

МАГНИТОФОРЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФЕТАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА, МАРКИРОВАННЫХ СУПЕРПАРАМАГНИТНЫМИ НАНОЧАСТИЦАМИ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА, СТАБИЛИЗИРОВАННЫМИ ЦИТРАТОМ

В.В. Турчин¹, Ю.А. Лёгенький², М.В. Солопов², А.Г. Попандопуло¹,
С.В. Беспалова², Э.Я. Фисталь¹

¹ Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака, Донецк

² Донецкий национальный университет, Донецк

Magnetophoretic properties of human fetal fibroblasts magnetically labeled with citrate stabilized superparamagnetic iron oxide nanoparticles

V.V. Turchyn¹, Yu.A. Legenkiy², M.V. Solopov², A.G. Popandopulo¹, S.V. Bespalova², E.Ya. Fistal¹.

¹ V.K. Gusak Institute of Urgent and Recovery Surgery, Donetsk

² Donetsk National University, Donetsk

Клеточная трансплантология является актуальным и активно развивающимся направлением регенеративной медицины, но эффективность её часто остаётся относительно низкой при ряде показаний для применения. С помощью магнитных наночастиц и магнитных полей можно повысить эффективность трансплантации клеток. Суперпарамагнитные наночастицы оксида железа (SPION) являются наиболее перспективными для магнитоуправляемой доставки клеток *in vivo*.

Цель настоящего исследования — оптимизация методики магнитной маркировки клеток с помощью SPION, стабилизированных цитратом (SPION-Cit), относящихся к анионным магнитным наночастицам. Объектом магнитного маркирования были выбраны фетальные фибробласты человека (ФФЧ) в качестве модели здоровых клеток человека. Дозы наночастиц составляли 100, 200, 300 и 500 мкг Fe/мл; время инкубации 1, 2 и 3 ч. Эффективность магнитной маркировки клеток оценивали с помощью магнитофореза в специальной камере с использованием дискового NdFeB магнита диаметром 6 мм и толщиной 3 мм, с индукцией 0,255 Тл: определяли скорость движения магнитомаркированных клеток в градиентном магнитном поле и рассчитывали их магнитную восприимчивость. Жизнеспособность магнитомаркированных фибробластов оценивали методом окрашивания трипановым синим и с помощью МТТ-теста.

Величина магнитной восприимчивости магнитомаркированных ФФЧ зависела от дозы наночастиц и времени инкубации. Дальность захвата магнитомаркированных клеток магнитом была в пределах 3–4 мм. Магнитофоретическое движение контрольных ФФЧ отсутствовало. Магнитомаркированные ФФЧ в пределах концентраций наночастиц 100–300 мкг Fe/мл и времени инкубации 1–3 ч. сохраняли жизнеспособность. При концентрации 500 мкг Fe/мл наблюдали частичную гибель клеток и отслоение клеточного пласта от поверхности культурального флакона (начальные признаки отслоения наблюдали при режиме мечения 300 мкг Fe/мл, 3 ч.).

По результатам исследования были определены оптимальные параметры магнитного маркирования ФФЧ SPION-Cit — концентрация наночастиц 100 мкг Fe/мл, время инкубации 3 ч., обеспечивающие дальность захвата клеток магнитом на расстоянии 4 мм.

Ключевые слова: суперпарамагнитные наночастицы оксида железа, фетальные фибробласты человека, магнитофорез.

Введение

Клеточная трансплантология является перспективным и активно развивающимся направлением регенеративной медицины. Несмотря на существенный прогресс в области клеточной трансплантологии, контроль и управление процессом клеточной транс-

e-mail: turchin.dn@mail.ru

Cell transplantology is a perspective and actively developing field of regenerative medicine, but its effectiveness often remains relatively low for some indications. Appliance of magnetic nanoparticles and magnetic fields can increase efficacy of cell transplantation. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) is a most prospective type of magnetic nanoparticles for magnetically controlled targeting of cells *in vivo*.

In the investigation human fetal fibroblasts were labeled with citrate stabilized SPION (SPION-Cit) that refer to anionic magnetic nanoparticles. 100, 200, 300 and 500 μg Fe/ml doses of magnetic nanoparticles and incubation times of 1, 2 and 3 h were used. The effectiveness of magnetic labeling of cells was evaluated by magnetophoresis in a special chamber using disk NdFeB magnet with diameter of 6 mm and thickness of 3 mm and field induction of 0,255 T: magnetophoretic velocity of magnetized cells in magnetic field gradient was assessed and their magnetic susceptibility was calculated. Viability of magnetically labeled cells was evaluated by trypan blue staining and MTT-test.

The value of magnetic susceptibility of magnetically labeled fetal fibroblasts was dose and incubation time depended. A capture distance of labeled cell with the magnet was in a range of 3–4 mm. Magnetophoretic movement of control fibroblasts was not observed. Viability of labeled cells was not decreased substantially in ranges of nanoparticles concentrations 100–300 μg Fe/ml and incubation times 1–3 h. In the concentration of 500 μg Fe/ml partial cell death and exfoliation of cell layer from culture flask observed (signs of low grade exfoliation also observed in the labeling conditions of 300 μg Fe/ml for 3 h).

