

А.А. Расторгуева, Т.А. Астрелина, В.А. Брунчуков, Д.Ю. Усупжанова, И.В. Кобзева,
В.А. Никитина, С.В. Лищук, Е.А. Дубова, К.А. Павлов, В.А. Брумберг, А.С. Самойлов

СРАВНЕНИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КРЫС И ЧЕЛОВЕКА И ИХ КОНДИЦИОНИРОВАННЫХ СРЕД ПРИ МЕСТНЫХ ЛУЧЕВЫХ ПОРАЖЕНИЯХ

Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва

Контактное лицо: Татьяна Алексеевна Астрелина: t_astrelina@mail.ru

РЕФЕРАТ

Цель: Сравнить результаты применения мезенхимальных стромальных клеток (МСК) слизистой ткани десны человека и МСК слизистой ткани десны крысы, их кондиционированных сред и оценить их влияние на регенерацию тканей при местных лучевых поражениях (МЛП).

Материал и методы: В исследование включено 120 белых крыс-самцов линии Wistar массой 210 ± 30 г в возрасте 8–12 нед, рандомизированных на 6 групп (по 20 животных в каждой): контроль (К), животные не получали терапию; контроль с введением концентрата культуральной среды (КС) трехкратно на 1, 14, 21 сут; введение МСК слизистой десны человека (ДЧ) в дозе 2 млн на 1 кг трехкратно на 1, 14, 21 сут; введение концентрата кондиционированной среды МСК слизистой десны человека (ДЧКС) в расчетной дозе 2 млн клеток на 1 кг трехкратно на 1, 14, 21 сут; введение МСК слизистой десны крысы (ДК) в дозе 2 млн на 1 кг трехкратно на 1, 14, 21 сут; введение концентрата кондиционированной среды МСК слизистой десны крысы (ДККС) в расчетной дозе 2 млн клеток на 1 кг трехкратно на 1, 14, 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, PGP 9.5, MMP2,9, Collag 1, TIMP 2) 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 сравнительном анализе с контрольной группой (К) начиная с 42-го дня исследования наблюдали тенденцию уменьшения площади язвы кожи животных во всех группах, несмотря на то, что не во все дни статистически значимые различия были выявлены. На 112-е сут полное заживление язвы кожи в группе КС отмечалось у 40 % животных в группе ДЧ – у 60 %, в группе ДЧКС – у 20 % животных, в группе ДККС – 20 %, а в группах К и ДК не было ни одного животного с затянувшейся раневым дефектом.

Положительная экспрессия маркера VEGF отмечалась в группах К и КС на 28-е сутки и в опытных группах (ДЧ, ДЧКС, ДК, ДККС) на 112-е сутки. Статистически значимое увеличение маркера CD68 отмечено в группах К, ДК и ДККС, а в остальных группах отмечено уменьшение количества макрофагов.

Заключение: Таким образом, все использованные методы лечения, включая введение МСК, концентратов культуральной и кондиционированных сред 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 стромальных клеток слизистой ткани десны человека приводило к улучшению васкуляризации и уменьшению воспалительных процессов в очаге лучевого поражения в большей степени, чем введение аналогичных клеток, полученных от крысы.

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

Для цитирования: Расторгуева А.А., Астрелина Т.А., Брунчуков В.А., Усупжанова Д.Ю., Кобзева И.В., Никитина В.А., Лищук С.В., Дубова Е.А., Павлов К.А., Брумберг В.А., Самойлов А.С. Сравнение терапевтического потенциала мезенхимальных стромальных клеток крыс и человека и их кондиционированных сред при местных лучевых поражениях // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2021. Т. 66. № 4. С.5–12.

DOI: 10.12737/1024-6177-2021-66-4-5-12

Введение

Благодаря широкому использованию радиоактивных материалов в медицинских, промышленных, сельскохозяйственных, военных и исследовательских целях исследователи пытаются найти новые методы лечения последствий воздействия ионизирующего излучения. Чаще всего воздействию радиации подвергается естественный защитный барьер организма – кожа, которая является радиочувствительным органом, т.к. цикл обновления клеток эпидермиса составляет 4–20 сут. Сложность лечения местных лучевых поражений (МЛП) (длительный и болезненный период заживления) связана с гибелью клеток базального слоя эпидермиса, включающего основную массу стромальных клеток и около 70 % всех пролиферирующих клеток кожи [1–3].

Основное лечение МЛП направлено на восстановление погибших базальных клеток, волосяных фолликулов и фибробластов [4]. Одним из направлений лечения кожных ран в настоящее время является использование клеточных технологий применения мезенхимальных стромальных клеток (МСК) и их продуктов, в частности

кондиционированной среды МСК. МСК отличаются низкой иммуногенностью, что позволяет проводить их аллогенную трансплантацию [5]. Хорошо известно, что продуцируемые клетками цитокины могут регулировать по принципу обратной связи функциональный статус и активность как тех клеток, которые их синтезируют, так и окружающих клеток (аутокринные и паракринные эффекты). Паракринные факторы, выделяемые МСК (кондиционированная среда), обеспечивают пролиферативную и репаративную функцию клеток в системах клеточного обновления [6–8].

На сегодняшний день известно несколько источников мезенхимальных стромальных клеток, например, пуповинная кровь, жировая ткань, костный мозг и др. Интересным источником МСК является слизистая ткань десны. Слизистая ткань десны – это легко доступный источник МСК, обладающий высоким пролиферативным и регенеративным потенциалом. Результаты применения МСК слизистой ткани десны при лечении МЛП мало изучены, единичны [1, 6, 8], исходя из чего представленное исследование является актуальным.

Целью настоящего исследования являлось сравнение результатов применения мезенхимальных стромальных клеток (МСК) слизистой ткани десны человека (ДЧ) и МСК слизистой ткани десны крысы (ДК), их кондиционированных сред и оценка их влияния на регенерацию тканей при МЛП.

