

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ИХ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ В СУБРЕТИНАЛЬНОЕ ПРОСТРАНСТВО

© 2020 г. М.А. Плахотный*, А.М. Кодунов*, Е.В. Горина**, В.В. Бояринцев**, А.В. Трофименко**, С.А. Бирюков**, Г.И. Фильков**

*Калужский филиал НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» Минздрава России, 248007, Калуга, ул. Святослава Федорова, 5

E-mail: nauka@eye-kaluga.com

**Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), 141701, Долгопрудный Московской области, Институтский пер., 9

E-mail: biryukov.sa@mipt.ru

Поступила в редакцию 19.08.2020 г.

После доработки 19.08.2020 г.

Принята к публикации 23.08.2020 г.

Использование мезенхимальных стволовых клеток является эффективной стратегией лечения ряда дегенеративных заболеваний сетчатки. Лимитирующим фактором данного подхода является ограниченная выживаемость этих клеток после трансплантации. Ранее было показано, что выращивание мезенхимальных стволовых клеток в условиях гипоксии способно увеличить их пролиферативную активность. Мы предположили, что такой способ культивирования позволит улучшить жизнеспособность данных клеток после введения в субретинальное пространство. С этой целью мы выделили мезенхимальные стволовые клетки красного костного мозга мышей, охарактеризовали их фенотип, способность к дифференцировке в хондрогенном, остеогенном и адипогенном направлениях, а также их пролиферативную активность в условиях культивирования при гипоксии (5% кислорода в атмосфере) и в условиях нормоксии (21% кислорода в атмосфере). Таким же образом были получены клетки из красного костного мозга от мышей линии C57 Black, несущих ген *GFP*. Эти клетки после предварительного культивирования в условиях нормоксии (контроль) и гипоксии (опыт) были нагружены магнитными микрочастицами и введены субретинально кроликам. Клетки удерживали в месте инъекции с помощью магнитного импланта, препятствующего их миграции. Выживаемость клеток оценивали на третьи, пятые, девятые, двенадцатые и пятнадцатые сутки по данным флуоресцентной микроскопии и оптической когерентной томографии. Согласно полученным данным, выращенные в гипоксических условиях клетки сохраняли жизнеспособность в субретинальном пространстве в течение девяти суток, в то время как клетки, которые росли в условиях нормоксии, погибали спустя шесть суток. Таким образом, предварительное культивирование мезенхимальных стволовых клеток в условиях гипоксии способно увеличить их жизнеспособность после введения в субретинальное пространство, что может быть использовано при терапии дегенеративных заболеваний сетчатки.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, условия культивирования, выживаемость, субретинальная трансплантация, болезни сетчатки, гипоксия.

DOI: 10.31857/S0006302920060125

Возрастная дегенерация желтого пятна, диабетическая ретинопатия и глаукома, являющиеся основными причинами необратимой слепоты, в одной только Европе, согласно прогнозам, затронут около 200 миллионов человек к 2020 г. Ише-

мия сетчатки и гибель клеток, вызванные, среди прочего, апоптозом и воспалительными процессами, являются основой патогенеза многих заболеваний, приводящих к потере зрения [1]. Современная терапия направлена на предотвращение прогрессирования этих заболеваний с использованием внутриглазных инъекций (например, анти-VEGF-препаратов, препятствующих росту патологических сосудов в сетчатке), метаболических, антиоксидантных и вазоактивных препа-

Сокращения: VEGF — фактор роста эндотелия сосудов (Vascular Endothelial Growth Factor), МСК — мезенхимальные стволовые клетки, GFP — зеленый флуоресцентный белок (Green Fluorescent Protein), PBS — фосфатный буфер (Phosphate Buffer Solution).

ратов в форме глазных капель или хирургического вмешательства. Тем не менее эффективность этих методов ограничена.

Использование мезенхимальных стволовых клеток (МСК) для лечения офтальмологических заболеваний является одним из перспективных направлений исследования. МСК являются мультипотентными клетками с регенеративными и иммуномодулирующими свойствами [2, 3]. Субретинальные инъекции препаратов на основе стволовых клеток запускают процессы нейропротекции и/или регенерации сетчатки [4]. Одним из ограничений данной стратегии является слабая выживаемость трансплантированных МСК в субретинальном пространстве [5]. Вместе с тем выращивание МСК в условиях гипоксии способно увеличить пролиферативную активность и выживаемость данных клеток в культуре и при трансплантации в поврежденные ткани, что было показано на примере инфаркта миокарда [6]. В связи с этим целью данной работы была оценка влияния культивирования МСК в условиях гипоксии на жизнеспособность клеток после введения в субретинальное пространство. Проведенное нами исследование сроков выживаемости МСК при субретинальном введении является важным шагом на пути к эффективному лечению офтальмологических заболеваний с применением препаратов на основе МСК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение и культивирование первичных МСК.

Первичные линии мезенхимальных стволовых клеток животных были получены из аутбредных мышей ICR (CD 1) и SHK, а также от мышей линии C57 Black, модифицированной геном зеленого флуоресцентного белка (GFP). Выделение первичных МСК из красного костного мозга мышей в возрасте 8–11 недель проводили по стандартному протоколу [7]. Клетки культивировали в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США). Смену среды проводили каждые трое суток.

