

**Темнов А.А.¹, Белый Ю.А.², Миргородская С.А.³, Семенов А.Д.³,
Ревещин А.В.⁴, Павлова Г.В.⁴, Куст Н.Н.⁴**

¹Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы, Москва

²Калужский филиал МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова Минздрава России

³МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

⁴Институт Биологии гена Российской Академии Наук, Москва

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ЛОКАЛЬНОГО СУБРЕТИНАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ КСЕНОГЕННЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, МЕЧЕННЫХ МАГНИТНЫМИ ЧАСТИЦАМИ

Разработана методика локального субретинального введения ксеногенных стволовых клеток, меченных магнитными частицами, и экспериментально обоснована ее эффективность. Опытная группа: к склере подшивали комплекс полимерного эластичного магнитного имплантата (ПЭМИ) с лазерным зондом, производили срединную витрэктомию и вводили под сетчатку линию стволовых клеток, меченную магнитными частицами. В группе контроля ПЭМИ не фиксировали. По данным морфологического исследования доказано, что в опытной группе клетки располагаются в субретинальном пространстве в сроки до 14 суток, а в группе контроля только до 3 суток. Разработанный хирургический способ дает возможность контролировать введение клеток в субретинальное пространство.

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

Актуальность

Методы клеточной трансплантации в настоящее время открывают широкие возможности возмещения отсутствующих клонов специализированных клеток в поврежденных органах и тканях. Стволовые клетки также способствуют активизации в сохранившихся клетках поврежденного органа собственного резерва регенерации и пролиферации [4], [9].

В экспериментальной офтальмологии, в работах по трансплантации эмбриональных частей сетчатки в сетчатку взрослого млекопитающего было показано, что имплантированная ткань интегрируется с сетчаткой реципиента, и даже могут устанавливаться морфологические контакты с первичными зрительными центрами [8]. Также проводились исследования возможности встраивания стволовых клеток в слои сетчатки и дифференцировки их в фоторецепторы [17], [18]. Было показано, что стволовые клетки, введенные интравитреально, если не погибают в течение нескольких суток после трансплантации, то мигрируют, встраиваются в слои сетчатки и формируют многочисленные отростки, идентичные нормальным аксонам, а в отдельных случаях аксоны введенных клеток прорастают в зрительный нерв и остаются жизнеспособными сроком до 30 дней [10], [20].

Применение стволовых клеток из мезенхимальной ткани является перспективным за счет возможности получения материала от самого реципиента. В ряде работ было показано, что мезенхимальные стволовые клетки эффективны в лечении повреждений роговицы [12], [14], [16], способствуют повышению выживаемости ганглиозных клеток при глаукоме [11]. Отмечается способность стволовых клеток ингибировать апоптоз клеток сетчатки, уменьшать воспаление, вызванное лазерным воздействием, и ограничивать зону распространения лазерного повреждения [13].

В исследованиях по влиянию стволовых клеток на функциональное состояние и степень выраженности дегенеративных изменений в сетчатке у крыс линии Campbell [6] при токсическом поражении зрительного нерва [3], при лечении частичной атрофии зрительного нерва [5] было показано, что стволовые клетки оказывают выраженное стабилизирующее влияние на процессы дегенерации и на органические изменения: происходило краткосрочное улучшение функций сетчатки, подтвержденное методами ЭРГ. Однако все авторы указывают на кратковременность эффекта в связи с трудностями фиксации клеток в месте введения и 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. Преимущественным является метод субретинального введения в связи с возможностью максимального приближения к месту повреждения. Но, к сожалению, субретинальный способ введения клеток является достаточно травматичным и также 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 магнитными наночастицами были использованы для доставки стволовых клеток к области печени. Для этого крысам в области печени размещали внешний магнит, который «притягивал» введенные внутривенно клетки, где они в итоге и депонировались [7], [19]. Также стволовые клетки с введенными в них магнитными наночастицами применяли для доставки к месту повреждения сосудов и сердца [15].

До настоящего времени магнитные технологии для фиксации клеточного материала в офтальмологии не использовали.

Цель

Разработать методику локального субретинального введения ксеногенных стволовых клеток, меченных магнитными частицами, и экспериментально обосновать ее эффективность.