Материал и методы

Планирование эксперимента. В исследование включены 120 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 было одобрено на заседании секции Ученого совета (выписка № 43А от 25.09.2017) и локальным биоэтическим комитетом (Протокол № 86 от 10.11.2012) ФМБЦ им А.И. Бурназяна ФМБА России.

Лабораторные животные были разделены на 6 групп по 20 крыс в каждой:

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

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

3-я группа – интрадермальное введение 0,4 мл МСК слизистой ДЧ в дозе 2 млн на 1 кг трехкратно на 1, 14, 21 сут вокруг МЛП;

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

5-ая группа – интрадермальное введение 0,4 мл МСК слизистой ДК в дозе 2 млн на 1 кг трехкратно на 1, 14, 21 сут вокруг МЛП;

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

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 радиационного ожога. При осмотре проводился мониторинг состояния лабораторного животного с оценкой его поведения, движений, сердечно-сосудистой и/или респираторной функций, изменения аппетита и веса; температуры тела; состояния поверхности кожи и течения раневого процесса (глубина повреждения кожных покровов, их размеры (длина, ширина), общая площадь измененной кожи, площадь открытой раневой поверхности, наличие отделяемого, пузырей, струпа, слущенного эпидермиса, цвет обнаженной дермы, фибриновый налет).

Вывод животных из эксперимента осуществляли на 28, 42, 56, 70, 91 и 112-е сут с начала эксперимента. 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 ±6 % по предложенной раннее методике, приводящей 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 слизистой десны человека, находящиеся на длительном криохраниении в биобанке и образцы МСК слизистой десны крысы, полученные от самцов белых нелинейных крыс породы Wistar. Все 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 % конfluenceности. Для получения КС 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 (фунтов на дюйм квадратный) 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

Имунофенотип МСК определяли до 5-го пассажа с помощью проточной цитофлуориметрии. Экспрессию поверхностных маркеров оценивали с помощью меченых 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

Фотографии с МЛП кожи лабораторных животных анализировали в программе ImageTool. Для расчета площади выделенного повреждения МЛП кожи животного задавали необходимый масштаб изображения в программе.

Гистологическое исследование

Материал иссеченных образцов пораженных участков кожи (область раневого дефекта с прилегающей 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 ×40 до ×400.

Иммуногистохимическое исследование

Анализировали следующие маркеры: антиген CD31 – маркер тромбоцитарно-эндотелиальной молекулы адгезии, антиген CD68 – маркер гистиоцитов (макрофагов) и VEGF – маркер эндотелия кровеносных сосудов,

Таблица 1

Динамика заживления МЛП у лабораторных животных, в см²
Dynamics of LRI healing in laboratory animals, in cm²

Сутки	14	21	42	56	77	91	112
К	6,59±0,27	3,91±0,19	1,90±0,28	3,07±0,51	3,91±0,91	2,98±0,78	2,15±0,51
КС	5,19±0,32(*)	3,05±0,14(*)	0,55±0,16(*)	0,41±0,17(*)	0,94±0,58*	0,93±0,58	1,04±0,61
ДЧ	7,16±0,31(**)	4,00±0,19(**)	1,85±0,32(**)	1,39±0,43*/**	1,74±0,69	2,02±1,05	0,93±0,74
ДЧКС	7,06±0,30(**)	3,76±0,22(**)	1,90±0,36(**)	1,29±0,57*	0,97±0,47*	1,08±0,53	1,01±0,50
ДК	7,31±0,37	5,30±0,23	2,45±0,26	2,03±0,54	3,00±1,13	2,69±0,53	2,91±0,71
ДККС	6,96±0,18	5,11±0,18	1,62±0,30	1,25±0,55	1,43±0,65	1,75±0,63	3,45±0,92

Примечание: * – достоверные различия по сравнению с контролем (К) ($p \leq 0,05$),
** – достоверные различия по сравнению с группой КС ($p \leq 0,05$),
(*) – достоверные различия по сравнению с контролем (К) ($p \leq 0,01$),
(**) – достоверные различия по сравнению с группой КС ($p \leq 0,01$)

антиген PGP 9.5 – маркер повреждения нервов, MMP 2,9 – матриксные металлопротеиназы, разрушающие белки (преимущественно коллаген) внеклеточного матрикса, уровень коллагена 1, входящего в состав соединительной ткани и кожи, антиген TIMP 2 – тканевой ингибитор металлопротеиназ (Roche, Франция). Экспрессия VEGF, PGP 9.5, MMP 2,9, Collag 1, TIMP 2 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 Оценка МСК

При анализе иммунофенотипа МСК на 4 пассаже с помощью проточной цитометрии во всех культурах клеток выявлялась 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 [9]. При дальнейших пассажах клетки в течение нескольких часов прикреплялись к пластиковой поверхности культуральных флаконов и сохраняли высокую пролиферативную активность и жизнеспособность (98±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 24,25 % из них отмечалось развитие сухого дерматита в области облучения. При планиметрической оценке измененной кожи животных на 7-е сут в группах ДЧКС и ДККС площадь была достоверно больше по сравнению с остальными группами К, КС, ДЧ, ДК ($p \leq 0,05$) (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, покрытой плотным струпом. Вокруг раны определялась зона перифокального воспаления, некротический эпидермис ограничивался демаркационной линией. В группе КС площадь открытой раневой поверхности была достоверно меньше по сравнению с другими группами К, ДЧ, ДЧКС, ДК, ДККС ($p \leq 0,05$) (табл. 1).

На 21-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 группами К, ДЧ, ДЧКС, ДКС, ДККС ($p \leq 0,05$) (табл. 1).

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 остальными группами ($p \leq 0,05$).

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

На 112-е сут полное заживление язвы кожи в группе КС отмечалось у 40 %, в группе ДЧ – у 60 %, в группе ДЧКС – лишь у 20 % животных, в группе ДККС – 20 %, а в группах К и ДК не было ни одного животного с затянувшейся раневой дефектом (табл.1, рис. 1, 2).

