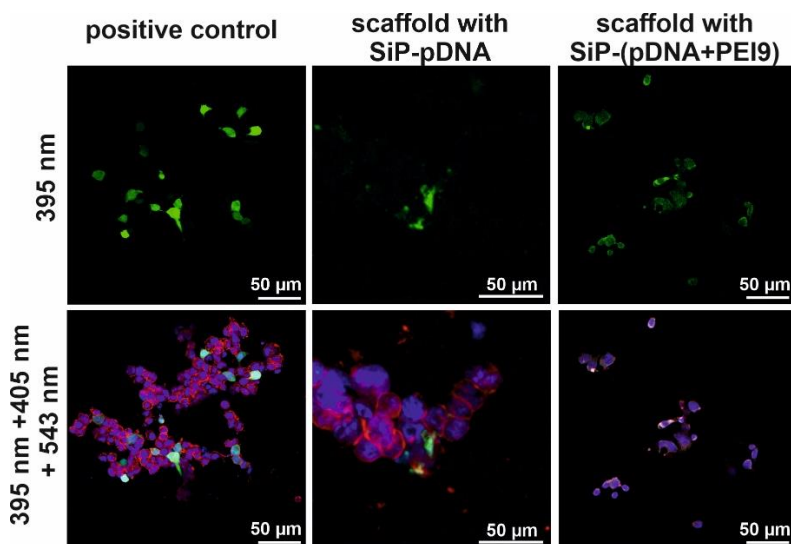


Fig. 1. Fluorescence microscopy data of HEK293T cells cultured on different scaffolds for 5 days. Positive control – cells after pDNA transfection using the TurboFect reagent. Cells are stained with Hoechst 33342 and Phalloidin-TRITC

Conclusion: The results of the work demonstrate that polymer scaffolds made by electrospinning and enriched with pDNA are able to deliver nucleic acids in cells cultivated on this scaffold in order to reprogramming of these cells.

Funding: The study is supported by the Russian State-funded budget project of ICBFM SB RAS No. 121031300042-1.

Список литературы/References

- 1 Jo J.I., Gao J.Q., Tabata Y. Biomaterial-based delivery systems of nucleic acid for regenerative research and regenerative therapy. *Regener Ther.* 2019;11:123-130
- 2 Zhuang Y., Cui W. Biomaterial-based delivery of nucleic acids for tissue regeneration. *Adv Drug Delivery Rev.* 2021;176:113885
- 3 Popova V. et al. Doxorubicin-loaded silica nanocomposites for cancer treatment. *Coatings.* 2023;13:324