

**К.В. Котенко, Б.Б. Мороз, Ю.Б. Дешевой, Т.А. Насонова,  
О.А. Добрынина, В.Г. Лебедев, А.В. Лырщикова, И.И. Еремин**  
**СИНГЕННЫЕ МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ  
СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ В ТЕРАПИИ ДЛИТЕЛЬНО  
НЕЗАЖИВАЮЩИХ ЛУЧЕВЫХ ЯЗВ КОЖИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

**K.V. Kotenko, B.B. Moroz, Yu.B. Deshevoy, T.A. Nasonova, O.A. Dobrynina,  
V.G. Lebedev, A.V. Lirshikova, I.I. Eremin**

**Syngenic Multipotent Mesenchymal Stromal Cells in the Treatment  
of Persisted Radiation Skin Ulcers in the Experiment**

## РЕФЕРАТ

**Цель:** Исследование в эксперименте эффективности сингенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) при лечении тяжелых (глубоких) длительно незаживающих лучевых поражений кожи, вызванных относительно мягким рентгеновским излучением.

**Материал и методы:** Эксперименты были выполнены на крысах-самцах инбредной линии Wistar-Kyoto. Крыс облучали локально в пояснично-подвздошной области на рентгеновской установке РАП 100-10 в дозе 110 Гр (напряжение на трубке 30 кВ, ток 6,1 мА, фильтр Al толщиной 0,1 мм). Мощность дозы 17,34 Гр/мин. На 84-е сут после воздействия радиации были отобраны 27 крыс из 40 облученных с незажившими лучевыми язвами кожи. Эти животные были равномерно в соответствии с размерами и клиническим течением язв распределены в три группы. Двум группам крыс трансплантировали сингенные ММСК, выделенные из костного мозга и наработанные *in vitro*: однократно (на 85-е сут) или двукратно (на 85-е и 93-е сут). ММСК ( $1,7 \times 10^6$  клеток на одну инъекцию) вводили под кожу вокруг лучевой язвы. Третья группа являлась облученным контролем.

**Результаты:** Показано, что двукратное введение сингенных культивированных ММСК стимулировало заживление длительно незаживающих лучевых язв, что четко прослеживалось в период с 93-е по 111-е сут после облучения.

**Выводы:** Полученные данные показывают, что сингенные ММСК могут быть эффективны при терапии глубоких длительно незаживающих лучевых язв кожи, так как способны в адекватной дозе индуцировать процессы восстановительной регенерации в поврежденной коже. Для получения лечебного эффекта необходима, по крайней мере, двукратная (с интервалом в неделю) трансплантация ММСК.

**Ключевые слова:** мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, рентгеновское излучение, лучевые язвы кожи

## ABSTRACT

**Purpose:** The effectiveness of syngenic multipotent mesenchymal stromal cells (MMSC) in treatment of persisted radiation skin ulcers caused by relatively soft x-ray was studied.

**Material and methods:** Experiments were carried out on rats by the inbred strain Wistar-Kyoto. Rats had been irradiated locally in lumbariliac region using x-ray machine RAP 100–110 with the dose of 110 Gy (30 kV tube voltage, current 6.1 ma, thick Al filter 0.1 mm). Dose rate is 17.3 Gy/min. 27 rats (from 40 being irradiated) with expanded radiation skin ulcers of the were selected on day 84 after exposure to radiation. This group of animals were divided into three groups (in accordance with the dimensions and clinical course of ulcers). Two groups of rats have been treated with transplantation of MMSC isolated from bone marrow and developed *in vitro*: once (in 85 days) or twice (on 85 and 93 days). MMSC ( $1.7 \times 10^6$  cells per injection) was injected under the skin around the radiation ulcer. The third group was the control.

**Results:** The double imposition of syngenic MMSC stimulated healing of persisted radiation ulcers, that became clear from 93 to 111 days after exposure.

**Conclusion:** The findings suggest that syngenic MMSC can be effective in the treatment of persisted radiation skin ulcers..

**Key words:** multipotent mesenchymal stromal cells, X-ray, radiation skin ulcers

## Введение

Глубокие радиационные поражения кожи, обычно сопровождающиеся угнетением функции клеток иммунной системы, в том числе клеток костного мозга и селезенки, приводят к развитию длительно незаживающих хронических лучевых язв, которые очень трудно поддаются консервативному лечению [1–3].

Поэтому нередко пострадавшим требуется хирургическое вмешательство, которое не всегда возможно из-за состояния организма и может приводить к неблагоприятным последствиям.