Гистологические исследования

В группе К при гистологическом исследовании иссеченных образцов пораженных участков кожи у всех лабораторных животных отмечались гнойно-геморрагические изменения с участками краевой эпителизации на протяжении всего наблюдения. Воспаление дермы с признаками инфильтрации сохранялось на протяжении всего исследования, при этом фиброз дермы всех образцов отмечался с 42-х сут. Зачатки волосяных фолликулов присутствовали у 66 % животных в 28 и 42-е сут исследования, в последующие сут 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 (рис. 3).

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. Волосяные фолликулы и их зачатки (1–3 фолликула в поле зрения) начинали активно появляться с 56-х сут и последующие сут наблюдения. В подкожно-жировой клетчатке и подкожной мышце явления отека и инфильтрации (до 70-х сут) сменялись фиброзированием

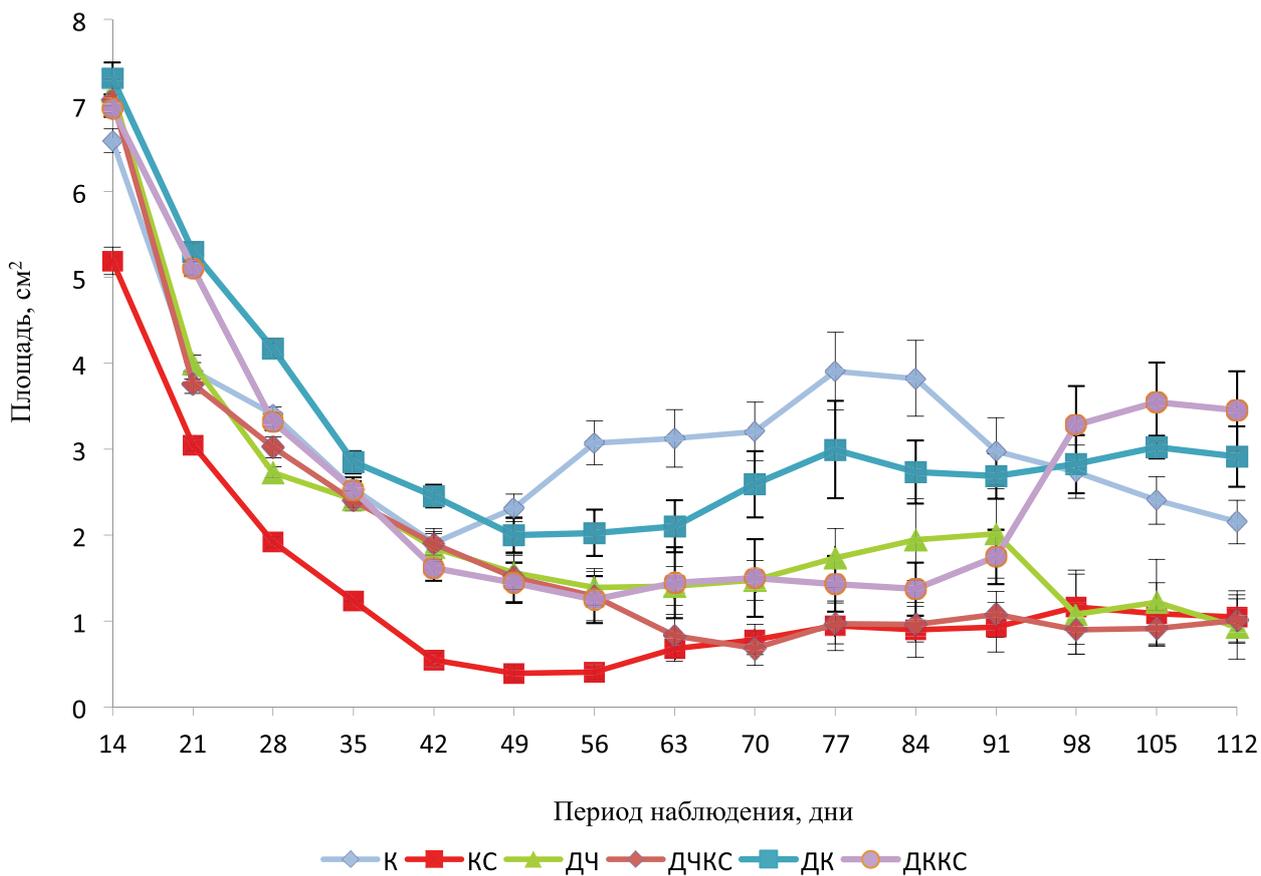


Рис. 1. Динамика заживления МЛП у лабораторных животных
Fig 1. Dynamics of LRI healing in laboratory animals

