

В.А. Брунчуков, Т.А. Астрелина, В.А. Никитина, И.В. Кобзева, Ю.Б. Сучкова, Д.Ю. Усупжанова, А.А. Расторгуева, Т.В. Карасева, А.В. Гордеев, О.А. Максимова, Л.А. Наумова, С.В. Лишук, Е.А. Дубова, К.А. Павлов, В.А. Брумберг, А.Е. Махова, Е.Е. Ломоносова, Е.И. Добровольская, И.М. Барабаш, А.Ю. Бушманов, А.С. Самойлов

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ЛЕЧЕНИЕ МЕСТНЫХ ЛУЧЕВЫХ ПОРАЖЕНИЙ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ И ИХ КОНДИЦИОНИРОВАННОЙ СРЕДОЙ

Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва.
Контактное лицо: Астрелина Татьяна Алексеевна t_astrelina@mail.ru

РЕФЕРАТ

Цель: Изучение процессов регенерации при лечении местных лучевых поражений (МЛП) кожи мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) слизистой ткани десны человека, культуральной средой (КС) и концентратом кондиционированной среды (ККС) на лабораторных животных.

Материал и методы: В исследование включено 80 белых крыс-самцов линии Wistar массой 210 ± 30 г в возрасте 8–12 нед, рандомизированных случайным образом на 4 группы (по 20 животных в каждой): контроль (К), животные не получали терапии; контроль с введением концентрата культуральной среды (КС) трехкратно на 1, 14 и 21 сут; введение МСК в дозе 2 млн на 1 кг трехкратно на 1, 14 и 21 сут; введение ККС в расчетной дозе 2 млн клеток на 1 кг трехкратно на 1, 14 и 21 сут. Каждое лабораторное животное наблюдали 17 раз: на 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91, 98, 105, 112-е сут после моделирования ожога. Проводили гистологическое (окраска гематоксилином-эозином) и иммуногистохимическое (CD31, CD68, VEGF) исследования. Моделирование МЛП проводили на рентгеновской установке в дозе 110 Гр. Культивировали МСК по стандартной методике до 3–5 пассажа, осуществляли забор кондиционированной среды и концентрировали ее в 10 раз. Иммунофенотип МСК (CD34, CD45, CD90, CD105, CD73, HLA-DR) и жизнеспособность (7-ADD) определяли с помощью проточной цитофлуориметрии.

Результаты: При планиметрической оценке измененной кожи животных на 7 сут в группе ККС площадь была достоверно больше по сравнению с группами К, МСК, КС ($p \leq 0,05$). В группе КС на 14-е сут площадь открытой раневой поверхности и язвы с 28 до 42-х сут была достоверно меньше по сравнению с группами К, МСК и ККС ($p \leq 0,05$). В группе К с 42 до 77-х сут наблюдения отмечалось увеличение площади язвы кожи по сравнению с группами КС и ККС ($p \leq 0,05$). На 112-е сут полное заживление язвы кожи в группе КС отмечалось у 40 %, в группе МСК – у 60 %, а в группе ККС – лишь у 20 % животных, а в группе К не регистрировалось. Выраженная экспрессия маркера VEGF в эндотелиальных клетках и клетках стромы отмечалась в группах К и КС на 28-е сут и в группах МСК и ККС на 112-е сут.

Заключение: Таким образом, все использованные методы лечения, включая 3-кратное введение КС, МСК и ККС в дозе 2 млн на 1 кг, были эффективны при МЛП кожи и приводили к сокращению площади поражения, ускоренному заживлению язвы, улучшению регенеративных процессов. Кроме того, применение МСК приводило к улучшению васкуляризации и уменьшению воспалительных процессов в очаге лучевого поражения.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, местные лучевые поражения, кондиционированная среда, клеточные технологии, рентгеновское излучение, кожа

Для цитирования: Брунчуков В.А., Астрелина Т.А., Никитина В.А., Кобзева И.В., Сучкова Ю.Б., Усупжанова Д.Ю., Расторгуева А.А., Карасева Т.В., Гордеев А.В., Максимова О.А., Наумова Л.А., Лишук С.В., Дубова Е.А., Павлов К.А., Брумберг В.А., Махова А.Е., Ломоносова Е.Е., Добровольская Е.И., Барабаш И.М., Бушманов А.Ю., Самойлов А.С. Экспериментальное лечение местных лучевых поражений мезенхимальными стволовыми клетками и их кондиционированной средой. Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2020;65(1):5–12.

DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-1-5-12

Введение

Одним из наиболее распространенных видов радиационных повреждений при воздействии ионизирующего излучения являются радиационные ожоги – местные лучевые поражения (МЛП). МЛП возникают на ограниченном участке тела при неравномерном или локальном воздействии на организм ионизирующего излучения в дозах свыше 8 Гр [1]. МЛП кожи часто встречаются при радиационных авариях и инцидентах с источниками ионизирующих излучений.

Согласно проведенным исследованиям, изменения кожи вследствие радиационного поражения в ранний период возникают из-за повреждений стволовых и пролиферирующих клеток эпидермиса вследствие снижения репаративных процессов [2, 3]. Важное значение имеют и повреждения менее радиочувствительных клеточных и тканевых элементов: эндотелия сосудов, фибробластов, эластичной и

гладкомышечной оболочек. Характерной особенностью клинического течения МЛП является большая вероятность появления поздних лучевых осложнений, развивающихся спустя 6 и более месяцев после периода видимого восстановления.

МЛП очень трудно поддаются лечению, консервативные методы лечения незаживающих хронических лучевых язв являются малоэффективными, и нередко требуется хирургическое вмешательство, которое не всегда возможно из-за состояния организма.

Одним из перспективных методов лечения МЛП является клеточная терапия мезенхимальными стволовыми клетками (МСК), а также паракринными факторами, полученными из них. Показано, что применение МСК костного мозга улучшает течение МЛП кожи (уменьшение фиброза, улучшалась организация коллагена) и ускоряет процессы заживления ран [4–6]. Ряд исследователей считает, что клиническая эф-

фективность применения стволовых клеток связана не с самими клетками, а с паракринными факторами, которые секретируются в процессе культивирования стволовых клеток [7–12].