According to our data, most optimal conditions for magnetic labeling of human fetal fibroblast with SPION-Cit is particles concentration 100 μg Fe/ml for 3 h, which provides the capture distance of labeled cells with the magnet about 4 mm.

Keywords: superparamagnetic iron oxide nanoparticles, human fetal fibroblasts, magnetophoresis.

плантации *in vivo* часто трудноосуществимы или невозможны, в результате чего эффективность трансплантации может быть относительно низкой [1]. Чаще всего это связано с низкой селективностью доставки и удержания клеток в том месте, где они должны выполнять свои терапевтические функции,

и может зависеть от типа ткани, в которую трансплантируют клетки (сердце, крупные сосуды и др.), ее физиологического или патофизиологического состояния (ишемия, воспаление и др.), типа и состояния трансплантируемых клеток. С помощью использования магнитных наночастиц и магнитных полей можно повысить управляемость процессами клеточной трансплантации *in vivo*, и, таким образом, увеличить её эффективность [2, 3].

На сегодняшний день магнитные наночастицы используются в ряде исследовательских и практических медико-биологических направлений, таких как магнитная сортировка клеток [4], исследования клеточной механики [5], доставка генетического материала в клетки (магнитофекция) [6], доставка лекарственных препаратов [7], МРТ диагностика (в качестве контрастных агентов) [8], гипертермическая терапия [7, 9], тканевая инженерия [10], а также магнитоуправляемая доставка и (или) отслеживание (трекинг) различных типов клеток *in vivo* [2, 3, 11]. Имея возможность отследить местоположение клеток *in vivo*, можно определять наиболее оптимальные дозы и пути доставки клеток в те или иные ткани, оценивать эффективность приживления трансплантированных клеток и их посттрансплантационную миграцию (биораспределение) [12]. Применяемые в биомедицине магнитные наночастицы чаще всего представляют собой магнитоактивное ядро, окружённое оболочкой из различных синтетических или природных полимеров (полисахаридов, полипептидов, полиэтиленгликоля и др.) или других стабилизирующих молекул (цитрата, оксида кремния и др.) [13–15]. Оболочка таких наночастиц выполняет ряд важных функций: предотвращает слипание ядер наночастиц, повышает их гидрофильность, защищает магнитное ядро от окисления и эрозии, обеспечивает проникновение наночастиц внутрь клеток [13, 14]. Эффективность поглощения наночастиц клетками зависит как от типа клеток, так и от физико-химических параметров наночастиц, таких как размер, форма, поверхностный заряд и структура оболочки [13, 16]. Магнитные наночастицы могут быть классифицированы как парамагнетики и суперпарамагнетики, в зависимости от свойств их магнитного ядра, и могут содержать марганец, никель, кобальт, гадолиний или, чаще всего, оксид железа [17, 18].

Наиболее перспективными магнитными наночастицами для доставки, удержания и трекинга клеток *in vivo* являются суперпарамагнитные наночастицы оксида железа (superparamagnetic iron oxide nanoparticles, SPION) отличающиеся формой, размерами и имеющие разные варианты оболочек. SPION обладают следующими ключевыми характеристиками: способностью к существенному намагничиванию без гистерезиса под действием приложенного магнитного поля (суперпарамагнетизм); способностью формировать стабильную коллоидную суспензию в водных растворах; биосовместимостью, биодegradацией (наночастицы метаболизируются клетками, в результате чего железо попадает в нормальный пул железа плазмы крови и может быть использовано для синтеза гемоглобина в эритроцитах или других метаболических процессов [19]); возможностью индуцировать быструю T2/T2* релаксацию при МРТ, что позволяет осуществлять МРТ-трекинг клеток *in vivo* [13, 14]. Кроме того, в процессе синтеза можно легко контролировать их физико-химические параметры.

SPION, стабилизированные цитратом (SPION-Cit), относят к анионным магнитным наночастицам (АМНЧ), несущим отрицательный заряд на своей поверхности, обеспечивающий электростатическую адсорбцию на поверхности клеток и, таким образом, облегчающий их захват клетками. АМНЧ позволяют осуществлять быстрое, эффективное и неспецифическое магнитное маркирование различных типов клеток, включая лимфоциты, макрофаги, опухолевые клетки, фибробласты, эндотелиальные, прогениторные клетки и другие типы клеток [15]. Синтезированные нами SPION-Cit не дороги, относительно просты в производстве, формируют стабильный коллоид в буферных растворах и ростовой среде при физиологических pH, стерилизуются фильтрованием.

Цель исследования – оптимизация методики магнитной маркировки клеток с помощью SPION-Cit. Объектом магнитного маркирования были выбраны фетальные фибробласты человека (ФФЧ) в качестве модели здоровых клеток человека. Исходя из цели работы, были поставлены следующие задачи: 1) определить оптимальные параметры магнитного маркирования ФФЧ с помощью синтезированных нами SPION-Cit; 2) оценить эффективность магнитного маркирования ФФЧ методом магнитофореза в специальной магнитофоретической камере (определение скорости и магнитной восприимчивости магнитомаркированных ФФЧ); 3) оценить жизнеспособность магнитомаркированных ФФЧ.