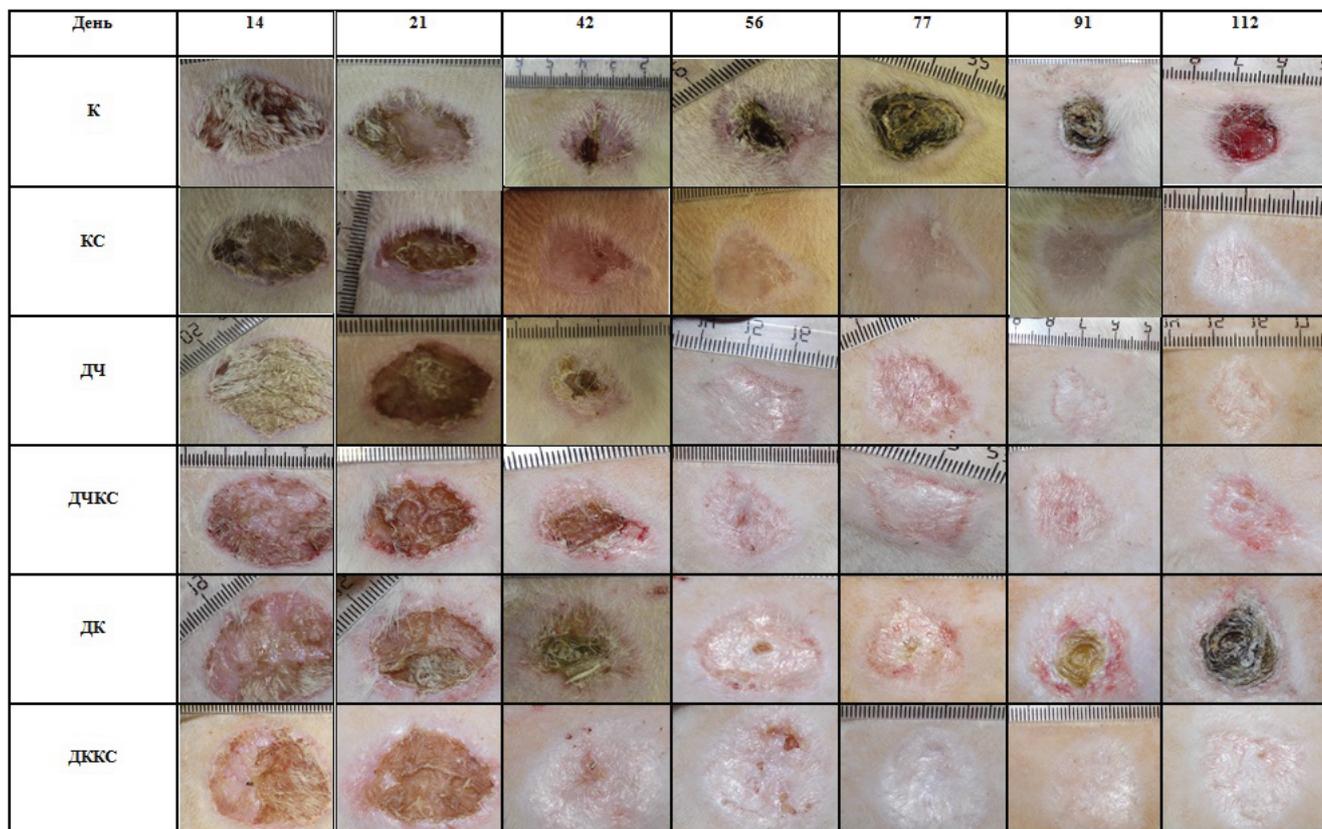


Рис. 2. Динамика заживления МЛП у лабораторных животных
Fig. 2. Dynamics of LRI healing in laboratory animals

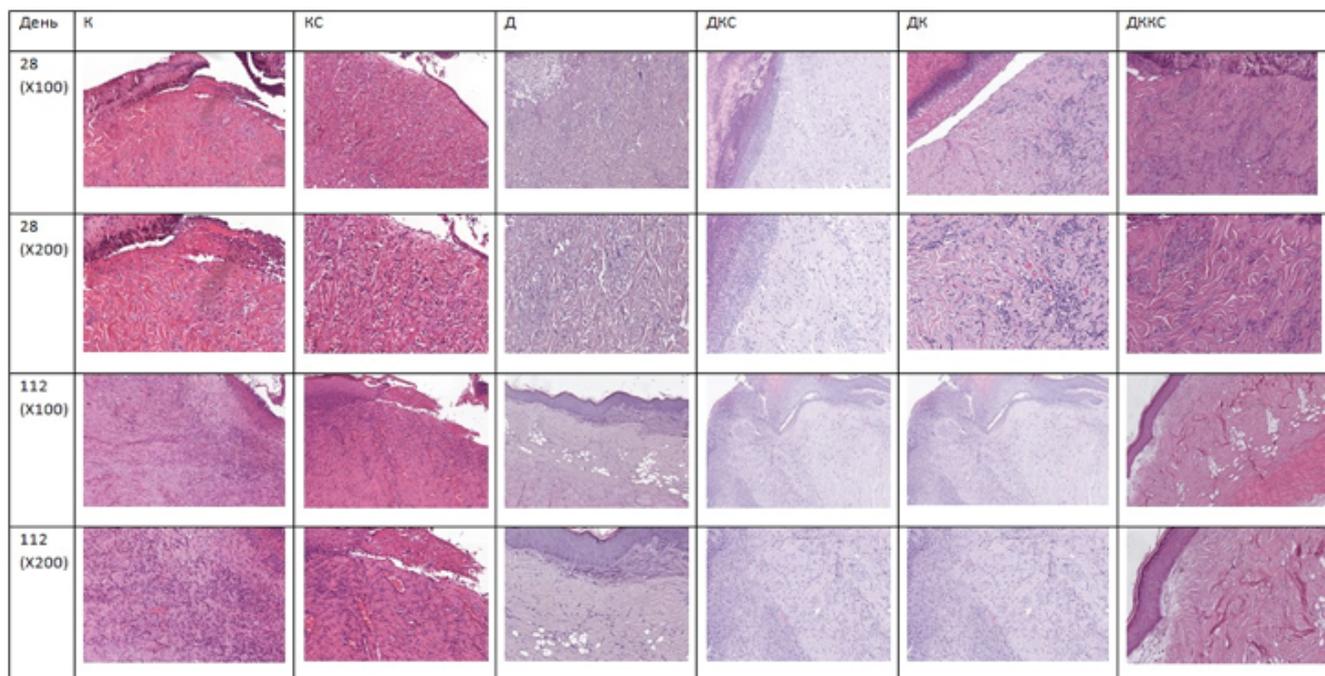


Рис. 3. Морфологические изменения в биоптате кожи с МЛП. Увеличение $\times 100$ и $\times 200$, окраска гематоксилин-эозин
 Fig. 3. Morphological changes in skin biopsy from LRI. Magnification $\times 100$ and $\times 200$, staining with hematoxylin-eosin

(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 (рис. 3).

В группе ДЧ 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. В подлежащей дерме до 56-х сут наблюдали процессы лимфо-плазмоцитарной 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 волосяных 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 суток и до конца наблюдения (рис. 3).