Анализ фенотипа МСК и способности к дифференцировке. Для фенотипирования МСК снимали с культуральных флаконов с помощью раствора Версена и окрашивали растворами антител против CD105 (BioLegend, 120408; Biorbyt, orb187245), CD73 (BioLegend, 127220; Bioss, bs-4834R-A488), CD29 (BioLegend, 102205), CD44 (BioLegend, 203906), CD45 (BioLegend, 103107) и CD34 (BioLegend, 152204), содержащими 0.5% бычьего сывороточного альбумина. Анализ образцов МСК проводили на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter, США).

Дифференцировку клеток в хондрогенном, остеогенном и адипогенном направлениях про-

водили с использованием сред для дифференцировки StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit, StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit и StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit (все — Gibco, Life Technologies, США) соответственно, согласно рекомендованным протоколам. Дифференцированные клетки окрашивали растворами красителей сафранин О, ализариновый красный и Судан III соответственно.

Оценка жизнеспособности и пролиферации МСК. Для оценки жизнеспособности и пролиферации МСК высевали на шестилуночные планшеты в количестве 250000 клеток на лунку в 2 мл среды. Спустя сутки клеткам меняли среду. Затем через одни или двое суток клетки снимали с применением холодного раствора 0.05% трипсина (Gibco, США), промывали раствором фосфатно-буферного раствора (PBS), pH 7.4, и фиксировали в 66%-м этаноле на льду. Далее МСК отмывали, а затем инкубировали с пропидий-йодидом (Molecular Probes, США) в концентрации 50 мкг/мл в присутствии 50 ед./мл РНКазы А в течение 30 мин для удаления из клеток РНК. Анализ образцов МСК проводили на проточном цитометре CytoFLEX. Всего были проанализированы как минимум 10000 событий для каждой пробы. Анализ каждой пробы проводили в трех повторах.

Модификация МСК магнитными частицами. После достижения 80% плотности монослоя в клеточную культуру МСК, изолированных из красного костного мозга мышей со стабильной экспрессией GFP, добавляли коммерческие магнитные частицы Dynabeads M-280 (Invitrogen, США) диаметром 2.8 мкм, обработанные 4%-м поверхностно-активным веществом Pluronic L-123 (Sigma-Aldrich, США). Через 24 ч после инкубации с магнитными частицами мезенхимальные стволовые клетки поглощали частицы. Клетки снимали с подложки, обрабатывая культуру 0.05%-м раствором трипсина, содержащего ЭДТА (Gibco, США).

Трансплантация стволовых клеток. Для фиксации трансплантированных клеток, содержащих магнитные частицы, использовали полимерные эластичные фиксирующие магнитные имплантаты, пластины толщиной 0.35 мм круглой формы, диаметром 7 мм, с индукцией магнитного поля 5 мТл, оригинальной конструкции с лазерным зондом, разработанные совместно МНТК «Микрохирургия глаза» (Калуга) с НЭП «МГ» (Москва).

Экспериментальная группа составила пять кроликов-самцов породы Шиншила массой 2000–2500 г. После семи суток карантина животным проводили хирургическое вмешательство. После достижения медикаментозного мидриаза животные находились под общим ингаляционным масочным наркозом (Фторатан — 2.7 л/мин, кислород — 2 л/мин). Под контролем операцион-

Фенотипирование полученных образцов МСК из красного костного мозга аутбредных мышей ICR (CD 1) и SHK

| Маркер | CD105 | CD73 | CD29 | CD44 | CD45 | CD34 |
|--|-------|--------|--------|--------|-------|-------|
| Доля положительных клеток в популяции, % | 94.6% | 98.80% | 98.25% | 98.00% | 0.30% | 0.10% |

ного микроскопа ALLEGRA 90 (Moller-Wedel, Германия) комплекс из полимерного эластичного магнитного имплантата и световода заводили в субтеноново пространство и фиксировали в верхне-наружном квадранте глазного яблока.

В правый глаз субретинально вводили суспензию клеток, культивированных при 5%-м содержании кислорода; в левый глаз вводили суспензию клеток, культивированных при 21%-м содержании кислорода. Для введения 10000 клеток, находящихся в жидкой среде (0.05 мл), канюля была присоединена к субретинальному инъектору (MicroDose injection kit 1 ml, Med One, США).

Оценка жизнеспособности МСК в субретинальном пространстве. Исследования выживаемости трансплантированных клеток проводили на третьи, шестые, девятые, двенадцатые и пятнадцатые сутки.

Оптическую когерентную томографию проводили на приборе RTVue-100 (Optovue, США). Скорость захвата изображений – 26000 А-сканов/с; частота строк от 256 до 1024 А-сканов/кадр; захват скана: глубина 2 мм, длина 12 мм, длина волны сканирующего луча от 830 до 750 нм. После фиксации животного выполняли ряд сканирований и отбирали наиболее информативные снимки, позволяющие оценить состояние места введения клеток.

После выведения животных из эксперимента методом ингаляции углекислого газа в указанные сроки наблюдения глазные яблоки энуклеировали, вскрывали переднюю камеру, глаза фиксировали с помощью погружения в раствор 4%-го параформальдегида в PBS-буфере, pH 7.3 в течение 24 ч при температуре 4°C. Затем глаза пропитывали в 30%-м растворе сахарозы в PBS-буфере 24 ч при 4°C и замораживали при температуре –24°C, после чего изготавливали срезы толщиной 40 мкм с помощью криотома CM 1510S (Leica, Германия).

