

УДК 576.53: 615.032: 57.084.1

DOI: <https://doi.org/10.17816/brmma609492>

Эффективность клеточной терапии острого лучевого синдрома у мышей при внутривенном и внутрибрюшинном введении клеточного продукта

Е.В. Мурзина, Н.В. Пак, Н.В. Аксенова, Н.А. Жирнова, О.М. Веселова, А.А. Ховпачев, Н.В. Белый

Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

АННОТАЦИЯ

На мышинной экспериментальной модели исследовано терапевтическое действие популяции фибробластоподобных клеток, полученных из стромально-васкулярной фракции подкожной жировой ткани мышей и выращенных в культуре, для лечения костномозговой формы острого радиационного синдрома. Клетки были идентифицированы как мультипотентные мезенхимальные стволовые (стромальные) клетки, поскольку обладали адгезивностью к пластику, формируя при культивировании конфлюэнтный монослой, а процесс их остеогенной дифференцировки *in vitro* завершался созреванием остеобластов и формированием кальциевых депозитов, что свидетельствовало об их мультипотентной природе. Облучение лабораторных грызунов осуществляли с помощью рентгенотерапевтической установки «РУМ-17». В качестве клеточного продукта использовали популяцию стромальных клеток, полученных из подкожной жировой ткани мыши и выращенных в культуре 3–4-го пассажа. Трансплантацию клеток осуществляли через 24 ч после общего относительно равномерного рентгеновского облучения мышей в дозе 7,8 Гр. Впервые сравнивается терапевтическая эффективность аллогенной трансплантации мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток при разных путях введения клеточной суспензии — внутривенном и внутрибрюшинном. Показано существенное повышение выживаемости мышей в течение 30-суточного периода наблюдения после облучения в летальной дозе, которое зависело от количества введенных клеток и способа доставки биомедицинского клеточного продукта. Так, при внутривенном введении 30 и 60×10^3 мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток 30-суточная выживаемость мышей после облучения в дозе 7,8 Гр по сравнению с группой животных без лечения повышалась на 54,5 и 40 % соответственно ($p = 0,03$). Увеличение численности клеток в клеточном продукте до 120×10^3 /мышь приводило к снижению эффективности терапии. При внутрибрюшинном введении защита животных от гибели составила 57 % после трансплантации 30 и 60×10^3 клеток ($p = 0,039$) и 50 % после применения 120×10^3 клеток. На 30-е сутки после облучения на фоне введения клеточного продукта в разных схемах у 70–80 % животных было отмечено восстановление значений основных показателей системы кроветворения до исходного уровня. Таким образом, клеточная терапия с использованием мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток, выделенных из жировой ткани, при внутривенном и внутрибрюшинном путях доставки клеточного продукта в облученный организм обеспечивает защиту мышей от гибели после воздействия рентгеновского излучения в летальных дозах, способствуя снижению тяжести лучевого поражения гемопозитической системы у мышей, и имеет несомненные перспективы для дальнейших исследований в качестве эффективного и безопасного средства лечения острой лучевой болезни.

Ключевые слова: выживаемость; жировая ткань; клеточная терапия; острый радиационный синдром; рентгеновское излучение; острая лучевая болезнь; мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки; гемопоэз.

Как цитировать

Мурзина Е.В., Пак Н.В., Аксенова Н.В., Жирнова Н.А., Веселова О.М., Ховпачев А.А., Белый Н.В. Эффективность клеточной терапии острого лучевого синдрома у мышей при внутривенном и внутрибрюшинном введении клеточного продукта // Вестник Российской военно-медицинской академии. 2024. Т. 26, № 2. С. 169–184. DOI: <https://doi.org/10.17816/brmma609492>

DOI: <https://doi.org/10.17816/brmma609492>

Effectiveness of cell therapy of acute radiation syndrome in mice with intravenous and intraperitoneal administration of a cellular product

E.V. Murzina, N.V. Pak, N.V. Aksenova, N.A. Zhirnova, O.M. Veselova, A.A. Khovpachev, N.V. Belyi

Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia

ABSTRACT

The therapeutic effect of fibroblast-like cells obtained from the stromal vascular fraction of subcutaneous adipose tissue of mice and cultured for the treatment of bone marrow form of acute radiation syndrome was studied on a mouse experimental model. The cells were identified as multipotent mesenchymal stem (stromal) cells, owing to adhesion to plastic, confluent monolayer formation during cultivation, and the fact that osteogenic differentiation in vitro resulted in osteoblast maturation and calcium deposit formation, which indicated their multipotent nature. Irradiation of laboratory rodents was conducted using the X-ray therapy unit "RUM-17". Stromal cells were obtained from subcutaneous adipose tissue of a mouse and grown in a culture of 3–4 passages and used as a cell product. Cell transplantation was performed 24 h after uniform X-ray irradiation of mice at a dose of 7.8 Gy. This is the first study to compare the therapeutic efficacy of allogeneic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells with the different routes (intravenous and intraperitoneal) of cell suspension administration. A significant increase was found in the survival rate of mice during the 30-day follow-up period after lethal dose irradiation, which depended on the number of injected cells and delivery method of the biomedical cell product. Thus, with intravenous administration of 30 and 60 × 10³ multipotent mesenchymal stem cells, the 30-day survival rate of mice after irradiation at a dose of 7.8 Gy increased by 54.5% and 40%, respectively, compared with that of untreated animals ($p = 0.03$). An increase in the number of cells in the cell product to 120 × 10³/mouse led to a decrease in therapy effectiveness. In intraperitoneal administration, the protection of animals from death was 57% after transplantation of 30 and 60 × 10³ cells ($p = 0.039$) and 50% after application of 120 × 10³ cells. On day 30 after irradiation, in the introduction of a cellular product in different schemes, 70%–80% of animals showed restoration of the values of the main indicators of the hematopoiesis system to initial levels. Thus, cell therapy using multipotent mesenchymal stem cells isolated from adipose tissue with intravenous and intraperitoneal delivery routes of the cellular product to the irradiated body protects mice from death after exposure to X-ray radiation in lethal doses, decreasing the severity of radiation damage to the hematopoietic system in mice, and provides prospects for further research as an effective and safe treatment for acute radiation sickness.

Keywords: survival; adipose tissue; cell therapy; acute radiation syndrome; X-ray radiation; acute radiation sickness; multipotent mesenchymal stem cells; hematopoiesis.

To cite this article

Murzina EV, Pak NV, Aksenova NV, Zhirnova NA, Veselova OM, Khovpachev AA, Belyi NV. Effectiveness of cell therapy of acute radiation syndrome in mice with intravenous and intraperitoneal administration of a cellular product. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2024;26(2):169–184. DOI: <https://doi.org/10.17816/brmma609492>

Received: 20.11.2023

Accepted: 02.04.2024

Published: 03.06.2024

DOI: <https://doi.org/10.17816/brmma609492>

通过静脉注射和腹腔注射细胞产品对小鼠急性放射综合征进行细胞治疗的疗效

E.V. Murzina, N.V. Pak, N.V. Aksenova, N.A. Zhirnova, O.M. Veselova, A.A. Khovpachev, N.V. Belyi

Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia

摘要

在小鼠实验模型中，研究了从小鼠皮下脂肪组织的基质血管部分提取并培养的成纤维细胞对急性放射综合征髓质型的治疗效果。这些细胞被鉴定为多能间质干（基质）细胞，因为它们具有与塑料的粘附性，培养时形成汇合单层。细胞在体外的成骨分化过程是通过成骨细胞的成熟和钙沉积的形成来完成的，这表明了细胞的多能性。使用 RUM-17 X 射线治疗装置对实验鼠进行照射。从小鼠皮下脂肪组织中提取并培养到第 3-4 期的基质细胞群被用作细胞产品。在小鼠接受剂量为 7.8 Gy 的相对均匀的 X 射线照射 24 小时后进行细胞移植。首次比较了通过静脉注射和腹腔注射细胞悬液进行多能间充质干细胞异体移植的疗效。结果表明，小鼠在接受致死剂量照射后的 30 天观察期内存活率明显提高，这取决于注射细胞的数量和生物学细胞产品的给药方法。因此，静脉注射 30×10^3 和 60×10^3 多能间充质干细胞可提高小鼠在 7.8 Gy 剂量照射后 30 天的存活率，与未接受治疗的动物组相比，存活率分别提高了 54.5% 和 40% ($p = 0.03$)。将细胞产品中的细胞数量增加到 120×10^3 个/只小鼠，会导致疗效下降。腹腔注射时，移植 30×10^3 和 60×10^3 细胞后，保护动物免于死亡的比例分别为 57% ($p = 0.039$)，移植 120×10^3 细胞后，保护动物免于死亡的比例为 50%。在按不同方案注射细胞产品的背景下，在照射后第 30 天，70%-80% 的动物观察到造血系统的基本参数恢复到初始水平。因此，利用从脂肪组织中分离出来的多能间充质干细胞，通过静脉注射和腹腔注射途径将细胞产品输送到受照射的机体中，对小鼠进行细胞疗法，可以保护小鼠在暴露于致命剂量的 X 射线后免于死亡。这有助于减轻辐射对小鼠造血系统损伤的严重程度，作为一种有效、安全的急性放射病治疗方法，具有不容置疑的进一步研究前景。

关键词：存活率；脂肪组织；细胞疗法；急性辐射综合征；X 射线辐射；急性放射病；多能间充质干细胞；造血。

引用本文

Murzina EV, Pak NV, Aksenova NV, Zhirnova NA, Veselova OM, Khovpachev AA, Belyi NV. 通过静脉注射和腹腔注射细胞产品对小鼠急性放射综合征进行细胞治疗的疗效. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2024;26(2):169-184. DOI: <https://doi.org/10.17816/brmma609492>

收稿：20.11.2023

录用：02.04.2024

发表：03.06.2024



ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее перспективных направлений клеточной терапии радиационных поражений в настоящее время считается использование мезенхимальных стволовых клеток, однако имеющиеся данные об их применении малочисленны и достаточно ограничены. Клеточная терапия разных патологических состояний на протяжении последних десятилетий рассматривается как передовой многообещающий метод, нацеленный на замещение в организме поврежденных клеток и тканевых структур с последующим восстановлением функций различных органов, и активно изучается медицинскими специалистами широкого круга [1, 2].

