

УДК 617.7:611.018.82.013.089.67

Ю.А. ДЕМИН*, Л.В. ЛИТВИНОВА

Распределение меченых эмбриональных нервных клеток после введения *in vivo* при экспериментальной травме глаза

UDC 617.7:611.018.82.013.089.67

YU.A. DEMIN*, L.V. LITVINOVA

Distribution of Labeled Embryonic Nerve Cells After *In Vivo* Introduction at Experimental Eye Trauma

Изучали распределение криоконсервированных эмбриональных нервных клеток, меченных 3,3'-диооктадецил-оксакарбоданид бромидом (DDC), в тканях сетчатой и сосудистой оболочек после их введения при экспериментальном лазерном ожоге сетчатой оболочки глаза у кроликов. Показано присутствие красителя в очаге поражения на протяжении 21 суток.

Ключевые слова: эмбриональные нервные клетки, экспериментальная травма глаза, флуоресцентный краситель.

Вивчали розподіл криоконсервованих ембріональних нервових клітин, мечених 3,3'-діоктадецилоксакарбодіанід бромідом, в тканинах сітчастої і судинної оболонки після їх введення при експериментальному лазерному опіку сітчастої оболонки ока у кролів. Показана наявність барвника в осередку ураження на протязі 21 доби.

Ключові слова: ембріональні нервові клітини, експериментальна травма ока, флуоресцентний барвник.

The distribution of cryopreserved embryonic nerve cells labeled with 3,3'-dioctadecyloxycarbocyanide bromide (DDC) in the tissues of retinal and vascular membranes after introduction at experimental laser burn of eye retina in rabbits has been studied. The presence of dye in the damage focus for 21 days has been shown.

Key-words: embryonic nerve cells, experimental eye trauma, fluorescent dye.

На современном этапе развития трансплантологии разработаны методы выделения, хранения, оценки жизнеспособности эмбриональных нервных клеток.

Наиболее достоверным методом оценки путей миграции введенных клеток *in vivo* является их идентификация в организме реципиента [1-6].

В настоящее время предложены различные маркеры для идентификации клеток в организме реципиента, в частности метод флуоресцентных зондов (ФЗ) [11].

Флуоресцентные зонды, которые используются для исследования клеточной структуры, должны иметь высокие солеватохромные свойства и значительное увеличение квантового выхода при связывании с биологическим объектом, а также реагировать на изменение микроокружения [6].

В биологии и медицине используется большое количество флуоресцентных зондов, например, этидий бромид, карбодиметилфлуоресцеин, Хехст 33258, пропидий йодид, ДСМ (4-N-диметил-аминостирил 1-метилпиридиний-N-толуолсульфонат) и др. [8, 12].

At the contemporary stage of transplantology development the methods of isolation, storage and estimation of viability of embryonic nerve tissues have been designed.

The identification of the introduced cells into a recipient's organism is the most valid method to estimate their migration ways [1-6].

Today different markers for identification of cells in a recipient's organism, in particular, the method of fluorescent probes (FP) have been proposed [11].

Fluorescent probes which are used for study of cell structures should have solvate-chrome properties and significant increase in quantum yield during binding with biological object and also respond to the changed microenvironment [6].

In biology and medicine there is used a big number of fluorescent probes, for example ethidium bromide, carbodimethyl fluorescein, Hoechst 33258, propidium iodide, DSM (4-N-dimethyl-aminostyryl 1-methylpyridinium-N-toluolsulfonate) etc. [8, 12].

There are available data that these fluorochromes may render manifested toxic effect and cause structural and functional impairments in a cell by reducing the

Харьковская медицинская академия постдипломного образования

Kharkov Medical Academy of Post-Diploma Education, Kharkov, Ukraine

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. О. Гончара, 5, г. Харьков, Украина 61176; тел.:+38 (057) 700-54-64

* To whom correspondence should be addressed: 5, O. Gonchar str., Kharkov, Ukraine 61176; tel.:+380 57 700 5464

Имеются данные, что эти флуорохромы могут оказывать выраженное токсическое действие и вызывать структурно-функциональные нарушения в клетке, снижая жизнеспособность и способность к пролиферации, что приводит к ее гибели. Кроме того, низкая интенсивность сигнала и возможность быстрой элиминации красителя из клетки снижают ценность данной методики [8].