На сегодняшний день альтернативным источником МСК является слизистая ткань десны. МСК слизистой ткани десны идентичны клеткам костного мозга, легко доступны, обладают высоким пролиферативным и регенеративным потенциалом, однако отсутствуют исследования о их применении при лечении МЛП [13–15].

Целью настоящей работы являлось изучение процессов регенерации при лечении МЛП кожи МСК слизистой ткани десны человека и концентратом их кондиционированной среды (ККС) или концентратом культуральной среды (КС) на лабораторных животных.

Материал и методы

В эксперимент включены 80 белых крыс-самцов линии Wistar массой 210 ± 30 г в возрасте 8–12 нед, полученных в специализированном питомнике лабораторных животных «Пушино», имеющих соответствующее ветеринарное свидетельство, прошедших карантин. Исследование одобрено на секции Ученого совета (выписка № 43А от 25.09.2017) и на заседании локального биоэтического комитета (Протокол № 86 от 10.11.2012) ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им А.И. Бурназяна ФМБА России.

Лабораторные животные были рандомизированы случайным образом на 4 группы (по 20 животных в каждой) в зависимости от вида проводимой терапии:

1-ая группа – контроль (К), в которой животные не получали терапию;

2-ая группа – контроль с интрадермальным введением вокруг МЛП 0,4 мл концентрата культуральной среды (КС) трехкратно на 1, 14 и 21-е сут;

3-я группа – интрадермальное введение вокруг МЛП 0,4 мл МСК слизистой десны человека (МСК) в дозе 2 млн на 1 кг трехкратно на 1, 14 и 21-е сут;

4-ая группа – интрадермальное введение вокруг МЛП 0,4 мл концентрата кондиционированной среды (ККС) МСК слизистой десны человека в расчетной дозе 2 млн клеток на 1 кг трехкратно на 1, 14 и 21-е сут.

Каждое лабораторное животное наблюдали 17 раз: на 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91, 98, 105, 112-е сут после моделирования ожога. При осмотре производился мониторинг состояния лабораторного животного с оценкой его поведения, движения, сердечно-сосудистой и/или респираторной функций, изменения аппетита и веса; температуры тела и др. В установленные сутки производили осмотр поверхности кожи и оценивали течение раневого процесса (глубина повреждения кожных покровов, их размеры (длина, ширина), общая площадь измененной кожи, площадь открытой раневой поверхности, наличие отделяемого, пузырей, струпа, слущенного эпидермиса, цвете обнаженной дермы, фибринового налета).

Вывод животных из эксперимента осуществляли на 28, 42, 56, 70, 91 и 112-е сут недели с начала экс-

перимента. Проводили гистологическое и иммуногистохимическое исследование.

Моделирование МЛП

Моделирование МЛП проводили на рентгеновской установке ЛНК-268 (РАП100-10) (ООО «Диагностика-М», Россия) с режимом радиационного воздействия в дозе 110 Гр с алюминиевым фильтром 0,1 мм, напряжением 30 кВп, током пучка 6,1 мА, мощностью дозы 21,4 Гр/мин, неопределенностью измерения дозы $\pm 6\%$ по предложенной ранее методике [7], приводящего к длительно текущим поражениям кожи (язв) у лабораторных животных. После облучения животных рассаживали по индивидуальным стерильным боксам с автономной системой вентиляции Smart Flow (Tecniplast Group, Италия), обеспечивая свободный доступ к воде и еде.

Получение МСК и кондиционированной среды

В эксперименте были использованы неперсонифицированные образцы МСК, находящиеся на длительном криохранении в биобанке. Размороженные МСК (на 3 пассаже) культивировались в среде без ксеногенных компонентов – xeno-free (Stem Cell, Канада) с добавлением 100 Ед/мл пенициллина 100 Ед/мл стрептомицина; 2 мМ глутамин. МСК культивировали до 5 пассажа. Проводили тестирование полученной клеточной суспензии (оценивали количество, иммунофенотип и жизнеспособность).

Забор КС МСК проводили в стерильные пробирки на 3–5 пассаже при достижении 80–90 % конfluence. Для получения ККС использовали лабораторную систему фильтрации в тангенциальном потоке LabScale, разработанную для концентрирования, диафильтрации и микрофильтрации. КС помещали в систему фильтрации в тангенциальном потоке и осуществляли ее концентрирование в 10 раз с установкой входного давления 40–52 psi и выходного давления 8–12 psi. Полученный объем пропускали через нейлоновый шприцевой фильтр с размером пор 0,22 мкм (Corning, США). Для клинического применения расчет дозы введения КС проводили с учетом концентрации клеток.

Иммунологическая характеристика МСК

Иммунофенотип МСК определяли до 5-го пассажа с помощью проточной цитофлуориметрии. Экспрессию поверхностных маркеров оценивали с помощью меченных флуорохромами антител против CD34, CD45, CD90, CD105, CD73, HLA-DR (BD Biosciences и Becton Coulter, США) на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (Becton Dickinson CA, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Жизнеспособность МСК

Жизнеспособность оценивали с помощью красителя 7-ADD, понижающего через цитоплазматическую мембрану клетки и связывающегося с ДНК. Определяли количество 7-ADD позитивных клеток на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (Becton

Dickinson CA, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Планиметрический анализ

Планиметрического анализа фотографий с МЛП кожи лабораторных животных анализировали в программе ImageTool. Задавали необходимый масштаб изображения в программе и рассчитывали площадь выделенного повреждения МЛП кожи животного.

Гистологическое исследование

Материал иссеченных образцов пораженных участков кожи (область раневого дефекта с прилежащей кожей и подлежащими мышцами) фиксировали в 10 %-м нейтральном формалине. Дальнейшая обработка производилась по стандартной общепринятой унифицированной методике. Гистологическое исследование биоптатов проводили с применением стандартной окраски гематоксилин-эозином. Исследование гистологических препаратов проводилось в световом микроскопе при увеличениях от $\times 40$ до $\times 400$.

