

© Коллектив авторов, 2017  
УДК 616-001.28

Дешевой Ю.Б., Мороз Б.Б., Насонова Т.А., Лебедев В.Г., Добрынина О.А., Лырщикова А.В.

## **Влияние культивированных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани на восстановление кожи при местных лучевых поражениях**

ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна»  
ФМБА России, 123182, г. Москва, Россия, ул. Живописная, д. 46

**Цель** — изучение лечебной эффективности сингенных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) при тяжелых лучевых поражениях кожи. **Методы.** Эксперименты проводили на крысах инбредной линии Wistar-Kyoto. Локальное облучение в дозе 110 Гр (напряжение на трубке 30 кВ, ток 6,1 мА, фильтр Al толщиной 0,1 мм) выполняли на рентгеновской установке. Мощность дозы — 17,34 Гр/мин. Площадь облучения — 8,5 см<sup>2</sup>. Такое радиационное воздействие позволяло получать тяжелые лучевые поражения кожи с длительно (до 3,5 мес.) не заживающими язвами. ММСК выделяли из подкожной жировой ткани интактных животных с помощью коллагеназы и затем культивировали их *in vitro*. ММСК вводили (1,6—1,8 × 10<sup>6</sup> клеток на одну инъекцию) под кожу вокруг лучевых язв. Тяжесть лучевого поражения кожи и эффекты клеточной терапии оценивали в динамике по клиническим проявлениям, с помощью планиметрии и патоморфологических методов. **Результаты.** Установлено, что введение культивированных сингенных ММСК дважды через 27 и 34 сут. или через 34 и 42 сут. после локального облучения, способствует усилению регенераторных процессов в пораженной ткани, что проявлялось более быстрым заживлением лучевых язв у леченых животных по сравнению с облученным контролем. **Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют, что трансплантированные аутологичные ММСК, полученные из жировой ткани, могут быть эффективны при лечении длительно незаживающих лучевых язв.

**Ключевые слова:** клеточная терапия; мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки; жировая ткань; рентгеновское излучение; лучевые язвы кожи.

**Для цитирования:** Дешевой Ю.Б., Мороз Б.Б., Насонова Т.А., Лебедев В.Г., Добрынина О.А., Лырщикова А.В. Влияние культивированных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани на восстановление кожи при местных лучевых поражениях. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2017; 61(4): 62—66. DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8524

**Для корреспонденции:** Дешевой Юрий Борисович, канд. мед. наук, вед. науч. сотр., центр биомедицинских технологий ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна, ФМБА России, e-mail: iury.deshevoi@yandex.ru

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 18.03.2017

Deshevoy Yu.B., Moroz B.B., Nasonova T.A., Lebedev V.G., Dobrynina O.A., Lirshnikova A.V.

## **Effect of cultivated multipotent mesenchymal stromal cells of adipose tissue to restore skin with local radiation lesions**

A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, 46, Zhivopisnaya str., Moscow, 123182, Russia

**The purpose.** Study of the therapeutic effectiveness of syngeneic mesenchymal stem cells (MMSK) with heavy radiation skin lesions. **Methods.** Experiments conducted on rats Wistar-Kyoto inbred. Local irradiation dose of 110 Gy (voltage on the tube 30 kV, current 6.1 Ma, filter 0.1 mm thick Al) served through an x-ray machine. Dose rate is 17.34 Gy/min. Area field irradiation was 8.5 cm<sup>2</sup>. Radiative forcing is allowed to receive severe radiation damage of the skin with long (up to 3.5 months) did not heal ulcers. MMSK singled out of the subcutaneous adipose tissue intact animals using collagenase and then cultivated *in vitro*. MMSK injected (1.6—1.8 × 10<sup>6</sup> cells per injection) under the skin around the radiation ulcers. The severity of radiation injury to the skin and the effects of cell therapy were evaluated in the dynamics of clinical manifestations, using planar geometry and pathomorphological methods. **Results.** It has been established that the introduction of cultivated syngeneic MMSK, investigated through 27 and 34 days or twice through 34 and 42 days after local irradiation enhances regenerative processes in the affected tissue, which showed faster healing Ray treated ulcers in animals compared to the irradiated control. **Conclusion.** The results showed that the transplanted autologous MMSK derived from adipose tissue, can be effective in the treatment of long-term healing of radiation ulcers.