Материал и методы

Синтез и стабилизация SPION-Cit

Для синтеза и стабилизации наночастиц суперпарамагнитного оксида железа была взята за основу методика, описанная ранее в статьях S. Nigam с соавт. (2011) и L. Li с соавт. (2013) [20, 21]. В нашей работе были использованы следующие реагенты: железо (II) сульфат ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), железо (III) хлорид ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 25% водный раствор аммиака ($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$), лимонная кислота ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Синбиас, Украина). Синтез магнитных наночастиц Fe_3O_4 осуществляли путём соосаждения солей железа в щелочной среде. Навески солей $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,9 г) и $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (3,6 г) растворяли в 80 мл деионизированной воды, медленно нагревали до 70°C и в полученный раствор вливали 20 мл аммиака при постоянном перемешивании на магнитной мешалке. Затем в раствор добавляли лимонную кислоту (5 г/10 мл), доводили температуру до 90°C и перемешивали феррожидкость в течение 1 ч. при фиксированной температуре. В результате были получены суперпарамагнитные частицы Fe_3O_4 , стабилизированные цитратом. Крупные частицы отделяли центрифугированием в течение 10 мин. при $F_r = 2570 \times g$ (фактор разделения). Размер наночастиц определяли с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEOL JEM 200 (Япония). Средний размер частиц составил около 15 нм (рис. 1). Концентрацию железа в синтезированном коллоиде устанавливали спектрофотометрически относительно раствора железа с известной концентрацией (препарат Феррум Лек, Sandoz, Швейцария): определяли количество пигмента берлинской лазури, образующейся в результате взаимодействия Fe (III) с гексацианоферратом калия в присутствии HCl, при длине волны

700 нм [22]. Коллоид SPION-Cit стерилизовали фильтрованием через шприцевый фильтр с размером пор 0,2 мкм (Millipore, США).

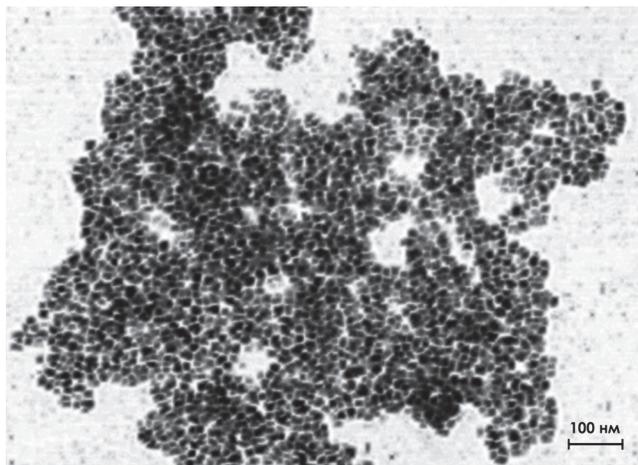


Рис. 1. Суперпарамагнитные наночастицы оксида железа, стабилизированные цитратом (SPION-Cit). Трансмиссионная электронная микроскопия

Культура фетальных фибробластов человека

ФФЧ были выделены из эмбриона человека 11 нед. гестации, полученного от здоровой матери после операции по прерыванию беременности. Материал забирали в условиях операционной отделения гинекологии ИНВХ, предварительно получив информированное согласие матери. Эмбрион был помещён в стерильную транспортировочную среду — среду Игла с пенициллином и стрептомицином (Биолот, Россия) и в течение 10 мин. доставлен в лабораторию клеточного и тканевого культивирования ИНВХ. Все дальнейшие процедуры с материалом проводили в стерильных условиях чистой (боксовой) зоны лаборатории.

Эмбрион дважды промывали в 10 мл фосфатного буферного раствора (DPBS, Биолот, Россия). Отделенные мягкие ткани механически гомогенизировали при помощи скальпеля и хирургических ножниц. Гомогенат подвергали серийной трипсинизации 0,25% раствором трипсина (Биолот, Россия). Образующуюся клеточную суспензию периодически отбирали, нейтрализовали трипсин фетальной телячьей сывороткой (ФТС, Биолот, Россия) и центрифугировали. Осаждённые клетки подсчитывали в камере Горяева и высаживали в 75 см²-культуральные флаконы (Greiner, Германия) в ростовую среду Игла с двойным набором аминокислот (Биолот, Россия), содержащую 10% ФТС, и культивировали в CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония) при 37°C, 5% CO₂ и 95% влажности. Через 1 сут. культуральную среду заменяли на свежую. В дальнейшем среду меняли каждые 3–4 сут. Клетки пассировали при достижении ~80% субконфлюэнтного монослоя. Ко второму пассажу культура становилась однородной. В исследовании использовали культуру ФФЧ 4 пассажа.