В связи с этим необходимы поиск новых ФЗ и экспериментальное обоснование их использования.

Недавно для идентификации клеток до и после криоконсервирования, а также на ранних и отдаленных этапах восстановительного периода после их введения был предложен ФЗ 3,3'-диооктадецил-оксакарбониан д бромид (DDC).

По имеющимся данным при использовании флуоресцентного зонда DDC окрашиваются только мембраны клеток, при этом сохраняется их целостность, что может явиться одним из показателей функциональности клеток до и после их деконсервирования и введения, а также позволяет рассчитывать на возможность их идентификации в организме реципиента [11]. Данный зонд позволяет оценить и проследить за миграцией, распределением нервных клеток до 21 суток, что может быть важной предпосылкой для изучения процессов регенерации в патологическом очаге.

Цель работы – изучение распределения меченых DDC криоконсервированных эмбриональных нервных клеток после введения в организм кролика при модельной патологии сетчатой оболочки в различные временные промежутки.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на половозрелых кроликах породы Шиншилла массой 1,5-2,5 кг согласно положениям “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1985).

В качестве модельной патологии сетчатки использовали экспериментальную модель лазерного макулярного ожога. Лазерное повреждение сетчатки глаза кролика осуществляли с помощью аргонной лазерной установки (Visuals 532). Коагуляты наносили в нижней половине глазного дна через грань 3-зеркальной линзы по 20 коагулятов на каждом экспериментальном глазу. Экспериментальными глазами были правые, а контрольными – левые глаза тех же животных. Средняя мощность излучения составляла 400 мВт, длительность экспозиции 0,1 с, диаметр пятна 100 мкм. По классификации L'Esperance световой ожог в таких случаях соответствует 3-й степени [10].

Препараты эмбриональных нервных клеток получали по методу, разработанному в Институте

viability and ability to proliferation that results in its death. In addition, signal low intensity and possibility of rapid elimination of the dye out of a cell decrease the value of this method [8].

In this connection the search for new FPs and experimental substantiation of their use are needed.

Recently for identification of the cells prior to and after cryopreservation as well as at early and distant stages of recovery period after their introduction the FP 3,3'-dioctadecyloxycarbocyanine bromide (DDC) has been proposed.

According to available data when using fluorescent probe DDC only membranes of the cells are stained, herewith their integrity is preserved, that may be one of the indices of cell functionality prior to and after their freeze-thawing and introduction, as well it enables the taking into account the possibility of their identification on a recipient's organism [11]. This probe is helpful in estimation and tracing of the migration, distribution of nerve cells up to 21 days, that may be an important precondition for studying the regeneration in pathological focus.

The research aim is to investigate the distribution of labeled DDC of cryopreserved embryonic nerve cells after introduction into rabbit's organism under model pathology of retina in various times intervals.

Materials and methods

The experiments were performed in mature Chinchilla rabbits of 1.5-2.5 kg weight in accordance to the statements of “European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes” (Strasbourg, 1985).

As a model pathology of retina we used experimental model of laser macular burn. Laser damage of rabbit's retina was performed with argon laser equipment (Visuals 532). Coagulants were put on eye fundus lower half via the mirror lens plane by 20 coagulants per each experimental eye. The rights eyes served as experimental ones and the left eyes of the same animals were the controls. An average irradiation power made 400 mW, the exposure duration was 0.1 sec, spot diameter was 100 mm. According to the classification of L'Esperance the flash-burn in these cases corresponds to the third grade [10].