Одним из наиболее важных и актуальных направлений применения биомедицинских клеточных продуктов является лечение острой лучевой болезни (ОЛБ) [3, 4] — тяжелого угрожающего жизни состояния, развивающегося после облучения всего тела (или большей его части) в течение относительно небольшого промежутка времени. Наиболее серьезные осложнения после острого лучевого воздействия связаны с повреждениями костного мозга и системы кроветворения, которые имеют место уже после облучения в дозах 4–6 Гр и могут стать фатальными для организма из-за высокой вероятности развития инфекционных осложнений и геморрагического синдрома [5–7].

Общепризнанным патогенетически обоснованным способом противорадиационной клеточной терапии являются трансплантации костного мозга или аллогенных гемопоэтических стволовых клеток, однако уже первые клинические испытания показали, что они способны привести к тяжелым осложнениям, нередко приводящим к летальному исходу, к тому же в условиях полной миелодепрессии недостаточно эффективны [3, 7].

Эти неудачи побудили исследователей к поиску новых перспективных стратегий, в частности, использованию мультипотентных мезенхимальных стволовых (стромальных) клеток (ММСК), основная физиологическая функция которых заключается в поддержании защитного и регенеративного микроокружения для гемопоэтических стволовых клеток. Клинический интерес к ММСК значительно возрос после обнаружения их иммунопrivилегированных свойств, благодаря которым они могут использоваться в аллогенных трансплантациях. Успешность применения ММСК для лечения ОЛБ потенциально обусловлена их низкой иммуногенностью, секреторной активностью, способностью продуцировать широкий спектр цитокинов и факторов роста, необходимых для пролиферации и дифференцировки кроветворных предшественников [3, 8–11].

Основным источником получения ММСК долгое время оставался костный мозг, но в последние годы большинство научных исследований направлено на изучение терапевтической эффективности ММСК, выделенных из более доступных источников — плаценты и плацентарной

крови, соединительной ткани пупочного канатика, жировой ткани [3].

В настоящее время для лечения ОЛБ, а также реакции «трансплантат против хозяина» и синдрома приживления трансплантированных гемопоэтических клеток разрабатывается биомедицинский клеточный продукт PLX-R18 фирмы «Pluri Inc.» (Израиль), в коллаборации с Исследовательским центром Эймса (Соединенные Штаты Америки — США), представляющий собой культуру человеческих плацентарных клеток с фенотипом мезенхимальных клеток [4]. В Российской Федерации нет зарегистрированных лекарственных препаратов, созданных на основе клеточных технологий, работы же в области клеточной терапии радиационных поражений крайне ограничены, в связи с чем исследования, нацеленные на возможность получения оптимального клеточного продукта для лечения ОЛБ имеют несомненную актуальность и научную и практическую значимость.

Цель исследования — экспериментально оценить эффективность клеточной терапии костномозговой формы острого радиационного синдрома у мышей при разных путях введения популяции стромальных клеток, полученных из жировой ткани.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено в экспериментах *in vivo* на модели костномозговой формы острого радиационного синдрома (ОРС) у лабораторных мышей. В качестве клеточного продукта использовали популяцию аллогенных стромальных клеток, полученных из жировой ткани. Клеточную терапию проводили через 24 ч после общего облучения мышей в летальной дозе. Формирование групп для исследований проводили путем блочной рандомизации с применением компьютерного генератора случайных чисел. Экспериментальные группы включали животных, подвергавшихся воздействию рентгеновского излучения с проведением разных вариантов клеточной терапии; группу «контроль — облучение» (К обл) составили животные, облученные без лечения, группу (К биол) — интактные мыши. После 30-суточного периода наблюдения выживших мышей выводили из эксперимента с проведением некропсии и отбором образцов крови для гематологических исследований. Эффективность клеточной терапии оценивали путем сравнения параметров выживаемости и некоторых морфофункциональных характеристик у животных при ее проведении с контрольными группами.

Эксперименты выполнены с использованием 120 белых беспородных мышей-самцов массой тела 20–25 г, полученных из питомника лабораторных животных «Рап-полово» Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (Ленинградская обл.). Животные содержались в стандартных условиях вивария по 12 особей в клетке со свободным доступом к воде и пище; световой

режим составлял 12 × 12 ч. Кормление и уход за животными проводили в первой половине дня, для кормления использовали полнорационный комбикорм. После поступления из питомника животные находились в 14-дневном карантине; особи с признаками заболеваний или иных повреждений из исследования исключались.

Манипуляции по получению тканей лабораторных грызунов, выделению клеток, а также работы с культурой клеток осуществляли в культуральной лаборатории в асептических условиях при вертикальном потоке воздуха в ламинарном боксе фирмы «Faster» (Италия). Подкожную жировую ткань, выделенную из абдоминальной области лабораторной мыши, помещали в чашки Петри, отмывали 0,9 % раствором хлорида натрия и тщательно измельчали с помощью стерильных инструментов. Расщепление фрагментов жировой ткани проводили 0,1 % раствором коллагеназы из гепатопанкреаса краба в буфере Дюльбекко без Са и Mg производства «БиолоТ» (Россия) в режиме постоянного перемешивания на магнитной мешалке в течение 40 мин при температуре 37 °С. По окончании процесса для инактивации фермента к полученной суспензии добавляли питательную среду DMEM фирмы «Gibco» (США) с 10 % эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС) фирмы «Gibco» (США) и центрифугировали при 400 g в течение 10 мин. Полученный осадок клеток трижды отмывали в растворе Хенкса производства «БиолоТ» (Россия) центрифугированием при 400 g в течение 5 мин. Отмытые стромальные клетки ресуспендировали в среде DMEM с добавлением 10 % ЭТС, 50 мкг/мл гентамицина производства «БиолоТ» (Россия), 300 мкг/мл L-глутамина производства «БиолоТ» (Россия), после чего переносили в культуральные флаконы фирмы «Jet Biofil» (Китай) и культивировали при температуре 37 °С в атмосфере 5 % углекислого газа (CO₂) и 80 % влажности в CO₂-инкубаторе фирмы «Shellab» (США). Через 48–72 ч культуру клеток осторожно отмывали от не прикрепившихся клеток средой Хенкса, затем заливали свежей питательной средой. При достижении 70–90 % конфлюентности клетки снимали с поверхности пластикового носителя с помощью раствора Трипсина – Версена производства «БиолоТ» (Россия) в соотношении 1:1, ресуспендировали в питательной среде DMEM (1:3) и распределяли в новые носители с плотностью посева 3–5 × 10⁴ клеток/см².

Жизнеспособность определяли путем окрашивания клеток 0,4 % раствором трипанового синего и подсчета в камере Горяева живых и мертвых клеток. Микроскопию и фотографирование объектов проводили с помощью инвертированного микроскопа «AxioVert.A1 FL LED» с цифровой камерой AxioCam 503 color и программным обеспечением Zen 2 (Blue) фирмы «Carl Zeiss» (Германия).

Источником ионизирующего излучения для облучения экспериментальных животных служила рентгенотерапевтическая установка «РУМ-17» производства «Мосрентген» (Союз Советских Социалистических Республик).

Для облучения мышей помещали в отдельные ячейки пластиковых контейнеров, которые закреплялись на вращающейся подставке (кимографе). Поглощенная доза составляла 7,8 Гр, что соответствует летальной дозе (ЛД) 70–90/30 — дозе ионизирующего излучения, приводящей к гибели в результате костномозговой формы ОРС 70–90 % облученных животных в течение 30-суточного периода наблюдения. Облучение проводили в направлении «спина — грудь» с кожно-фокусным расстоянием 50 см, при напряжении 180 кВт, силе тока 14 мА, с фильтром 0,5 мм Cu + 1 мм Al; мощность дозы излучения составляла 0,328 Гр/мин. Одновременно облучению подвергали животных разных групп. Животных группы биологического контроля подвергали «ложному» облучению, помещая в пластиковых контейнерах на кимограф и выдерживая под выключенной анодной трубкой установки в течение того же времени, что и опытные группы.

В течение 30 суток после радиационного воздействия ежедневно проводили наблюдение за общим состоянием облученных животных и учет погибших, дважды в неделю осуществляли контроль массы тела.

Для введения животным использовали культуру клеток на уровне 3–4 пассажа. Монослой снимали с поверхности пластикового носителя с помощью раствора Трипсина – Версена, ресуспендировали в изотоническом растворе хлорида натрия и трижды отмывали центрифугированием при 400 g в течение 10 мин. Необходимое для введения животным количество клеток получали путем подсчета в камере Горяева и разведения суспензии до заданной концентрации 0,9 % раствором хлорида натрия. Трансплантацию клеток осуществляли через 24 ч после облучения в количестве 30, 60 или 120 × 10³/осoby в объеме 0,3 мл/мышь путем введения в хвостовую вену или в брюшную полость.

На 30-е сутки после облучения выживших животных подвергали эвтаназии с предварительной премедикацией, которая осуществлялась внутримышечным введением золетила 100 фирмы «Virbac» (Франция) в дозе 2 мг/кг. Образцы периферической крови в объеме 40 мкл отбирали в пробирки вакутайнер с антикоагулянтом этилендиаминтетрауксусной кислотой.

Оценку эффективности клеточной терапии проводили путем сравнения параметров 30-суточной выживаемости облученных мышей: динамики гибели, доли (%) выживших животных в группах и средней продолжительности жизни погибших мышей. Гематологические исследования выполняли с помощью ветеринарного автоматического гематологического анализатора «MicroCC-20Plus-Vet» фирмы «High Technology» (США), позволяющего провести количественное определение содержания эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитов и соотношение их основных популяций, а также уровня гемоглобина и гематокрита. Кроме того, осуществляли полную некропсию экспериментальных животных и взвешивание внутренних органов для определения их массового индекса, рассчитываемого

как отношение массы органа к массе тела животного, выраженного в процентах от массы тела.