Срезы монтировали на предметных стеклах, высушивали при комнатной температуре и анализировали с помощью микроскопа Olympus IX81 (Olympus, Япония) в режиме флуоресценции. Микроскоп был снабжен цифровой камерой Olympus DP72 (Olympus, Япония), соединенной с компьютером.

По гистологическим препаратам срезов глазных яблок определяли наличие в области введения стволовых клеток, содержащих магнитные

частицы, идентифицируемую GFP-флуоресценцию и миграцию МСК.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Согласно принятым в научном сообществе нормам МСК должны экспрессировать на своей поверхности такие маркеры, как CD105, CD73, CD29 и CD44. В то же время МСК не должны иметь на поверхности гемопоэтических антигенов, включая, например, CD45 и CD34. Фенотипирование полученных нами МСК аутбредных мышей ICR (CD 1) и SHK показало, что более 95% МСК экспрессируют CD105, CD73, CD29 и CD44 (таблица). При этом популяция практически не содержит CD45- и CD34-позитивных клеток, что говорит высокой чистоте и однородности популяции полученных МСК. Поскольку метод выделения и культивирования МСК мышей линии C57 Black был тот же, что и линии ICR (CD 1) и SHK, мы принимаем, что эти клетки тоже относятся к МСК.

Еще одним важным признаком МСК является способность к дифференцировке в адипогенном, хондрогенном и остеогенном направлениях. В результате хондрогенной дифференцировки клетки приобретали характерную фибробласто-подобную морфологию, во внеклеточном матриксе присутствовало большое содержание глюкозаминогликанов, окрашенных сафранином O. МСК, дифференцировавшиеся по остеогенному пути, приобретали кубоидальную и полигональную форму, а окраска ализариновым красным S продемонстрировала наличие минерализованного внеклеточного матрикса. В случае индукции адипогенеза МСК приобретали округленную форму, отмечалось формирование вакуолей и внутриклеточное накопление нейтральных жиров, окрашенных Суданом III (рис. 1).

На следующем этапе мы решили оценить, как влияют условия культивирования МСК при пониженном содержании кислорода на пролиферацию и жизнеспособность клеток. Для оценки влияния гипоксии на пролиферативную активность МСК мы сравнили профили содержания ДНК в клетках, культивируемых в стандартных условиях (при 21% кислорода), и при выращивании в мультигазовом CO₂-инкубаторе в атмосфере с пониженным содержанием кислорода (5% CO₂, 5% O₂, 95% влажности). Сравнение профилей у мышечных МСК не выявило разницы в коли-

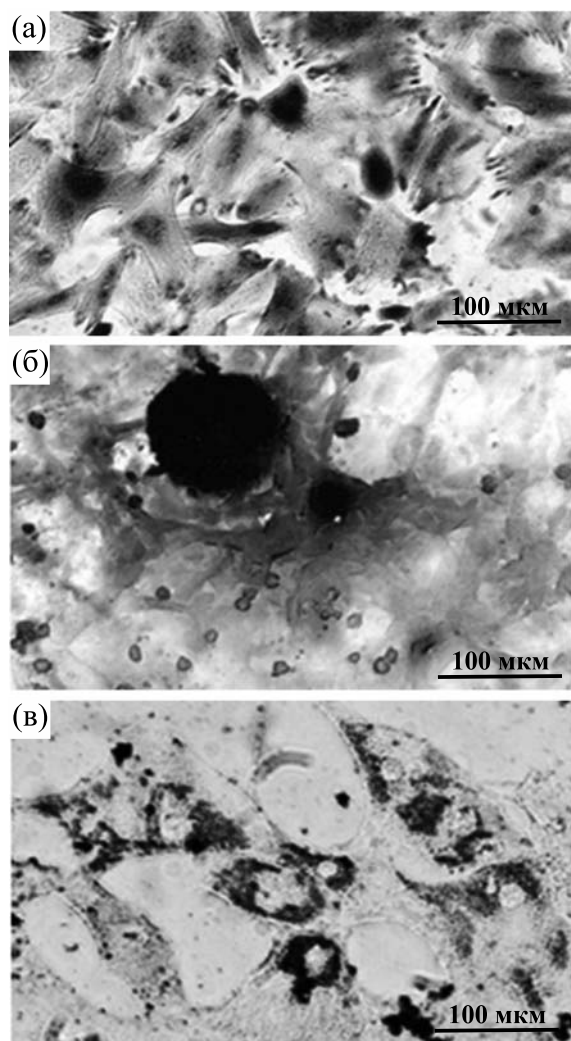


Рис. 1. Оценка способности МСК к дифференцировке: (а) – хондрогенная дифференцировка экспериментального образца МСК мыши, окраска сафранином О; (б) – остеогенная дифференцировка экспериментального образца МСК мыши, окраска ализариновым красным С; (в) – адипогенная дифференцировка экспериментального образца МСК мыши, окраска Суданом III.

честве апоптических клеток: как при содержании кислорода 5%, так и при 21% их количество было меньше 1%. В то же время мы наблюдали достоверное увеличение числа клеток, находящихся в S- и G₂/M-стадиях клеточного цикла, т.е. находящихся в процессе удвоения (рис. 2). Это говорит о том, что атмосфера с пониженным содержанием кислорода является оптимальной для роста МСК. Этот же вывод был подтвержден в результате эксперимента с колониеобразованием: при гипоксии наблюдали более ускоренный рост площади колоний МСК, чем в условиях нормоксии (рис. 3).