The preparations of embryonic nerve cells were obtained on the method designed at the Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, the city of Kharkov [5, 7, 9]. Prior to staining the cells suspension was thawed on water bath at 38°C for 2 min and washed-out from DMSO in cultural medium with sedimentation of cells by centrifugation at 1000 g.

Before the preparation introduction supravital staining of the cells with DDC dye solution developed at the Institute of Single Crystals of National Academy

проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков [5, 7, 9]. Перед окрашиванием клеточную суспензию размораживали на водяной бане при 38°C в течение 2-х минут и отмывали от DMSO в культуральной среде, осажая клетки центрифугированием при 1000 g.

Перед введением препарата проводили суправитальное окрашивание клеток раствором красителя DDC, разработанным в Институте монокристаллов НАН Украины [11], для чего клеточный осадок ресуспендировали в растворе Хенкса с 10^3 М красителя и инкубировали клетки в течение 15-30 мин при 37°C. Затем клетки отмывали от несвязавшегося красителя в растворе Хенкса.

По данным [11] краситель DDC связывается с белково-липидными компонентами клеточной мембраны, не повреждая клетки, и сохраняет высокий уровень флуоресценции *in vitro* и *in vivo* в течение 2-3 недель.

Клетки, меченные ФЗ, вводили в правый экспериментальный глаз кроликам парабульбарно в растворе объемом 0,5 мл.

Забой животных проводили через 24 ч, 3, 7, 14 сут после введения, извлекали глазное яблоко, изготавливали криосрезы на криостате и исследовали криопрепараты на люминесцентном микроскопе (ЛОМО, Россия).

Результаты и обсуждение

До введения препарата в организм экспериментальных животных свежеприготовленные мазки суспензии эмбриональных клеток были оценены с помощью люминесцентного микроскопа: окрашенные клетки светились желто-зеленым светом (рис.1).

На 3-и сутки после введения клеток в организм животных отмечено скопление меченого материала в сосудистой и сетчатой оболочках в виде компактной группы с интенсивным зеленым свечением, свидетельствующем о том, что введенные клетки проникли через гематофтальмический барьер, имея тропность к очагу поражения в оболочках глазного яблока (рис. 2, а).

В криосрезах тканей на 7-е сутки после введения клеток регистрируется более интенсивное свечение (рис. 2, б).

На 21-е сутки восстановительного периода отмечается уменьшение количества окрашенных клеток в сетчатой и сосудистой оболочках (рис. 2, в).

Таким образом, введенный вместе с клетками в организм животного краситель определяется в месте патологического очага до 21-х суток.

Можно предположить, что криоконсервированные нервные клетки после деконсервации и введения мигрируют в очаг повреждения, локализованный в сетчатой и сосудистой оболочках, и

of Sciences of Ukraine [11] was performed, with this aim cell residual was re-suspended in Henk's solution with 10^3 M dye and the cells were incubated for 15-20 min at 37°C. Then the cells were washed-out of non-bound dye in Henk's solution.

According the data [11] the DDC dye is bound with protein-lipid components of cell membrane with no damage of cells and preserves a high level of fluorescence *in vitro* and *in vivo* for 3-4 weeks.

The cells labeled with FP were introduced into rabbit's right experimental eye parabulbarly in the 0.5 ml solution.

The slaughtering of animals was done in 24 hrs, 3, 7, 14 days after introduction, the eyeball was removed, cryoslices were performed and cryopreparations were studied with luminescent microscope (LOMO, Russia).

Results and discussion

Prior to the preparation introduction to experimental animals freshly prepared smears of the suspensions of embryonic cells were evaluated using luminescent microscope: there was green illumination from stained cells (Fig. 1).

To the 3rd day after cell introduction to animals there was noted an accumulation of labeled material in vascular and retinal membranes as compact groups with intensive green illumination that testified to the fact that introduced cells penetrated via blood brain barrier with the damage focus-seeking in eyeball membranes (Fig. 2, a).

In cryoslices of tissues to the 7th day after introduction of cells more intensive illumination is recorded (Fig. 2, b).