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica 8,0. Выживаемость облученных мышей оценивали по методу Каплана – Мейера. Для сравнения 30-суточной выживаемости и продолжительности жизни погибших от облучения мышей экспериментальных и контрольных групп применяли критерии Гехана – Вилкоксона и точный критерий Фишера (двусторонний тест). Также для анализа использовали критерии: Краскелла – Уоллеса или χ^2 (для множественных сравнений), Вилкоксона для межгрупповых сравнений и Манна – Уитни для оценки внутригрупповых различий. Результаты представлены в виде: $M \pm \sigma$, где M — среднее значение показателя, σ — среднеквадратическое отклонение, или $Me [Q_{25}; Q_{75}]$, где Me — медиана, Q_{25} и Q_{75} — нижний и верхний квартили. Различия принимались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Все манипуляции с экспериментальными животными проводили с соблюдением правил гуманного обращения с лабораторными животными, определенными Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных [11]. Исследование проведено в рамках научно-исследовательской работы «Экспериментальное обоснование перспективности применения клеточной терапии при лечении костномозговой формы острой лучевой болезни».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика популяции клеток, полученных из жировой ткани лабораторных мышей. Перед началом экспериментов *in vivo* была проведена идентификация популяции клеток, полученных из подкожной жировой ткани лабораторных мышей. Известно, что в результате обработки жировой ткани коллагеназой получают стромально-васкулярную фракцию, примерно 2 % клеточного состава которой составляют стволовые клетки. Основным свойством стволовых клеток является их способность к дифференцировке в разные клеточные линии, т. е. «потентность» [12]. Комитетом Международного общества клеточной терапии (The International Society for Cellular Therapy) введена система идентификации мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК), включающая источник происхождения ММСК (костный мозг, жировая ткань и проч.) и минимальные критерии для их определения [13]:

1) адгезивность к пластику при культивировании в стандартных условиях;

2) экспрессия специфических поверхностных антигенов — молекул адгезии CD105, CD73 и CD90; отсутствие экспрессии CD45, CD34, CD14 или CD11b, CD79 или CD19 и HLA-DR;

3) способность дифференцировки *in vitro* в остеобласты, адипоциты и хондробласты.

Клетки, полученные нами из жировой ткани лабораторных грызунов, имели фибробластоподобную форму и обладали полноценной адгезивностью к пластику — в процессе культивирования на пластиковых поверхностях культуральных флаконов и планшетов формировали конфлюэнтный монослой (рис. 1).

Для подтверждения способности полученных клеток к остеогенной дифференцировке на клеточную суспензию воздействовали дифференцировочной средой, которую готовили на основе питательной среды DMEM фирмы «Gibco» (США) с 10 % ЭТС фирмы «Gibco» (США), 50 мкг/мл гентамицином производства «БиолоТ» (Россия) и 2 mM L-глутамином производства «БиолоТ» (Россия) путем добавления дексаметазона фирмы «KRKA» (Словения) в концентрации 0,04 мг/л, β -глицеролфосфата фирмы «SIGMA» (Швеция) в концентрации 2,16 г/л и аскорбиновой-L(+) кислоты производства «ДИАЭМ» (Россия) в концентрации 0,05 г/л.

Культуру клеток на уровне 4-го пассажа высевали в 96-луночные планшеты фирмы «Orange Scientific» (Бельгия) в концентрации 3×10^4 клеток/100 мкл. Через 18–24 ч после формирования монослоя в опытных лунках 2 раза в неделю осуществляли смену среды на дифференцировочную. В качестве контрольных использовали лунки, в которых клетки культивировали в обычной питательной среде без добавления стимулирующих остеогенную дифференцировку факторов. В процессе культивирования клеток в течение 21 суток регистрировали проявление визуальных признаков модификации клеток в остеобласты под влиянием стимуляторов дифференцировки с помощью микроскопии объектов (рис. 2).

После культивирования осуществляли оценку минерализации путем окрашивания клеток ализариновым красным и по методу фон Косса.

Окрашивание ализариновым красным. После удаления культуральной среды в каждую лунку с монослоем

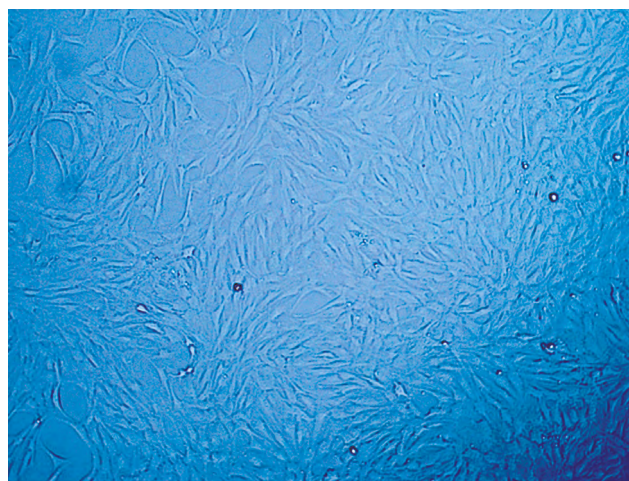
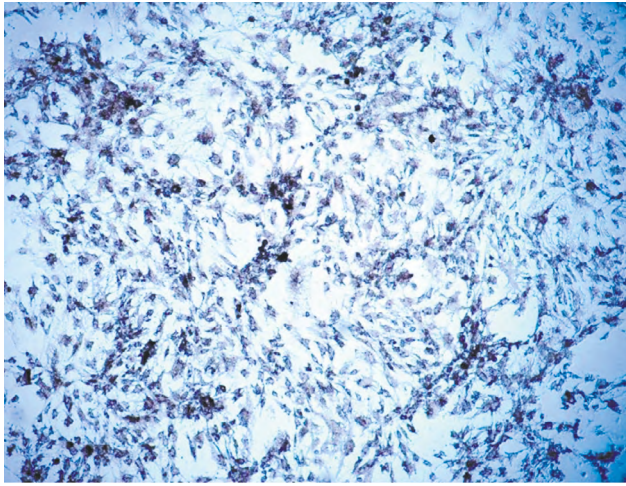


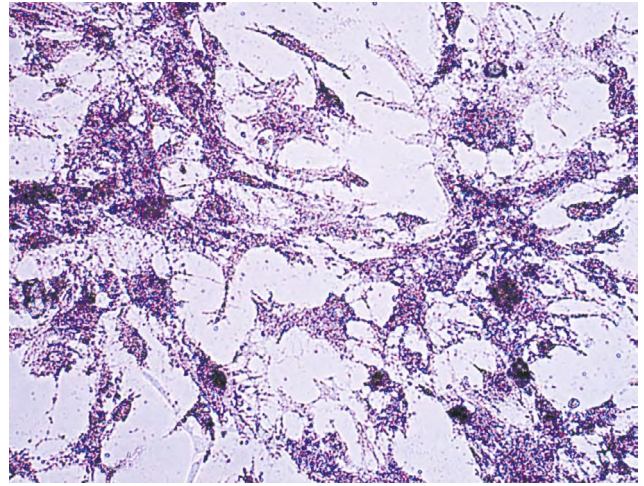
Рис. 1. Монослой стромальных клеток, полученных из жировой ткани лабораторной мыши, ув. $\times 10$
Fig. 1. Monolayer of stromal cells obtained from the adipose tissue of a laboratory mouse, incr. $\times 10$

клеток вносили по 50 мкл 4 % раствора параформальдегида и инкубировали в течение 30 мин при температуре 37 °С, затем трижды отмывали от фиксатора дистиллированной водой и вносили в каждую лунку по 50 мкл 2 % раствора ализаринового красного. Через 5 мин экспозиции

краситель тщательно отмывали, после чего добавляли по 50 мкл ацетона на 20 с. При микроскопии объектов выявлялись окрашенные в красный цвет соли неорганического кальция, что свидетельствовало об остеогенной дифференцировке клеток (рис. 3, а, с).



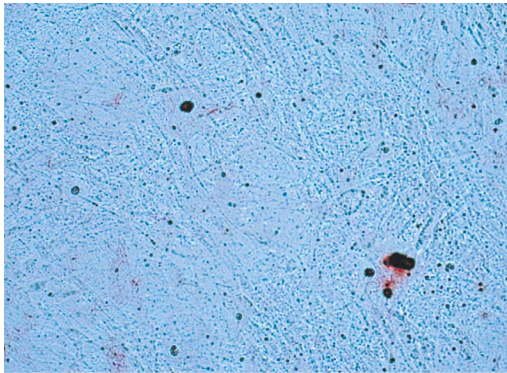
a



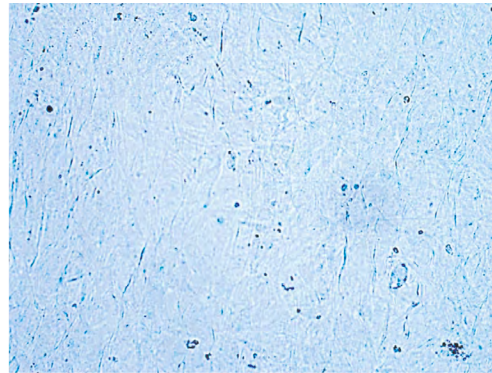
b

Рис. 2. Модификация стромальных клеток, полученных из жировой ткани мыши, в процессе остеогенной дифференцировки в остеобласты: *a* — ув. $\times 5$; *b* — ув. $\times 20$

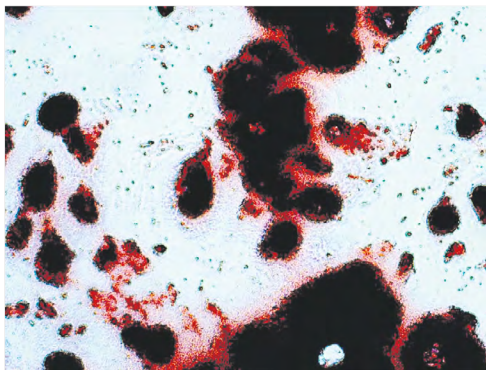
Fig. 2. Modification of stromal cells obtained from mouse adipose tissue during osteogenic differentiation into osteoblasts: *a* — incr. $\times 5$; *b* — incr. $\times 20$