Иммуногистохимическое исследование

Анализировали следующие маркеры: антиген CD31 – маркер тромбоцитарно-эндотелиальной молекулы адгезии, антиген CD68 – маркер гистиоцитов (макрофагов) и VEGF – маркер эндотелия кровеносных сосудов VEGF, фирмы Roche (Франция). Экспрессия VEGF оценивалась в эндотелиальных клетках сосудов и клетках стромы, в т.ч. воспалительных, в области дна раны полуколичественно в баллах от 0 до 3, где 0 – отсутствие экспрессии, а 3 – выраженная экспрессия.

Статистический анализ результатов проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2007, Statistica 6, ImageTool.

Результаты

При анализе иммунофенотипа МСК с помощью проточной цитометрии во всех культурах клеток была выявлена высокая экспрессия маркеров МСК (CD73, CD90, CD105), маркеры гемопоэтического и лимфоцитарного происхождения отсутствовали (CD34, CD45, HLA-DR). Иммунофенотип соответствовал требованиям Международной организации клеточной терапии, предъявляемым к МСК человека [16]. При дальнейших пассажах клетки в течение нескольких часов прикреплялись к пластиковой поверхности культуральных флаконов и сохраняли высокую пролиферативную активность и жизнеспособность ($98 \pm 1,2\%$ 7-ADD) на протяжении всего периода культивирования.

Планиметрический анализ

На 3-и сут наблюдения после облучения у животных появлялась первичная эритема, сопровождающаяся нарушением нормального тонуса кожи.

На 7-е сут у животных всех групп прослеживались признаки появления демаркационной линии, у 6,25 % из них отмечалось развитие сухого дерматита

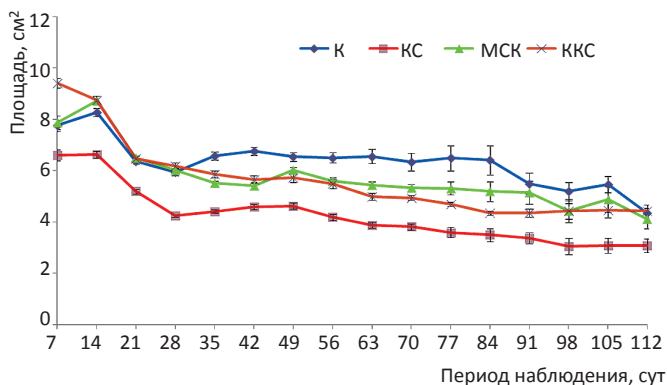


Рис. 1. Динамика площади измененной кожи животных
Fig. 1. Dynamics of skin ulcers in animals

Таблица 1

Площадь общей измененной поверхности
кожи животных при МЛП
The area of the total modified surface of animal skin in MSC

Дни	К	КС	МСК	ККС
14	6,59 ± 0,27	5,19 ± 0,32*	7,16 ± 0,31**	7,06 ± 0,30**
21	3,91 ± 0,19	3,05 ± 0,14*	4,00 ± 0,19**	3,76 ± 0,22**
28	3,40 ± 0,18	1,92 ± 0,13*	2,73 ± 0,13*/**	3,02 ± 0,24**
35	2,54 ± 0,18	1,23 ± 0,16*	2,42 ± 0,20**	2,40 ± 0,24**
42	1,90 ± 0,28	0,55 ± 0,16*	1,85 ± 0,32**	1,90 ± 0,36**
49	2,32 ± 0,33	0,39 ± 0,18*	1,57 ± 0,40**	1,50 ± 0,56
56	3,07 ± 0,51	0,41 ± 0,17*	1,39 ± 0,43*/**	1,29 ± 0,57*
63	3,12 ± 0,67	0,68 ± 0,30*	1,41 ± 0,45*	0,83 ± 0,50*
70	3,20 ± 0,68	0,78 ± 0,35*	1,47 ± 0,46*	0,68 ± 0,39*
77	3,91 ± 0,91	0,94 ± 0,58*	1,74 ± 0,69	0,97 ± 0,47*
84	3,82 ± 0,89	0,90 ± 0,64*	1,95 ± 0,95	0,96 ± 0,42*
91	2,98 ± 0,78	0,93 ± 0,58	2,02 ± 1,05	1,08 ± 0,53
98	2,74 ± 0,62	1,16 ± 0,87	1,08 ± 0,93	0,90 ± 0,56
105	2,40 ± 0,55	1,09 ± 0,71	1,22 ± 1,01	0,92 ± 0,42
112	2,15 ± 0,51	1,04 ± 0,61	0,93 ± 0,74	1,01 ± 0,50

Примечание: * – достоверные различия всех групп по сравнению с контролем (К) ($p \leq 0,05$), ** – достоверные различия МСК и ККС групп по сравнению с группой КС ($p \leq 0,05$)

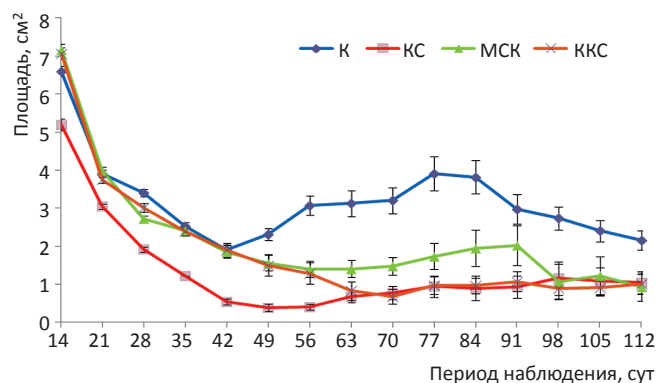


Рис. 2. Динамика развития язв кожи у животных
Fig. 2. Dynamics of skin ulcers in animals

Таблица 2

Площадь язвенной поверхности кожи животных при МЛП**The area of the ulcerative surface of animal skin in MSC**