Материал и методы

В работе использовалась линия стволовых клеток НЕК-293 GFP (human embryonic kidneys), полученная из клеток почки эмбриона человека, выращенная в культуре ткани, и трансфицированная GFP плазмидой.

Для культивирования НЕК-293 применялась среда DMEM (ПанЭко, Россия) при добавлении 10% фетальной сыворотки крови (Perbio NuClone, США), L-глутамин (ПанЭко, Россия) и 4% гентамицин (ПанЭко, Россия). Культура клеток инкубировалась при 37°C в CO₂ инкубаторе. Клетки росли на площади 25 см² во флаконах («Costar»). По мере нарастания культуры клеток почек эмбриона человека НЕК-293 до концентрации 1,5×10⁵ клеток мл⁻¹ клетки подверга-

лись трансфекции полученными конструкциями: EGFP-N1 («Clontech»). Трансфекция осуществлялась с помощью реагента ExGene 500 (Fermentas, R0511) согласно протоколу. Селекция клонов, несущих встроенную конструкцию, проводилась с помощью реагента гинцитина (G418, Invitrogen # 15750045) в течение десяти дней. После селекции с использованием антибиотика клоны, устойчивые к G418, были использованы для анализа с помощью микроскопа (Olympus). Все колонии были GFP позитивные. Клетки были рассеяны на чашки Петри («Corning») в количестве около 300 тысяч. Через 24 часа были добавлены магнитные частицы («Invitrogen»; H54700), в соотношении 1:100. Магнитные частицы были предварительно обработаны поверхностно активными веществами для создания условий проникновения в цитоплазму клетки. Комбинация клеток НЕК/GFP с магнитными частицами культивировалась 24 часа при температуре 37°C в CO₂ инкубаторе. Через 24 часа трансгенная культура по гену GFP с магнитными частицами была пятикратно промыта раствором Хенкса (ПанЭко, Россия) и обработана раствором трипсина (ПанЭко, Россия). Коллекцию клеток осуществляли в 1,5 мл эппендорф фирмы Corning. Клетки были осаждены на центрифуге фирмы Eppendorf в течение 3 минут при 2,5 тысяч оборотов в минуту. По достижении 80–90% конфлюентности к культуре НЕК-293 добавляли суспензию магнитных частиц. Клетки инкубировали с частицами 24 ч в CO₂-инкубаторе. После инкубации культуральную среду меняли и клетки 5-кратно отмывали от свободных магнитных частиц раствором Хенкса. Производилась оценка влияния магнитных частиц на пролиферативную активность стволовых клеток костного мозга методом МТТ теста, на функциональную активность стволовых клеток костного мозга и жизнеспособность с использованием флуоресцентных красителей.

Исследование *in vivo* проведено на 84 глазах 42 кроликов породы шиншилла в возрасте 6 месяцев весом от 2,5 до 3,5 кг. Все правые глаза были опытными (42 глаза), а левые (42 глаза) – контрольными. Всем кроликам в оба глаза за 30 минут до операции в конъюнктивальную полость инстиллировали 1–2 капли 1% раствора атропина и 10% мезатона для достижения медикаментозного мидриаза. Всем кроликам в качестве анестезии выполняли общий наркоз, кото-

рый осуществляли внутримышечным введением 1% раствора гексена из расчета 0,5 мл на 1 кг веса животного. Общее обезболивание дополняли трехкратной инстилляцией в конъюнктивальную полость 0,4% раствора инокаина. Перед операцией всем кроликам проводили промывание конъюнктивальной полости раствором фурацилина 1:5000. Иммобилизация животных производилась путем тугого бинтования.

В опытной группе (42 глаза) после установки блефаростата, отступя 3 мм от лимба, с помощью конъюнктивных ножниц в нижнем сегменте производился разрез конъюнктивы и теиновой оболочки протяженностью 10 мм. Далее выделяли нижнюю прямую мышцу, брали ее на шов-держалку. Затем в 7-ми мм от лимба подшивали комплекс полимерного эластичного магнитного имплантата (ПЭМИ) толщиной 0,35 мм, диаметром 4 мм, с многополюсным реверсивным намагничиванием с напряженностью магнитного поля 5,0 мТл с лазерным зондом. В 3-х мм от лимба в верхнем и верхне-наружном сегменте устанавливали три порта 25G в проекции плоской части цилиарного тела, фиксировали инфузионную систему, световод, витреотом, производили срединную витректомию. Суспензию объемом 0,02 мл, содержащую стволовые клетки ($n \sim 6000$), меченные магнитными частицами, вводили субретинально при помощи разработанного устройства для дозирования с иглой 25G, на конце которой расположена изогнутая канюля 41G с заточенным нижним краем. Для предотвращения выхода клеток через ретиномическое отверстие сразу после их введения витреальную полость заполняли газо-воздушной смесью. По завершению эксперимента лазерный зонд обрезался на уровне полимерного эластичного магнитного имплантата. На склеротомические отверстия и конъюнктиву накладывался шов Coated Vicryl 8-0 (Ethicon).