Магнитная маркировка клеток

Магнитную маркировку ФФЧ проводили в 75 см² культуральных флаконах при достижении ~95% плотности монослоя клеток (~3×10⁶ клеток), добавляя коллоид магнитных наночастиц SPION-Cit в куль-

туральную среду до конечной концентрации 100, 200, 300 и 500 мкг Fe/мл. Время инкубации 1, 2 и 3 ч.

Оценка жизнеспособности клеток

Жизнеспособность клеток, меченных наночастицами, оценивали двумя методами: окраской красителем трипановым синим (Sigma-Aldrich, США) и с помощью МТТ-теста. Контролем служили немеченные клетки.

Для оценки жизнеспособности методом окраски трипановым синим, суспензию клеток смешивали с раствором красителя трипанового синего (1:1) и подсчитывали долю погибших клеток (минимальное количество клеток для подсчета — 100), цитоплазма которых окрашивалась синим цветом, в камере Горяева.

МТТ-тест: субстрат МТТ (3-(4, 5-диметил-2-тиазолил)-2, 5-дифенил-2Н-тетразолия бромид) (Sigma-Aldrich, США) восстанавливается в митохондриях живых клеток под действием сукцинатдегидрогеназы до водонерастворимого формазана, который может быть элюирован из клеток с помощью органических растворителей. Жизнеспособность клеток оценивали сразу после маркировки и через 1 и 2 сут. ФФЧ высевали в 48-луночные культуральные планшеты (Costar, США) в количестве 50×10³ клеток в лунку. Через 1 сут. клетки метили магнитными наночастицами (100, 200 и 300 мкг Fe/мл) в течение 3 ч. После насыщения клеток наночастицами, культуральную среду удаляли, клетки дважды промывали 0,5 мл раствора DPBS, добавляли рабочий раствор МТТ (0,5 мг/мл субстрата в ростовой среде) и инкубировали в течение 3 ч. при стандартных культуральных условиях. Затем удаляли рабочий раствор МТТ, образовавшийся кристаллический пигмент растворяли 2-пропанолом (Merk, Германия) и определяли его количество с помощью планшетного спектрофотометра Synergy HT (BioTek, США) при длине волны 570 нм.

Магнитофорез магнитомаркированных клеток

Магнитофорез клеток выполняли в специальной магнитофоретической камере (рис. 2): источник магнитного поля — NdFeB дисковый магнит диаметром 6 мм и толщиной 3 мм, с индукцией 0,255 Тл. Для видео регистрации движения клеток использовали фото/видео камеру SC30, входящую в комплект микроскопа Olympus CKX-41, и программу CellSens (Olympus, Япония).

Магнитомаркированные и контрольные ФФЧ открепляли от поверхности культурального флакона трипсинизацией, дважды промывали 10 мл раствора DPBS, разводили в 6 мл этого же буфера (~5×10⁵ кл/мл) и сразу проводили магнитофорез ФФЧ: 20 мкл клеточной суспензии (~1×10⁴ кл) вносили в магнитофоретическую камеру, подводили магнит и в течение 1–2 мин. регистрировали движение клеток по направлению к магниту.

Скорость движения модифицированных клеток в магнитном поле определяли с помощью трекинга (отслеживания положения объекта при движении), обрабатывая видеofайлы в программе Adobe After Effects CC 2014. Возможности этой программы позволяют проводить ручное и автоматическое отслеживание движения заданного объекта и сохранять данные о его положении в определенные моменты времени в формате таблицы Excel.

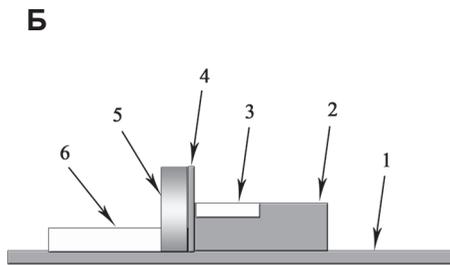
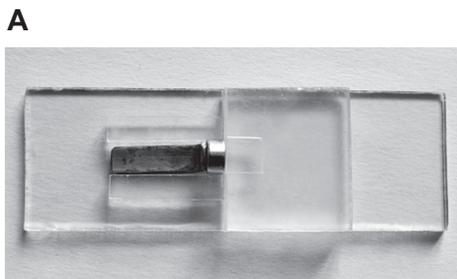


Рис. 2. Магнитофоретическая камера:

А – общий вид; Б – схема:

1 – основание (предметное стекло);

2 – опорная платформа;

3 – ячейка для образца клеток;

4 – тонкая пластиковая мембрана;

5 – дисковый NdFeB магнит;

6 – направляющие, по которым перемещается магнит

Числовые массивы, содержавшие данные о траекториях движения отдельных клеток, обрабатывали с помощью пакета прикладных программ Matlab 2013b, используя специальный скрипт, который производил вычисление скорости движения клетки путём линейной аппроксимации массива, содержащего данные о координатах её положения (зависимая переменная), и массива значений времени, по которым вычислялось положение объекта (независимая переменная) (рис. 3).