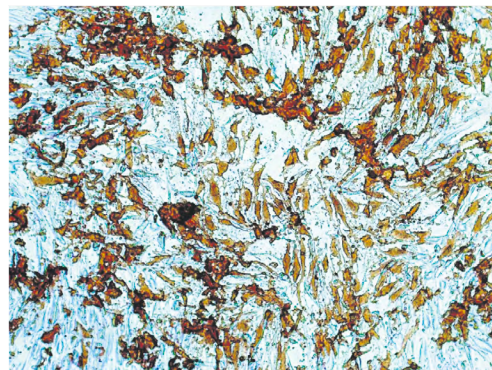
a



b



c



d

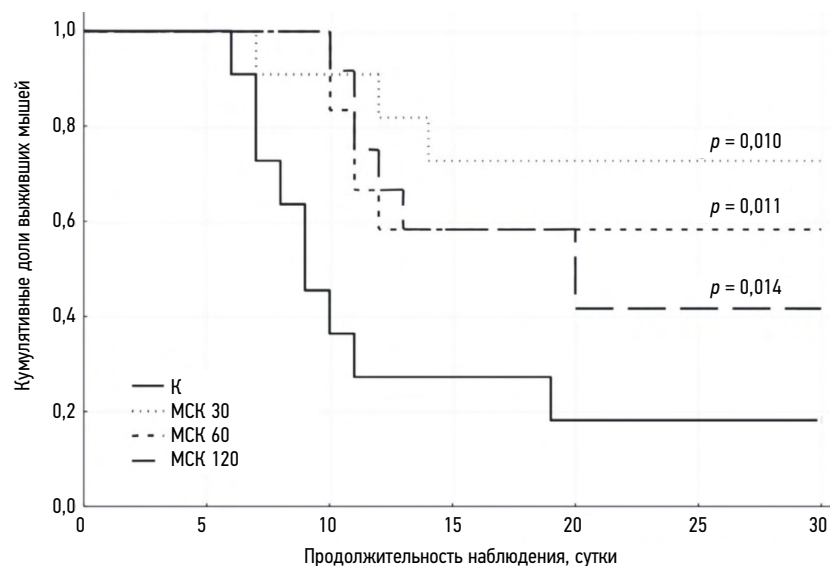
Рис. 3. Депозиты кальция в процессе остеогенной дифференцировки стромальных клеток, полученных из жировой ткани мыши: *a, b* — контроль; *c, d* — культивирование в дифференцировочной среде, ув. $\times 10$. Окрашивание: *a, c* — ализариновым красным; *b, d* — по методу фон Косса

Fig. 3. Calcium deposits in osteogenic differentiation of stromal cells obtained from mouse adipose tissue: *a, b* — control; *c, d* — cultivation in a differentiation medium, incr. $\times 10$. Staining: *a, c* — alizarin red; *b, d* — by the von Koss method

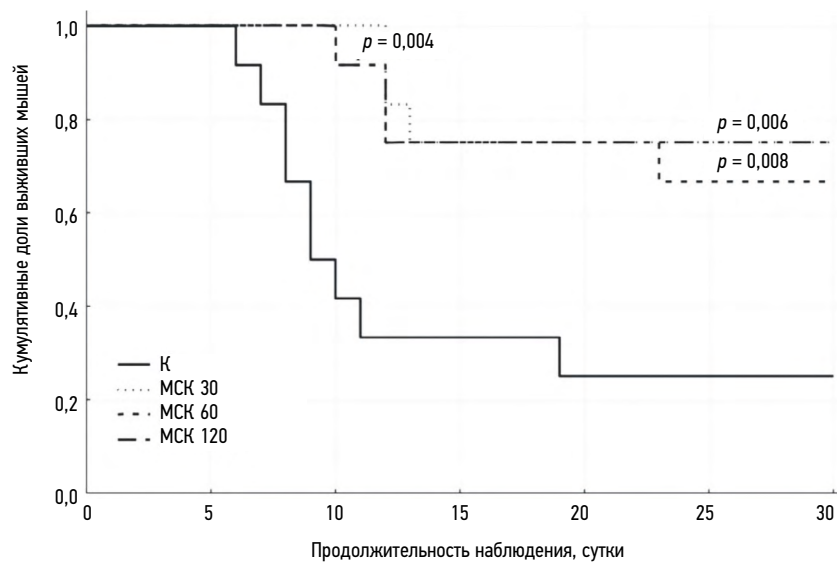
Окрашивание по методу фон Косса (Von Koss). Из лунок планшета с клетками удаляли культуральную среду и фиксировали клетки 4 % параформальдегидом в течение 30 мин. В отмытые дистиллированной водой лунки добавляли 5 % водный раствор нитрата серебра и планшет экспонировали при солнечном свете в течение 30 мин. После тщательного отмывания реактива дистиллированной водой на клетки воздействовали 5 % водным раствором тиосульфата натрия в течение 5 мин, после чего лунки снова отмывали и микроскопировали для регистрации результатов окрашивания. Минеральные отложения имели темно-коричневый цвет (рис. 3, *b, d*).

Данные, полученные после проведения двух видов тестов, продемонстрировали наличие отложений кальция во всех опытных лунках планшета и отсутствие таковых в контрольных (см. рис. 4).

Таким образом, процесс остеогенной дифференровки полученных из жировой ткани клеток, характеризующихся фибробластоподобной морфологией и обладающих адгезивностью к пластику при культивировании в стандартных условиях, завершался созреванием остеобластов и формированием кальциевых депозитов. Несмотря на то, что не была подтверждена экспрессия специфических для ММСК поверхностных антигенов,



a



b

Рис. 4. Кривые выживаемости мышей после общего облучения в дозе 7,8 Гр без лечения (К) или с введением через 24 ч после облучения стромальных клеток, выделенных из жировой ткани мыши (МСК), в количестве 30, 60 или 120 тыс. клеток/мышь: *a* — внутривенно; *b* — внутривентально

Fig. 4. Survival curves of mice after total irradiation at a dose of 7.8 Gy without treatment (K) or with administration 24 h after irradiation of stromal cells isolated from mouse adipose tissue (MSC) in the amount of 30, 60, and 120 thousand cells/mouse: *a* — intravenous; *b* — intraperitoneal

ввиду отсутствия возможности проведения иммунофенотипирования, на основании полученных данных выделенные из стромально-васкулярной фракции лабораторных мышей клетки в дальнейшем мы обозначали как ММСК жировой ткани.

Исследование эффективности ММСК, полученных из жировой ткани, при остром радиационном поражении провели в двух экспериментах: в первом ММСК жировой ткани вводили мышам в разном количестве (30, 60 или 120 тыс. клеток/особь, что соответствовало $1,1 \pm 0,07$; $2,2 \pm 0,15$ и $4,3 \pm 0,12 \times 10^6$ клеток/кг) в хвостовую вену, во втором использовали внутрибрюшинный путь доставки клеточной суспензии в тех же дозах. Введение ММСК в 0,9 % растворе хлорида натрия проводили через 24 ч после облучения в дозе 7,8 Гр; животным контрольных групп в тот же срок соответствующим способом вводили физиологический раствор в объеме 0,3 мл/мышь.

Кривые выживаемости мышей в течение 30 суток после облучения в дозе 7,8 Гр отражены на рисунке 4, из которого следует, что применение ММСК в обоих случаях оказывало лечебное действие, способствуя значительному снижению гибели облученных животных в сравнении с контрольными группами. Межгрупповые отличия по критерию χ^2 были статистически значимы для обоих способов введения клеточной суспензии ($p = 0,012$ — после внутривенного введения и $p = 0,004$ — после внутрибрюшинной инъекции). При этом в случае внутривенного введения клеточного продукта с увеличением количества ММСК отмечалось снижение терапевтического эффекта. Зависимость «доза — эффект» носила обратно пропорциональный характер, однако отличия между группами при применении разного количества ММСК не имели статистической значимости. Введение ММСК

в количестве 30 тыс. клеток/мышь повысило 30-суточную выживаемость на 53,5 % по сравнению с группой мышей без лечения, терапия с использованием 60 тыс. клеток/мышь — на 40 %, трансплантация 120 тыс. клеток/мышь способствовало увеличению выживаемости на 23,5 %. При внутрибрюшинном введении ММСК количество клеток не оказало существенного влияния на значение данного показателя, клеточная терапия обеспечивала защиту от гибели 67–75 % животных (табл. 1).

Средняя продолжительность жизни погибших после рентгеновского облучения в дозе 7,8 Гр без лечения мышей составила 9 [7; 10] суток. Клеточная терапия приводила к отдалению сроков гибели грызунов в результате костномозговой формы ОРС до 11–12 суток. Значимое влияние ММСК на данный параметр выживаемости в сравнении с контрольной группой было выявлено при внутривенном введении клеточного продукта с численностью 60 и 120 тыс. клеток, при внутрибрюшинном введении — 30 и 60 тыс. клеток/мышь (см. табл. 1).

Следует отметить, что на протяжении 30-суточного периода наблюдения проводился ежедневный контроль за общим состоянием животных и дважды в неделю осуществлялось их взвешивание. Динамика массы тела у мышей экспериментальных и контрольных групп отражена на рис. 5.

Из представленных данных видно, что у мышей группы К биол отмечалось постоянное возрастание массы тела в среднем на 5 % в неделю, к 30-м суткам прирост составил более 20 % от исходного уровня. После воздействия рентгеновского излучения отмечалась обратная динамика, максимальная потеря массы тела у облученных мышей всех групп, от 17 до 23 %, регистрировалась в период разгара острого лучевого поражения.

Таблица 1. Параметры 30-суточной выживаемости мышей после общего облучения в дозе 7,8 Гр и введения стромальных клеток, выделенных из жировой ткани мыши (ММСК, 30, 60 или 120 тыс. клеток/мышь)

Table 1. Parameters of 30-day survival of mice after total irradiation at a dose of 7.8 Gy and administration of stromal cells isolated from mouse adipose tissue (MMSK, 30, 60, and 120 thousand cells/mouse)

Группа животных	Погибло/выжило	Выживаемость, %	Продолжительность жизни погибших мышей, сутки, $Me [Q_{25}; Q_{75}]$
внутривенное введение ММСК			
7,8 Гр + ММСК 30 тыс. клеток/мышь	3/8	72,7 ± 13,4*	12 [7; 14]
7,8 Гр + ММСК 60 тыс. клеток/мышь	5/7	58,3 ± 14,2	11 [10; 11]#
7,8 Гр + ММСК 120 тыс. клеток/мышь	7/5	41,7 ± 14,2	12 [11; 20]##
7,8 Гр (К обл)	9/2	18,2 ± 11,6	9 [7; 10]
внутрибрюшинное введение ММСК			
7,8 Гр + ММСК 30 тыс. клеток/мышь	3/9	75 ± 12,5*	12 [12; 13]###
7,8 Гр + ММСК 60 тыс. клеток/мышь	3/9	75 ± 12,5*	12 [11; 17,5]####
7,8 Гр + ММСК 120 тыс. клеток/мышь	4/8	67 ± 13,6	12 [10; 12]
7,8 Гр (К обл)	9/3	25 ± 12,5	9 [8; 10]

Примечание: различия по сравнению с группой К обл: * — $p = 0,03$ (точный критерий Фишера); # — $p = 0,009$; ## — $p = 0,004$; ### — $p = 0,05$; #### — $p = 0,03$ (U -критерий Манна – Уитни).