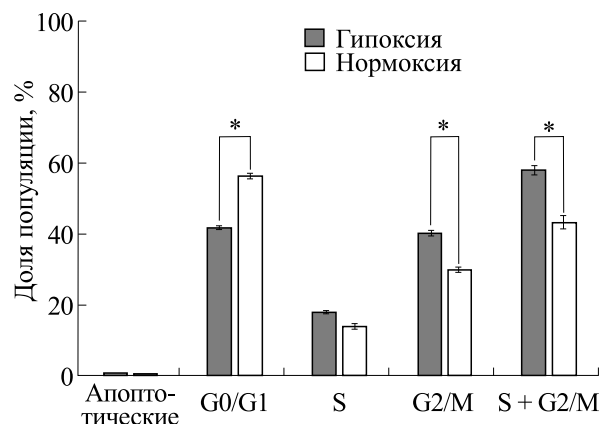


Рис. 2. Количественный анализ профилей ДНК МСК красного костного мозга. Показаны размеры субпопуляций МСК мыши при культивации в условиях нормоксии (в атмосфере с 21% кислорода) и при культивировании при пониженном содержании кислорода в атмосфере (5%). Доля пролиферирующих клеток (S + G₂/M) при переносе клеток в атмосферу с 5%-м содержанием кислорода достоверно увеличивается на несколько процентов (* – $P < 0.05$ согласно дисперсионному анализу ANOVA с последующим тестом Тьюки).

Для оценки влияния культивирования МСК в условиях гипоксии на жизнеспособность этих клеток после введения в субретинальное пространство мы использовали клетки с постоянной экспрессией GFP. Для наблюдения за трансплантированными МСК важно было удерживать клетки в месте инъекции. Чтобы достичь этого, МСК мыши были нагружены магнитными частицами, которые поглощались путем эндоцитоза и оставались локализованы в цитоплазме клеток (рис. 4).

Одной из важнейших задач для контроля выживаемости трансплантированных клеток является их визуализация *in vivo*. Оптическая когерентная томография позволяет увидеть трансплантированные субретинально клетки, нагруженные магнитными наночастицами. Этот метод визуализации является неинвазивным и применим в клинической практике. По данным когерентной томографии на третьи сутки в месте введения визуализировался локальный дефект с конгломератом клеток под сетчаткой в обоих глазах. Различия между выживаемостью трансплантированных клеток на третьи сутки в зависимости от условий культивирования не наблюдалось (рис. 5).

На пятые сутки наблюдали большее количество клеточного конгломерата под сетчаткой в глазу, в который вводили клетки, культивированные в гипоксических условиях. В другом глазу количество клеток было значительно меньшим.

На девятые сутки в глазах, где были трансплантированы МСК, культивированные в гипо-

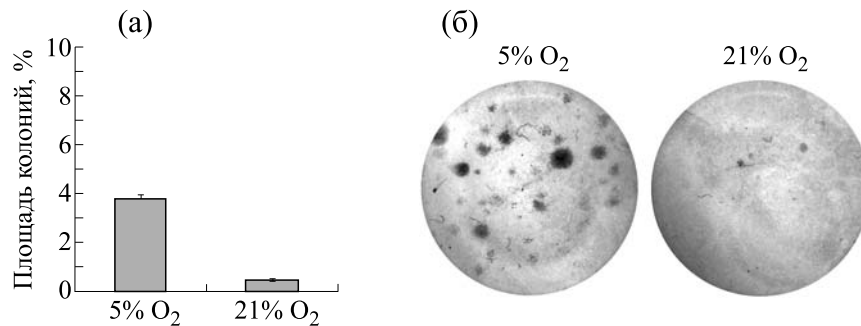


Рис. 3. Размеры колоний популяций первичных МСК мыши при культивировании в условиях нормоксии (в атмосфере с 21% кислорода) и при пониженном содержании кислорода в атмосфере (5%): (а) – площадь колоний, (б) – общий вид планшетов. Окраска метиловым фиолетовым проведена спустя две недели после высевания колоний на планшеты.

кисических условиях, некоторое количество клеток сохранялось. Там, где были трансплантированы нормоксические МСК, наблюдали локальный дефект сетчатки с зонами дистрофии пигментного эпителия вокруг них, однако МСК не визуализировались (рис. 6).

Аналогичная динамика наблюдалась по данным гистологического исследования. На третьи сутки у всех животных в левом и правом глазу МСК, содержащие GFP, располагались в месте введения. В стекловидном теле и в других структурах глаза трансплантированные клетки обнаружены не были (рис. 7). Это свидетельствует об отсутствии миграции МСК под воздействием магнитного имплантата.

На шестые сутки в левом и правом глазу клетки, содержащие GFP, располагались в месте введения под сетчаткой и сохраняли свою жизнеспособность. В стекловидном теле и других структурах глаза клетки обнаружены не были. Количество жизнеспособных (сохраняющих свою способность к зеленой флуоресценции) клеток, которые предварительно культивировались в условиях гипоксии, визуально было боль-

ше по сравнению с клетками, которые выращивали при 21% O₂.