**Key words:** cellular therapy; multipotent mesenchymal stromal cells; adipose tissue; X-ray; radiation skin ulcers.

**For citation:** Deshevoy Yu.B., Moroz B.B., Nasonova T.A., Lebedev V.G., Dobrynina O.A., Lirhshikova A.V. Effect of cultivated multipotent mesenchymal stromal cells of adipose tissue to restore skin with local radiation lesions. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimentalnaya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61(4): 62–66. (in Russian). DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8524

**For correspondence:** Yuri B. Deshevoy, Candidate of Medical Sciences, Leading Researcher A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, 46, Zhivopisnaya str., Moscow, 123182, Russia Federation, e-mail: iury.deshevoi@yandex.ru

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

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

#### Information about authors:

Deshevoi Yu.B., <http://orcid.org/0000-0003-2755-5674>

Moroz B.B., <http://orcid.org/0000-0002-9982-723X>

Nasonova T.A., <http://orcid.org/0000-0003-1511-4329>

Received 18.03.2017

## Введение

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК), выделенные из костного мозга, способны замещать и восстанавливать структуру и функции поврежденных тканей и могут использоваться для клеточной терапии различных заболеваний [1, 2]. Существует 3 основных источника для выделения ММСК у человека: костный мозг, подкожная жировая ткань и пуповинная кровь. Показана близость функциональных свойств ММСК, полученных из различных тканей [3]. Тем не менее, в настоящее время жировая ткань у человека является предпочтительным источником получения ММСК для клеточной терапии. Это обусловлено тем, что в подкожной жировой ткани концентрация ММСК гораздо выше, чем в других тканях [4]. Жировую ткань просто получать в больших количествах в клинических условиях и процедура ее выделения безопасна. Обработка выделенного жира коллагеназой с дальнейшим центрифугированием позволяет быстро получить клетки стромальной васкулярной фракции жировой ткани (СВКФ). Стромальная васкулярная фракция жировой ткани является сложным клеточным комплексом, содержащим стволовые клетки, эндотелиальные и гладкомышечные клетки кровеносных сосудов и их предшественники, перидциты, фибробласты и клетки крови [4, 5]. СВКФ служат источником для выделения ММСК жировой ткани.

Тяжелые лучевые поражения кожи очень трудно поддаются лечению и склонны к хроническому течению с серьезными осложнениями [6]. Методы клеточной терапии могут быть эффективны при терапии данной патологии [7, 8]. Трансплантированные ММСК жировой ткани оказывают существенное влияние на репаративные процессы в поврежденных тканях. Информация о свойствах, выделенных из жи-

ровой ткани ММСК, их идентификации, перспективах клинического использования для тканевой инженерии и в регенерационной медицине представлена в ряде обзоров [4, 5, 9]. Имеются единичные наблюдения об эффективности стволовых клеток жировой ткани при лечении лучевых ожогов кожи [10–12].

Целью работы является изучение возможности применения ММСК, выделенных из жировой ткани и культивированных *in vitro*, для совершенствования метода клеточной терапии тяжелых лучевых поражений кожи.

## Методика

Исследования были проведены на крысах, самцах инбредной линии Wistar-Kyoto массой 200–220 г, полученных из питомника лабораторных животных ФИБХ РАН (г. Пушкино). Использование инбредных животных позволяет проводить трансплантации ММСК в сингенной системе (без отторжения пересаженных клеток). Все процедуры и эксперименты на животных проводили в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 267 от 19.06.2003 г.

Предварительно фиксированных крыс облучали локально в области спины на рентгеновской установке РАП 100 — 10 в дозе 110 Гр (напряжение на трубке 30 кВ, ток 6,1 мА, фильтр Al толщиной 0,1 мм). Мощность дозы — 17,34 Гр/мин. Такое радиационное воздействие позволяло получать тяжелые лучевые поражения кожи с длительно (до 3,5 мес.) не заживающими язвами [13].