Включение в стандартную схему лечения методов клеточной терапии с использованием активированных (культивированных) мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) костного моз-

га может являться перспективным способом лечения тяжелых лучевых ожогов. Экспериментальные и клинические данные показывают, что стволовые/прогениторные ММСК, выделенные из костного мозга и наработанные *in vitro*, могут использоваться для лечения различных заболеваний. Они способны также замещать и восстанавливать функции поврежденных тканей (кожи, хрящей, скелетных мышц, сердечной мышцы, нервной ткани, печени и др.). Этот эффект обусловлен способностью ММСК выделять цитокины и регуляторные пептиды, стимулирующие регенераторные процессы в пораженных органах и тканях. В лаборатории радиационной патологии ФМБЦ им. А.И. Бурназяна в эксперименте была установлена способность аллогенных ММСК, выделенных из костного мозга, улучшать течение поверхностных лучевых поражений кожи после  $\beta$ -облучения источником  $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$  [4]. Описаны случаи успешного применения ММСК при лечении поздних лучевых язв в клинике ФМБЦ, вызванных рентгеновским излучением [5, 6], что также свидетельствует о том, что использование культивированных (активированных) ММСК может быть весьма эффективным в схеме лечения тяжелых местных лучевых поражений.

Целью данного исследования является выявление в эксперименте эффективности культивированных сингенных ММСК костного мозга при лечении тяжелых (глубоких) длительно незаживающих лучевых поражений кожи, вызванных относительно мягким рентгеновским излучением.

## Материал и методы

Эксперименты были выполнены на 40 крысах-самцах инбредной линии Wistar-Kyoto массой 240–260 г, полученных из питомника лабораторных животных ФИБХ РАН (г. Пущино). Животные этой линии генетически не отличаются друг от друга, что позволяет проводить трансплантации ММСК в сингенной системе.

Предварительно фиксированных в положении на животе крыс облучали локально в пояснично-подвздошной области на рентгеновской установке РАП 100-10 в дозе 110 Гр (напряжение на трубке 30 кВ, ток 6,1 мА, фильтр Al толщиной 0,1 мм). Мощность дозы 17,3 Гр/мин. Диаметр поля облучения на поверхности кожи — 3,2 см. Результаты дозиметрических измерений, проведенные с помощью тканеэквивалентного фантома, показали, что при таких условиях облучения в дозе 110 Гр доза рентгеновского излучения на глубине 2 мм была порядка 30 Гр, а на глубине 5–10 мм — не более 10 Гр. Эти условия облучения позволяли получать тяжелые лучевые поражения кожи с длительно незаживающими язвами у крыс породы Wistar [7].

Тяжесть течения лучевого поражения кожи оценивали в динамике как по клинической картине, так и с помощью планиметрического метода, позволяющего измерять площадь пораженного участка кожи. Для проведения измерений производили фотосъемку лучевой язвы цифровой фотокамерой Canon. Площадь лучевого поражения кожи рассчитывали с помощью компьютерной программы AutoCad 14.

На 84-е сут после воздействия радиации были отобраны 27 крыс с незажившими лучевыми язвами. Далее эти животные были равномерно (в соответствии с клиническим течением и размерами язв) распределены в три группы по 9 крыс в каждой: 1-я группа — облученный контроль, 2-я группа — крысам однократно вводили ММСК в дозе  $1,7 \times 10^6$  через 85 сут после облучения, 3-я группа — крысам вводили ММСК в дозе  $1,7 \times 10^6$  двукратно — через 85 и 93 сут после облучения. Суспензию ММСК в 1 мл стерильного раствора Хенкса вводили под кожу в 5 точек (по 0,2 мл на точку) вокруг лучевой язвы, отступив по 2 мм от края очага.

Работа по выделению клеток костного мозга и ведению культур ММСК выполнялись в асептических условиях в ламинарном боксе в соответствии с общими принципами проведения культуральных исследований.