To the 21st day of recovery period there was found a reduction of stained cells in retinal and vascular

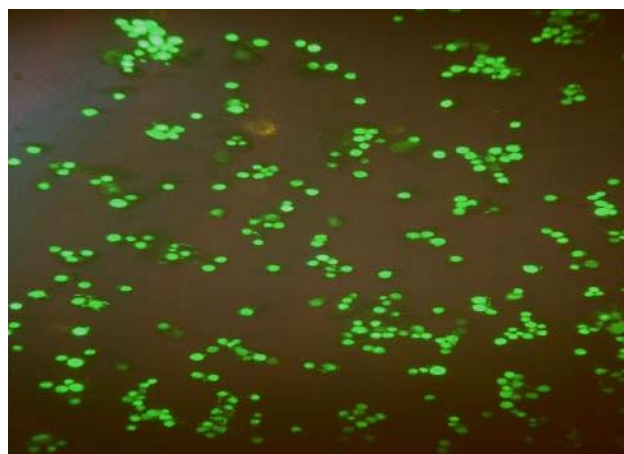


Рис. 1. Препарат декриоконсервированных эмбриональных нервных клеток. Суправитальное окрашивание раствором DDC на предметном стекле. Люминесцентная микроскопия ок. 10, об. 10.

Fig.1. Preparation of frozen-thawed embryonic nerve cells. Supravital staining with DDC on object-plate. Luminescent microscopy, ocular 10, objective 10.

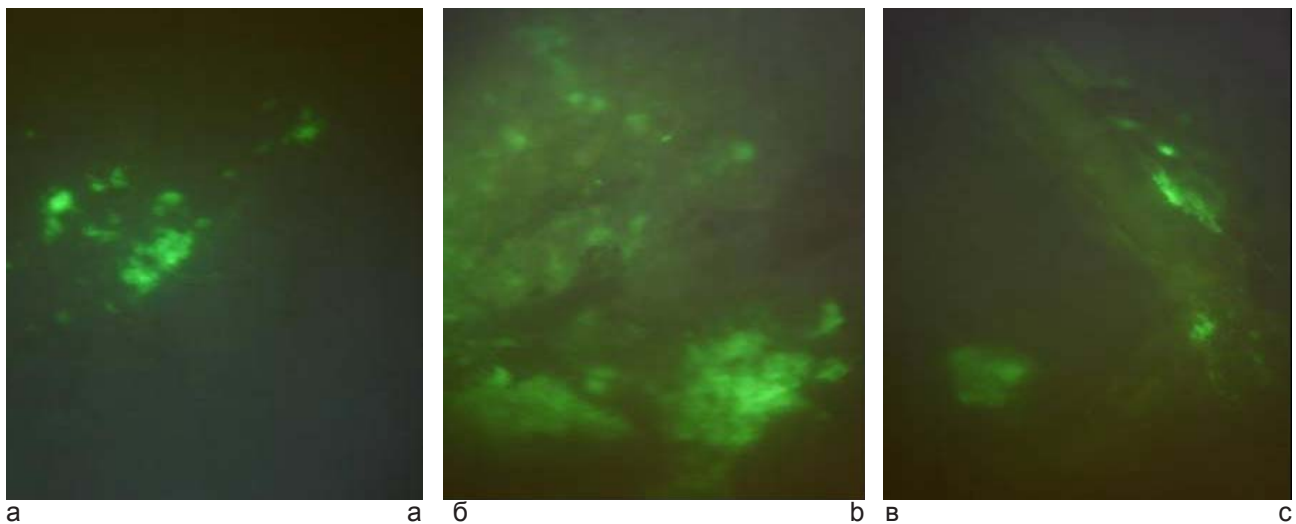


Рис. 2. Криоконсервированные эмбриональные нервные клетки в сетчатой и сосудистой оболочках кролика после суправитального окрашивания раствором DDC: а – 3-и; б – 7-е; в – 21-е сутки после введения препарата в организм экспериментальных животных, ок. 10, об. 20. Люминесцентная микроскопия.