В группе ДЧКС с 28 до 56-х сут наблюдалось гнойно-геморрагическое повреждение кожи. На 70-е сут язвы были полностью эпителизированы, 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 сут наблюдения была с признаками фиброза, лимфоцитарной инфильтрации, а также с грануляциями и некрозом. В 28, 42, 56-е сут гистологического исследования в подкожно-жировой клетчатке и подкожной мышце обнаружены инфильтрации и отеки, а в 112-й день они не выявлены. Волосяные фолликулы обнаружены на 91 и 112 дни наблюдения у 66 % животных. С 70 дня у всех животных развивалось краевое утолщение эпидермиса и гиперкератоз (рис. 3).

В группе ДК 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. В подлежащей дерме до 56-х сут наблюдали процессы лимфо-плазмоцитарной инфильтрации, наличие некрозов и отеков, с 91-х суток отмечали уменьшение этих процессов и фиброз дермы. Воспаление с инфильтрацией и отеком в подкожно-жировой клетчатке и подкожной мышце в исследуемых образцах сохранялось до 91-х сут с последующим очаговым разрастанием соединительной ткани. Краевое утолщение эпидермиса с вакуольной дистрофией наблюдали на 28, 42, 56, 70 и 91-е сут. На 112-е сут отмечался обширный дефект кожи, покрытой гнойно-некротической корочкой, дно дефекта с некротизированными дермой, большой подкожной мышцей, подкожной жировой клетчаткой, по периферии некротизированной ткани – «ободок» из скоплений нейтрофилов, скоплений колоний микроорганизмов, соединительная ткань с участками фиброобразования, с отеком, выраженной лимфо-гистиоцитарной с примесью нейтрофилов инфильтрацией, грануляциями с выраженной пролиферацией микрососудов. Прилежащий к раневому дефекту эпидермис утолщен (до 10–12 слоев клеток) с дегенеративными изменениями кератиноцитов с немногочисленными (до 4–5 клеток в 1 поле зрения) внутри-эпидермальными лимфоцитами.

В группе ДККС с 28 до 56-х сут наблюдалось гнойно-геморрагическое повреждение кожи. На 70-е сут язвы были полностью эпителизированы, 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 сут наблюдения была с признаками фиброза, лимфоцитарной инфильтрации, а также грануляциями и некрозом. В 28, 42, 56-е сут гистологического исследования в подкожно-жировой клетчатке и подкожной мышце обнаружены инфильтрации и отеки, а в 91 и 112 дни они не выявлены. Волосяные фолликулы обнаружены на 70, 91 и 112 дни наблюдения у 66 % животных. С 70 дня у всех животных развивалось краевое утолщение эпидермиса и гиперкератоз. На 112-е сут отмечался обширный дефект кожи, достигающий подкожно-жировой клетчатки, покрытый гнойно-некрот-

Таблица 2

**Экспрессия маркеров в биоптате кожи с МЛП (иммуногистохимическое исследование)
Expression of markers in skin biopsy with LRP (immunohistochemical study)**

Маркер	День	К	КС	ДЧ	ДЧКС	ДК	ДККС
Cd31	28	13,97±2,0	15,87±1,1	6,00±1,2	19,10±1,1	5,53±0,9	12,2±1,6
	112	17,47±1,3	13,1±1,8	12,75±2,1(*)	28,67±2,7(*)	17,87±1,8(*)	12,53±2,4
Cd68	28	11,7±1,4	22,2±1,6	7,7±0,9	24,0±1,7	16,6±2,3	11,4±1,5
	112	24,7±2,4(*)	13,1±1,8(*)	9,8±1,6	20,9±2,5	31,1±3,9(*)	25,7±3,9
PGP 9.5	28	1,97±0,3	1,97±0,3	1,87±0,4	2,03±0,4	2,6±0,4	1,83±0,3
	112	6,47±1,1(*)	5,7±1,0(*)	4,40±0,9	3,03±0,8	2,7±0,5	2,6±0,4
VEGF (эндотелий)	28	2,67±0,3	2,33±0,3	1,67±0,3	2,67±0,3	2,33±0,67	2,0±0,0
	112	2±0,3	1,33±0,3	2,33±0,3	2,67±0,3	2,67±0,33	2,33±0,33
VEGF (стромы)	28	2,33±0,3	2,0±0	1,0±0,0	2,67±0,3	1,67±0,33	1,33±0,33
	112	1,33±0,3	1,0±0	1,67±0,3	2,0±0,3	2,33±0,67	2,67±0,33
MMP 2	28	3,0±0	3,0±0	2,0±0	3,0±0,0	2,33±0,33	2,67±0,33
	112	2,33±0,3	2,0±0	2,33±0,3	1,33±0,33	2,67±0,33	3,00±0,00
MMP 9	28	3,0±0	2,33±0,3	2,0±0,58	3,0±0	2,67±0,33	3,00±0,00
	112	1,67±0,7	1,0±0	1,33±0,3	1,67±0,67	1,67±0,33	1,67±0,33
Collag I	28	1,0±0	1,33±0,3	1,0±0	2,0±0	1,33±0,33	1,33±0,33
	112	2,0±0	2,0±0	2,0±0	2,33±0,3	2,67±0,00	2,33±0,33
TIMP 2	28	1,0±0	1,33±0,3	1,67±0,3	1,33±0,3	1,67±0,33	2,00±0,00
	112	2,33±0	2,0±0	2,33±0,3	2,0±0,58	2,67±0,33	2,00±0,58

Примечание: (*) – $p \leq 0,05$

тической корочкой, дно и края его представлены соединительной тканью и поперечно-полосатой мышечной тканью с фиброзированием, грануляциями, выраженной пролиферацией сосудов микроциркуляторного русла, выраженной лимфоплазмозитарной с примесью нейтрофилов инфильтрацией. Прилежащий эпидермис был утолщен до 6–7 слоев клеток, с признаками выраженной дистрофии с немногочисленными (до 3 клеток в 1 поле зрения) внутриэпидермальными лимфоцитами (рис. 3).