Note: Differences compared to the K group: * — $p = 0,03$ (Fisher's exact test); # — $p = 0,009$; ## — $p = 0,004$; ### — $p = 0,05$; #### — $p = 0,03$ (Mann-Whitney U test).

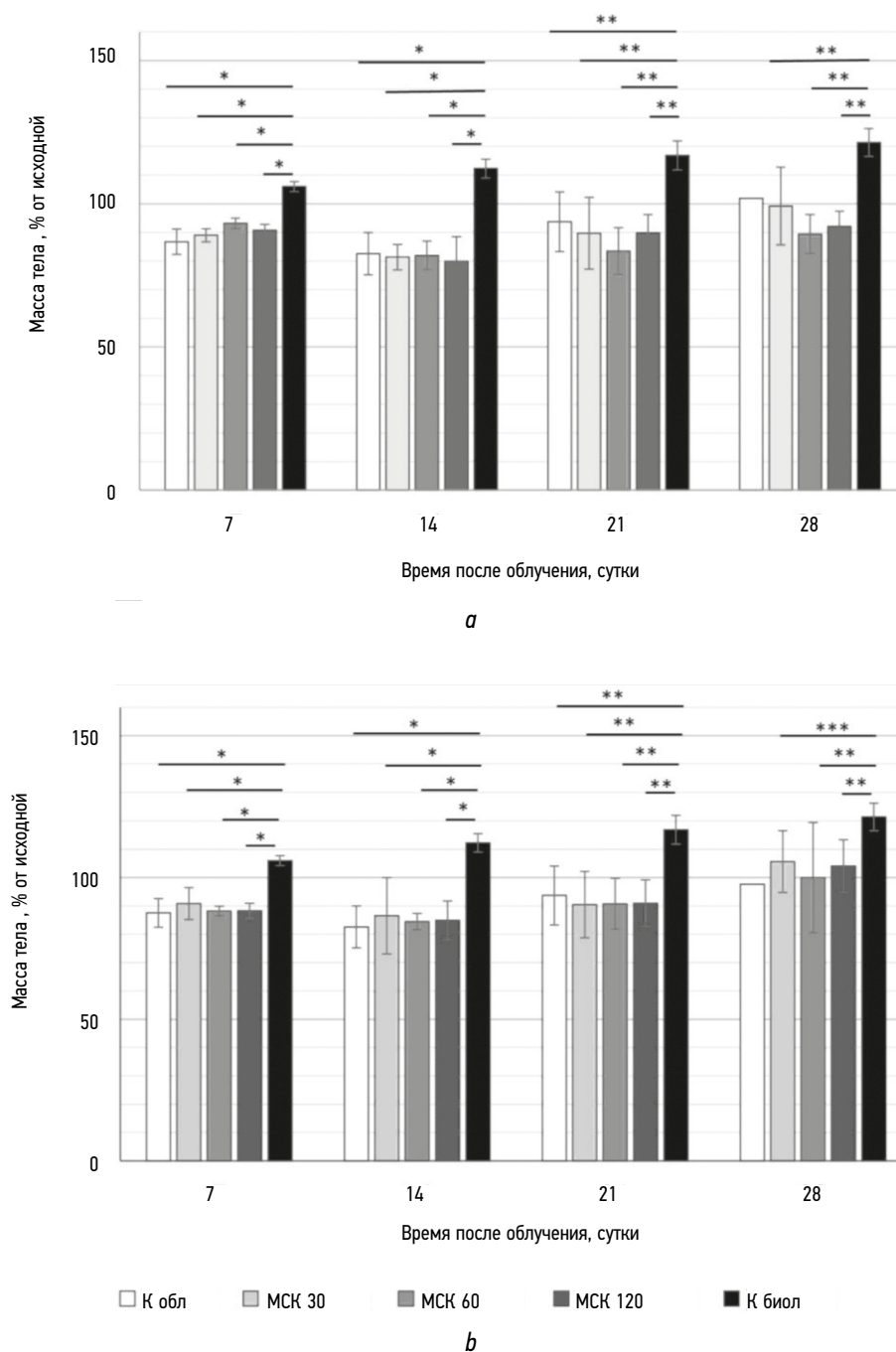


Рис. 5. Изменение массы тела у мышей: интактных (К биол), после облучения в дозе 7,8 Гр без лечения (К обл) или с введением стромальных клеток, выделенных из жировой ткани мыши (МСК, 30, 60 и 120 тыс. клеток/мышь): *a* — внутривенно; *b* — внутрибрюшинно. Различия по сравнению с группой К биол: * — $p < 0,001$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,05$ (*U*-критерий Манна – Уитни)
Fig. 5. Body weight change in mice: intact (To biol), after irradiation at a dose of 7.8 Gy without treatment (To vol), or with the introduction of stromal cells isolated from mouse adipose tissue (MSC, 30, 60, and 120 thousand cells/mouse): *a* — intravenous; *b* — intraperitoneal. Differences compared to the K biol group: * — $p < 0.001$; ** — $p < 0.01$; *** — $p < 0.05$ (Mann–Whitney *U* criterion)

При внутривенном введении ММСК к 30-м суткам после летального облучения восстановление массы тела до исходного уровня было отмечено в группе мышей с использованием минимального в эксперименте количества ММСК — 30 тыс. клеток/мышь. Изменение массы тела мышей после облучения и внутрибрюшинного введения ММСК имело сходный характер, на 30-е сутки после облучения исходный уровень массы тела был достигнут у 77 %

выживших животных, получивших лечение с ММСК вне зависимости от численности клеток.

Данные о клеточном составе периферической крови животных контрольных и опытных групп на 30-е сутки после рентгеновского воздействия в дозе 7,8 Гр представлены в таблице 2, из которой следует, что к окончанию срока наблюдения восстановления уровня лейкоцитов и тромбоцитов у облученных животных до показателей

Таблица 2. Клеточный состав периферической крови мышей на 30-е сутки после общего облучения в дозе 7,8 Гр без лечения и с внутривенным или внутрибрюшинным введением ММСК, выделенных из жировой ткани мыши, $Me [Q_{25}; Q_{75}]$

Table 2. Cellular composition of peripheral blood of mice on day 30 after total irradiation at a dose of 7.8 Gy without treatment and with intravenous or intraperitoneal administration of MMSCs isolated from mouse adipose tissue, $Me [Q_{25}; Q_{75}]$

Группа животных		Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$ (норма 3,5–9)	Эритроциты, $\times 10^{12}/\text{л}$ (норма 7–11)	Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$ (норма 200–800)
Интактная		8,8 [8,1; 9,5]	9,1 [8,7; 9,3]	400 [353; 452]
Контрольная 7,8 Гр		3,1 [2,4; 3,9]*	6,0 [5,0; 6,9]*	204 [141; 269]*
7,8 Гр + ММСК	в/в	4,2 [4,1; 4,8]*	7,8 [6,8; 8,3]*	172 [165; 182]*
30 тыс. клеток/мышь	в/б	3,6 [3,1; 3,8]*#	8,1 [7,4; 8,3]#	304 [253; 339]
7,8 Гр + ММСК	в/в	3,1 [2,6; 3,4]*	6,1 [5,3; 8,1]	308 [227; 330]*
60 тыс. клеток/мышь	в/б	5,3 [3,9; 5,5]*#	7,6 [7,6; 8,2]#	357 [334; 412]#
7,8 Гр + ММСК, 120 тыс.	в/в	2,6 [2,5; 2,9]*	4,6 [4,3; 8,6]*	219 [157; 263]*
клеток/мышь	в/б	4,3 [4,2; 4,9]*#	9,0 [8,4; 9,0]#	317 [277; 377]#

Примечание: в/в — внутривенно; в/б — внутрибрюшинно; * — различия по сравнению с интактной группой; # — по сравнению с контрольной 7,8 Гр группой, $p < 0,05$ (U -критерий Манна – Уитни).

Note: i/v — intravenous; i/p — intraperitoneal; * — differences compared to the intact group; # — compared to the control 7.8 Gy group, $p < 0.05$ (Mann–Whitney U test).

биологического контроля еще не происходило, однако у более 50 % облученных животных содержание этих клеток крови превысило нижнюю границу физиологической нормы для грызунов данного вида. При этом внутрибрюшинные инъекции суспензии ММСК обеспечивали восстановление численности лейкоцитов и тромбоцитов более эффективно, чем внутривенный путь доставки клеточного продукта — значимые отличия по сравнению с контрольной группой выявлялись после введения стромальных клеток во всех дозах.

Клеточная терапия с использованием ММСК также способствовала более быстрому восстановлению содержания эритроцитов в крови облученных животных, наиболее существенно при внутрибрюшном введении клеточного продукта. Изменения уровня гемоглобина и гематокрита имели схожую направленность и выраженность (результаты не представлены). Обращает на себя внимание, что наиболее низкие данные по оцениваемым показателям были получены при внутривенном введении ММСК в количестве 120×10^3 клеток.

Сохраняющаяся лейкопения была обусловлена, главным образом, снижением содержания лимфоцитов. Так, при внутривенном применении ММСК в количестве 30 тыс. клеток/мышь и во всем диапазоне доз в случае внутрибрюшного введения клеточной суспензии отмечалось повышение их уровня в сравнении с нелеченым контролем. Количественное содержание моноцитов у мышей всех экспериментальных групп отличалось от интактных животных незначительно; уровень нейтрофилов в крови облученных мышей на 30-е сутки после радиационного воздействия восстановился до уровня у животных группы К биол вне зависимости от пути доставки клеточного продукта при введении ММСК в количестве 60 тыс. клеток/мышь (табл. 3).

Таким образом, на 30-е сутки после облучения у животных при применении ММСК регистрировалось улучшение показателей периферической крови, при этом введение клеточного продукта в брюшную полость способствовало повышению эффективности клеточной терапии.

Макроскопическая оценка состояния внутренних органов лабораторных животных на 30-е сутки после облучения в дозе 7,8 Гр и клеточной терапии с внутривенным или внутрибрюшным введением аллогенных ММСК в разных дозах показала, что наиболее существенные патологические изменения регистрировались в легких, в меньшей степени в селезенке. У большинства облученных мышей без лечения или после проведенной терапии отмечено увеличение массы и объема легких, обусловленное воспалительными процессами в легочной ткани, что отразилось в значимом повышении значений массового индекса органа в сравнении с животными группы К биол (рис. 6).