Fig. 2. Cryopreserved embryonic nerve cells in rabbit's retinal and vascular membranes after supravital staining with DDC: a – to the 3rd day; b – to the 7th day; c – to the 21st day after injection of preparation in to organism of experimental animals. Luminescent microscopy, ocular 10, objective 10.

активно участвуют в процессах репаративной регенерации.

Постепенное снижение флуоресценции после 21 суток можно объяснить резорбцией введенного материала.

Выводы

Краситель 3,3'-диоктадецилоксакробоцианид бромид окрашивает эмбриональные нервные клетки и определяется в поврежденной сетчатке в течение 21-х суток после введения клеток в организм экспериментальных животных, что может служить предпосылкой его использования для идентификации введенного биологического материала.

Литература

1. *Бабенко Н.Н., Вотякова И.А.* Особенности пролиферации и дифференцировки нативных и криоконсервированных эмбриональных нервных клеток человека 5-13 недель гестации // Пробл. криобиологии.– 1999.– №1.– С. 35-39.
2. *Высеканцев И.П., Кудокотсева О.В., Петренко Т.Ф., Гурина Т.М. и др.* Влияние колебаний температуры хранения на жизнеспособность криоконсервированных клеток про- и эукариотов // Пробл. криобиологии. 2005.– Т.15, №1.– С. 33-41.
3. *Гольцев А.Н., Гурина Т.М., Бабенко Н.Н.* Влияние различных режимов криоконсервирования на некоторые характеристики эмбриональных нервных клеток // Пробл. криобиологии.– 2003.– №1.– С.46-50.
4. *Грищенко В.И., Гольцев А.Н., Щегельская Е.А., Миклулинский Ю.Е.* Криоконсервирование стволовых клеток // Досягнення біології та медицини.– 2006.– №1(7).– С. 4-9.
5. *Грищенко В.И., Снурников О.С., Дьомін Ю.А.* Заготівля, криоконсервування та клінічне застосування ембріо-

membranes (Fig. 2, c). Thus introduced in combination with the cells into animals' organism dye is found in the site of pathological focus up to 21 days.

One may suppose that cryopreserved nerve cells after thawing and introduction migrate into damage focus, localized in retinal and vascular membranes and actively participate in the processes of reparative regeneration.

Gradual reduction in fluorescence after the 21 day can be explained by resorption of introduced material.

Conclusions

The 3,3'-dioctadecyloxacarbocyanide bromide dye stains embryonic nerve cells and is found in the impaired retina for 21 days after the cells' introduction into an organism of experimental animals that may serve as a precondition for its use to identify the introduced biological material.

References

1. *Babenko N.N., Votyakova I.A.* Proliferation and differentiation characteristics of native and cryopreserved embryonic nerve human cells of gestation 5-13 weeks// Problems of Cryobiology.– 1999.– №1.– P.35-39.
2. *Vysekantsev I.P., Kudokotseva O.V., Petrenko T.F., Gurina T.M. et al.* Effect of storage temperature variations on viability of cryopreserved cells of pro- and eukaryotes // Problems of Cryobiology.– Vol.15.– 2005.– №1.– P. 33-41.
3. *Goltsev A.N., Gurina T.M., Babenko N.N.* Effect of different regimes of cryopreservation for some characteristics of embryonic and nerve cells // Problems of Cryobiology.– 2003.– №1.– P. 46-50.
4. *Grischenko V.I., Goltsev A.N., Schegelskaya E.A., Mikulinskiy Yu.E.* Cryopreservation of stem cells // Dosyagnennya Biologii i Medytsyny.– 2006.– №1(7).– P. 4-9.