Дни	К	КС	МСК	ККС
14	6,59 ± 0,27	5,19 ± 0,32*	7,16 ± 0,31**	7,06 ± 0,30**
21	3,91 ± 0,19	3,05 ± 0,14*	4,00 ± 0,19**	3,76 ± 0,22**
28	3,40 ± 0,18	1,92 ± 0,13*	2,73 ± 0,13**	3,02 ± 0,24**
35	2,54 ± 0,18	1,23 ± 0,16*	2,42 ± 0,20**	2,40 ± 0,24**
42	1,90 ± 0,28	0,55 ± 0,16*	1,85 ± 0,32**	1,90 ± 0,36**
49	2,32 ± 0,33	0,39 ± 0,18*	1,57 ± 0,40**	1,50 ± 0,56
56	3,07 ± 0,51	0,41 ± 0,17*	1,39 ± 0,43**	1,29 ± 0,57*
63	3,12 ± 0,67	0,68 ± 0,30*	1,41 ± 0,45*	0,83 ± 0,50*
70	3,20 ± 0,68	0,78 ± 0,35*	1,47 ± 0,46*	0,68 ± 0,39*
77	3,91 ± 0,91	0,94 ± 0,58*	1,74 ± 0,69	0,97 ± 0,47*
84	3,82 ± 0,89	0,90 ± 0,64*	1,95 ± 0,95	0,96 ± 0,42*
91	2,98 ± 0,78	0,93 ± 0,58	2,02 ± 1,05	1,08 ± 0,53
98	2,74 ± 0,62	1,16 ± 0,87	1,08 ± 0,93	0,90 ± 0,56
105	2,40 ± 0,55	1,09 ± 0,71	1,22 ± 1,01	0,92 ± 0,42
112	2,15 ± 0,51	1,04 ± 0,61	0,93 ± 0,74	1,01 ± 0,50

Примечание: * – достоверные различия всех групп по сравнению с контролем (К) ($p \leq 0,05$), ** – достоверные различия МСК и ККС групп по сравнению с группой КС ($p \leq 0,05$)

в области облучения. При планиметрической оценке измененной кожи животных на 7-е сут в группе ККС площадь была достоверно больше по сравнению с остальными группами К, МСК, КС ($p \leq 0,05$) (рис. 1, табл. 1).

На 14-е сут у всех животных отмечалось появление влажного дерматита, а также увеличение размеров области пораженной кожи с формированием открытой раневой поверхности. В группе КС площадь открытой раневой поверхности была достоверно меньше по сравнению с другими группами К, МСК и ККС ($p \leq 0,05$) (рис. 2, табл. 2).

На 28-е сут у всех животных зарегистрировано появление отслоившегося некротизированного эпидермиса (язва), покрывающего раневую поверхность кожи. В группе КС площадь язвы была достоверно меньше по сравнению со всеми тремя группами К, МСК и ККС ($p \leq 0,05$) (рис. 3, табл. 2).

До 42-х сут исследования во всех группах отмечалась динамика уменьшения площади язвы кожи животных. Площадь язвы кожи была меньше в группе КС при сравнении с группами К, МСК и ККС ($p \leq 0,05$). В группе К с 42 до 77-е сут наблюдения отмечалось увеличение площади язвы кожи по сравнению с группами КС и ККС ($p \leq 0,05$).

С 91-х сут и до конца наблюдения (112-е сут) статистически достоверных различий по параметрам общая площадь измененной кожи и площадь язвы во всех группах отсутствовали (табл. 1 и 2).

На 112-е сут полное заживление язвы кожи в группе КС отмечалось у 40 %, в группе МСК – у 60 %, в группе ККС – лишь у 20 % животных, а в группе К не было ни одного животного с затянувшейся раневым дефектом. Динамика заживления язвы кожи животных представлена на рис. 3.

Гистологические исследования

В группе К при гистологическом исследовании иссеченных образцов пораженных участков кожи у

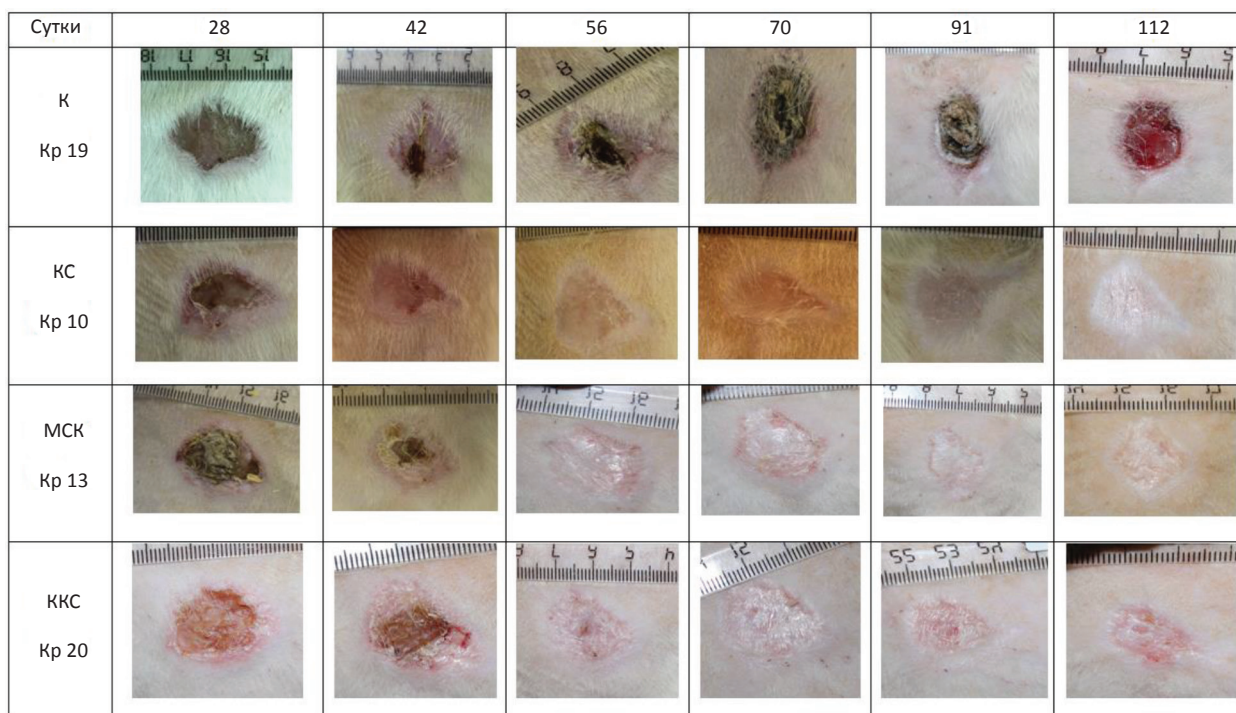


Рис. 3. Динамика заживления язвы у животных
Fig. 3. Dynamics of ulcer healing in animals