Значения массового индекса селезенки у облученных мышей при разных вариантах клеточной терапии проиллюстрированы на рис. 7. У интактных животных масса селезенки составляла 196 [160; 202] мг, селезеночный массовый индекс — 6,06 [5,67; 6,75] %. На 30-е сутки после облучения масса и массовый индекс данного органа у животных, которым в терапевтических целях вводились ММСК, существенно отличались в зависимости от способа доставки клеточного продукта. При внутривенном введении значения данных показателей составляли 126 [97; 177] и 4,66 [3,54; 7,84] %, при этом только у 26,7 % облученных мышей их величины находились ниже уровня, характерного для интактных животных. При внутрибрюшинном введении масса органа не достигала значений физиологической нормы у 66,7 % животных, составляя 97 [76; 134] мг (в сравнении с биологическим контролем $p = 0,011$, критерий

Манна – Уитни), соответственно массовый индекс находился в диапазоне 3,08 [2,65; 4,12] % ($p = 0,003$).

Патологических нарушений в остальных жизненно важных органах (тимусе, печени, почках, сердце) у облученных мышей не выявлено, значения массового индекса между группами не имели отличий. В целом негативных эффектов при проведении клеточной терапии с использованием аллогенных клеток, полученных из жировой ткани, при обоих путях введения не выявлено.

Таким образом, результаты работы показали, что клеточная терапия с применением ММСК, полученных

из жировой ткани, может быть рассмотрена как эффективный способ лечения костномозговой формы ОЛБ.

Подводя краткий итог всему вышесказанному отметим, что в настоящее время существует много нерешенных вопросов относительно проведения клеточной терапии ОЛБ с использованием ММСК. Предметом дискуссий являются выбор источника получения ММСК, оптимальный временной интервал для их трансплантации после облучения организма, путь доставки клеточного продукта, количество введенных клеток, кратность введения. В нашем исследовании была использована популяция клеток

Таблица 3. Содержание основных форм лейкоцитов в периферической крови мышей на 30-е сутки после общего облучения в дозе 7,8 Гр без лечения и с внутривенным или внутрибрюшинным введением ММСК через 24 ч после радиационного воздействия, $Me [Q_{25}; Q_{75}]$

Table 3. Content of the main forms of leukocytes in the peripheral blood of mice on day 30 after total irradiation at a dose of 7.8 Gy without treatment and with intravenous or intraperitoneal administration of MMSC 24 h after radiation exposure, $Me [Q_{25}; Q_{75}]$

Группа животных		Лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	Моноциты, $\times 10^9/\text{л}$	Нейтрофилы, $\times 10^9/\text{л}$
Интактная		5,2 [4,8; 7,0]	1,3 [1,1; 1,4]	1,8 [1,4; 1,9]
Контрольная 7,8 Гр		1,1 [1,0; 1,6]*	0,6 [0,4; 1,1]	0,7 [0,5; 0,9]**
7,8 Гр + ММСК 30 тыс. клеток/мышь	в/в	1,68 [1,65; 2,6]*	1,4 [0,5; 1,6]	1,0 [0,5; 1,0]**
	в/б	1,68 [1,6; 1,7]*	1,1 [0,96; 1,2]	0,8 [0,8; 1,0]**
7,8 Гр + ММСК 60 тыс. клеток/мышь	в/в	1,2 [0,96; 1,3]*	0,96 [0,8; 1,2]	0,96 [0,96; 1,6]
	в/б	2,3 [1,0; 2,4]*	1,3 [1,3; 1,8]	1,3 [1,0; 1,4]
7,8 Гр + ММСК 120 тыс. клеток/мышь	в/в	1,3 [1,1; 1,6]*	0,8 [0,5; 0,8]	0,78 [0,6; 0,8]**
	в/б	2,1 [1,8; 2,3]*	1,3 [1,3; 1,4]	1,3 [0,8; 1,4]

Примечание: * — различия по сравнению с интактной группой, $p < 0,01$; ** — $p < 0,05$ (U-критерий Манна – Уитни).

Note: * — differences compared to the intact group, $p < 0.01$; ** — $p < 0.05$ (Mann–Whitney U test).

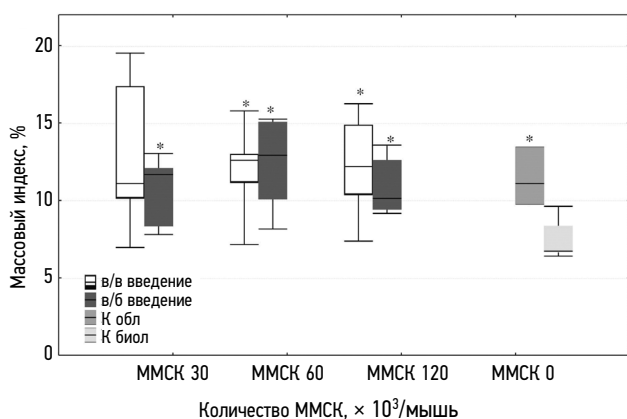


Рис. 6. Массовый индекс легких у интактных мышей группы К биол и на 30-е сутки после облучения в дозе 7,8 Гр в группе К обл без лечения или с введением ММСК, выделенных из жировой ткани мыши (30, 60 и 120 тыс. клеток/мышь). Различия по сравнению с группой К биол: * — $p < 0,05$ (U-критерий Манна – Уитни)

Fig. 6. Lung mass indices in intact mice of the biol group and on day 30 after irradiation at a dose of 7.8 Gy in the Kl group without treatment or with the introduction of MMSCs isolated from mouse adipose tissue (30, 60, and 120 thousand cells/mouse). Differences compared to the K biol group: * — $p < 0.05$ (Mann–Whitney U test)

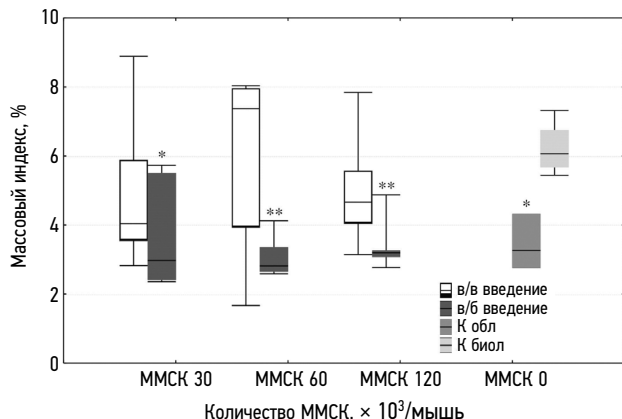


Рис. 7. Массовый индекс селезенки у интактных мышей (К биол) и на 30-е сутки после облучения в дозе 7,8 Гр в группе К обл без лечения или с введением ММСК, выделенных из жировой ткани мыши (30, 60 и 120 тыс. клеток/мышь). Различия по сравнению с группой К биол: * — $p < 0,01$; ** — $p < 0,05$ (U-критерий Манна – Уитни)

Fig. 7. Mass indices of the spleen in intact mice (K biol) and on day 30 after irradiation at a dose of 7.8 Gy in the Kl group without treatment or with the introduction of MMSCs isolated from mouse adipose tissue (30, 60, and 120 thousand cells/mouse). Differences compared to the biol group: * — $p < 0.01$; ** — $p < 0.05$ (Mann–Whitney U test)

адипогенного происхождения с учетом все возрастающего интереса к использованию жировой ткани в качестве источника ММСК, очевидными преимуществами которой являются ее доступность, относительно простые методологии выделения и культивирования ММСК, минимальные этические аспекты, содержание большого количества функционально активных и жизнеспособных стволовых клеток [12, 14].

При выборе срока проведения клеточной терапии мы руководствовались данными научной литературы и результатами ранее проведенных экспериментов *in vivo* и *in vitro*. Большинство авторов сходится во мнении, что оптимальная терапевтическая эффективность ММСК проявляется при их использовании в первые сутки после облучения; более отдаленные сроки приводят к снижению положительного действия клеточной терапии [15, 16]. На мышинной модели костномозговой формы ОРС и на клеточных культурах (моноклеарной фракции клеток костного мозга и ММСК, полученных из подкожной жировой ткани мышей) выявлено преимущество применения ММСК через 24 ч после облучения мышей в летальной дозе 7,5 Гр над более ранними сроками клеточной терапии ОРС: в течение 4 ч после острого лучевого воздействия в крови животных происходили изменения, вызывающие появление токсичности по отношению к клеточным системам. Через 24 ч цитопатогенное действие сыворотки крови облученных мышей полностью минимизировалось, что отразилось в повышении 30-суточной выживаемости облученных животных и положительной динамике в восстановлении костномозгового кроветворения и численности клеток периферической крови при использовании ММСК через 24 ч после облучения по сравнению с более ранним сроком клеточной терапии (2 ч после рентгеновского воздействия).

С клинической точки зрения внутривенный способ доставки биомедицинских клеточных продуктов, в том числе ММСК, в организм является наиболее перспективным и патогенетически оправданным. Однако накапливаются данные, свидетельствующие о кумуляции внутривенно введенных ММСК в легких и печени, что может привести к образованию микроэмболов и иметь серьезные последствия для функционирования этих органов [17–19], в связи с чем многими исследователями проводится поиск альтернативных способов введения. Основываясь на данных литературы, доказывающих способность внутрибрюшинно введенных ММСК мигрировать в пораженный после облучения костный мозг, обеспечивая его репаративное восстановление [20], нами была изучена эффективность клеточной терапии острого лучевого поражения при внутривенном и внутрибрюшинном способах введения клеточного продукта. Результаты проведенного исследования показали, что применение ММСК адипогенного происхождения при обоих путях доставки способствовало увеличению продолжительности жизни мышей после летального облучения, что является важным показателем

эффективности проведенной терапии, поскольку дает возможность снизить потенциальные риски фатального для организма исхода путем подключения поддерживающей терапии, в частности антибактериальной, противовоспалительной и др.