В группе контроля (42 глаза) хирургическое введение стволовых клеток субретинально производили без фиксации полимерного эластичного магнитного имплантата с лазерным зондом.

Всем экспериментальным животным в послеоперационном периоде через 3 часа, 1, 3, 5, 7, 10, 14 суток, 1 месяц проводили биомикроскопию, офтальмоскопию глазного дна с фотографированием, ультразвуковое офтальмосканирование, оптическую когерентную томографию

(ОКТ), компьютерную томографию (КТ), морфологическое исследование (крио-гистологические срезы).

Результаты

По результатам эксперимента *in vitro* было показано, что проникновение магнитных частиц внутрь стволовых клеток незначительно снижает пролиферативную активность (до 5% через 72 часа инкубации). Это говорит о том, что жизнеспособность клеток при данной технологии составляет до 95%.

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.

Также 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%.

По результатам клинических исследований при биомикроскопии в сроки наблюдения 1–3 суток в обеих группах отмечалась инъекция глазного яблока в зоне проведения хирургического вмешательства, которая проходила к 5-м суткам. На всех сроках наблюдения швы конъюнктивы и склеротомических отверстий были адаптированы, оптические среды прозрачны, воспалительных явлений не наблюдалось.

По результатам офтальмоскопии на 1-е сутки во всех глазах опытной и контрольной групп визуализировалась локальная отслойка сетчатки в зоне введения клеток, дефект сетчатки и сосудистой оболочки. К 3-м суткам отслойка сетчатки не визуализировалась, но дефект сетчатки и сосудистой оболочки сохранялся. В дальнейшие сроки наблюдения было сложно визуализировать место локального введения клеток.

По данным ультразвукового исследования во всех глазах опытной и контрольной групп на 1-е сутки визуализировалась локальная отслойка сетчатки высотой 1,0–1,4 мм, которая к 3-м суткам уменьшилась до 0,4–0,7 мм, а к 5-м суткам не визуализировалась. Во все сроки наблюдения в обеих группах визуализировалась мелкодисперсная взвесь в стекловидном теле, а в опытной группе – эхо-тень от магнита.

По данным КТ во всех случаях выявлено расположение ПЭМИ в правом ретробульбарном пространстве в нижне-латеральном квадранте, левые орбиты были интактны, патологических очагов выявлено не было.

По данным флюоресцентной микроскопии криосрезов энуклеированных глазных яблок в 1-е сутки во всех 6-ти глазах опытной группы клетки НЕК-293 GFP располагались в месте их введения под сетчаткой, в стекловидном теле и других структурах глаза обнаружены не были (рис. 1, цветная вкладка). Во всех глазах группы контроля были обнаружены единичные клетки или группы клеток НЕК-293 GFP в полости стекловидного тела, не связанные с другими структурами глаза (рис. 2, цветная вкладка).

На 3-и сутки во всех глазах опытной группы клетки НЕК-293 GFP располагались также в месте введения под сетчаткой. При добавлении на срезы красителя бисбензимида, окрашивающего ядра живых клеток, доказано, что клетки, находящиеся под сетчаткой, являются живыми. В группе контроля в 3-х глазах из 6-ти в полости стекловидного тела были обнаружены скопления клеток НЕК-293 GFP, не связанные с другими структурами глаза, в остальных 3-х глазах клетки НЕК-293 GFP обнаружены не были (рис. 3, цветная вкладка).

