

Własności biologiczne ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych napromieniowanych ze źródeł LED

Lewandowski R.¹, Trafny E.A.¹, Stępińska M.¹, Gietka A.², Kotowski P.², Dobrzyńska M.¹, Łapiński M.¹
Centrum Inżynierii Biomedycznej¹ i Zakład Technologii Optoelektronicznych², Instytut Optoelektroniki,
Wojskowa Akademia Techniczna, Warszawa

Wstęp

Ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste (hMSC) coraz częściej są stosowane w medycynie regeneracyjnej, ponieważ mogą różnicować się do kilku rodzajów komórek tworzących tkanki pochodzenia mezodermalnego. Zwiększenie liczby hMSC dla potrzeb klinicznych uzyskuje się obecnie w wyniku ich namnażania (prolifracji) w hodowlach *in vitro*. Jednak proces ten trwa kilka dni i pozwala uzyskać populację nowych komórek, która nie zawsze jest wystarczająco liczna dla skutecznego zastosowania klinicznego. Dlatego w ostatnich latach poszukuje się metod efektywnego zwiększenia proliferacji komórek hMSC w krótkim czasie.

Celem pracy była ocena możliwości zwiększenia proliferacji komórek hMSC ze szpiku kostnego w warunkach *in vitro* za pomocą niskoenergetycznego promieniowania emitowanego z układu oświetlacza LED oraz ocena własności biologicznych tych komórek.

Materiały i metody

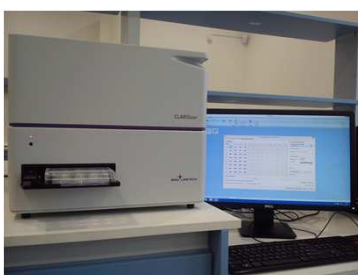
Do badań użyto ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste Poietics™ (Lonza) uzyskane ze szpiku kostnego od zdrowego dawcy z trzeciego pasażu (Lonza PT-2501). Hodowlę komórek *in vitro* prowadzono w sterylnych warunkach w Pracowni Biologii Molekularnej Centrum Inżynierii Biomedycznej (CIB) WAT. Optymalne warunki wzrostu dla komórek hMSC (temperaturę, wilgotność i stężenie CO₂) uzyskiwano w specjalnym inkubatorze. Komórki przeznaczone do badań hodowano w płytkach titracyjnych z użyciem pożywki hodowlanej MSCGM™ (Lonza). Po 48 godzinach od zaszczepienia komórek płytki naświetlano w oświetlaczach opracowanych w Zakładzie Technologii Optoelektronicznych Instytutu Optoelektroniki WAT, które zawierały 12 lub 96 źródeł LED emitujących promieniowanie o długości fali 630. Badania wykonano dla różnych wartości powierzchniowej gęstości energii i powierzchniowej gęstości mocy. Po 2, 5 i 9 dniach od naświetlania oceniano aktywność metaboliczną komórek hMSC za pomocą testu PrestoBlue® (Invitrogen), który odczytywano w czytniku Clariostar® (BMG Labtech). Oceniano również morfologię komórek przy użyciu mikroskopu odwróconego MW-100 (OPTA-TECH). Obrazy uzyskane za pomocą kamery cyfrowej 5 MP zapisywano przy pomocy programu Opta-view-IS (OPTA-TECH). Po 2 dniach od naświetlania oceniano również odsetek komórek żywych, martwych oraz znajdujących się w stanie apoptozy przy użyciu mini cytometru Tali® (Invitrogen).



Rycina 1. Oświetlacze LED do napromieniowywania komórek hMSC opracowane w IOE WAT.



Rycina 2. Płytki titracyjne 12 – dołkowa z hodowlą komórek hMSC podczas naświetlania.