Для клеточной терапии использовали сингенные ММСК, полученные нами ранее из костного мозга крыс линии Wistar-Kyoto и помещенные в криобанк. ММСК размораживали согласно стандартному протоколу, ресуспендировали в полной среде и высеивали в культуральные флаконы для наработки необходимого для трансплантации количества клеток. Полную среду готовили на основе среды Iscov'MDM+ Glutamax + Hepes (Sigma, США) с добавлением эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота — до 15 % концентрации (HyClone, США), гентамицина (50 мг/л) и амфотерицина Б (2,5 мг/л). Суспензию размороженных клеток помещали в пластиковые культуральные флаконы с дном площадью 75 см<sup>2</sup> (Nunc, Дания) из расчета порядка  $1,0 \times 10^6$  клеток на флакон и культивировали при 37 °С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (Sanyo, Япония), в атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub> и 95 % влажности. Процесс культивирования клеток оценивали в динамике визуально с помощью инвертированного микроскопа (Nikon, Япония), отмечая процент площади дна флакона, покрытого клетками. Клетки формировали на дне флакона монослой и имели фибробластоподобную морфологию. Характеристика клеточной культуры, проведенная методом непрямой иммунофлуоресценции, показала, что в 100 % клеток выявлялся виментин — белок цитоплазматического скелета стромальных клеток, коллаген I типа и коллаген III типа — белок межклеточного матрикса, син-

тезируемый ММСК различного уровня дифференцировки. Смену среды производили каждые три дня. При достижении культурой 80–90 % конfluenceности клетки снимали (трипсин+ ЭДТА) со дна флакона, отмывали от фермента, подсчитывали количество выращенных клеток и далее их использовали в нужной концентрации (разведение раствором Хенкса) для последующей трансплантации.

Полученный цифровой материал обрабатывался методом вариационной статистики. Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

## Результаты и обсуждение

Клинические проявления лучевого поражения кожи у крыс развивались не сразу. Только через 8–11 сут после облучения у животных наблюдали в зоне поражения симптомы сухого дерматита. К 12–15-м сут развивался влажный дерматит. К 3–4-ой неделе после воздействия ионизирующей радиации на коже крыс образовывались глубокие язвы, покрытые плотным струпом. Затем происходило постепенное, вяло текущее заживление язв. Процесс заживления лучевых язв четко прослеживался по изменению площади язв: так, на 27-е сут после облучения площадь была  $3,51 \pm 0,11$ ; на 51 сут  $1,81 \pm 0,13$ ; на 71-е сут  $-1,51 \pm 0,09$  и на 83-е сут  $1,20 \pm 0,13$  см<sup>2</sup> ( $M \pm m$ ).

На 84-е сут после воздействия радиации были отобраны 27 крыс (из 40 облученных) с незажившими лучевыми язвами. Эти животные равномерно в соответствии с размерами и клиническим течением язв были распределены в три группы. Двум группам животных трансплантировали ММСК: однократно (на 85-е сут) или двукратно (на 85-е и 93-е сут).

Данные, представленные на рис. 1, показывают, что двукратное введение сингенных ММСК стимулировало заживление длительно незаживающих лучевых язв, что четко прослеживалось в период с 93-е по 111-е сут после облучения. Так, у леченых животных третьей группы площади лучевых язв с 104-е по 111-е сут были достоверно ( $p \leq 0,05$ ) на 52–64 % меньше, чем у облученного контроля.

Важно отметить, что лечебный эффект проявился только при двукратной трансплантации. Известно, что для реализации своего потенциала трансплантированные ММСК должны попасть в соответствующее микроокружение или создать его [8]. По-видимому, первая трансплантация клеток создает благоприятный плацдарм (микроокружение) для реализации при повторной пересадке ММСК своего стимулирующего потенциала. Трансплантированные ММСК могут сформировать достаточно динамичную систему в дермальном слое кожи, состоящую из фибробластов, гистиоцитов, эндотелия, компонентов экстрацеллюлярного матрикса и цитокинов. При этом взаимо-

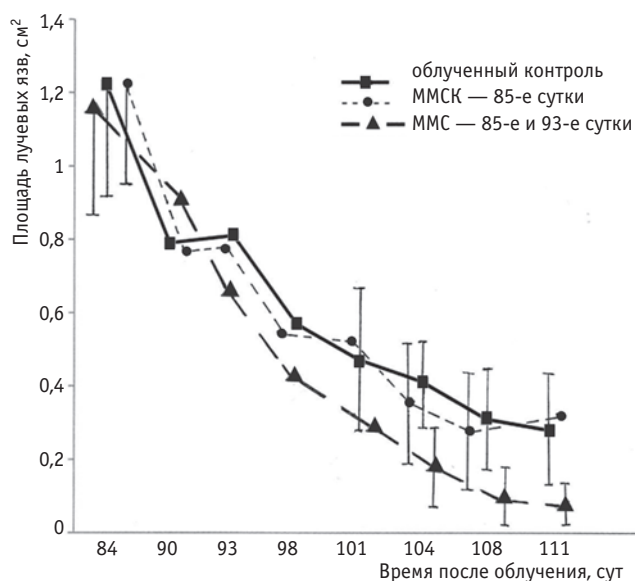


Рис. 1. Динамика процесса заживления лучевой язвы в условиях однократной (на 85-е сут) или двукратной (на 85-е и 93-е сут) трансплантации сингенных ММСК костного мозга в поздний период после облучения. Каждая точка на графиках представлена в виде средней арифметической для каждой группы. Вертикальные линии — доверительные интервалы, вычисленные при  $p = 0,05$