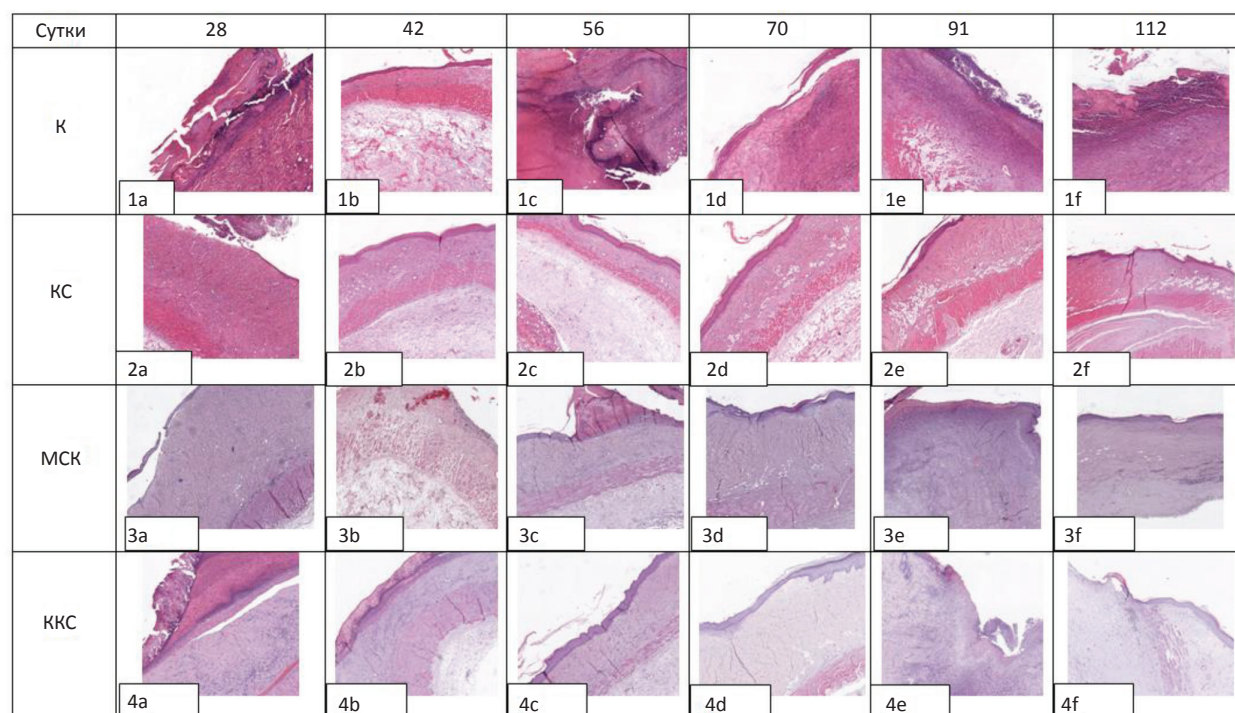


Рис. 4. Гистологическое исследование кожного дефекта животных. Окраска гемоксилин-эозином, увеличение $\times 40$
 Fig. 4. Histological examination of animal skin defects. Hemotoxylin-eosin staining, increase $\times 40$

всех лабораторных животных отмечались гнойно-геморрагические изменения с участками краевой эпителизации на протяжении всего наблюдения (рис. 4, 1a-1f). Воспаление дермы с признаками инфильтрации сохранялось на протяжении всего исследования, при этом фиброз дермы всех образцов отмечался с 42-х сут. Зачатки волосных фолликулов присутствовали у 66 % животных в 28 и 42-е сут исследования, в последующие сутки не выявлялись. Во все сутки наблюдения у животных наблюдали краевое утолщение эпидермиса с явлениями дистрофии эпителиоцитов, иногда с явлениями акантоза и дегенеративными изменениями кератиноцитов. Подкожная мышца в период всего наблюдения была с признаками лимфоцитарной инфильтрации, а начиная с 42-х сут регистрировался фиброз. Слабую пролиферацию сосудов на протяжении эксперимента наблюдали в 61 % образцов.

В группе КС до 56-х сут исследования отмечалось уменьшение гнойно-геморрагической поверхности, покрытой темно-коричневой корочкой. До 70-х сут площадь эпителизированной поверхности не изменялась, а затем в некоторых случаях наблюдались рецидивы (уменьшение площади эпителизации и увеличение гнойно-геморрагических поверхностей). Воспаление дермы с признаками инфильтрации сохранялось на протяжении всего исследования. Волосные фолликулы и их зачатки (1–3 фолликула в поле зрения) начинали активно появляться с 56-х сут и последующие сутки наблюдения. В подкожно-жировой клетчатке и подкожной мышце явления отека и инфильтрации (до 70-х сут) сменялись фиброзированием (с 91-х сут). Краевое утолщение эпидермиса и

дистрофия эпителиоцитов отмечались во всех образцах иссеченной ткани в 28 и 42-е сут и у 33 % образцов в период с 70 по 112-е сут наблюдения.