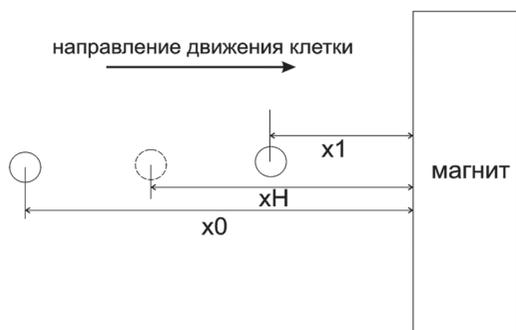


Рис. 3. Схема определения координат движения клеток в магнитофоретической камере:

x_0 – расстояние от края магнита в начальный момент времени;

x_1 – расстояние от края магнита в конце трекинга;

x_H – расстояние от края магнита, на котором вычислялось значение напряжённости магнитного поля

Магнитную восприимчивость рассчитывали по формуле:

$$\chi_{\text{кл}} = \frac{6\pi\eta r v}{\mu_0 \nabla H \nabla H} - \chi_{\text{буф}},$$

где $\chi_{\text{кл}}$ – магнитная восприимчивость клетки; $\chi_{\text{буф}}$ – магнитная восприимчивость буферной среды; η – динамическая вязкость жидкости, в которой происходит движение частицы; r – средний радиус клетки; v – скорость клетки; μ_0 – магнитная проницаемость среды; V – объем клетки; H – напряженность магнитного поля; ∇H – градиент напряженности магнитного поля.

Величины H и ∇H получали при моделировании распределения напряженности магнитного поля, которое было выполнено с помощью программы FEMM 4.2.

Результаты

Оценка магнитной восприимчивости магнитомаркированных ФФЧ

Показатели магнитной восприимчивости ФФЧ, маркированных магнитными наночастицами SPION-Cit, представлены на гистограмме (рис. 4).

Как видно из полученных результатов, магнитная восприимчивость маркированных ФФЧ возрастала в зависимости от концентрации магнитных наночастиц SPION-Cit и времени их инкубации с клетками. В исследуемом диапазоне параметров магнитного маркирования, время инкубации имело ключевое значение, так как магнитная восприимчивость клеток при каждой данной концентрации магнитных наночастиц значительно и достоверно увеличивалась в зависимости от времени инкубации. Зависимость магнитной восприимчивости клеток от концентрации магнитных наночастиц при каждом данном времени инкубации была менее существенна: при времени инкубации 1 ч., значения χ при концентрациях 100 и 200 мкг Fe/мл достоверно не отличались, а при 300 и 500 мкг Fe/мл – были достоверно выше, чем при предыдущих концентрациях; при времени инкубации 2 ч. было зафиксировано плавное повышение значения χ в зависимости от концентрации частиц, однако между концентрациями 200 и 300 мкг Fe/мл достоверных отличий не было; при времени инкубации 3 ч. достоверных отличий в значениях χ не было обнаружено, но наблюдалась тенденция к плавному повышению магнитной восприимчивости клеток в зависимости от концентрации магнитных наночастиц (для концентрации 500 мкг Fe/мл χ , при 3 ч. инкубации не определяли из-за большого процента погибших клеток). У контрольных, немеченых, клеток магнитофоретическое движение отсутствовало.

Дальность захвата магнитомаркированных ФФЧ использованным магнитом была в пределах 3–4 мм и более (для отдельных клеток) и зависела от величины магнитной восприимчивости клеток.

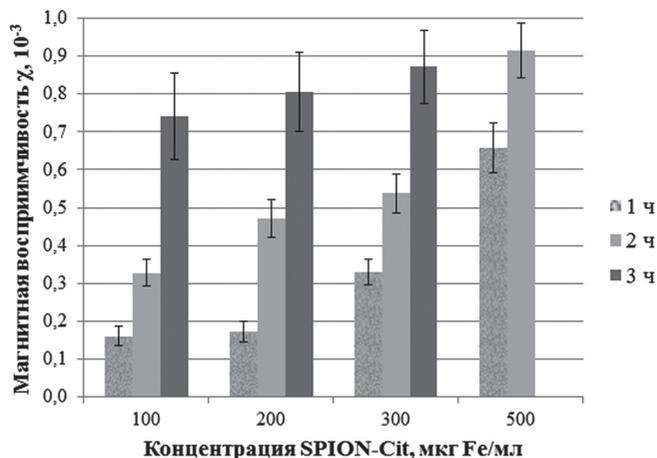


Рис. 4. Зависимость магнитной восприимчивости χ магнитомаркированных ФФЧ от концентрации SPION-Cit и времени инкубации

Оценка жизнеспособности магнитомаркированных ФФЧ

Оценка жизнеспособности клеток по окраске трипановым синим показала незначительное увеличение количества погибших клеток в зависимости от концентрации частиц SPION-Cit (за исключением концентрации 500 мкг Fe/мл) и времени инкубации (рис. 5). При концентрации 300 мкг Fe/мл и времени инкубации 3 ч. наблюдали начальные признаки процесса открепления клеток. При концентрации частиц 500 мкг Fe/мл наблюдали частичное открепление ФФЧ от поверхности культурального флакона, степень которого коррелировала со временем инкубации.