На девятые сутки одиночные живые клетки, содержащие GFP, были обнаружены только в правом глазу (клетки культивировали при 5% O₂). В тканях левого глаза, куда вводили клетки, культивированные при 21% O₂, флуоресцентное свечение не наблюдалось (рис. 7).

На двенадцатые и пятнадцатые сутки в тканях глаза кролика ни в одной группе МСК GFP-клетки не были найдены.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В рамках проведенного исследования было установлено, что клетки, культивированные в условиях гипоксии (5% O₂), при субретинальной трансплантации живут дольше, чем клетки, культивированные в нормоксических условиях. Этот результат согласуется со множеством литературных данных.

Условия культивирования оказывают значимое влияние на время выживаемости МСК. Предшествующее трансплантации кондиционирование в условиях гипоксии, включающее культивирование в течение 15 мин при 2.5% O₂, реоксигенацию в течение 30 мин при 21% O₂ и предварительное кондиционирование в условиях гипоксии в течение 72 ч при 2.5% O₂, значительно улучшает пролиферативные и миграционные способности МСК *in vitro* [8]. При инкубации в среде с низким содержанием сыворотки МСК перейдут в состояние апоптоза, но предварительное кондиционирование при гипоксии (1% O₂) может предотвратить повреждение путем увеличения секреции ангиогенных факторов, VEGF и bFGF (основного фактора роста фибробластов) [9]. Более того, 1% O₂ также увеличивает метаболическую активность и снижает активность каспазы-3/7 и высвобождение лактатдегидрогеназы

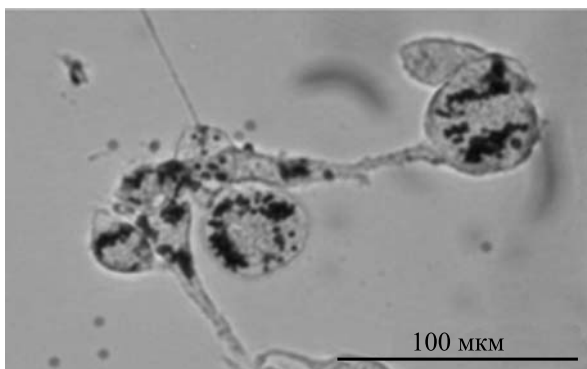


Рис. 4. Мезенхимальные стволовые клетки мыши, содержащие магнитные частицы в цитоплазме.

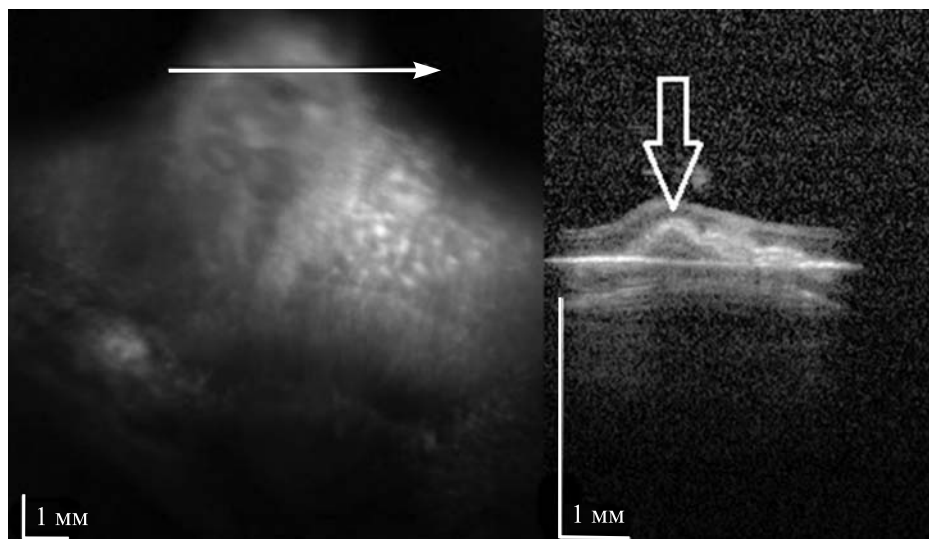


Рис. 5. Оптическая когерентная томография на третьи сутки после трансплантации клеток, культивированных при 5% O_2 . Визуализируется конгломерат из суспензии клеток под сетчаткой (отмечен стрелкой).

МСК, тем самым снижая чувствительность МСК к ишемическому микроокружению без изменения их биологического поведения, иммунофенотипа или кариотипа [10]. Было продемонстриро-

вано уменьшение онкогенного потенциала МСК, индуцированное 2% O_2 , что обусловлено увеличением экспрессии генов-супрессоров опухолей, а также индукцией субоптимальных разрывов