В сроки наблюдения 5, 7, 10, 14 суток в опытной группе клетки НЕК-293 GFP также располагались в месте их введения, но количество клеток снижалось на каждом последующем сроке наблюдения. К сроку 1 месяц клетки обнаружить не удалось ни в одном случае, но во всех 6-ти глазах наблюдалась присклеральная флюоресценция в зоне подшивания ПЭМИ (рис. 4, цветная вкладка). В группе контроля в сроки наблюдения 5, 7, 10, 14 суток и 1 месяц клетки не визуализировались.

Обсуждение

В настоящее время клеточные технологии выступают наиболее перспективным направлением для восстановления поврежденных органов и тканей [4]. В офтальмологических экспериментальных работах трансплантация стволовых клеток также доказала свою эффективность при травматических и дегенеративных заболеваниях сетчатки и зрительного нерва [3], [5], [6], [13]. Однако исследователи столкнулись с проблемой кратковременности эффекта в свя-

зи с выраженной миграцией трансплантированного материала в другие отделы глаза и травматизацией окружающих тканей при проведении хирургических вмешательств. Поэтому актуальным вопросом является разработка технологии фиксации клеточного материала в зоне его локальной трансплантации с наименьшей травматизацией тканей во время операции.

В предыдущих своих работах нами была доказана безопасность и эффективность разработанной технологии культивирования мезенхимальных стволовых клеток с магнитными частицами [1], [2]. В данном исследовании мы использовали клеточную линию НЕК-293 в связи с доступностью материала, легкостью культивирования и возможностью провести трансфекцию GFP-плазмидой, что давало неоспоримое преимущество при проведении флюоресцентной микроскопии криогистологических срезов в эксперименте *in vivo*.

Для введения клеточной суспензии в субретинальное пространство нами было разработано специальное устройство, которое обеспечивало деликатное введение клеток с минимальной травматизацией окружающих тканей с возможностью точного дозирования вводимой суспензии.

Для интраоперационной диафаноскопии с целью точного определения места и последующего контролируемого локального введения стволовых клеток мы применяли ПЭМИ с лазерным зондом оригинальной конструкции. Мы также модифицировали хирургический способ введения стволовых клеток субретинально, проводя срединную витрэктомию и заполняя витреальную полость газо-воздушной смесью после введения клеток, что позволило избежать выхода клеток из субретинального пространства в полость стекловидного тела.

В результате проведенных исследований доказано, что предложенная методика является микроинвазивной: в сроки от 3-х до 5-ти суток послеоперационного периода локальной отслойки сетчатки в месте введения клеток уже не наблюдалось, воспалительных явлений и интраоперационных осложнений ни в одном случае выявлено не было. Данные морфологического исследования демонстрируют, что предложенная методика позволяет осуществить фиксацию клеточного материала в месте их локального введения сроком до 14 дней и дает возможность прогнозирования их движения. Отсут-

ствие клеток в зоне введения через 1 месяца мы связываем с иммунным ответом на ксеногенные стволовые клетки.

Заключение

Предложенная оригинальная методика локального субретинального введения стволовых клеток, меченных магнитными частицами, является эффективным способом фиксации мате-

риала в зоне введения. Данная технология может стать основой для изучения механизмов воздействия стволовых клеток на очаг повреждения, разработки новых перспективных стратегий в офтальмологии, а также открыть новые возможности применения стволовых клеток в качестве средств нейропротекции или альтернативных терапевтических приемов при лечении различной патологии.

19.09.2014

Список литературы:

1. Белый, Ю.А. Разработка технологии культивирования мезенхимальных стволовых клеток с магнитными частицами для субретинального введения / Ю.А. Белый, А.А. Темнов, С.А. Миргородская // Вестник ОГУ. – 2013. – 4(153). – С. 40–43.
2. Мезенхимальные стволовые клетки с магнитными частицами для субретинального введения в офтальмологии / Ю.А. Белый [и др.] // Научно-медицинский журнал Офтальмология. – 2013. – 10(3). – С. 72–74.
3. Беляковский, П.В. Применение эмбриональных стволовых клеток и факторов роста стволовых клеток (stem cell factor, lif) при токсическом поражении зрительного нерва у кроликов / П.В. Беляковский, Н.И. Позняк, Е.С. Лобанок // Рецепт. – 2009. – 12. – С. 156–161.
4. Онищенко, Н.А. Клеточная трансплантация – перспективное направление регенерационной медицины / Н.А. Онищенко, М.Е. Крашенинников // Биологические резервы клеток костного мозга и коррекция органных дисфункций. – М.: 2009.
5. Ромашенко, А.Д. Способ лечения атрофии зрительного нерва посредством трансплантации аутологичных стволовых клеток / А.Д. Ромашенко, А.В. Ковалев // Официальный бюллетень Российского агентства по патентам и товарным знакам. – 2009. – 26. – С. 8.
6. Влияние стволовых/прогениторных клеток на функциональное состояние и степень выраженности дегенеративных изменений сетчатки у крыс линии Campbell / Х.П. Тахчиди [и др.] // Офтальмохирургия. – 2010. – 3. – С. 33–38.
7. In vivo trafficking and targeted delivery of magnetically labeled stem cells / A.S. Arbab [et al.] // Hum Gene Ther. – 2004. – 15(4). – P. 351–360.
8. Transplantation of ocular stem cells: the role of injury in incorporation and differentiation of grafted cells in the retina / D.M. Chacko [et al.] // Vision Res. – 2003. – 43(8). – P. 937–946.
9. The possible use of stem cells in regenerative medicine: dream or reality? / S. Ehnert [et al.] // Langenbecks Arch Surg. – 2009. – 394. – P. 985–997.
10. Embryonic stem cells are capable of generating a neuronal network in the adult mouse retina / A. Hara [et al.] // Brain Res. – 2004. – 999(2). – P. 216–221.
11. Bone marrow mesenchymal stem cells protect against retinal ganglion cell loss in aged rats with glaucoma / Y. Hu [et al.] // Clin. Interv. Aging. – 2013. – 8. – P. 1467–1470.
12. Reconstruction of the corneal epithelium with induced marrow mesenchymal stem cells in rats / T.S. Jiang [et al.] // Mol. Vis. – 2010. – 16. – P. 1304–1316.
13. Therapeutic effect of bone marrow mesenchymal stem cells on laser-induced retinal injury in mice / Y. Jiang [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2014. – 15(6). – P. 9372–9385.
14. Joe, A.W. Mesenchymal stem cells and potential applications in treating ocular disease / A.W. Joe, K. Gregory-Evans // Curr. Eye. Res. – 2010. – 35(11). – P. 941–952.
15. Magnetic tagging increases delivery of circulating progenitors in vascular injury / P. Kyrtatos [et al.] // JACC Cardiovasc Interv. – 2009. – 2(8). – P. 794–802.
16. Liu, X.W. Transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells for the treatment of corneal endothelium damages in rabbits / X.W. Liu, J.L. Zhao // Zhonghua Yan. Ke. Za. Zhi. – 2007. – 43(6). – P. 540–545.
17. Nrl is required for rod photoreceptor development / A. Mears [et al.] // Nature Genet. – 2001. – 29. – P. 447–452.
18. Silvermann, M.S. Photoreceptor transplantation in inherited and environmentally induced retinal degeneration: anatomy, immunohistochemistry and function / M.S. Silvermann, S.E. Hughes // Prog. Clin. Biol. Res. – 1989. – 314. – P. 687–704.
19. Using a neodymium magnet to target delivery of ferumoxide-labeled human neural stem cells in a rat model of focal cerebral ischemia / M. Song [et al.] // Hum. Gene Ther. – 2010. – 21(5). – P. 603–610.
20. Widespread integration and survival of adult-derived neural progenitor cells in the developing optic retina / M. Takahashi [et al.] // Mol. Cell Neurosci. – 1998. – 12(6). – P. 340–348.

Сведения об авторах:

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

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

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

Семенов Александр Дмитриевич, главный научный консультант МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктор медицинских наук, профессор

Ревущин Александр Владимирович, старший научный сотрудник группы нейрогенетики и генетики развития отдела геномики и клеточных технологий Института биологии гена Российской академии наук, кандидат биологических наук, e-mail: revishchin@mail.ru

Павлова Галина Валерьевна, руководитель группы нейрогенетики и генетики развития отдела геномики и клеточных технологий Института биологии гена Российской академии наук, доктор биологических наук, профессор; e-mail: lkorochkin@mail.ru

Куст Надежда Николаевна, старший лаборант-исследователь группы нейрогенетики и генетики развития отдела геномики и клеточных технологий Института биологии гена Российской академии наук; e-mail: kananada@yandex.ru