Забор подкожной жировой ткани методом операционной липоэктомии из брюшной и паховых областей проводили у наркотизированных (золетил, в/бр в дозе

10 мг/кг) интактных крыс [14], которые не использовались в дальнейших экспериментах. Выделение СВКФ жировой ткани выполняли посредством использования коллагеназы IА для растворения коллагеновых волокон и освобождения клеток из предварительно размельченной жировой ткани. После центрифугирования и отмывки от фермента получали очищенную СВКФ [15, 16]. Далее клетки сразу после их выделения суспендировали в культуральной среде Iscov'MDM + GlutaMax + Neres (Sigma, США), содержащей 15% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота («HyClone», США), гентамицин 50,0 мг/л, амфотерицин Б 2,5 мг/л и высаживали в культуральные пластиковые флаконы для получения ММСК и наработки этих клеток *in vitro* [16]. Культивирование проводили в CO<sub>2</sub> инкубаторе (Sanyo, Япония). Клетки формировали на дне флакона монослой и имели фибробластоподобную морфологию. Характеристика клеточной культуры, проведенная методом непрямой иммунофлуоресценции, показала, что в 100% клеток выявлялся виментин — белок цитоплазматического скелета стромальных клеток,

коллаген I типа и коллаген III типа — белок межклеточного матрикса, синтезируемый ММСК различного уровня дифференцировки. Для клеточной терапии использовали ММСК второго пассажа. Перед трансплантацией клетки отслаивали со дна флакона (трипсин-ЭДТА), отмывали от фермента, подсчитывали и далее разводили стерильным раствором Хенкса до необходимой концентрации. Суспензию ММСК в 1 мл раствора вводили под кожу в 5 точек (по 0,2 мл на точку) вокруг лучевой язвы, отступив 2—3 мм от края очага.

Трансплантацию ММСК проводили в 2 отдельных экспериментах в период, когда в сформировавшейся лучевой язве должны активизироваться процессы, приводящие к восстановлению облученной ткани. В 1-м опыте — крысам (17 особей) трансплантировали ММСК дважды — через 27 (в дозе  $1,8 \times 10^6$  клеток на животное) и 34 сут. (в дозе  $1,6 \times 10^6$  клеток на животное) после облучения. Во 2-м опыте ММСК (9 животных) вводили дважды в тех же количествах, но через 34 и 42 сут. Контроль (облученные животные без лечения) составили: в 1-м опыте — 17, во 2-м — 9 крыс. Наблюдение за животными проводили в течение 100—105 сут. после воздействия радиации.

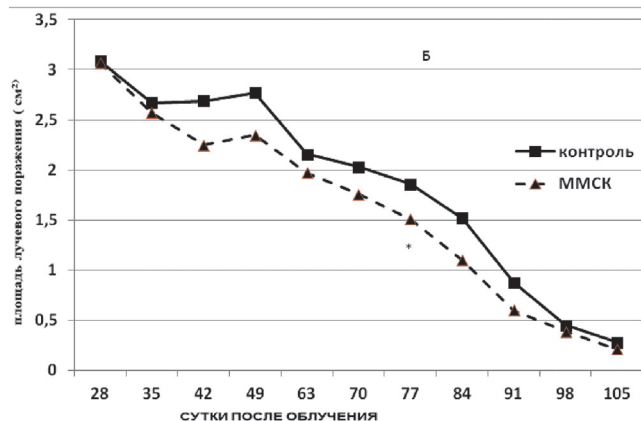
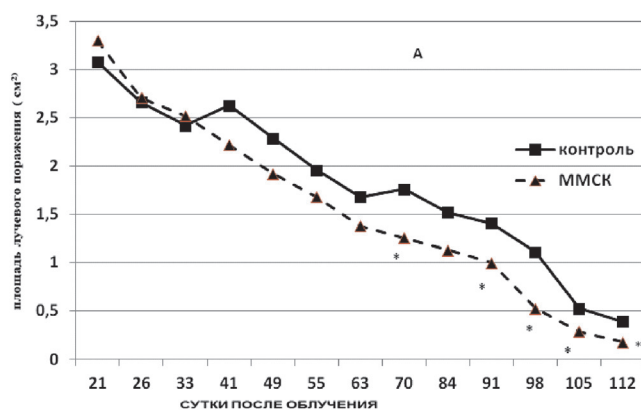
Тяжесть течения лучевого поражения и эффективность клеточной терапии оценивали в динамике по изменению клинической картины и площади пораженного участка кожи, определяемого методом планиметрии. Для этого производили фотосъемку лучевой язвы цифровой фотокамерой Canon и рассчитывали площадь поражения кожи с помощью компьютерной программы AutoCad 14.

