

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК С МАГНИТНЫМИ ЧАСТИЦАМИ ДЛЯ СУБРЕТИНАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ

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 жизнеспособности стволовых клеток. Было доказано, что данная технология является безопасной, эффективность мечения мезенхимальных стволовых клеток (МСК) магнитными частицами по данной технологии составляет порядка 90%, жизнеспособность стволовых клеток составляет 95%.

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

Актуальность

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. Стволовые клетки также способствуют активизации в сохранившихся клетках поврежденного органа собственного резерва регенерации и пролиферации [7].

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 [14], на проявление каинатной оптиконейропатии [13], при лечении частичной атрофии зрительного нерва [12]. В данных работах авторы показали, что стволовые клетки оказывали выраженное стабилизирующее влияние на процессы дегенерации и на органические изменения, происходило краткосрочное улучшение функций сетчатки, подтвержденное методами ЭРГ. 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, парабулбарное, интравитреальное, супрахориоидальное, введение в канал, образованный после радиальной оптической нейротомии. Однако по данным литературы большим преимуществом обладает метод субретинального введения, в связи с возможностью максимального приближения к месту повреждения, но, к сожалению, данный способ также как и остальные, не исключает миграции клеток.

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 были использованы для движения стволовых клеток при внутривенном введении к области печени. Для этого крысам в области печени размещали внешний магнит, который «притягивал» введенные внутривенно клетки, где клетки в итоге и депонировались [2]. Затем стволовые клетки с введенными в них магнитными наночастицами были использованы для движения стволовых клеток к месту повреждения сосудов и сердца [5].

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

Таким образом, актуальным представляется разработка методики культивирования ство-

ловых клеток с магнитными частицами для субретинального введения.

Цель работы

Разработать технологию 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 клеточных культур. Также использовались: 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 исходного костного мозга использовали стерильные одноразовые пластиковые культуральные флаконы с площадью дна в 25 и 150 см². При размножении МСК использовали следующие среды и растворы: среда RPMI-1640, среда 199, антибиотики: пенициллин, амфотерицин, – раствор L-глутамина, эмбриональная телячья сыворотка. За 12-14 последовательных удвоений (в течение 25-30 суток) из исходного количества недифференцированных МСК, содержащихся в полученном пунктате и составляющем примерно 10³ клеток, продуцируется примерно (1-2)×10⁷ МСК, необходимых для проведения успешной трансплантации стволовых клеток. 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 частицами 24 ч в СО₂-инкубаторе. После инкубации культуральную среду меняли и клетки 5-кратно отмывали от свободных магнитных частиц раствором Хенкса.

Следующим этапом производилась оценка влияния магнитных частиц на пролиферативную активность стволовых клеток костно-

го мозга методом МТТ теста. Для этого инкубированные в течение 72 часов клетки, содержащие магнитные частицы высевались в 6-луночные планшеты с плотностью 50 тысяч клеток/лун. Затем в лунки вносили МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид) и инкубировали в присутствии МТТ (0,25 мг/мл, Serva, Германия) в течение еще 3-х часов. Формазан элюировали с помощью диметилсульфоксида (ДМСО) в течение 30 мин при 37°С и проводили измерение оптической плотности элюата на планшетном спектрофотометре Multiscan (Thermo Scientific) при длине волны 570 нм. Для просчета элюат из одной лунки 6-луночной платы переносили на 3 лунки 96-луночного планшета в объеме 100 мкл для получения статистически более достоверных результатов.

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

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

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

Результаты и обсуждение

По данным, полученным в результате проведения МТТ-теста, было показано, что проник-

новение магнитных частиц внутрь стволовых клеток незначительно (до 15% через 72 часа инкубации) снижает пролиферативную активность. Это говорит о том, что жизнеспособность клеток при данной технологии составляет до 95% (рис. 1).

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

Так же при добавлении акридинового желтого красителя и эпидия бромида к культуре стволовых клеток, содержащих магнитные частицы, соотношение живых клеток к некротическим показало жизнеспособность клеток до 95%

При использовании внешнего магнитного поля с напряженностью 10 мТл была продемонстрирована эффективность мечения МСК магнитными частицами, она составила 90%. При увеличении видно, что клетки, содержащие частицы в цитоплазме мигрируют в зону над вне-

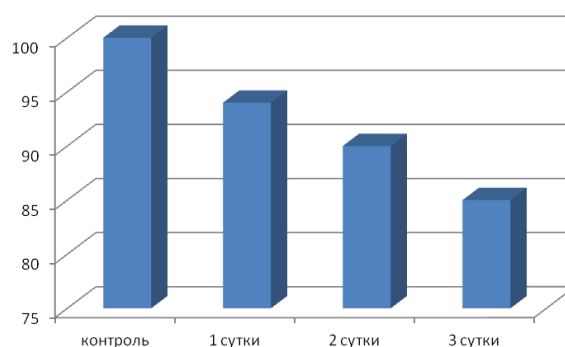


Рисунок 1. Влияние магнитных частиц на пролиферацию стволовых клеток костного мозга

шним магнитом, прикрепляются и распластаются (рис. 2 а, б, в, цветная вкладка).

Заключение

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.