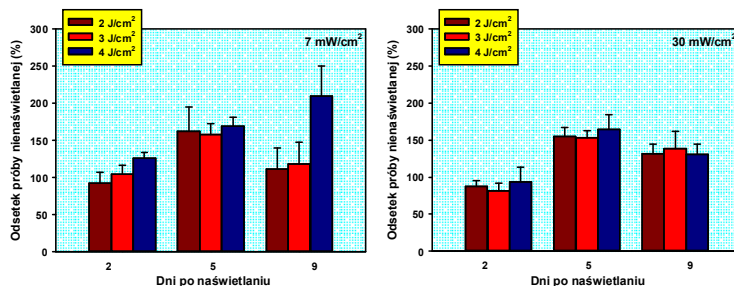


Rycina 3. Czytnik wielofunkcyjny do analizy testów biochemicznych na płytkach titracyjnych.

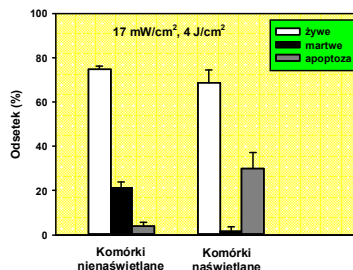
Wyniki

Długość fali (nm)	Powierzchniowa gęstość mocy (mW/cm ²)	Powierzchniowa gęstość energii (J/cm ²)	Liczba naświetlań w eksperymencie
630	mała	4	0,11, 0,5, 4
	średnia	7	0,5, 1, 2, 3, 4, 5
		17	1, 4
		30	1, 2, 3, 4, 10, 20

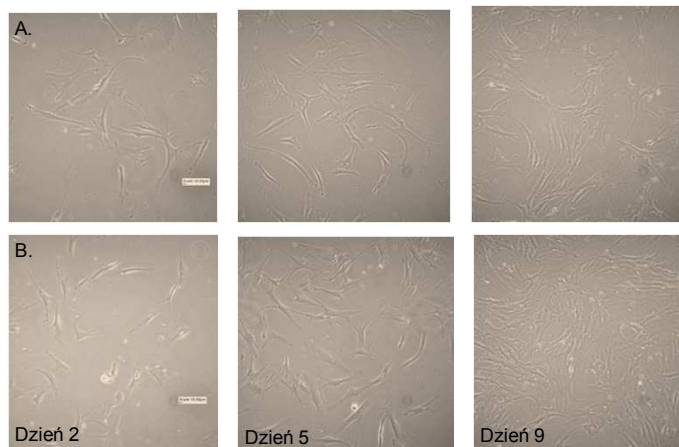
Tabela 1. Zestawienie wszystkich parametrów energetycznych promieniowania emitowanego przez źródła LED stosowanych dotychczas w CIB WAT w eksperymentach z komórkami hMSC.



Rycina 4. Wpływ promieniowania emitowanego ze źródeł LED o małej lub średniej powierzchniowej gęstości mocy (7 lub 30 mW/cm²) na szybkość proliferacji komórek hMSC przy tych samych powierzchniowych gęstościach energii (2, 3, 4 J/cm²).



Rycina 5. Odsetek liczby komórek hMSC żywych, martwych i w stanie apoptozy w 2 dniu po naświetlaniu promieniowaniem emitowanym ze źródła LED o średniej powierzchniowej gęstości mocy wynoszącej 17 mW/cm² i powierzchniowej gęstości energii wynoszącej 4 J/cm².



Rycina 6. Porównanie morfologii i liczby komórek hMSC niepoddawanych ekspozycji na promieniowanie (A) oraz po napromieniowaniu (4 J/cm², 17 mW/cm²) w oświetlaczu LED (B).

Wnioski

- Promieniowanie emitowane przez opracowane źródła LED może wpływać na szybkość proliferacji komórek hMSC tylko przy określonych parametrach energetycznych.
- Metoda mini cytometrii obrazowej umożliwia wykonanie ilościowej analizy populacji komórek uzyskanych po naświetlaniu w tym określenie frakcji komórek żywych, apoptotycznych i nekrotycznych.
- Konieczne jest prowadzenie dalszych badań w celu sprawdzenia oddziaływania na komórki hMSC promieniowania emitowanego przez źródła LED o innych parametrach energetycznych.