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

### Результаты и обсуждение

В начальный период после облучения клиническая картина поражения кожи у всех животных была примерно одинакова. Так, на 8-е — 11-е сут. у крыс в области поражения наблюдались симптомы сухого дерматита. К 14-м — 16-м сут. появилась экссудация и сухой дерматит переходил во влажный. Через 21—25 сут. после радиационного воздействия на коже крыс образовывались язвы, покрытые струпом коричневого цвета. Далее происходило либо постепенное заживление язв с образованием атрофического рубца, либо патологический процесс приобретал хроническое течение.

На рисунке (А, Б) представлены данные изменения площади поражения кожи у разных групп живот-



Динамика заживления лучевых язв кожи у крыс после локального облучения в условиях трансплантации ММСК жировой ткани. А — трансплантация ММСК через 27 и 34 сут.; Б — введение ММСК через 34 и 42 сут. \* — статистически значимые различия по сравнению с облученным контролем ( $p < 0,05$ ).

ных после облучения. Результаты показывают, что введение ММСК через 27 и 34 сут. после локального облучения способствует активизации регенераторных процессов в облученной ткани, что проявилось в ускорении заживления лучевых язв. Так, начиная с 42-х сут. после воздействия радиации, площадь лучевых язв у леченных животных была на 15—52% меньше, по сравнению с облученным контролем. Второй эксперимент с отсроченным на 1 нед. введением ММСК показал несколько меньшую эффективность — площади лучевой язвы у леченных животных были меньше на 9—32% по сравнению с облученным контролем.

Наши результаты близки к данным, опубликованным в обзорной статье [17], где эффективность применения ММСК при лечении вялотекущих язв кожи (не лучевой этиологии) у животных была менее выражена — скорость заживления ран после трансплантации повышалась не более чем на 20—35% по сравнению с контролем. Можно предположить, что в условиях комплексной терапии эффективность применения ММСК будет возрастать.

Реализация лечебного действия трансплантированных клеток зависит от многих факторов: от исходного статуса клетки и потенциала дальнейшей её дифференцировки; способности клетки секретировать цитокины и факторы роста; необходимости приживания и дальнейшего выживания клеток для достижения желаемого результата, способности введенных клеток заменять погибшие и поврежденные клетки, стимулировать эндогенные механизмы репарации и регенерации, а также от миграционных способностей клеток.

Лечебный эффект от введения аутологичных или сингенных ММСК под кожу вокруг лучевой язвы может быть связан с тем, что ММСК выживают после трансплантации и длительно остаются в зоне близкой к пораженному участку кожи [12, 18—20]. Судьба этих клеток не совсем понятна. Могут ли они пролиферировать? Как длительно сохраняется их функциональная активность? Способны ли они к дифференцировке или трансдифференцировке?

Считается, что пересаженные в кожу ММСК могут дифференцироваться там в конечном счете в фибробласты и жировые клетки. Предполагается, что лечебный эффект ММСК все таки в большей степени связан с их паракринным действием: выработкой различных факторов роста, усилением неоангиогенеза, снижением местной воспалительной реакции [5, 9, 18, 20, 21].

Таким образом, трансплантированные аутологичные ММСК могут быть эффективны при лечении длительно незаживающих лучевых язв за счет стимулирующего их действия на регенераторные процессы в облученной ткани.

