

Мезенхимальные стволовые клетки с магнитными частицами для субретинального введения в офтальмологии

Ю.А. Белый¹А.А. Темнов²А.В. Терещенко¹С.А. Миргородская³

¹ Калужский филиал ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова» Минздрава России, Калуга; ² Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н. В. Склифосовского, Москва

³ ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова» Минздрава России, Москва

РЕЗЮМЕ

Разработана технология культивирования мезенхимальных стволовых клеток с магнитными частицами для субретинального введения. Произведена оценка влияния магнитных частиц: на пролиферативную и функциональную активность стволовых клеток костного мозга, на индукцию апоптоза и жизнеспособность стволовых клеток. Эффективность мечения мезенхимальных стволовых клеток (МСК) магнитными частицами составляет порядка 90%, жизнеспособность стволовых клеток — 95%.

Ключевые слова: стволовые клетки, магнитные частицы, субретинальное введение, фиксация

ABSTRACT

Yu. A. Belyi, A. A. Temnov, A. V. Tereshchenko, S. A. Mirgorodskaya

Mesenchymal stem cells with magnetic particles for the subretinal injection in ophthalmology

The technology of the cultivation of mesenchymal stem cells with magnetic particles for the subretinal injection was developed in this work. The estimation of the effect of magnetic particles on the proliferation and functional activity of mesenchymal stem cells has been done. We studied the induction of apoptosis and viability of stem cells with magnetic particles. The efficiency of the labeling of MSCs by magnetic particles for this technology is about 90%, the viability of stem cells is about 95%.

Key words: stem cells, magnetic particles, subretinal injection, fixation

Офтальмология. — 2013. — Т. 10, № 3. — С. 72–74.

Поступила 25.07.13. Принята к печати 20.08.13

Проблема восстановления функции необратимо поврежденных органов и тканей путем трансплантации органов и клеток разрабатывалась на протяжении всего XX века. В результате многочисленных исследований и наблюдений стало очевидным, что с помощью методов клеточной трансплантации появляется возможность возмещения отсутствующих клонов специализированных клеток в поврежденных органах и увеличения пула функционирующих клеток [8, 10]. Стволовые клетки также способствуют активизации в сохранившихся клетках поврежденного органа собственного резерва регенерации и пролиферации [5, 6, 9, 11].

В офтальмологии в условиях эксперимента стволовые клетки применяли при травматических повреждениях и органических заболеваниях сетчатки экспериментальных животных. Было исследовано влияние

стволовых клеток на функциональное состояние и степень выраженности дегенеративных изменений в сетчатке у крыс линии Campbell [2], на проявление каинатной оптиконейропатии [13]. В данных работах авторы показали, что стволовые клетки оказывали выраженное стабилизирующее влияние на процессы дегенерации и на органические изменения, кроме того, происходило краткосрочное улучшение функций сетчатки, подтвержденное методами электроретинографии. Однако все авторы описывают сложность визуализации клеток в экспериментах *in vivo* после трансплантации, а также кратковременность эффекта, связанную с затруднением фиксации клеток в месте введения, их миграцией в другие отделы глаза.

Предложены различные способы введения стволовых клеток при патологии сетчатки и зрительного

нерва: внутривенное, субконъюнктивальное, субтеноновое, парабульбарное, интравитреальное, супрахориоидальное, введение в канал, образованный после радиальной оптической нейротомии [3, 12]. По данным литературы, наибольшим преимуществом обладает метод субретинального введения в связи с возможностью максимального приближения к месту повреждения. К сожалению, субретинальный способ введения клеток также не исключает их миграции.

В настоящее время популярным направлением становится использование магнитных технологий с целью фиксации стволовых клеток в месте их введения. Впервые с этой целью стволовые клетки с введенными в них магнитными наночастицами использованы для анализа движения стволовых клеток при внутривенном введении к области печени. Для этого у крыс в области печени размещали внешний магнит, который «притягивал» введенные внутривенно клетки. В итоге клетки депонировались в печени [4]. Затем стволовые клетки с введенными в них магнитными наночастицами были использованы для анализа их движения к месту повреждения сосудов и сердца [7].

В офтальмологии магнитные технологии с целью фиксации клеточного материала после его введения не использовали.

Таким образом, актуальной представляется разработка методики культивирования стволовых клеток с магнитными частицами для субретинального введения.