Таким образом, моделированное МЛП у лабораторных животных контрольной группы (К), группе с МСК десны крысы (группа ДК) и группе с концентратом кондиционированной среды МСК десны крысы (группа ДККС) протекало по типу неполной регенерации с образованием рубцовой ткани, и на протяжении почти всех сроков наблюдения сохранялась полиморфноклеточная воспалительная инфильтрация. Применение МСК слизистой ткани десны человека (группа ДЧ) и также концентрата кондиционированной среды МСК десны человека (ДЧКС) приводило к ускорению образования грануляционной ткани и ускорению сроков заживления.

Иммуногистохимическое исследование

Также при иммуногистохимическом исследовании определяли маркер макрофагов CD68. Статистически значимое увеличение количества макрофагов выявлено в контрольной группе (К) и группе ДК с 28 по 112-е сут – 11,7±1,4 и 24,73±2,4, ($p \leq 0,05$) и, 16,6±2,3 и 31,1±3,9, ($p \leq 0,05$) соответственно, а в группе КС уменьшение – 22,1±1,6 и 13,07±1,8 ($p \leq 0,05$). (табл. 2).

В ходе исследования отмечено значительное увеличение количества новообразованных сосудов по данным антигена CD31: на 28-е сут в группе ДЧ среднее количество сосудов в поле зрения составило 6,0±1,2, а на 112-е сут – 12,75±2,1 ($p \leq 0,05$), в группе ДЧКС – 19,10±1,1 и 28,6±2,7 ($p \leq 0,05$), в группе ДК – 5,53±0,9 и 17,87±1,8 ($p \leq 0,05$) соответственно.

Уровень маркера ранней дифференциации нейронов PGP 9.5 повышался в контрольных группах (К, КС) практически в 3 раза (с 28 по 112-е сут, $p \leq 0,05$).

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 опытных группах (ДЧ, ДЧКС, ДК, ДККС) на 112-е сут (табл. 2).

Было отмечено снижение экспрессии маркера MMP 2 во всех группах, что возможно свидетельствует о повреждении тканей и воспалительных процессах на протяжении всего процесса регенерации.

Во всех группах отмечалось снижение экспрессии маркера MMP 9.

Увеличение количества коллагена 1 наблюдалось во всех группах, что свидетельствует о процессах регенерации кожи.

Уровень маркера TIMP 2 во всех группах повышался с 28 до 112-х сут, кроме группы ДККС, в которой его уровень оставался неизменным, что демонстрирует подавление пролиферации эндотелиальных клеток (за счет ингибирования MMP) во всех группах, кроме ДККС.

Обсуждение

Местные лучевые поражения, впервые описанные еще в 1895 г., являются самым первым выявленным видом радиационных поражений человека. Поэтому на протяжении многих десятилетий проблема лечения МЛП, связанная с радиационно-индуцированными кожными реакциями, находится в центре внимания врачей и радиобиологов.

Применение клеточной терапии направлено на восстановление погибших базальных клеток, волосяных фолликулов и фибробластов, снижение воспалительных процессов в дерме, привлечение собственных клеток организма в очаг поражения для регенерации поврежденной ткани за счет цитокинов МСК [2, 10].

Статистически значимая разница в площадях ожоговых ран отмечалась на 42–56 сут. Наибольшее количество случаев полного заживления язвы кожи животных к концу периода наблюдения (112-е сут.) было выявлено в группе

ДЧ (60 %) и отмечалось в группах КС, ДЧКС и ДККС (40, 20 и 20 % соответственно), но не в группе К и ДК (рис. 2).

На сегодняшний день имеются единичные публикации, касающиеся сравнения регенеративного потенциала МСК крысы и человека [11, 12]. Известно, что МСК человека продуцируют широкий спектр цитокинов [13], но исследования по качественному составу продуцируемых МСК крыс паракринных факторов на сегодняшний день отсутствуют.

По результатам гистологического исследования отмечали уменьшение воспалительных процессов и фиброза дермы, увеличение количества зачатков волосяных фолликулов и количества сосудов микроциркуляторного русла в группе ДЧ в отличие от других групп, в которых эти изменения были не столь заметны. Одновременно с этим, в группах ДЧ, ДК и ДЧКС 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 Д, ДК и ДКС. Во всех группах отмечалась выраженная экспрессия коллагена I-го типа и увеличение уровня белка PGP 9.5. Все эти данные могут свидетельствовать об интенсивных регенеративных процессах и успешном

заживлении ран после применения клеток и концентрата их кондиционированной среды.

В группах лабораторных животных К, ДК и ДККС в ходе исследования отмечалось увеличение экспрессии макрофагов CD68 с 28-го дня до 112-е сут ($p \leq 0,05$), тогда как в группах КС, ДЧ и ДЧКС отмечали снижение экспрессии макрофагов CD68 с 28-го дня до 112-х сут, и также во всех группах отмечалось увеличение уровня MMP 2, что согласуется с нашими результатами планиметрического анализа воспаления в очаге поражения, что может быть связано со снижением воспалительного процесса (табл. 2).

Заключение

Таким образом, все использованные методы лечения (введение МСК, концентратов культуральной и кондиционированных сред 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 стромальных клеток слизистой ткани десны человека приводило к улучшению васкуляризации и уменьшению воспалительных процессов в очаге лучевого поражения в большей степени, чем аналогичных клеток, полученных от лабораторных животных (крысы).

Comparison of the Therapeutic Potential of Rat and Human Mesenchymal Stromal Cells and Their Conditioned Media in Local Radiation Lesions

A.A. Rastorgueva, T.A. Astrelina, V.A. Brunchukov, D.Yu. Usupzhanova, I.V. Kobzeva, V.A. Nikitina, S.V. Lischuk, E.A. Dubova, K.A. Pavlov, V.A. Brumberg, A.S. Samoilov

A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia

Contact person: Tatiana Alexandrovna Astrelina: t_astrelina@mail.ru

ABSTRACT

Background: To compare the results of the use of mesenchymal stromal cells (MSCs) of human gingival mucosa and MSCs of rat gingival mucosa, their conditioned media, and to evaluate their effect on tissue regeneration in local radiation injury (LRI).