В группе МСК на протяжении всего исследования сохранялось гнойно-геморрагическое повреждение кожи, уменьшение или отсутствие его с увеличением площади эпителизированной поверхности отмечалось только в 112-е сут наблюдения (рис. 4. 3f). В подлежащей дерме до 56-х сут наблюдали процессы лимфо-плазмочитарной инфильтрации, наличие некрозов и отеков, с 70-х сут отмечали уменьшение этих процессов и фиброз дермы. Воспаление с инфильтрацией и отеком в подкожно-жировой клетчатке и подкожной мышце в исследуемых образцах сохранялось до 70-х сут с последующим очаговым разрастанием соединительной ткани. Отмечались увеличение количества зачатков волосных фолликулов с 56-х сут и до конца наблюдения. Краевое утолщение эпидермиса с вакуольной дистрофией наблюдали на 28, 56, 70 и 91-е сут. Увеличение количества сосудов микроциркуляторного русла отмечали с 70-х сут и до конца наблюдения.

В группе ККС с 28 до 56-х сут наблюдалось гнойно-геморрагическое повреждение кожи. На 70-е сут язвы были полностью эпителизованы, а на 91 и 112-е сут снова наблюдалось формирование язвенных поверхностей. Процессы краевой эпителизации были выявлены на 28-е сут и сохранялись на протяжении всего исследования. Подлежащая дерма во все сутки наблюдения была с признаками фиброза, лимфоцитарной инфильтрации, а так же грануляциями и некрозом. В 28, 42, 56-е сут гистологического исследования в подкожно-жировой клетчатке и под-

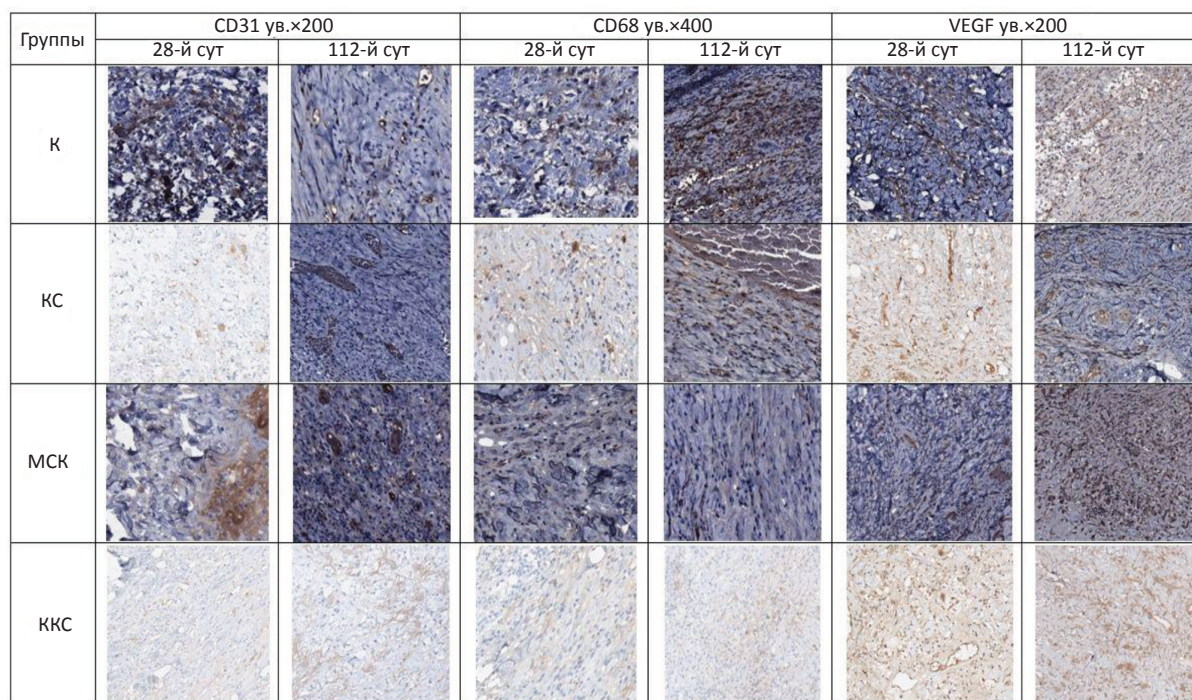


Рис. 5. Иммуногистохимическое исследование кожного дефекта животных
Fig. 5. Immunohistochemical study of animal skin defects

кожной мышце обнаружены инфильтрации и отеки, а в 112-е сут они не выявлены. Волосные фолликулы обнаружены на 91 и 112-е сут наблюдения у 66 % животных. С 70-х сут у всех животных развивалось краевое утолщение эпидермиса и гиперкератоз.

Иммуногистохимическое исследование

Положительная экспрессия маркера VEGF в эндотелиальных клетках и клетках стромы отмечалась при иммуногистохимическом исследовании иссеченных образцов пораженных участков кожи во всех групп животных, а выраженная экспрессия (3 балла) – в группах К и КС на 28-е сут и в группах МСК и ККС на 112-е сут (рис. 5).

В ходе исследования отмечено значительное увеличение количества новообразованных сосудов по данным антигена CD31: на 28-е сут в группе МСК среднее количество сосудов в поле зрения составило $6,0 \pm 1,2$, а на 112-е сут – $12,75 \pm 2,1$ ($p \leq 0,05$), в группе ККС – $19,10 \pm 1,1$ и $28,6 \pm 2,7$ соответственно ($p \leq 0,05$).

При иммуногистохимическом исследовании определяли маркер макрофагов CD68. Статистически значимое увеличение количества макрофагов выявлено в контрольной группе с 28 до 112-е сут ($11,7 \pm 1,4$ и $24,73 \pm 2,4$ ($p \leq 0,05$)), а в группе КС уменьшение – $22,1 \pm 1,6$ и $13,07 \pm 1,8$ соответственно ($p \leq 0,05$).

Обсуждение

Известно, что цикл обновления клеток эпидермиса в зависимости от их расположения варьирует от 4–5 до 14–20-х сут, поэтому кожа является радиочувствительным органом («Закон Бергонье-Трибондо»).