Цель исследования — разработка технологии культивирования стволовых клеток с магнитными частицами для субретинального введения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Первым этапом мезенхимальные стволовые клетки (МСК) выращивали в культуре клеток костного мозга, взятых у GFP-мыши при помощи пункции из подвздошной кости (объем — до 0,1 мл). Выращивание культуры производили в специальном боксе для кле-

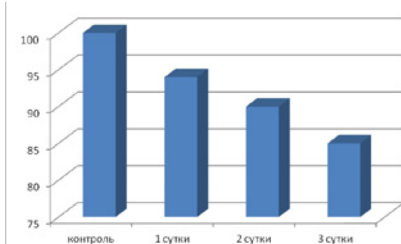


Рисунок 1. Влияние магнитных частиц на пролиферацию стволовых клеток костного мозга.

точных культур. Использованы центрифуга с одноразовыми стерильными центрифужными пробирками на 50 мл, термостат воздушный, ламинарный бокс, инвертированный и обычный микроскопы, автоматические пипетки, баллоны с углекислым газом и воздухом, камеры Горяева для подсчета концентрации клеток. Для культивирования клеток исходно-

го костного мозга использовали стерильные одноразовые пластиковые культуральные флаконы с площадью дна 25 и 150 см². При размножении МСК использовали следующие среды: среда RPMI-1640, среда 199, а также антибиотики — пенициллин, амфотерицин, раствор L-глутамина, эмбриональную телячью сыворотку. За 12-14 последовательных удвоений (в течение 25-30 суток) из исходного количества недифференцированных МСК, содержащихся в полученном пункте и составляющем примерно 103 клетки, продуцируется около (1-2) × 10⁷ МСК, необходимых для проведения успешной трансплантации.

Магнитные частицы (d = 2,8 мкм) вводили в цитоплазму МСК по следующей методике. По достижении 80-90% конfluence к культуре МСК добавляли суспензию магнитных частиц. Магнитные частицы предварительно обрабатывали поверхностно-активными веществами для создания условий проникновения в цитоплазму клетки. Клетки инкубировали с магнитными частицами 24 ч в СО₂-инкубаторе. После инкубации культуральную среду меняли, а клетки пятикратно отмывали от свободных магнитных частиц раствором Хенкса.

На следующем этапе проводили оценку влияния магнитных частиц на пролиферативную активность стволовых клеток костного мозга методом МТТ теста. Для этого инкубированные в течение 72 часов клетки, содержащие магнитные частицы, высеивали в 6-луночные планшеты с плотностью 50 тысяч клеток/луночку. Затем в лунки вносили МТТ (0,25 мг/мл, Serva, Германия) и инкубировали в течение еще 3-х часов. Фор-

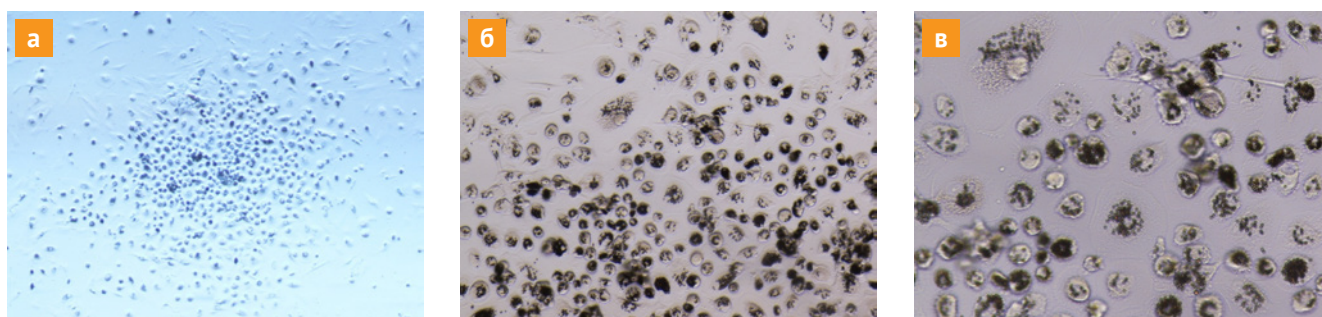


Рисунок 2. Миграция и распластывание клеток, содержащих магнитные частицы, во внешнем магнитном поле: а — ув. x10, б — ув. x20, в — ув. x40.

мазан элюировали с помощью диметилсульфоксида (ДМСО) в течение 30 мин при 37°C и измеряли оптическую плотность элюата на планшетном спектрофотометре Multiscan (Thermo Scientific) при длине волны 570 нм. Для подсчета элюат из одной лунки 6-луночной платы переносили на 3 лунки 96-луночного планшета в объеме 100 мкл для получения статистически более достоверных результатов.