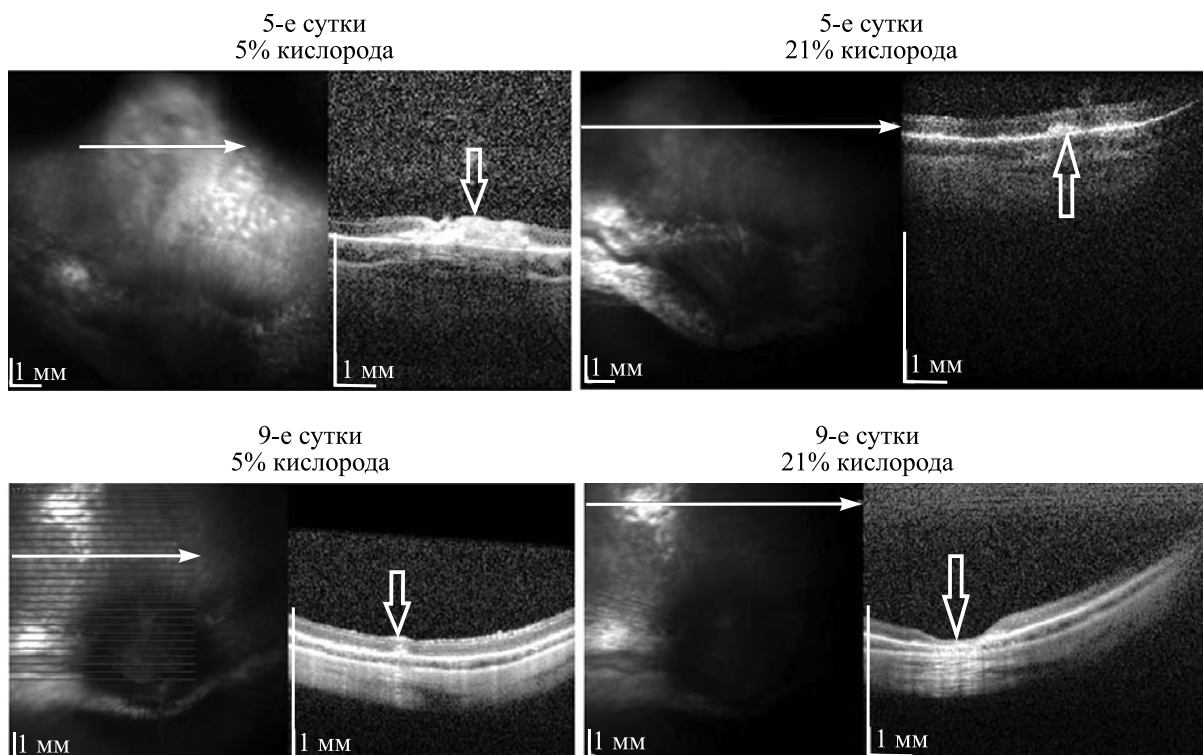


Рис. 6. Оптическая когерентная томография на пятые и девятые сутки после трансплантации клеток. Место введения клеток отмечено стрелкой. На пятые сутки в обоих глазах визуализируется трансплантированная суспензия клеток. На девятые сутки в глазу, куда были трансплантированы МСК, культивированные при 5% O_2 , клетки сохраняются, в другом глазу – клетки полностью отсутствуют.