- нальних та фетальних клітин людини в офтальмологічній практиці: Метод. рекомендації.– Харків, 2000.– 15 с.
6. *Егоров М.І., Дюбка Т.С., Ліннік Т.П. та інші.* Нові флуоресцентні барвники як зонди для дослідження сперматозоїдів собак у криозахисних середовищах // Пробл. криобіології.– 2006.– Т. 16, №1.– С. 13-22.
 7. *Кадникова Н.Г., Петренко Т.Ф., Марценюк В.Ф., Кошій С.В.* Методи получения жизнеспособных эмбриональных клеток нейроткани и печени // Пробл. криобіології.– 2001.– №3.– С.43-44.
 8. *Личисенко Н.Л., Ромоданова Э.А., Нардид О.А. и др.* Структурные изменения в компонентах спермы хряка при воздействии малых доз лазерного излучения // Фотобиология и фотомедицина.– 2000.– №3-4.– С. 86-89.
 9. *Сукач А.Н.* Характеристика эмбриональных нервных клеток человека, полученных неферментативным способом // Цитология.– 2005.– Т.47.– С. 207-209.
 10. *Ченцова Е.В., Пак Н.В., Иванов А.Н., Сухих Г.Т.* Влияние трансплантации нейральных стволовых клеток на процессы регенерации сетчатки в эксперименте // Регенеративная медицина и трансплантация тканей в офтальмологии. – М., 2005.– С.17-18.
 11. *Пат. Украины 13724 МПК 2006 С12N5/08.* Способ применения суправитального красителя для разных типов биологических тканей / И.А. Боровой, Ю.В. Малукин, В.П. Семиноженко, Е.А. Щегельская, Ю.Е. Микулинский, Ю.А. Демин, В.А. Пятикоп. Заявл. 17.10.2005. Оpubл. 17.04.2006.– Бюл. №4.
 12. *Kiernan J.A.* Classification and naming of dyes, stains and fluorochromes // Biotech. Histochem.– 2001.– Vol. 76, N5-6.– P. 261-278.
 5. *Grischenko V.I., Snurnikov O.S., Dyomin Yu.A.* Storage, cryopreservation and clinical application embryonic and fetal human cells in ophthalmologic practice: Methodical recommendations.– Kharkov, 2000.– P.15.
 6. *Egorov M.I., Dyubko T.S., Linnik T.P. et al.* New fluorescent dyes as fluorescent probes for examination of canine spermatozoa in cryoprotective media // Problems of Cryobiology.– 2006.– Vol.16, №1.– P. 13-23.
 7. *Kadnikova N.G., Petrenko T.F., Martsenyuk V.F., Koschiy S.V.* Methods of obtaining viable embryonic cells of neurotissue and liver // Problems of Cryobiology.– 2001.– №3.– P. 43-44.
 8. *Lisichenko N.L., Romadanova E.A., Nardid O.A.* Structural changes in sperm component of hog at the effect of low irradiation doses // Fotobiologiya i Fotomedisyna.– 2000.– N 3-4.– P. 86-89.
 9. *Sukach A.N.* Characteristic of embryonic nerve human cells, obtained by nonenzymatic method // Cytology.– 2005.– Vol.47.– P. 207-209.
 10. *Chentsova E.V., Pak N.V., Sukhikh G.T.* Transplantation effect of neural stem cells on retina regeneration process in experiment // Regenerative medicine and tissues transplantation in ophthalmology.– Moscow.– 2005.– P. 17-18.
 11. *Patent 13724 (Ukraine) IPC 2006 C12N5/08.* Application method of 3,3-dioctadecyloxacarbocyanine bromide supravital dye for different types of biological tissues / I.A.Borovoy, Yu.V. Malyukin, V.P. Seminozhenko, E.A. Schegelskaya, Yu.E. Mikulinskiy, Yu.A. Dyomin, V.A. Pyatikop. Filed 17.10.2005. Published 17.04.2006.– Bull. N4.
 12. *Kiernan J.A.* Classification and naming of dyes, stains and fluorochromes // Biotech. Histochem.– 2001.– Vol. 76, N5-6.– P. 261-278.

Поступила 14.02.2007

Accepted in 14.02.2007