По результатам предыдущего этапа исследования нами были определены оптимальные, с нашей точки зрения, параметры магнитного мечения ФФЧ частицами SPION-Cit: концентрация до 300 мкг Fe/мл и

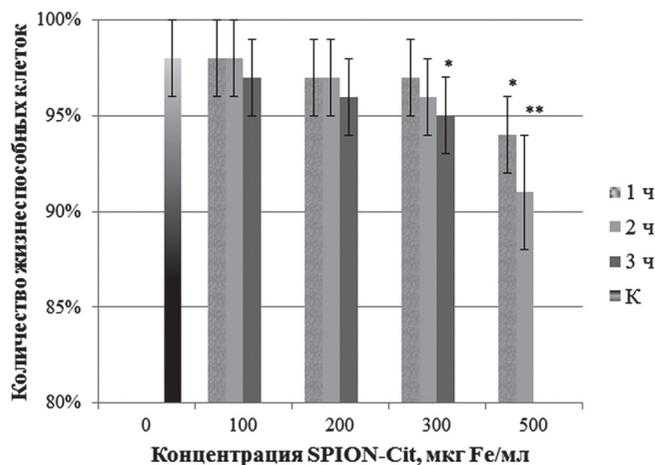


Рис. 5. Жизнеспособность магнитомаркированных фетальных фибробластов человека (ФФЧ) при разных концентрациях SPION-Cit, выявленная методом окрашивания трипановым синим. К – контроль. * – отмечены условия, при которых наблюдали открепление ФФЧ от дна культурального флакона

время инкубации 3 ч. МТТ-анализ ФФЧ, магнитомаркированных в выбранном диапазоне, не выявил статистически значимых отличий в жизнеспособности между магнитомаркированными и контрольными ФФЧ, ни непосредственно после мечения, ни через 24 и 48 ч. после мечения (рис. 6).

Микроскопическое исследование магнитомаркированных ФФЧ

При микроскопии ФФЧ сразу после магнитной маркировки видимых агрегаций магнитных частиц в цитоплазме не наблюдали (не наблюдали их и при окрашивании клеток на наличие железа гексацианоферратом калия), но отмечали присутствие значительного количества пищеварительных вакуолей, уровень которых зависел от концентрации частиц и времени инкубации (рис. 7).

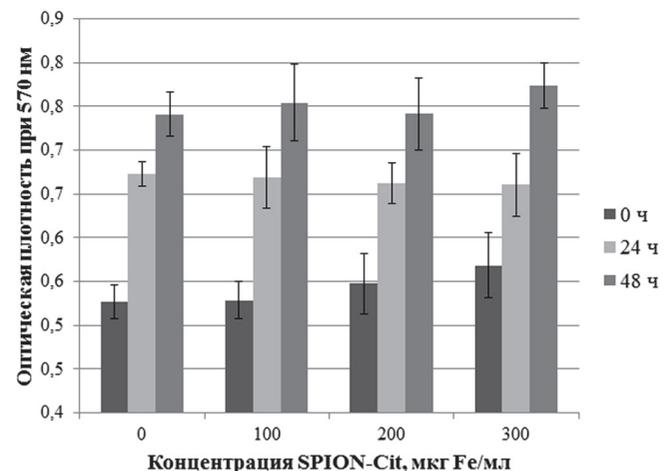
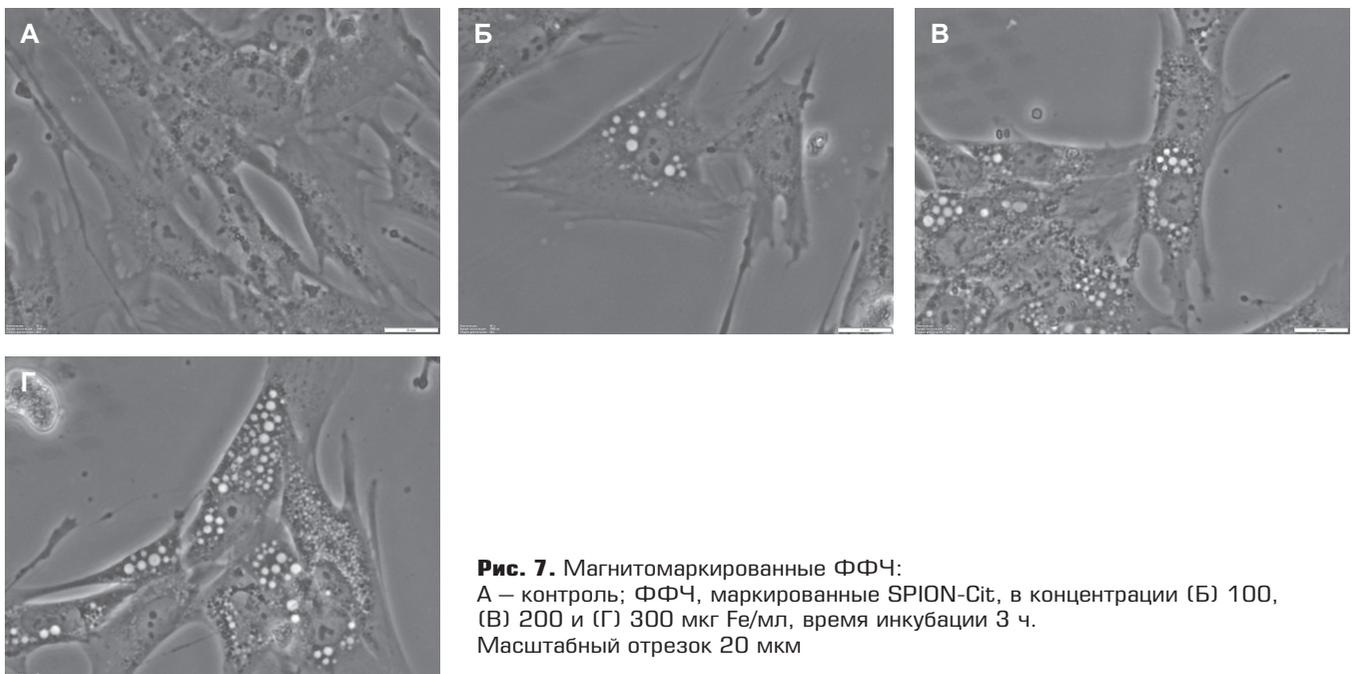