Material and methods: The study included 120 white male Wistar rats weighing 210 ± 30 g at the age of 8–12 weeks, randomized into 6 groups (20 animals each): control (C), animals did not receive therapy; control with the introduction of culture medium concentrate (CM) three times for 1, 14, 21 days; administration of human gingival mucosa MSCs (HM) at a dose of 2 million per 1 kg three times for 1, 14, 21 days; administration of human gingival mucosa MSCS conditioned medium concentrate (HMCM) at a calculated dose of 2 million cells per 1 kg three times for 1, 14, 21 days; administration of rat gingival mucosal MSCs (RM) at a dose of 2 million cells per 1 kg three times for 1, 14, 21 days; administration of rat gingival mucosal MSCS (RMCM) conditioned medium concentrate at a calculated dose of 2 million cells per 1 kg three times for 1, 14, 21 days. Each laboratory animal was observed 17 times: on 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91, 98, 105, 112 day after the burn simulation. Histological (hematoxylin-eosin staining) and immunohistochemical (CD31, CD68, VEGF, PGP 9.5, MMP2,9, Collag 1, TIMP 2) studies were performed. LRI was modeled on an X-ray machine at a dose of 110 Gy. MSCs were cultured according to the standard method up to 3–5 passages, the conditioned medium was taken and concentrated 10 times. The immunophenotype of MSCs (CD34, CD45, CD90, CD105, CD73, HLA-DR) and viability (7-ADD) were determined by flow cytometry.

Results: In a comparative analysis with the control group (C), starting from the 42nd day of the study, a tendency to reduce the area of skin ulcers in animals in all groups was observed, despite the fact that not all days had statistically significant differences. On day 112th, complete healing of skin ulcers in the CM group was observed in 40 % of animals in the HM group – in 60 %, in the HMCM group – in 20 % of animals, in the RMCM group – 20 %, and in the C and RM groups there were no animals with a prolonged wound defect.

Positive expression of the VEGF marker was observed in groups C and CM on the 28th day and in experimental groups (HM, HMCM, RM, RMCM) on the 112th day. A statistically significant increase in the CD68 marker was observed in groups C, RM, and RMCM, while the remaining groups showed a decrease in the number of macrophages.

Conclusion: Thus, all the treatment methods used, including the administration of MSCs, culture concentrates and conditioned media at a dose of 2 million per 1 kg, were effective in treating skin LRI and led to a reduction in the lesion area, accelerated ulcer healing, and improved regenerative processes. In addition, the use of mesenchymal stromal cells of the human gum mucosa led to an improvement in vascularization and a decrease in inflammatory processes in the focus of radiation damage to a greater extent than similar cells obtained from a rat.

Key words: mesenchymal stromal cells, local radiation lesions, conditioned medium, cell technologies, X-ray radiation, skin

For citation: Rastorgueva AA, Astrelina TA, Brunchukov VA, Usupzhanova DYu, Kobzeva IV, Nikitina VA, Lischuk SV, Dubova EA, Pavlov KA, Brumberg VA, Samoilov AS. Comparison of the Therapeutic Potential of Rat and Human Mesenchymal Stromal Cells and Their Conditioned Media in Local Radiation Lesions. Medical Radiology and Radiation Safety. 2021;66(4):5–12.

DOI: 10.12737/1024-6177-2021-66-4-5-12

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов.

Поступила: 16.03.2021. Принята к публикации: 21.04.2021.

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

Financing. The study had no sponsorship.

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

Article received: 16.03.2021. Accepted for publication: 21.04.2021.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Брунчук В.А., Астрелина Т.А., Никитина В.А., Кобзева И.В., Сучкова Ю.Б., Усупжанова Д.Ю., и др. Применение мезенхимальных стромальных клеток плаценты при местных лучевых поражениях кожи. Гены и клетки. 2019, Т. 14, Приложение 41 с.
2. Еремин П.С., Деев Р.В., Бозо И.Я., Дешевой Ю.Б., Лебедев В.Г., Еремин И.И., и др. Заживление тканей в области тяжелого местного лучевого поражения кожи при генноопосредованной индукции ангиогенеза препаратом «Неоваскулген» // Журнал анатомии и гистопатологии. 2020. Т. 9, № 2. С. 26–34. DOI: 10.18499/2225-7357-2020-9-2-26-34
3. Котенко К.В., Еремин И.И., Мороз Б.Б., Бушманов А.Ю., Надежина Н.М., Галстян И.А., Гринаковская О.С., Аксиненко А.В., Дешевой Ю.Б., Лебедев В.Г., Свободина Т.С., Жгутув Ю.А., Лаук-Дубицкий С.Е., Еремин П.С. Клеточные технологии в лечении радиационных ожогов: опыт ФМБЦ им. А.И. Бурназяна. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2012, Т. 7, № 2, С. 97–102.
4. Zheng K, Wu W, Yang S, Huang L, Chen J, Gong C et al. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Implantation for the Treatment of Radioactivity Induced Acute Skin Damage in Rats. // Mol. Med. Rep. 2015, V. 12, № 5. P. 7065–7071.
5. Da Silva Meirelles L, Caplan A, Nardi N. In Search of the In Vivo Identity of Mesenchymal Stem Cells. // Stem Cells. 2008; Vol. 26, № 9, P 2287–2299. DOI:10.1634/Stemcells. 2007-1122.
6. Расторгуева А.А., Астрелина Т.А., Брунчук В.А., и др. Оценка терапевтического потенциала кондиционированной среды мезенхимальных стволовых клеток при химических ожогах у лабораторных животных. // Гены и клетки. 2019, Т. 14, Приложение, С.192–193.
7. Темнов А.А., Астрелина Т.А., Рогов К.А., и др. Исследование влияния факторов кондиционированной среды, полученной при культивировании мезенхимальных стромальных клеток костного мозга, на течение тяжелых местных лучевых поражений кожи у крыс // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2018, Т. 63, № 1. С. 35–39.
8. Брунчук 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., Лищук 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
9. Xu S, Liu C, Ji H. Concise Review: Therapeutic Potential of the Mesenchymal Stem Cell Derived Secretome and Extracellular Vesicles for Radiation-Induced Lung Injury: Progress and Hypotheses. // Stem Cells Transl Med. 2019; Vol. 8, № 4, P. 344–354. DOI:10.1002/sctm.18-0038.
10. Zuo R, Liu M, Wang Y et al. Correction to: BM-MSC-Derived Exosomes Alleviate Radiation-Induced Bone Loss by Restoring the Function of Recipient BM-MSCs and Activating Wnt/ β -catenin Signaling. // Stem Cell Res Ther. 2020. V. 11, № 1 DOI:10.1186/s13287-020-1553-x.
11. Scuteri A, Donzelli E, Foudah D et al. Mesengenic Differentiation: Comparison of Human and Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. Int J // Stem Cells. 2014; Vol. 7; № 2, P. 127–134. DOI:10.15283/ijsc.2014.7.2.127.
12. Orbay H, Devi K, Williams P, Dehghani T, Silva E, Sahar D. Comparison of Endothelial Differentiation Capacities of Human and Rat Adipose-Derived Stem Cells. // Plast Reconstr Surg. 2016, Vol. 138, № 6, P. 1231–1241. DOI:10.1097/prs.0000000000002791.
13. Iacovelli N, Torrente Y, Ciuffreda A et al. Topical Treatment of Radiation-Induced Dermatitis: Current Issues and Potential Solutions. // Drugs Context. 2020. Vol. 9. P. 1–13. DOI:10.7573/dic.2020-4-7