10.02.2013

Список литературы:

1. Aramant R.B., Seiler M.J. Progress in retinal sheet transplantation // Prog. Retin. Eye Res. – 2004. – V. 23, N 5. – P. 475-494.
2. Arbab AS, Jordan EK, Wilson LB, Yocum GT, Lewis BK, Frank JA. In vivo trafficking and targeted delivery of magnetically labeled stem cells. Hum Gene Ther. – 2004 – Apr;15(4) – V. 351-60.
3. Arragyal S., Pittenger M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses // Blood. – 2005 – V. 105. – P. 1815 – 1822.
4. 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.
5. Kyrtatos P.G. et al. Magnetic Tagging Increases Delivery of Circulating Progenitors in Vascular Injury. // JACC Cardiovascular Interventions. – 2009 – 2 (8) – P.794.
6. Lazarus H.M., Koc O.N., Devine S.M. 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. – №11. – V.5. – P.389-398.
7. Mimeault M, Batra SK: Concise review: recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. Stem Cells – 2006 – 24:2319-2345.
8. 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.
9. 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.
10. Silverman M.S., Hughes S.E. Photoreceptor transplantation in inherited and environmentally induced retinal degeneration: anatomy, immunohistochemistry and function. // Prog. Clin. Biol. Res. – 1989 – V. 314. – P. 687 – 704.
11. Takahashi M, Palmer TD, Takahashi J, Gage F.H. 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.
12. Белый Ю.А., Терещенко А.В., Конопляников А.Г., Соловьев Д.К., Способ лечения атрофии зрительного нерва различной этиологии // 2008, патент №2375019
13. Беляковский П.В., Позняк Н.И., Лобанок Е.С. Влияние стволовых клеток на проявление каинантной оптикнейропатии // Офтальмология в Беларуси – 2009 – №1 – 91-96
14. Купрашвили И.Т. Экспериментальное изучение эффективности клеточной трансплантации при посттравматической патологии сетчатки // Автореф. дис... канд. мед. наук. – М., 2009. – 25с.
15. Сергеев В.С. Иммунологические свойства мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток // Клеточная трансплантология и Тканевая Инженерия. – 2005. – №2 – С.39-42.
16. Тахчиди Х.П., Гаврилова Н.А., Комова О.Ю., Ланевская Н.И., Сабурова И.Н., Сергеев С.А., Павлова Г.В., Ревизиц А.В., Орлов О.Ю., Бастаков В.А. Влияние стволовых/прогениторных клеток на функциональное состояние и степень выраженности дегенеративных изменений сетчатки у крыс линии Campbell // Офтальмохирургия – 2010 №3. – С.33-38.

Сведения об авторах:

Белый Юрий Александрович, заместитель директора по науке Калужского филиала ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, доктор медицинских наук, профессор, e-mail: nauka@mntk.kaluga.ru

Темнов Андрей Александрович, заведующий лабораторией клеточных и физико-химических медицинских технологий научно-исследовательского института скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, доктор медицинских наук, e-mail: aa-temnov@yandex.ru

Миргородская Светлана Александровна, очный аспирант ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва, e-mail: schwappes@mail.ru

UDC 617.735

Belyu Yu.A., Temnov A.A., Mirgorodskaya S.A.

E-mail: nauka@mntk.kaluga.ru; aa-temnov@yandex.ru; schwappes@mail.ru

THE DEVELOPMENT OF CULTIVATION TECHNOLOGY OF MESENCHYMAL STEM CELLS WITH MAGNETIC PARTICLES FOR THE SUBRETINAL INJECTION

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. It has been proved that the technology is safe, 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.

Bibliography:

1. Aramant R.B., Seiler M.J. Progress in retinal sheet transplantation // Prog. Retin. Eye Res. – 2004. – V. 23, N 5. – P. 475-494.
2. Arbab AS, Jordan EK, Wilson LB, Yocum GT, Lewis BK, Frank JA. In vivo trafficking and targeted delivery of magnetically labeled stem cells. Hum Gene Ther. – 2004 – Apr;15(4) – V. 351-60.
3. Arragval S., Pittenger M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses // Blood. – 2005 – V. 105. – P. 1815 – 1822.
4. 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.
5. Kyrtatos P.G. et al. Magnetic Tagging Increases Delivery of Circulating Progenitors in Vascular Injury. // JACC Cardiovascular Interventions. – 2009 – 2 (8) – P. 794.
6. Lazarus H.M., Koc O.N., Devine S.M. 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. – №11. – V.5. – P.389-398.
7. Mimeault M, Batra SK: Concise review: recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. Stem Cells – 2006 – 24:2319-2345.
8. Noort WA, Krusselbrink AB, 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.
9. 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.
10. Silverman M.S., Hughes S.E. Photoreceptor transplantation in inherited and environmentally induced retinal degeneration: anatomy, immunohistochemistry and function. // Prog. Clin. Biol. Res. – 1989 – V. 314. – P. 687 – 704.
11. Takahashi M, Palmer TD, Takahashi J, Gage F.H. 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.
12. Belyu Yu.A., Tereshchenko A.V., Konoplyannikov A.G., Soloviev D.K. The method of treatment of atrophy of the optic nerve of different etiology// 2008 – patent №2375019
13. Belyakovskiy P.V., Poznyak N. I. Lobanok E.S. Influence of stromal cells on manifestation of a kainantny optikoneyropatiya // Ophthalmology in Belarus – 2009 – №1 – P. 91-96
14. Kuprashvili I.T. Experimental studying of efficiency of cellular transplantation at post-traumatic pathology of a retina // Dissertation of the candidate of medical sciences. – M., 2009. – 25 p.
15. Sergeev V.S. Immunological properties of multipotent progenitor of mesenchymal stromal cells // Cellular transplantation and Tissue Engineering. – 2005. – №2 – P.39-42.
16. Tahchidi H.P, Gavrilova N.A., Komova O.Y., Lanevskaya N.I., Sabourin I.N., Sergeev S.A., Pavlova, G.V., Revischin A.V., Orlov O. Y., Bastakov V.A. The impact of stromal/progenitor cells on the functional condition and the degree of severity of degenerative changes of retina in rats line Campbell // Ophthalmosurgery – 2010 – №3 – P. 33-38.