## References

1. Tuan R.S., Boland G., Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res. Ther.* 2003; 5(1): 32-45.
2. Phinney D.G., Prockop D.J. Concise review. Mesenchymal stem cells/multipotent stromal cells: the state of trans-differentiation and modes of tissue repair — current views. *Stem Cells.* 2007; 25(11): 2896-902.
3. Kern S., Eichler H., Stoeve J., Kluter H., Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem cells.* 2006; 24(5): 1294-301.
4. Bourin P., Bunnell B.A., Casteilla L., Dominici M., Katz A.J., March K.L. et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and cultured expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for adipose therapeutics and the International Society for cellular therapy (ISCT). *Cytotherapy.* 2013; 15: 641-8.
5. Terskikh V.V., Kiseleva E.V. Biological peculiarities and therapeutic potential of stromal cells of adipose tissue. Review. *Plasticheskaya hirurgiya i kosmetologiya.* 2010; 4: 613-21. (in Russian)
6. Bushmanov A.J., Nadejina N.M., Nugis V.Yu., Galshtyan I.A. Local radiation damage of human skin: possible biological indication of dose (analytical review). *Medicinskaya radiologiya i radiacionnaya bezopasnost.* 2005; 50 (1): 37-47. (in Russian)
7. Moroz B.B., Onischenko N.A., Lebedev V.G., Deshevoi Yu.B., Nasonova T.A., Dobrynina O.A., Lyschikova A.V. Influence of multipotent mesenchymal stromal cells of bone marrow on process the local radiation injury in rats after local  $\beta$ -irradiation. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya.* 2009; 49 (6): 688-93. (in Russian)
8. Kotenko K.V., Moroz B.B., Nadejina N.M., Deshevoi Yu.B., Nasonova T.A., Dobrynina O.A., Lyschikova A.V. Mesenchymal stem cells transplantation in the treatment of radiation skin lesions. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya.* 2011; 55(1): 2-7. (in Russian)
9. Gimble J.M., Guilak F., Bunnell B. Clinical and pre-clinical translation of cell-based therapies using adipose tissue-derived cells. *Stem Cell Research & Therapy.* 2010; 1: 19.
10. Rigotti G., Marchi A., Galie M., Baroni G., Krampera M., Pasini A. et al. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose tissue-derived adult stem cells. *Plast. Reconstr. Surg.* 2007; 119(5): 1409-22.
11. Riccodono D., Agay D., Scherthan H. Application adipose-derived stem cells in treatment of cutaneous radiation syndrome. *Health Phys.* 2012; 103(2): 120-6.
12. Sheng-Ping Huang, Chun-Hsiang Huang, Jia-Fwu Shyu, Heng-Sheng Lee. Promotion of wound healing using adipose-derived stem cells in radiation ulcer of a rat model. *Journal of Biomedical Science.* 2013; 20(1): 51-61.
13. Kotenko K.V., Moroz B.B., Nasonova T.A., Dobrynina O.A., Lipengolz A.A., Gimadova T.I. et al. Experimental model of severe local radiation injuries of the skin after x-rays. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya.* 2013; 57(4): 121-3. (in Russian)
14. Gregoire F., Todoroff G., Haiser N. The stroma-vascular fraction of rat inguinal and epididymal adipose tissue and the adipose conversion of fat cell precursors in primary culture. *Biol. Cell.* 1990; 69: 215-22.

15. Aronowitz J.A., Ellenhorn J.D.I. Adipose stromal vascular fraction isolation: four commercial cell separation systems. *Plast. Reconstr. Surg.* 2013; 132(6): 932 -9.
16. Bunnell B.A., Flaat M., Gagliardi Ch. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods.* 2008; 45(2): 115-20.
17. Brower J., Blumberg Sh., Carroll E. Mesenchymal stem cells therapy and delivery systems in nonhealing wounds. *Advances in skin & World care.* 2011; 24(11): 524-32.
18. Yaojiong Wu M.D., Liwen Cheng, Paul G. Scott. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem cells.* 2007; 25(10): 2648-59.
19. Lopez-Iglesias P., Blazquez-Martinez A., Fernandez-Delgado J. Short and long fate of human AMSC subcutaneously injected in mice. *World journal of stem cells.* 2011; 3(6): 53-62.
20. Ju-Won Kim, Jong-Hwan Lee, Yong S. Lyoo, Dong-In Jung, Hee-Myung Park. The effects of topical mesenchymal stem cell transplantation in canine experimental cutaneous wounds. *Veterinary dermatology.* 2013; 24(2): 242-53.
21. Kim W.S., Park B.S., Sung J.H. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *J. Dermatol. Sci.* 2007; 48(1): 15-24.

### Сведения об авторах:

Мороз Борис Борисович, доктор мед. наук, проф., академик РАН, зав. лаб. центра биомедицинских технологий ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России

Насонова Тамара Алексеевна, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. центра биомедицинских технологий ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России

Лебедев Владимир Георгиевич, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. центра биомедицинских технологий ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, e-mail: vgleb468@yandex.ru

Добрынина Ольга Александровна, науч. сотр. центра биомедицинских технологий ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России

Лырщикова Алла Васильевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. центра биомедицинских технологий ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России