Длительный и болезненный период заживления язв при МЛП кожи вероятно связан с гибелью клеток базального слоя эпидермиса, включающего основную массу стволовых клеток и около 70 % всех пролиферирующих клеток кожи [2, 3]. Применение клеточной терапии направлено на восстановление погибших базальных клеток, волосных фолликулов и фибробластов.

При сравнительном анализе с контрольной группой (К) начиная с 42-х сут исследования наблюдали тенденцию уменьшения площади язвы кожи животных во всех группах (КС, МСК и ККС) (рис. 2), несмотря на то, что не во все сутки статистические значимые различия были выявлены (табл. 2).

Наибольшее количество случаев полного заживления язвы кожи у животных после МЛП к концу периода наблюдения (112-е сут) было выявлено в группе МСК и отмечалось в группах КС и ККС, но не в группе К (рис. 3).

По данным гистологического исследования отмечали уменьшение воспалительных процессов и фиброза дермы, увеличение количества зачатков волосных фолликулов и количества сосудов микроциркуляторного русла в группе МСК в отличие от других групп, в которых эти изменения были не столь заметны. В то же время в группах МСК и ККС отмечалась выраженная экспрессия маркера VEGF в эндотелиальных клетках и клетках стромы. Более того, при оценке маркера CD31 в нашем исследовании показано увеличение абсолютного количества сосудов микроциркуляторного русла в группах ККС и МСК. Все эти данные могут свидетельствовать об интенсивных регенеративных процессах и успешном

заживление ран после применения МСК и концентрата их кондиционированной среды.

У всех животных в ходе исследования определялась экспрессия макрофагов CD68, что согласуется с нашими результатами планиметрического анализа о воспалении в очаге поражения. Интересно, что использование концентрата культуральной среды значительно уменьшало количество макрофагов в язве кожи, что может быть связано как со снижением воспалительного процесса, так и отсутствием адекватного иммунного ответа.

Заключение

Таким образом, все использованные методы лечения, включая трехкратное введение МСК, концентратов культуральной и кондиционированной среды в дозе 2 млн на 1 кг были эффективны при МЛП кожи и приводили к сокращению площади поражения, ускоренному заживлению язвы, улучшению регенеративных процессов. Кроме того, применение мезенхимальных стволовых клеток слизистой десны человека приводило к улучшению васкуляризации и уменьшению воспалительных процессов в очаге лучевого поражения.

Experimental Treatment of Radiation Skin Lesions with Mesenchymal Stem Cells and Their Conditioned Media

V.A. Brunchukov, T.A. Astrelina, V.A. Nikitina, I.V. Kobzeva, Yu.B. Suchkova, D.Yu. Usupzhanova, A.A. Rastorgueva, T.V. Karaseva, T.V. Gordeev, O.A. Maxsimova, L.A. Naumova, S.V. Lischuk, E.A. Dubova, K.A. Pavlov, V.A. Brumberg, A.E. Makhova, E.E. Lomonosova, E.I. Dobrovol'sskaya, I.M. Barabash, A.Yu. Bushmanov, A.S. Samoilov

A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia.
E-mail: t_astrelina@mail.ru

ABSTRACT

Purpose: To study the regeneration processes in the treatment of radiation skin lesions with the mesenchymal stem cells (MSC) derived from human gingiva and their conditional medium concentrate (CCM) during animal studies.

Material and methods: The study includes 80 white male Wistar rats weighing 210 ± 30 g at the age of 8–12 weeks, randomized into 4 groups (20 animals in each): control group (C), animal did not receive treatment; control with the introduction of the conditional medium concentrate (CCM) three times on days 1, 14 and 21; the introduction of MSC in a dose of 2 million cells per 1 kg three times on days 1, 14 and 21; the introduction of CCM in the estimated dose of 2 million cells per 1 kg three times on days 1, 14 and 21. Radiation burn simulation was performed (using on an X-ray unit at a dose of 110 Gy) and each animal was observed 17 times: at days 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91, 98, 105 and 112. Histological (stained with hematoxylin-eosin) and immunohistochemical (CD31, CD68, and VEGF) studies were performed. MSC was cultivated according to the standard procedure up to passages 3–5, the conditioned medium was collected and concentrated 10 times. The MSC immunophenotype (CD34, CD45, CD90, CD105, CD73, HLA-DR) and viability (7-ADD) were determined using flow cytometry.

Results: Under the assessment of the animal skin on the day 7 in the CCM group, the area was significantly larger compared to the C, MSC, CM groups ($p \leq 0.05$). In the CM group on the day 14 the area of the open wound surface and ulcers from day 28 to day 42 was significantly less, compared with the C, MSC and CCM groups ($p \leq 0.05$). In group C, from 42 to 77 days of observation, an increase in the area of skin ulcers was observed compared with the CM and CCM groups ($p \leq 0.05$). On the day 112, healing of skin ulcers in the CM group was observed in 40 %, in the MSC group in 60 %, and only in 20 % of animals in the CCM group, and in the C group it was not registered. Expression of VEGF marker on endothelial cells and stromal cells was observed in groups C and CM on day 28 and in groups MSCs and CCM on day 112. On the 28th day in the MSC group, the average number of vessels (CD31) in the field of view was 6.0, and on day 112 it was 12.75, $p \leq 0.05$, in the CCM group – 19.10 and 28.6, respectively, $p \leq 0.05$. An increase in the number of macrophages (CD68) was found in group C from 28 to 112 days (11.6 and 24.73, $p \leq 0.05$), and in the CM group the decrease was 22.1 and 13.07, respectively, $p \leq 0.05$.

Conclusion: Thus, all used treatment modes of radiation skin lesions, including 3-fold administration of CM, MSC and CCM at a dose of 2 million cells per 1 kg, were effective and resulted in a reduction in the damage area, accelerated ulcer healing, and improvement of the regenerative processes. In addition, the use of MSCs led to the improvement of inflammatory processes' vascularization and reduction in the radiation skin lesions.

