

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование FBS при культивировании клеток рака молочной железы увеличивает общее количество жизнеспособных клеток, клеток с экспрессией эстрогена и экспрессией белка клеточной пролиферации Ki-67.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Межевова И. В., Ситковская А. О., Кит О. И.* Первичные культуры опухолевых клеток: современные методы получения и поддержания in vitro // Южно-Российский онкологический журнал. 2020. № 1(3). С. 36–49.
2. Могиленских А. С., Сазонов С. В. Создание клеточных линий карциномы молочной железы // Гены и клетки. 2021. Т. 16. № 1. С. 15–23.
3. *Froud S. J.* The development, benefits and disadvantages of serum-free media. *Dev Biol Stand.* 1999; 99:157–166.
4. Бессывороточная питательная среда для культивирования клеток vero / Г. П. Трошкова и др. // *Фундаментальные исследования.* 2005. № 5. С. 94–94.
5. *Зорин В. Л., Копнин П. Б., Зорина А. И., Еремин И. И.* и др. Оптимизация условий получения и ведения культур фибробластов кожи и десны человека // Гены и клетки. — 2014. — Т. 9. — № 2. — С. 53–60.
6. *De Launoit Y., Gasperin P., Pauwels O., et al.* Influence of fetal bovine serum and hormones on primary vs. long-term cultures of human breast cancers. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1991; 27(3):234–238.
7. *Сазонов С. В.* Обеспечение качества молекулярно-биологических исследований при диагностике инвазивного рака молочной железы. Екатеринбург: ВУМАН, 2018. 152 с.

УДК 57.084: 576.53: 615.032

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

ПОЛУЧЕНИЕ БИМЕДИЦИНСКОГО КЛЕТОЧНОГО ПРОДУКТА И ОЦЕНКА ЕГО ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОСТРОГО ЛУЧЕВОГО ПОРАЖЕНИЯ

*Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова, Санкт-Петербург,
Российская Федерация*

Аннотация. Целью работы явилось исследование возможности использования биомедицинского клеточного продукта, полученного из жировой ткани, для лечения острого радиационного поражения.

Материалы и методы. Исследование проведено на белых беспородных мышак-самцах с костномозговой формой острой лучевой болезни в результате острого общего рентгеновского облучения. Из жировой ткани лабораторных грызунов получали фракцию стромальных клеток; для введения животным ис-

пользовали культуры клеток на уровне 3–4 пассажа. Оценивали влияние клеточной терапии на 30-суточную выживаемость и некоторые лабораторные и физиологические показатели у облученных мышей.

Результаты работы показали, что внутривенное введение клеточного продукта через 24 часа после облучения способствовало повышению выживаемости грызунов, улучшению гематологических показателей и ускорению восстановления лучевых поражений органов. Установлено, что оптимальное количество клеток в клеточном продукте составляет 30–60 тысяч клеток/мышь.

Ключевые слова: биомедицинский клеточный продукт, жировая ткань, рентгеновское излучение, лабораторные мыши, острый радиационный синдром.

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

OBTAINING A BIOMEDICAL CELL PRODUCT AND EVALUATION ITS EFFECTIVENESS FOR THE TREATMENT OF ACUTE RADIATION SYNDROME

S. M. Kirov Military medical academy, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The aim of the work was to investigate the possibility of using a biomedical cellular product obtained from adipose tissue for the treatment of acute radiation damage.

Materials and methods. An experimental model of the hematopoietic form of acute radiation syndrome in mice as a result of total body X-ray irradiation was used. The fraction of stromal cells was obtained from the adipose tissue of rodents. Cell cultures of 3–4 passages were used for administration to animals. The effect of cell therapy on 30-day survival and some laboratory and physiological parameters in irradiated mice was evaluated.

The results showed that intravenous administration of the cell product 24 hours after irradiation contributed to increased rodent survival, improved hematological parameters and accelerated recovery of radiation damage to organs. It was found that the optimal number of cells in a cell product is 30–60x10³ cells/mouse.

Keywords: biomedical cell product, adipose tissue, X-rays, white mice, acute radiation syndrome.

ВВЕДЕНИЕ

Перспективным и многообещающим методом лечения острого радиационного синдрома является клеточная терапия — направление в медицине, основанное на применении регенеративного потенциала стволовых клеток для лечения патологических состояний различного генеза [1, 2]. Однако, несмотря на несомненный потенциал, работы в области клеточной терапии радиационных поражений достаточно ограничены. Целью работы явилось исследование возможности использования биомедицинского клеточного продукта, полученного из жировой ткани, для лечения острого радиационного поражения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали белых беспородных мышей-самцов, выращенных в питомнике лабораторных животных «Рапполово». Содержание животных и все манипуляции с ними выполняли в соответствии с правилами и нормами работы с экспериментальными животными.