действие ММСК между собой и с другими клетками осуществляется через специфические рецепторы и молекулы адгезии [9–16]. Возможно, что усиление регенерации кожных ран после повторного введения ММСК костного мозга является результатом перепрограммирования мезенхимальными стволовыми клетками функции клеток тканевого микроокружения, способствуя их рекапитуляции (омоложению), усилению секреции регуляторных пептидов и повышению регенераторного потенциала клеток в зоне длительно незаживающих лучевых язв.

## Выводы

Представленные данные показывают, что сингенные ММСК могут быть эффективны при терапии глубоких длительно незаживающих лучевых язв, так как способны в адекватной дозе индуцировать процессы восстановительной регенерации в поврежденной коже. Для получения лечебного эффекта необходима по крайней двукратная (с интервалом в неделю) трансплантация ММСК.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Радиационная медицина. Руководство для врачей-исследователей и организаторов здравоохранения. Под ред. Л.А. Ильина. — М.: ИздАТ, 2001, 2, 432 с.
2. Бушманов А.Ю., Надежина Н.М., Нугис В.Ю., Галстян И.А. Местные лучевые поражения кожи че-

- ловека: возможности биологической индикации дозы (аналитический обзор). // Мед. радиол. и радиац. безопасность, 2005, **50**, № 1, С. 37–47.
3. Селидовкин Г.Д. Медицинская помощь при радиационной аварии с источником цезия-137 в Бразилии (1987). // В кн. «Медицинские аспекты аварии на Чернобыльской атомной станции». — Киев: Здоровье, 1988, С. 180–185.
  4. Мороз Б.Б., Онищенко Н.А., Лебедев В.Г. и соавт. Влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга на течение местных лучевых поражений у крыс после локального  $\beta$ -облучения. // Радиационная биология. Радиоэкология, 2009, **49**, № 6, С. 688–693.
  5. Котенко К.В., Мороз Б.Б., Надежина Н.М. и соавт. Трансплантация мезенхимальных клеток при лечении лучевых поражений кожи. // Патол. физиология и эксперим. терапия, 2011, № 1, С. 2–7.
  6. Котенко К.В., Еремин И.И., Мороз Б.Б. и соавт. Клеточные технологии в лечении радиационных ожогов: опыт ФМБЦ им. А.И. Бурназяна. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, 2012, **7**, № 2, С. 97–102.
  7. Котенко К.В., Мороз Б.Б., Насонова Т.А. и соавт. Экспериментальная модель тяжелых местных лучевых поражений кожи после действия рентгеновского излучения. // Патол. физиология и эксперим. терапия, 2011, № 4, С. 121–123.
  8. Чертков И.Л., Гуревич О.А. Стволовая кроветворная клетка и ее микроокружение. — М.: Медицина, 1984, 238 с.
  9. Clark R.A.F., Nielsen L.D., Welch M.P., McPherson J. Collagen matrices attenuate the collagen-synthetic response of cultured fibroblasts to TGF- $\beta$ . // J. Cell. Sci., 1995, **108**, P. 1251–1261.
  10. Klein G. The extracellular matrix of the hematopoietic microenvironment. // Experientia, 1995, **51**, P. 914–926.
  11. Prockop D.J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. // Science, 1997, **276**, P. 71–74.
  12. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. // Science, 1999, **284**, No. 2, P. 143–147.
  13. Reese J.S., Koc O.N., Gerson S.L. Human mesenchymal stem cells provide stromal support for efficient CD 34+ transduction. // J. Hematother. Stem Cell Res., 1999, **8**, P. 515–523.
  14. Conget P.A., Minguell J.J. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. // J. Cell Physiol., 1999, **181**, P. 67–73.
  15. Cheng L., Qasba P., Vanguri P. et al. Human mesenchymal stem cells support megakaryocyte and proplatelet formation from CD 34+ hematopoietic progenitor cells. // J. Cell Physiol., 2000, **184**, P. 58–69.
  16. Minguell J.J., Erices A., Conget P. Mesenchymal stem cells. // Exp. Biol. Med., 2001, **226**, No. 6, P. 507–520.

Поступила: 03.12.2014

Принята к публикации: 05.02.2015