Эффективность ММСК после внесистемного введения связывают с их паракринными эффектами, обусловленными способностью ММСК стимулировать восстановление лучевого повреждения костного мозга за счет секреции гемопозитических факторов (гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (КСФ), макрофагальных воспалительных белков 1 α и 1 β , хемотаксического фактора гранулоцитов, хемоаттрактанта кератиноцитов, Rantes, интерлейкина (ИЛ)-17, КСФ макрофагов, фактора некроза опухолей альфа, зотаксина и индуцируемого γ -интерфероном белка 10), приводящих к существенному повышению количества лейкоцитов в периферической крови. Похожие данные были получены при применении кондиционной среды, полученной при культивировании ММСК, также обеспечивающей снижение тяжести ОРС и стимулирующей восстановление угнетенного гемопоэза, повышая выживаемость облученных мышей [20]. Подтверждением паракринного характера действия ММСК служат исследования, показавшие терапевтическую эффективность клеточного продукта на основе популяции стромальных клеток плаценты (PLX-RAD) при внутримышечном и подкожном введении [25, 26]. В период разгара острого лучевого синдрома у облученных в дозе 7,7 Гр мышей, получавших PLX-RAD, выявлялся высокий уровень 9 из 63 тестируемых белков человека, которые включали основные цитокины, связанные с кроветворением, такие как КСФ гранулоцитов, белок регуляции роста GRO, хемоаттрактантный белок-1 моноцитов (MCP-1), ИЛ-6 и ИЛ-8, концентрация которых достигала максимума на 6–9-е сутки эксперимента. Похожую кинетику имели и цитокины, в основном связанные с миграцией лейкоцитов, включая MCP-3 (CCL7), эпителиальный аттрактант нейтрофилов (ENA, CXCL5), зотаксин (CCL11) и фракталкин (CX3CL1) [21].

Полученные нами данные о снижении лечебного действия ММСК при повышении количества внутривенно введенных клеток, оцененного по показателю 30-суточной выживаемости облученных мышей, вероятно, могут быть объяснены «эффектом первого прохождения через легкие». По мнению И.В. Майбородина и др. [22], ММСК, аккумулярованные после внутривенного введения в легочной капиллярной сети, подвергаются макрофагальному фагоцитозу, после чего дебрис разрушенных клеток транспортируется с кровью в остальные органы, при этом при других способах доставки клеточного продукта эти процессы могут быть гораздо менее выражены.

Результаты нашего исследования, показавшие при внутривенном способе доставки клеточного продукта обратную зависимость выживаемости животных от дозы, могут служить доказательством необходимости

контроля количества введенных в организм ММСК при лучевом поражении системы кроветворения. Похожие данные были получены К.Х. Ну et al. [23], показавшими, что трансплантация ММСК костномозгового происхождения в количестве 5×10^7 клеток/кг повышала 30-суточную выживаемость мышей после γ -облучения в дозе 8 Гр до 43 % при абсолютной летальности в контрольной группе, а применение ММСК в меньшем или большем количестве ($2,5 \times 10^7$ и $1,5 \times 10^8$ клеток) обеспечивало соответственно выживаемость лишь 30 и 12 % облученных мышей. М. Bandekar et al. [15] выявили зависимость эффективности клеточной терапии ОРС у мышей от численности введенных стромальных клеток, полученных из вартонова студня (WJ-MSC): максимальное влияние на показатели выживаемости животных после облучения в дозе 8,5 Гр имела внутривенная трансплантация клеток в количестве 1×10^6 /мышь, при применении 0,25; 0,5 или $1,5 \times 10^6$ клеток защитный эффект снижался. Эти данные особенно важно учитывать при совместном с клеточной терапией применении препаратов, стимулирующих кроветворение.

Таким образом, данные литературы и полученные в нашем исследовании результаты свидетельствуют, что клеточная терапия костномозговой формы ОЛБ с использованием ММСК, полученных из жировой ткани, имеет несомненные перспективы. Обеспечить защиту от гибели животных после летального облучения способны аллогенные ММСК, характеризующиеся, в отличие от гемопоэтических стволовых клеток, низкой иммуногенностью или ее отсутствием, при этом терапевтические эффекты проявляются не только после внутривенной трансплантации клеточного продукта, но и после внутрибрюшинного введения. Поддержка гемопоэза после острого лучевого воздействия обеспечивается, как следует из литературных данных, путем стимуляции экспрессии цитокинов и хемокинов, участвующих в кроветворении, что сопровождается улучшением показателей гемопоэза и ускорением восстановления численности клеток крови функционального пула и, в конечном счете, приводит к более быстрому восстановлению организма после радиационного воздействия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На мышинной экспериментальной модели исследовано терапевтическое действие популяции фибробластоподобных клеток, полученных из стромально-васкулярной фракции подкожной жировой ткани мышей и выращенных в культуре, для лечения костномозговой формы острого радиационного синдрома. Клетки были идентифицированы как ММСК, поскольку обладали адгезивностью к пластике, формируя при культивировании конгломератный монослой, а процесс их остеогенной дифференцировки *in vitro* завершался созреванием остеобластов и формированием кальциевых депозитов, что свидетельствовало

об их мультипотентной природе. Для введения животным использовали ММСК на уровне 3–4 пассажа.

Клеточную терапию проводили через 24 ч после общего относительно равномерного рентгеновского облучения лабораторных мышей в дозе 7,8 Гр. В работе впервые проведено сравнение терапевтической эффективности аллогенной трансплантации ММСК при разных путях введения клеточной суспензии — внутривенном и внутрибрюшинном. Показано существенное повышение выживаемости мышей в течение 30-суточного периода наблюдения после облучения в летальной дозе, которое зависело от количества введенных клеток и способа доставки биомедицинского клеточного продукта. При внутривенном введении ММСК количество клеток в клеточном продукте 30 и 60 тыс. обеспечивало выживаемость соответственно 72,7 и 58,3 % облученных животных; в группе нелеченых мышей выжило 18,2 %. При увеличении численности клеток в клеточном продукте до 120 тыс. клеток/мышь эффективность терапии снижалась. При внутрибрюшинном способе доставки ММСК терапевтический эффект обнаруживался при введении ММСК во всем диапазоне доз — 30, 60 или 120 тыс. клеток/мышь; клеточная терапия защитила от гибели 67–75 % животных.

Снижение летальности лабораторных мышей с острым лучевым костномозговым синдромом при аллогенной трансплантации ММСК сопровождалось улучшением гемопозитических показателей, ускорением восстановления численности клеток крови функционального пула. На фоне введения ММСК на 30 сутки после облучения у 70–80 % животных происходило восстановление значений основных показателей системы кроветворения до исходного уровня.

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют, что клеточная терапия с использованием ММСК, выделенных из жировой ткани, при внутривенном и внутрибрюшинном путях доставки клеточного продукта в облученный организм обеспечивает защиту мышей от гибели после воздействия рентгеновского излучения в летальных дозах, способствуя снижению тяжести лучевого поражения гемопоэтической системы у мышей, и имеет очевидные перспективы для дальнейших работ.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Вклад каждого автора. Е.В. Мурзина, Н.В. Пак — разработка общей концепции, дизайн исследования, анализ данных, написание статьи; Н.В. Аксенова, Н.А. Жирнова — анализ данных, подготовка статьи к публикации; О.М. Веселова, А.А. Ховпачев, Н.В. Белый — сбор материалов для исследования, анализ данных.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Этический комитет. Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова (№ 267 от 19.07.2022).

ADDITIONAL INFORMATION

Authors' contribution. Thereby, all authors made a substantial contribution to the conception of the study, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting

and revising the article, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the study.

The contribution of each author. E.V. Murzina, N.V. Pak — development of a general concept, research design, data analysis, writing an article; N.V. Aksenova, N.A. Zhirnova — data analysis, preparation of an article for publication; O.M. Veselova, A.A. Khovpachev, N.V. Bely — collection of materials for research, data analysis.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Ethics approval. The present study protocol was approved by the local Kirov Military Medical Academy, (reference number: 267, 19.07.2022).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Меркулов В.А., Бунятян Н.Д., Радаев С.М. Проблемы и перспективы применения клеточной терапии в клинической практике // Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. 2011. № 2. С. 35–38. EDN: RWVTFZ
2. Москалев А.В., Гумилевский Б.Ю., Апчел А.В., Цыган В.Н. Стволовые клетки и их физиологические эффекты // Вестник Российской военно-медицинской академии. 2019. Т. 58, № 4. С. 172–180. EDN: ZBDYZF
3. Qian L., Cen J. Hematopoietic stem cells and mesenchymal stromal cells in acute radiation syndrome // *Oxid Med Cell Longev*. 2020. Vol. 2020. P. 8340756. doi: 10.1155/2020/8340756
4. Singh V.K., Seed T.M. Pharmacological management of ionizing radiation injuries: current and prospective agents and targeted organ systems // *Expert Opin Pharmacother*. 2020. Vol. 21, N. 3. P. 317–337. doi: 10.1080/14656566.2019.1702968
5. Власенко А.Н., Гайдук С.В., Легеза В.И., и др. Клиническая радиология. Санкт-Петербург: Фолиант, 2020. 448 с.
6. Самойлов А.С., Кончаловский М.В., Бушманов А.Ю., и др. Рекомендации по диагностике и лечению костно-мозговой формы острой лучевой болезни // *Гематология и трансфузиология*. 2023. Т. 68, № 1. С. 98–128. EDN: NONQCI doi: 10.35754/0234-5730-2023-68-1-98-12
7. Asano S. Current status of hematopoietic stem cell transplantation for acute radiation syndromes // *Int J Hematol*. 2012. Vol. 95, N. 3. P. 227–231. doi: 10.1007/s12185-012-1027-8
8. Калмыкова Н.В., Александрова С.В. Терапевтическое действие полипотентных мезенхимальных стромальных клеток после радиационного воздействия // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2016. Т. 56, № 2. С. 117–137. EDN: VVHLHR doi: 10.7868/S0869803116020077
9. Rezvani M. Therapeutic potential of mesenchymal stromal cells and extracellular vesicles in the treatment of radiation lesions — a review // *Cells*. 2021. Vol. 10, N. 2. P. 427. doi: 10.3390/cells10020427
10. Потапнев М.П. Пути повышения эффективности клеточной терапии на основе мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток // *Гены и клетки*. 2021. Т. 16, № 4. С. 22–28. EDN: FWMWHS doi: 10.23868/202112003
11. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. Санкт-Петербург: Rus-LASA «НП объединение специалистов по работе с лабораторными животными», 2012. 48 с.
12. Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells // *Mol Biol Cell*. 2002. Vol. 13, N. 12. P. 4279–4295. doi: 10.1091/mbc.E02-02-0105
13. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells // *Cytotherapy*. 2006. Vol. 8, N.4. P. 315–317. doi: 10.1080/14653240600855905
14. Васильев В.С., Мантурова Н.Е., Васильев С.А., Терюшкова Ж.И. Биологическая характеристика жировой ткани // *Пластическая хирургия и эстетическая медицина*. 2019. № 2. С. 33–42. EDN: FFFVTP doi: 10.17116/plast.hirurgia201902133
15. Bandekar M., Murya D.K., Sharma D., Sandur S.K. Preclinical studies and clinical prospects of Wharton's Jelly-derived MSC for treatment of acute radiation syndrome // *Curr Stem Cell Rep*. 2021. Vol. 7, N. 2. P. 85–94. doi: 10.1007/s40778-021-00188-4
16. Kovalenko O.A., Azzam E.I., Ende N. Human umbilical cord blood mononucleated cells enhance the survival of lethally irradiated mice: dosage and the window of time // *J Radiat Res*. 2013. Vol. 54, N. 6. P. 1010–1014. doi: 10.1093/jrr/rrt062
17. Lee R.H., Pulin A.A., Seo M.J., et al. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6 // *Cell Stem Cell*. 2009. Vol. 5, N. 1. P. 54–63. doi: 10.1016/j.stem.2009.05.003
18. Schmuck E.G., Koch J.M., Centanni J.M., et al. Biodistribution and clearance of human mesenchymal stem cells by quantitative three-dimensional cryo-imaging after intravenous infusion in a rat lung injury model // *Stem Cells Transl Med*. 2016. Vol. 5, N. 12. P. 1668–1675. doi: 10.5966/sctm.2015-0379
19. Паюшина О.В., Цомартова Д.А., Черешнева Е.В., и др. Регуляторное влияние мезенхимных стромальных клеток на развитие фиброза печени: клеточно-молекулярные механизмы и перспективы клинического применения // *Жур-*