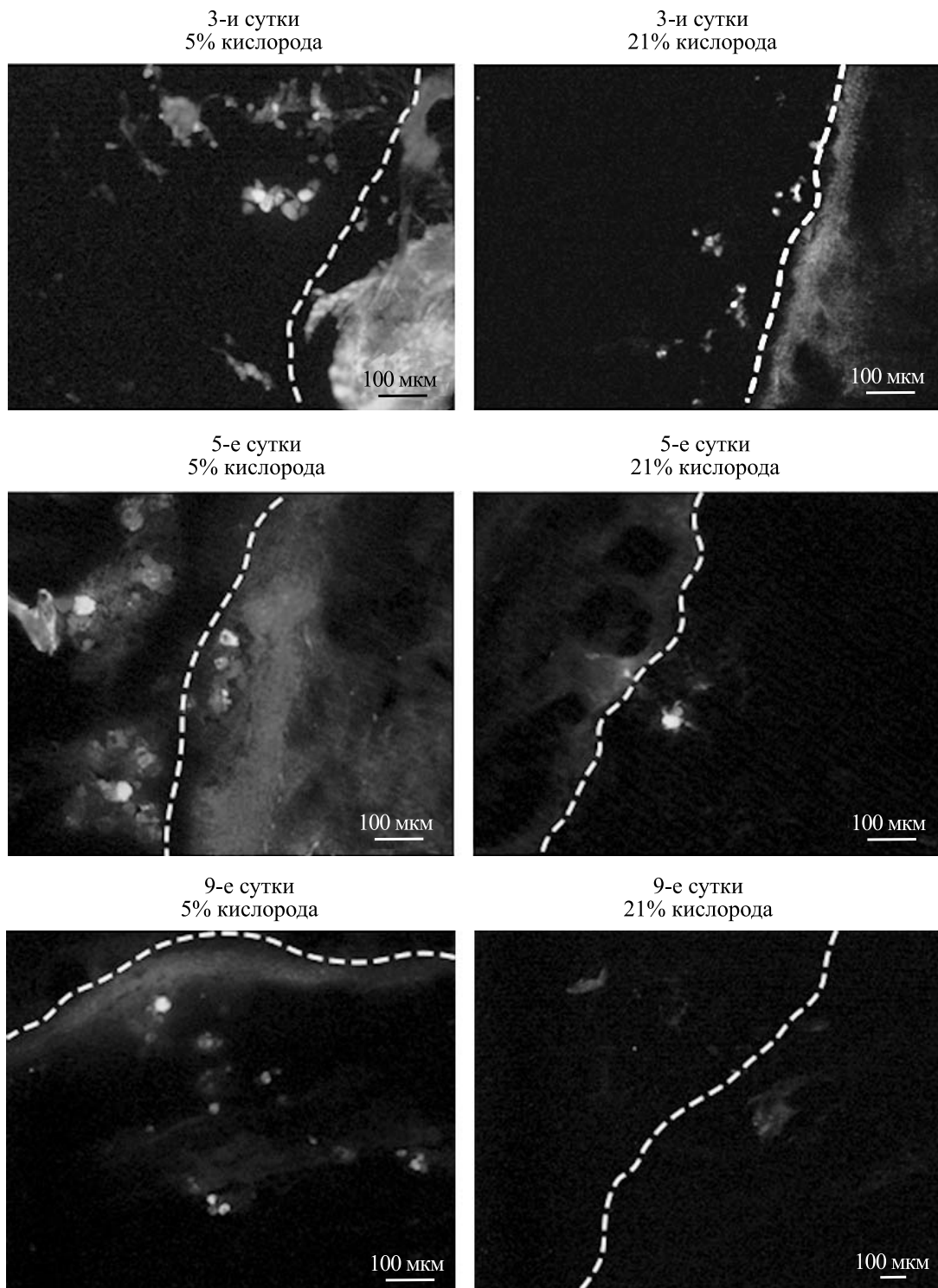


Рис. 7. Флуоресцентная микроскопия гистологических срезов сетчатки. Граница сетчатки отмечена пунктирной линией.

двухцепочечной ДНК в МСК *in vitro* [11]. Гипоксическое состояние при 3% O_2 снижает частоту анеуплоидии в МСК по сравнению с нормоксическим состоянием при 21% O_2 . Можно сделать

вывод, что предварительная инкубация в условиях гипоксии улучшает генетическую стабильность и стабильность хромосом [12]. Культивирование при 5% O_2 последовательно повышает кло-

ногенный потенциал и скорость пролиферации МСК за счет усиления секреции VEGF [13].

Хотя в большинстве исследований было доказано, что гипоксия является защитным фактором для МСК *in vitro* и *in vivo*, оптимальная концентрация кислорода для повышения выживаемости и терапевтических эффектов МСК остается не выявленной.

В ходе исследования впервые была оценена выживаемость МСК, культивированных в гипоксических и нормоксических условиях при трансплантации клеток в субретинальное пространство. Применены методы визуализации трансплантированных МСК *in vivo*, которые подтверждались данными гистологического исследования. Возможность точной визуализации и оценки состояния стволовых клеток *in vivo* позволит в дальнейшем осуществлять контроль лечения при клиническом применении клеточных препаратов. Оптическая когерентная томография может являться методом выбора для контроля распределения трансплантированных МСК *in vivo* при субретинальном введении.

Применение гибкого магнитного импланта оригинальной конструкции эффективно препятствовало миграции МСК, нагруженных магнитными наночастицами: в результате клетки на протяжении всего срока своей жизни находились в месте введения. Удержание клеток в зоне трансплантации важно для возможности репарации повреждений и лечения нейродегенеративных заболеваний сетчатки. Однако установка гибкого магнитного импланта – инвазивная процедура, поэтому необходим дальнейший поиск простых и безопасных решений, которые позволят контролировать миграцию трансплантированных МСК.

МСК сохраняют высокую способность к дифференцировке. Так, МСК, полученные из пуповинной крови, могут трансформироваться в разные нервные клетки, включая дофаминергические нейроны [14], холинергические нейроны [15], клетки Шванна [16] и олигодендроциты [17]. В доклиническом исследовании инсульта МСК, полученные из пуповинной крови и имплантированные в мозг крыс, дифференцировались в эндотелиальные клетки и нейроны [18]. Следовательно, МСК могут потенциально способствовать восстановлению нервной системы, дифференцируясь в специализированные клетки и позволяя заменить поврежденные болезнью нейроны или олигодендроциты, что может быть ключом к лечению дегенеративных заболеваний зрительного нерва.

Исследования показали, что МСК, полученные из красного костного мозга крысы, могут дифференцироваться в фоторецепторы [19] и пигментные эпителиальные клетки сетчатки [20]. Данный факт позволяет предположить, что эти

клеточные продукты применимы для лечения дегенеративных заболеваний сетчатки.

МСК также могут продуцировать и секретировать белки, которые стимулируют регенерацию тканей. МСК продуцируют ангиогенные факторы (такие как хемокиновые лиганды CXCL2 и CXCL5, глиа-активирующий фактор FGF9). Также они могут секретировать нейротрофические факторы, включая нейротрофический фактор нейротрофин-3, мидкин и глиальные клетки [21]. Благодаря этим свойствам МСК могут сыграть значительную роль в лечении многих офтальмологических заболеваний.

ВЫВОДЫ

МСК обладают значительным потенциалом в терапии глазных болезней. Одним из важных факторов, влияющих на успех лечения, является время выживания МСК.

Полимерный эластичный магнитный имплантат с оптоволоконным зондом позволяет осуществить интраоперационную диафаноскопию и локализовать место фиксации имплантата. В дальнейшем магнитный имплантат эффективно препятствует миграции МСК, что значительно упрощает оценку жизнеспособности трансплантированных клеток.