Key words: mesenchymal stem cells, radiation skin lesions, conditioned medium, cellular technologies, X-rays, skin

For citation: Brunchukov VA, Astrelina TA, Nikitina VA, Kobzeva IV, Suchkova YuB, Usupzhanova DYU, Rastorgueva AA, Karaseva TV, Gordeev TV, Maxsimova OA, Naumova LA, Lischuk SV, Dubova EA, Pavlov KA, Brumberg VA, Makhova AE, Lomonosova EE, Dobrovol'sskaya EI, Barabash IM, Bushmanov AYU, Samoilov AS. Experimental Treatment of Radiation Skin Lesions with Mesenchymal Stem Cells and Their Conditioned Media. Medical Radiology and Radiation Safety. 2020;65(1):5–12. (In Russ.).

DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-1-5-12

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Радиационная медицина. Руководство для врачей-исследователей и организаторов здравоохранения. Под ред. Л.А. Ильина. М.: ИздАТ. 2001;(2):432 [Radiation Medicine. A Guide for Medical Researchers and Health Care Organizers. Ed. LA Ilyin. Moscow: Izdat. 2001;(2):432 (In Russ.)].
2. Howpel JW, Coggle JE, Wells J, et al. The acute effects of different energy beta-emitters on pig and mouse skin. *Drit J Radiobiology*. 1968;(190):47-51.
3. Осанов ДП. Дозиметрия и радиационная биофизика кожи. М.: Энергоатомиздат. 1983. 152 с. [Osanov DP. Dosimetry and Radiation Biophysics of the Skin. M.: Energoatomizdat. 1983:152 (In Russ.)].
4. Zheng K, Wu W, Jang S, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell implantation for the treatment of radioactivity-induced acute skin damage in rats. *Molecular Medicine Reports*. 2015;12:7065-71.
5. Мороз ББ, Онищенко НА, Лебедев ВГ, и др. Влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга на течение местных лучевых поражений у крыс после локального β -облучения. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2009;49(6):688-93. [Moroz BB, Onishchenko NA, Lebedev VG, et al. Influence of multipotent mesenchymal bone marrow stromal cells on local radiation injury in rats after local β -irradiation. *Radiation Biology. Radioecology*. 2009;49(6):688-93 (In Russ.)].
6. Котенко КВ, Еремин ИИ, Мороз ББ, и др. Клеточные технологии в лечении радиационных ожогов: опыт ФМБЦ им. А.И. Бурназяна. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2012;7(2):97-102. [Kotenko KV, Eremin LI, Moroz BB, et al. Cell technologies in the treatment of radiation burns: experience of the Burnasyan Federal Medical Biophysical Centre. *Cell Transplantation and Tissue Engineering*. 2012;7(2):97-102 (In Russ.)].
7. Темнов АА, Астрелина ТА, Рогов КА, и др. Исследование влияния факторов кондиционированной среды, полученной при культивировании мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, на течение тяжелых местных лучевых поражений кожи у крыс. *Медицинская радиология и радиационная безопасность*. 2018;63(1):35-9. [Temnov AA, Astrelina TA, Rogov KA, et al. Investigation of the influence of the conditioning medium factors obtained during the cultivation of bone marrow mesenchymal stem cells on the course of severe local radiation injuries of skin in rats. *Medical Radiology and Radiation Safety*. 2018;63(1):35-9. (In Russ.)].
8. Kim HS, Choi DY, Yun SJ, et al. Proteomic analysis of microvesicles derived from human mesenchymal stem cells. *J Proteome Res*. 2012;11(2):839-49.
9. Daltro PS, Barreto BC, Silva PG, et al. Therapy with mesenchymal stromal cells or conditioned medium reverse cardiac alterations in a high-fat diet-induced obesity model. *The International Society for Cellular Therapy Position Statement Cytotherapy*. 2017;19:1176-88.
10. Gnechi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cells signaling and therapy. *Circ Res*. 2008;103:1204-19.
11. Lee C, Shim S, Jang H, et al. Human umbilical cord blood derived mesenchymal stromal cells and small intestinal submucosa hydrogel composite promotes combined radiation-wound healing of mice. *The International Society for Cellular Therapy Position Statement Cytotherapy*. 2017;19(9):1048-59.
12. Öksüz S, Şahin Alagöz M, Karagöz H, et al. Comparison of treatments with local mesenchymal stem cells and mesenchymal stem cells with increased vascular endothelial growth factor expression on irradiation injury of expanded skin. *Ann Plast Surg*. 2015;75:219-30.
13. Mitrano TI, Grob MS, Carrión F, et al. Culture and Characterization of Mesenchymal Stem Cells From Human Gingival Tissue. *Journal of Periodontology*. 2010;81:917-25.
14. Zhang QZ, Nguyen AL, Yu WH, Le AD. Human oral mucosa and gingiva: a unique reservoir for mesenchymal stem cells. *J Dent Res*. 2012;91(11):1011-8.
15. Duan HG, Ji F, Zheng CQ, et al. Conditioned medium from umbilical cord mesenchymal stem cells improves nasal mucosa damage by radiation. *Biotechnol Lett*. 2018;40(6):999-1007.
16. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *The International Society for Cellular Therapy Position Statement. Cytotherapy*. 2006;8:315-7.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Федеральной целевой программы «Обеспечение ядерной и радиационной безопасности на 2016–2020 гг. и на период до 2030 г.». Планируется серия публикаций по результатам проведенных исследований.

Financing. The study was financially supported by the Federal Target Program “Ensuring Nuclear and Radiation Safety for 2016–2020. and for the period until 2030”. A series of publications is planned based on the results of the studies.

Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов.

Contribution: Article was prepared with equal participation of the authors.

Соблюдение правил биоэтики. Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.

Compliance with the rules of bioethics. The study was performed in accordance with the ethical standards for the treatment of animals adopted by the European Convention for the protection of vertebrates used for research and other scientific purposes.

Поступила: 12.10.2018. **Принята к публикации:** 11.12.2019

Article received: 12.10.2018. **Accepted for publication:** 11.12.2019