Рис. 6. Жизнеспособность магнитомаркированных ФФЧ при разных концентрациях SPION-Cit, выявленная методом МТТ при времени инкубации 3 ч.



Осадок неокрашенных магнитомаркированных ФФЧ имел тёмно-коричневый цвет, окрашенных гексацианоферратом калия — синий цвет, а контрольных ФФЧ — желтовато-белый цвет.

Обсуждение

Магнитофорез магнитомаркированных клеток является наиболее адекватным методом оценки эффективности магнитного мечения. Он позволяет определить, достаточен ли тот или иной режим магнитной маркировки клеток для их магнитоуправляемого движения. Чаще всего магнитофорез клеток оценивают качественно путём примагничивания клеточной суспензии внешним магнитом к какой-либо поверхности (чашки Петри, пробирки для центрифугирования, тонкие капилляры) в статических или динамических (с имитацией тока крови) условиях [2, 3, 23, 24].

В данном исследовании нами был оптимизирован и использован удобный количественный метод оценки магнитофоретического движения магнитомаркированных клеток, благодаря которому можно сравнивать между собой различные способы магнитного мечения клеток. Конструкция камеры позволяет наблюдать и регистрировать магнитофоретическое движение клеток под микроскопом, а разработанный нами алгоритм способствует быстрому и точно определению скорости движения клеток и расчёту на этой основе их магнитной восприимчивости. В данном исследовании, магнитная восприимчивость (χ , величина безразмерная) выражает отношение величины магнитного момента (намагниченности), которую приобретает магнитомаркированная клетка, к напряжённости намагничивающего магнитного поля и может служить количественным критерием эффективности магнитного маркирования клеток.

Основная цель работы заключалась в определении оптимального режима магнитного мечения ФФЧ с помощью SPION-Cit. Оптимальный, с нашей точки зрения, режим мечения должен быть таким, при котором будет достигаться достаточный уровень магнитной восприимчивости клеток при мини-

мальном эффективном количестве использованных магнитных наночастиц и минимальном эффективном времени инкубации клеток с этими частицами, не нарушая при этом в значительной степени жизнеспособности и функций клеток. Согласно полученным нами результатам, наиболее оптимальный режим магнитного мечения ФФЧ SPION-Cit был при использовании концентрации магнитных наночастиц 100 мкг Fe/мл и времени инкубации 3 ч. При данном режиме мечения не наблюдали значительного снижения жизнеспособности ФФЧ (по окраске трипановым синим и МТТ-анализу) и открепления их от поверхности культурального флакона, наблюдаемого при концентрациях 300 и 500 мкг Fe/мл. У клеток при этом сохранялся достаточно высокий уровень магнитной восприимчивости. Дальность захвата меченых ФФЧ составила порядка 4 мм, что может позволить осуществлять магнитоуправляемую доставку клеток в поверхностных тканях *in vivo*.

Открепление клеток, наблюдаемое при концентрациях 300 и 500 мкг Fe/мл и не наблюдаемое при меньших концентрациях, вероятно, связано в большей степени не с гибелью клеток, а с нарушением механизма клеточной адгезии, в результате адсорбции SPION-Cit на поверхности клеток. В пользу этого предположения свидетельствует тот факт, что после отмывки открепившихся клеток от магнитных наночастиц, большая часть клеток вновь прикрепляются к культуральной поверхности и нормально пролиферируют.

Результаты данного исследования сопоставимы с данными литературы: эффективное мечение клеток с помощью АМНЧ проводили при концентрациях от 5 мкг до 1 мг Fe/мл и времени инкубации от 20 мин. до 2 ч. [15, 25]. Следует отметить, что время мечения клеток наиболее часто используемыми SPION с полимерными неполярными оболочками (например, Feridex, Resovist и др.) при сопоставимых рабочих концентрациях было намного больше и составляло в среднем 6–24 ч. [15, 23, 24]. Таким образом, использованные нами магнитные наночастицы обеспечивают более быстрое мечение клеток, что важно для их клинического применения.