нал общей биологии. 2020. Т. 81, № 2. С. 83–95. EDN: EOGIBI
doi: 10.31857/S0044459620020062

20. Chinnapaka S., Yang K.S., Samadi Y., et al. Allogeneic adipose-derived stem cells mitigate acute radiation syndrome by the rescue of damaged bone marrow cells from apoptosis // *Stem Cells J.* 2021. Vol. 10, N. 7. P. 1095–1114. doi: 10.1002/sctm.20-0455

21. Pinzur L., Akyuez L., Levdansky L., et al. Rescue from lethal acute radiation syndrome (ARS) with severe weight loss by secretome of intramuscularly injected human placental stromal cells // *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2018. Vol. 9, N. 6. P. 1079–1092. doi: 10.1002/jcsm.12342

22. Майбородин И.В., Маслов Р.Н., Михеева Т.В., и др. Распределение мультипотентных мезенхимных стромальных клеток и их детрита по организму после подкожного введения // *Журнал общей биологии.* 2020. Т. 81, № 2. С. 96–107. EDN: JPTPXD
doi: 10.31857/S0044459620020050

23. Hu K.X., Sun Q.Y., Guo M., Ai H.S. The radiation protection and therapy effects of mesenchymal stem cells in mice with acute radiation injury // *British J Rad.* 2010. Vol. 83, N. 985. P. 52–58. doi: 10.1259/bjr/61042310

REFERENCES

1. Merkulov VA, Bunyatyan ND, Radaev SM. Problems and perspectives of cell therapy in clinical practice. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation.* 2011;(2):35–38. EDN: RWVTFZ

2. Moskalev AB, Gumileskiy BYu, Apchel AV, Tsygan VN. Stem cells and their physiological effects. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy.* 2019;68(4):172–180. EDN: ZBDYZF

3. Qian L, Cen J. Hematopoietic stem cells and mesenchymal stromal cells in acute radiation syndrome. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;2020:8340756. doi: 10.1155/2020/8340756

4. Singh VK, Seed TM. Pharmacological management of ionizing radiation injuries: current and prospective agents and targeted organ systems. *Expert Opin Pharmacother.* 2020;21(3):317–337. doi: 10.1080/14656566.2019.1702968

5. Vlasenko AN, Gaiduk SV, Legeza VI, et al. *Clinical radiology.* Saint Petersburg: Foliant; 2020. 448 p. (In Russ.)

6. Samoylov AS, Konchalovsky MV, Bushmanov Ayu, et al. Recommendations for the diagnosis and treatment of bone marrow form of acute radiation syndrome. *Gematologiya i transfuziologiya.* 2023;68(1):98–128. EDN: NONQCI
doi: 10.35754/0234-5730-2023-68-1-98-12

7. Asano S. Current status of hematopoietic stem cell transplantation for acute radiation syndromes. *Int J Hematol.* 2012;95(3):227–231. doi: 10.1007/s12185-012-1027-8

8. Kalmykova NV, Alexandrova SV. Therapeutic effects of multipotent mesenchymal stromal cells after irradiation. *Radiation biology. Radioecology.* 2016;56(2):117–137. EDN: VVHLHR
doi: 10.7868/S0869803116020077

9. Rezvani M. Therapeutic potential of mesenchymal stromal cells and extracellular vesicles in the treatment of radiation lesions — a review. *Cells.* 2021;10(2):427. doi: 10.3390/cells10020427

10. Potapnev MP. Analysis of approaches to increase the efficacy of cell therapy based on mesenchymal stromal cells. *Genes & Cells.* 2021;16(4):22–28. EDN: FWMWHS
doi: 10.23868/202112003

11. Directive 2010/63/EU of the European parliament and of the council of 22 September 2010 on the protection of animals used for

scientific purposes (Text with EEA relevance). *Official Journal of the European Union.* 2010:33–79. (In Russ.)

12. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002;13(12):4279–4295. doi: 10.1091/mbc.E02-02-0105

13. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315–317. doi: 10.1080/14653240600855905

14. Vasil'ev VS, Manturova NE, Vasil'ev SA, Teryushkova ZhI. Biological features of adipose tissue. *Plastic Surgery and Aesthetic Medicine.* 2019;2:33–42. EDN: FFFVTP
doi: 10.17116/plast.hirurgia201902133

15. Bandekar M, Maurya DK, Sharma D, Sandur SK. Preclinical studies and clinical prospects of Wharton's Jelly-derived MSC for treatment of acute radiation syndrome. *Curr Stem Cell Rep.* 2021;7(2):85–94. doi: 10.1007/s40778-021-00188-4

16. Kovalenko OA, Azzam EI, Ende N. Human umbilical cord blood mononucleated cells enhance the survival of lethally irradiated mice: dosage and the window of time. *J Radiat Res.* 2013;54(6):1010–1014. doi: 10.1093/jrr/rrt062

17. Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, et al. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell.* 2009;5(1):54–63. doi: 10.1016/j.stem.2009.05.003

18. Schmuck EG, Koch JM, Centanni JM, et al. Biodistribution and clearance of human mesenchymal stem cells by quantitative three-dimensional cryoimaging after intravenous infusion in a rat lung injury model. *Stem Cells Transl Med.* 2016;5(12):1668–1675. doi: 10.5966/sctm.2015-0379

19. Payushina OV, Tsomartova DA, Cheresheva YV., et al. Regulatory effects of mesenchymal stromal cells on the development of liver fibrosis: Cellular and molecular mechanisms and prospects of clinical application. *Journal of General Biology.* 2020;81(1):83–95. doi: 10.31857/S0044459620020062

20. Chinnapaka S, Yang KS, Samadi Y, et al. Allogeneic adipose-derived stem cells mitigate acute radiation syndrome by the rescue of damaged bone marrow cells from apoptosis. *Stem Cells J.* 2021;10(7):1095–1114. doi: 10.1002/sctm.20-0455

21. Pinzur L, Akyuez L, Levdansky L, et al. Rescue from lethal acute radiation syndrome (ARS) with severe weight loss by secretome of intramuscularly injected human placental stromal cells. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2018;9(6):1079–1092. doi: 10.1002/jcsm.12342

22. Maiborodin IV, Maslov RV, Mikheeva TV, et al. The distribution of multipotent mesenchymal stromal cells and their detritus

throughout the organism after subcutaneous introduction. *Journal of General Biology*. 2020;81(1):96–107. EDN: JPTPXDOI doi: 10.31857/S0044459620020050

23. Hu KX, Sun QY, Guo M, Ai HS. The radiation protection and therapy effects of mesenchymal stem cells in mice with acute radiation injury. *British J Rad*. 2010;83(985):52–58. doi: 10.1259/bjr/61042310

ОБ АВТОРАХ

***Елена Викторовна Мурзина**, канд. биол. наук;
ORCID: 0000-0001-7052-3665; eLibrary SPIN: 5188-0797;
e-mail: elenmurzina@mail.ru

Наталья Викторовна Пак, канд. биол. наук;
ORCID: 0000-0003-1239-5663; eLibrary SPIN: 7181-3780

Наталья Владимировна Аксенова, канд. мед. наук,
ORCID: 0000-0002-5645-7072; eLibrary SPIN: 6821-6887

Наталья Андреевна Жирнова, канд. биол. наук;
ORCID: 0000-0002-9948-6260; eLibrary SPIN: 8308-2139

Ольга Михайловна Веселова, научный сотрудник;
ORCID: 0009-0007-9345-1845; eLibrary SPIN: 4864-8391

Алексей Андреевич Ховпачев, канд. мед. наук;
ORCID: 0009-0002-5780-1557; eLibrary SPIN: 6189-3624

Николай Викторович Белый, врач клинической лабораторной диагностики; ORCID: 0000-0002-9370-8678;
eLibrary SPIN: 8676-3186

AUTHORS INFO

***Elena V. Murzina**, MD, Cand. Sci. (Biol.);
ORCID: 0000-0001-7052-3665; eLibrary SPIN: 5188-0797;
e-mail: elenmurzina@mail.ru

Natalya V. Pak, MD, Cand. Sci. (Biol.);
ORCID: 0000-0003-1239-5663; eLibrary SPIN: 7181-3780

Natalia V. Aksenova, MD, Cand. Sci. (Med.);
ORCID: 0000-0002-5645-7072; eLibrary SPIN: 6821-6887

Natalya A. Zhirnova, MD, Cand. Sci. (Biol.);
ORCID: 0000-0002-9948-6260; eLibrary SPIN: 8308-2139

Olga M. Veselova, researcher; ORCID: 0009-0007-9345-1845;
eLibrary SPIN: 4864-8391

Aleksej A. Khovpachev, MD, Cand. Sci. (Med.);
ORCID: 0009-0002-5780-1557; eLibrary SPIN: 6189-3624

Nikolaj V. Belyj, clinical laboratory diagnostics doctor;
ORCID: 0000-0002-9370-8678; eLibrary SPIN: 8676-3186

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author