МСК, культивированные в гипоксических условиях при 5% O₂, продемонстрировали большую жизнеспособность (девять суток) при трансплантации в субретинальное пространство по сравнению с МСК, выращенными в условиях нормальной оксигенации (шесть суток).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке гранта в форме субсидии по соглашению от 28.10.2018 г. №14.575.21.0179 (уникальный идентификатор проекта RFMEFI57518X0179), заключенному между Министерством науки и высшего образования Российской Федерации и Московским физико-техническим институтом.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены. Животных содержали в соответствии с Директивой 2010/63/EU по защите животных, используемых в научных целях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. E. J. Duh, J. K. Sun, and A. W. Stitt, *JCI insight* **2** (14), e93751 (2017).
2. B. Yu, X. Zhang, and X. Li, *Int. J. Mol. Sci.* **15** (3), 4142 (2014).
3. H. J. Kim and J. S. Park, *Development & Reproduction* **21** (1), 1 (2017).
4. B. Mathew, J. N. Poston, J. C. Dreixler, et al., *Ophthalmologie* **255** (8), 1581 (2017).
5. D. Sacks, B. Baxter, C. V. Campbell, et al., *Int. J. Stroke* **13** (6), 612 (2018).
6. X. Hu, S. P. Yu, and J. L. Fraser, *J. Thoracic Cardiovasc. Surg.* **135** (4), 799 (2008).
7. X. Liu and N. Quan, *Bio Protoc.* **5** (20), e1631 (2015).
8. M. Kheirandish, S. P. Gavvani, and S. Samiee, *Transfus. Apher. Sci.* **56**, 392 (2017).
9. L. Liu, J. Gao, Y. Yuan, et al., *Cell Biol. Int.* **37**, 551 (2013).
10. A. M. Bader, K. Klose, K. Bieback, et al., *PLoS One* **10**, e0138477 (2015).
11. J. R. Choi, B. Pingguan-Murphy, W. A. Wan Abas, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **448**, 218 (2014).
12. J. Liu, H. Hao, H. Huang, et al., *Int. J. Low Extrem. Wounds* **14**, 63 (2015).
13. L. B. Boyette, O. A. Creasey, L. Guzik, et al., *Stem Cells Transl. Med.* **3**, 241 (2014).
14. I. Datta, S. Mishra, L. Mohanty, et al., *Cytotherapy* **13** (8), 918 (2011).
15. J. Liang, S. Wu, H. Zhao, et al., *Neurosci. Lett.* **532**, 59 (2013).
16. J. Peng, Y. Wang, L. Zhang, et al., *Brain Res. Bull.* **84** (3), 235 (2011).
17. E. Mikaeili Agah, K. Parivar, M. Nabiuni, et al., *J. Mol. Neurosci.* **51** (2), 328 (2013).
18. W. Liao, J. Xie, J. Zhong, et al., *Transplantation* **87** (3), 350 (2009).
19. A. Kicic, W. Y. Shen, A. S. Wilson, et al., *J. Neurosci.* **23** (21), 7742 (2003).
20. C. Huang, J. Zhang, M. Ao, et al., *J. Cell. Biochem.* **113** (2), 590–598 (2012).
21. J. Y. Hsieh, H. W. Wang, S. J. Chang, et al., *PLoS One* **8** (8), e72604 (2013).

Influence of Cultivation Conditions on Viability of Mesenchymal Stem Cells after Injection into Subretinal Space

M.A. Plakhotniy*, **A.M. Kodunov***, **E.V. Gorina****, **V.V. Boyarintsev****, **A.V. Trofimenko****, **S.A. Biryukov****, and **G.I. Filkov****

**Kaluga Branch of the National Medical Research Center “Inter-Branch Research and Technical Complex “Eye Microsurgery” named after academician S.N. Fedorov, Ministry of Health of the Russian Federation, ul. Svyatoslava Fedorova 5, Kaluga, 248007 Russia*

***Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Institutskiy per. 9, Dolgoprudny, Moscow Region, 141701 Russia*

The use of mesenchymal stem cells is an effective treatment strategy for a number of retinal degenerative diseases. Limited survival of these cells following transplantation remains a significant barrier in achieving a therapeutic effect. It has been shown earlier that hypoxia-grown mesenchymal stem cells display enhanced proliferative activity. We hypothesized that such cultivation condition could be beneficial for successful injection of these cells into the subretinal region. For this purpose, we isolated mesenchymal stem cells from mouse red bone marrow, described phenotypic characterization and the ability of these cells to chondrogenic, osteogenic and adipogenic differentiation, and proliferative activity in hypoxic (5% of oxygen in the atmosphere) and normoxic (21% of oxygen in the atmosphere) conditions. In the same manner, we isolated mesenchymal stem cells from red bone marrow obtained from GFP-expressing C57 black mice. After preliminary cultivation under normoxia (control cells) or hypoxia (experimental cells), the cells were loaded with magnetic particles and injected into the subretinal region of rabbit eyes. The cells were retained in the injection site tissue using magnet implant to prevent migration. The survival of transplanted mesenchymal stem cells was evaluated by fluorescence microscopy and optical coherence tomography on day 3, day 5, day 9, day 12, and day 15. We found that mesenchymal stem cells cultured under hypoxic condition demonstrated greater viability (9 days) in the subretinal space than those cultured in normoxia (6 days). Thus, the use of low oxygen conditions for cultivation of mesenchymal stem cells can improve cell viability after injection into the subretinal space that might be used for retinal degenerative disease therapy.

Keywords: mesenchymal stem cells, cultivation conditions, survival, subretinal transplantation, retinal diseases, hypoxia