ЛИТЕРАТУРА:

1. von Bahr L., Batsis I., Moll G. et al. Analysis of tissues following mesenchymal stromal cell therapy in humans indicates limited long-term engraftment and no ectopic tissue formation. *Stem Cells* 2012; 30(7): 1575-8.
2. Yanai A., Häfeli U.O., Metcalfe A.L. et al. Focused magnetic stem cell targeting to the retina using superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Cell Transplant.* 2012; 21: 1137-48.
3. Chaudergeur A., Wilhelm C., Chen-Tournoux A. et al. Can magnetic targeting of magnetically labeled circulating cells optimize intramyocardial cell retention? *Cell Transplant.* 2012; 21: 679-91.
4. Wang Y., Chen Q., Gan C. et al. A review on magnetophoretic immunoseparation. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2016; 16(3): 2152-63.
5. Wilhelm C. Out-of-equilibrium microrheology inside living cells. *Phys. Rev. Lett.* 2008; 101: 028101.
6. Czugała M., Mykhaylyk O., Böhler P. et al. Efficient and safe gene delivery to human corneal endothelium using magnetic nanoparticles. *Nanomedicine (Lond.)* 2016; 11(14): 1787-800.
7. Barakat N.S. Magnetically modulated nanosystems: a unique drug-delivery platform. *Nanomedicine (Lond.)* 2009; 4(7): 799-812.
8. Li Y.W., Chen Z.G., Wang J.C. et al. Superparamagnetic iron oxide-enhanced magnetic resonance imaging for focal hepatic lesions: systematic review and meta-analysis. *World J. Gastroenterol.* 2015; 21(14): 4334-44.
9. Lin M.M., Kim D.K., El Haj A.J. et al. Development of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONS) for translation

to clinical applications. *IEEE Trans. Nanobioscience* 2008; 7(4): 298-305.

10. Ito A., Kamihira M. Tissue engineering using magnetite nanoparticles. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2011; 104: 355-95.

11. Connell J.J., Patrick P.S., Yu Y. et al. Advanced cell therapies: targeting, tracking and actuation of cells with magnetic particles. *Regen. Med.* 2015; 10(6): 757-72.

12. Wimpenny I., Markides H., El Haj A.J. Orthopaedic applications of nanoparticle-based stem cell therapies. *Stem Cell Res. Ther.* 2012; 3(2): 13.

13. Laurent S., Forge D., Port M. et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem. Rev.* 2008; 108: 2064-110.

14. Colombo M., Carregal-Romero S., Casula M.F. et al. Biological applications of magnetic nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* 2012; 41: 4306-34.

15. Wilhelm C., Gazeau F. Universal cell labeling with anionic magnetic nanoparticles. *Biomaterials* 2008; 29: 3161-74.

16. Zhu X.M., Wang Y.X., Leung K.C. et al. Enhanced cellular uptake of aminosilane-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles in mammalian cell lines. *Int. J. Nanomedicine* 2012; 7: 953-64.

17. Cromer Berman S.M., Walczak P., Bulte J.W. Tracking stem cells using magnetic nanoparticles. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 2011; 3: 343-55.

18. Hofmann-Amttenbrink M., Hofmann H., Montet X. Superparamagnetic nanoparticles – a tool for early diagnostics. *Swiss Med. Wkly.* 2010; 140: w13081.
19. Weissleder R., Stark D.D., Engelstad B.L. et al. Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. *AJR Am. J. Roentgenol.* 1989; 152: 167-73.
20. Nigam S., Barick K.C., Bahadur D. Development of citrate-stabilized Fe₃O₄ nanoparticles: Conjugation and release of doxorubicin for the therapeutic applications. *J. Magnetism and Mag. Mater.* 2011; 323: 237-43.
21. Li L., Mak K., Leung C. et al. Effect of synthesis conditions on the properties of citric-acid coated iron oxide nanoparticles. *Microelectron. Eng.* 2013; 110: 329-34.
22. Rad A.M., Janic B., Iskander A.S. et al. Measurement of quantity of iron in magnetically labeled cells: comparison among different UV/VIS spectrometric methods. *Biotechniques* 2007; 43: 627-8.
23. Landázuri N., Tong S., Suo J. et al. Magnetic targeting of human mesenchymal stem cells with internalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Small* 2013; 9: 4017-26.
24. Vanecek V., Zablotskii V., Forostyak S. et al. Highly efficient magnetic targeting of mesenchymal stem cells in spinal cord injury. *Int. J. Nanomedicine* 2012; 7: 3719-30.
25. Naveau A., Smirnov P., Ménager C. et al. Phenotypic study of human gingival fibroblasts labeled with superparamagnetic anionic nanoparticles. *J. Periodontol.* 2006; 77(2): 238-47.

Поступила: 03.10.2016