Кроме того, проводили анализ влияния магнитных частиц на функциональную активность стволовых клеток костного мозга путем оценки продукции дезоксирибонуклеиновой (ДНК) и рибонуклеиновой (РНК) кислот с использованием флуоресцентных красителей. Для этого инкубированные в течение 72 часов клетки, содержащие магнитные частицы, помещали в 6-луночные планшеты с плотностью 50 тысяч клеток/лун. Затем в лунки вносили краситель акридиновый желтый и при помощи микроспектрофлуориметра определяли соотношение зеленой люминесценции (530 нм), которая характерна для ДНК, к красной люминесценции (640 нм), характерной для РНК.

Для оценки жизнеспособности адгезированных на пластике стволовых клеток с введенными в них магнитными частицами добавляли также краситель акридиновый желтый и этидий бромид. Акридиновый желтый окрашивал живые и апоптотические клетки, а этидий бромид — некротические. Было определено соотношение живых и некротических клеток.

Для проверки эффективности мечения материала суспензию клеток, содержащих магнитные частицы, помещали на чашку Петри, под дно которой подвешивали внешний магнит с напряженностью магнитного поля 10 мТл и отмечали возможность миграции клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По данным, полученным в результате проведения МТТ-теста, было показано, что проникновение магнитных частиц внутрь стволовых клеток незначительно снижает пролиферативную активность (до 15% через 72 часа инкубации). Это говорит о том, что жизнеспособность клеток при данной технологии составляет до 95% (рис. 1).

При добавлении к культуре клеток красителя акридинового желтого соотношение зеленой (ДНК) и красной (РНК) люминесценции было увеличено, что свидетельствует о функциональной активности стволовых клеток, содержащих магнитные частицы.

Кроме того, при добавлении акридинового желтого красителя и этидия бромида к культуре стволовых клеток, содержащих магнитные частицы, соотношение живых клеток к некротическим показало, что жизнеспособность клеток составляет до 95%.

При использовании внешнего магнитного поля с напряженностью 10 мТл была продемонстрирована эффективность мечения МСК магнитными частицами, которая составила 90%. При увеличении видно, что клетки, содержащие частицы в цитоплазме, мигрируют в зону, расположенную над внешним магнитом, прикрепляются и распластаются (рис. 2 а, б, в).

ВЫВОДЫ

Предложенная оригинальная технология культивирования МСК с магнитными частицами является безопасной, может использоваться для субретинального введения в экспериментальной офтальмологии и является основой для разработки методик локального введения МСК с целью фиксации клеточного материала.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сергеев В.С. Иммунологические свойства мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток // Клеточная трансплантология и Тканевая Инженерия. — 2005. — № 2. — С. 39-42.
2. Тахчиди Х.П., Гаврилова Н.А., Комова О.Ю. и др. Влияние стволовых/прогениторных клеток на функциональное состояние и степень выраженности дегенеративных изменений сетчатки у крыс линии Campbell // Офтальмохирургия. — 2010. — № 3. — С. 12-15.
3. Aramant R., Seiler M. Progress in retinal sheet transplantation // Prog. Retin. Eye Res. — 2004. — V. 23, N 5. — P. 475-494.
4. Arbab A., Jordan E., Wilson L. et al. In vivo trafficking and targeted delivery of magnetically labeled stem cells // Hum Gene Ther. — 2004. — Vol. 15, N. 4. — P. 351-60.
5. Arragval S., Pittenger M. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses // Blood. — 2005. — V. 105. — P. 1815-1822.
6. Bartholomew A., Sturgeon C., Siatskas M. et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo // Exp. Hematol. — 2002. — V. 30. — P. 42-48.
7. Kyrtatos P., Lehtolainen P., Junemann-Ramirez M. et al. Magnetic tagging increases delivery of circulating progenitors in vascular injury // JACC Cardiovasc Interv. — 2009. — Vol. 2, N. 8. — P. 794-802.
8. Lazarus H., Koc O., Devine S. et al. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients // Biol Blood Marrow Transplant. — 2005. — V. 5, N. 11. — P. 389-398.
9. Mimeault M., Batra S. Concise review: recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies // Stem Cells. — 2006. — Vol. 24. — P. 2319-2345.
10. Noort WA, Krusselbrink AB, in't Anker PS et al. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34 (+) cells in NOD/SCID mice // Exp Hematol — 2002. — V. 30. — P. 870-878.
11. Sekiya I., Larson B., Smith J. et al. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality // Stem Cells. — 2002. — V. 20. — P. 530-541.
12. Silverman M., Hughes S. Photoreceptor transplantation in inherited and environmentally induced retinal degeneration: anatomy, immunohistochemistry and function // Prog. Clin. Biol. Res. — 1989. — V. 314. — P. 687-704.
13. Takahashi M., Palmer T., Takahashi J., Gage F. Widespread integration and survival of adult-derived neural progenitor cells in the developing optic retina // Mol Cell Neurosci. 1998. — V 12, N 6. — P.340-348.