REFERENCES

1. Brunchukov VA, Astrelina TA, Nikitina VA, Kobzeva IV, Suchkova YuB, Usupzhanova DYU, et. al. The use of Placental Mesenchymal Stromal Cells in Local Radiation Skin Lesions. Genes and Cells. 2019, V. 14, Appendix 41p. (In Russian).
2. Eremin P. S., Deev R. V., Bozo I. Ya., Deshoy Yu. B., Lebedev V. G., Eremin I. I., et al. Healing of Tissues in the Area of Severe Local Radiation Damage to the Skin During Gene-mediated Induction of Angiogenesis with Neovascuigen. Journal of Anatomy and Histopathology. 2020; 9(2) 26–34 DOI: 10.18499/2225-7357-2020-9-2-26-34 (In Russian).
3. Kotenko KV, Eremin II, Moroz BB, Bushmanov AYU, Nadezhina NM, Galstyan IA, Grinakovskaya OS, Aksinenko AV, Deshoy YuB, Lebedev VG., Svobodina TS, Zhgutov YuA, Lauk-Dubitsky SE, Eremin PS. Cell Technologies in the Treatment of Radiation Burns: the Experience of the Burnazyan Federal Medical Center. Cell Transplantation and Tissue Engineering. 2012, 7(2) P. 97–102 (In Russian).
4. Zheng K, Wu W, Yang S, Huang L, Chen J, Gong C et al. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Implantation for the Treatment of Radioactivity Induced Acute Skin Damage in Rats. Mol Med Rep. 2015. 12(5). P. 7065–7071.
5. Da Silva Meirelles L, Caplan A, Nardi N. In Search of the In Vivo Identity of Mesenchymal Stem Cells. Stem Cells. 2008. 26(9) 2287–2299. DOI:10.1634/Stemcells. 2007-1122.
6. Rastorgueva AA, Astrelina TA, Brunchukov VA, et al. Evaluation of the Therapeutic Potential of the Conditioned Media of Mesenchymal Stem Cells in Chemical Burns in Laboratory Animals. Genes and Cells. 2019. 14. Appendix: 192–193 (In Russian).
7. Temnov AA, Astrelina TA, Rogov KA, et al. To Study the Influence of Factors of Conditioned Environment Obtained During the Cultivation of Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells on the Course of Severe Local Radiation Skin Lesions in Rats. Medical Radiology and Radiation safety. 2018;63(1):35–39. (In Russian).
8. 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, Dobrovolskaya 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. DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-1-5-12 (In Russian).
9. Xu S, Liu C, Ji H. Concise Review: Therapeutic Potential of the Mesenchymal Stem Cell Derived Secretome and Extracellular Vesicles for Radiation-Induced Lung Injury: Progress and Hypotheses. Stem Cells Transl Med. 2019; 8(4):344–354. DOI:10.1002/sctm.18-0038.
10. Zuo R, Liu M, Wang Y et al. Correction to: BM-MSC-Derived Exosomes Alleviate Radiation-Induced Bone Loss by Restoring the Function of Recipient BM-MSCs and Activating Wnt/ β -catenin Signaling. Stem Cell Res Ther. 2020; 11(1) DOI:10.1186/s13287-020-1553-x.
11. Scuteri A, Donzelli E, Foudah D et al. Mesengenic Differentiation: Comparison of Human and Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. Int J Stem Cells. 2014; 7(2):127–134. DOI:10.15283/ijsc.2014.7.2.127.
12. Orbay H, Devi K, Williams P, Dehghani T, Silva E, Sahar D. Comparison of Endothelial Differentiation Capacities of Human and Rat Adipose-Derived Stem Cells. Plast Reconstr Surg. 2016; 138(6):1231–1241. DOI:10.1097/prs.0000000000002791.
13. Iacovelli N, Torrente Y, Ciuffreda A et al. Topical Treatment of Radiation-Induced Dermatitis: Current Issues and Potential Solutions. Drugs Context. 2020; 9 : 1-13. DOI:10.7573/dic.2020-4-7