Культуру клеток получали из стромально-васкулярной фракции подкожной жировой ткани лабораторных грызунов, выделенной из абдоминальной области. Получение тканей, выделение клеток, а также работы с культурой клеток проводились в асептических условиях при ламинарном токе воздуха. Фрагменты ткани после механического измельчения инкубировали в 0,1%-ном растворе коллагеназы краба («Биолот», Россия) в течение 40 минут при температуре 37 °С при постоянном перемешивании. Полученную клеточную суспензию отмывали и ресуспендировали в среде ДМЕМ (Gibco, США) с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, Gibco, США), 50 мкг/мл гентамицина («Биолот», Россия), 2 мМ L-глутамин («Биолот», Россия) и затем культивировали в условиях 100%-ной влажности, 5% CO₂ в CO₂-инкубаторе. Не прикрепившиеся к пластику клетки удаляли через 48 часов при смене культуральной среды. Пересев осуществляли с помощью 0,25%-ного раствора Трипсина-Версена («Биолот», Россия). Проверку жизнеспособности и подсчет клеток осуществляли в камере Горяева. Для проверки жизнеспособности клеток использовали окраску трипановым синим. Микроскопирование культур клеток в носителях осуществляли с помощью инвертированного микроскопа AxioVert.A1 FL LED (Carl Zeiss, Германия). Перед введением подопытным животным культуру клеток на уровне 2–4 пассажей трижды отмывали изотоническим раствором хлорида натрия путем центрифугирования при 1500 об/мин в течение 5 минут. Отмытые клетки ресуспендировали в изотоническом растворе хлорида натрия и разводили до необходимой концентрации (в соответствии с задачами эксперимента). Суспензию клеток вводили экспериментальным животным в латеральную хвостовую вену в объеме 300 мкл; животным контрольной группы в том же объеме вводили физиологический раствор.

Облучение животных осуществляли с использованием рентгенотерапевтической установки «РУМ-17» в направлении «спина — грудь» (мощность дозы 0,328 Гр/мин). Эффективность проводимой терапии оценивали путем изучения параметров 30-суточной выживаемости облученных мышей, физиологических и гематологических показателей.

Анализ полученных данных проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica 8.0. Данные представлены в виде: Me (25%; 75%), где Me — медиана, 25% и 75% — соответственно нижний и верхний квартили; $M \pm s$, где M — среднее значение показателя, s — ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Костномозговую форму острого радиационного синдрома у мышей моделировали путем общего облучения животных в дозе 7,8 Гр — дозе рентгеновского излучения, соответствующей СД70-90/30, то есть приводящей к гибели в течение 30 суток 70—90% облученных животных. Клеточную терапию с использованием популяции фибробластоподобных клеток, полученных из жировой ткани мыши, проводили через 24 часа после облучения животных; для терапии использова-

ли клеточный продукт с разным содержанием клеток — 30×10^3 , 60×10^3 или 120×10^3 клеток/мышь, что соответствовало дозам $1,1 \pm 0,07$, $2,2 \pm 0,15$ и $4,3 \pm 0,12 \times 10^6$ клеток/кг. Параметры 30-суточной выживаемости мышей после облучения представлены в *табл. 1*. Клеточная терапия способствовала снижению летальности облученных животных по сравнению с нелеченым контролем. Наиболее эффективным было введение 30×10^3 клеток/мышь, обеспечившее выживаемость мышей на 53,5% больше, чем в контрольной группе. Минимальное лечебное действие оказало введение 120 тысяч клеток. Применение клеточного продукта не оказало статистически значимого влияния на продолжительность жизни погибших после облучения мышей.

В период разгара острого радиационного поражения (на 10–14-е сутки после облучения) потеря веса достигала 25% от исходного уровня (*рис. 1*). К 30-м суткам после облучения в группе мышей с трансплантацией 30×10^3 клеток/мышь было отмечено восстановление массы тела до исходного уровня, при содержании 60 или 120×10^3 клеток в клеточном продукте этот показатель составлял в среднем 90%.

Таблица 1

30-СУТОЧНАЯ ВЫЖИВАЕМОСТЬ МЫШЕЙ, ОБЛУЧЕННЫХ В ДОЗЕ 7,8 Гр
БЕЗ ЛЕЧЕНИЯ ИЛИ С ВВЕДЕНИЕМ КЛЕТОЧНОГО ПРОДУКТА ЧЕРЕЗ
24 ЧАСА ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ

Группы животных	Погибло/выжило	Выживаемость, % (M ± s)	Продолжительность жизни погибших мышей, сутки, Me (25%; 75%)
Облучение + 30×10^3 клеток/мышь	3 / 8	$72,7 \pm 13,4$, p = 0,030*	12 (7; 14)
Облучение + 60×10^3 клеток/мышь	5 / 7	$58,3 \pm 14,2$, p = 0,045*	11 (10; 11)
Облучение + 120×10^3 клеток/мышь	7 / 5	$41,7 \pm 14,2$	12 (11; 20)
Облучение (контроль)	9 / 2	$18,2 \pm 11,6$	9 (7; 10)

* — значимость отличий в сравнении с контролем, точный критерий Фишера, двусторонний тест.

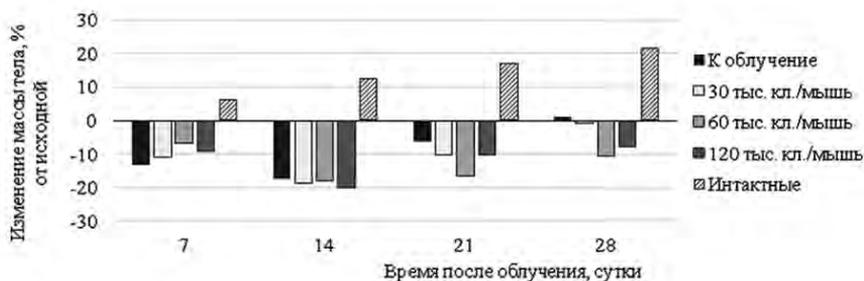


Рис. 1. Динамика массы тела у мышей после общего облучения в дозе 7,8 Гр и клеточной терапии с использованием популяции клеток, полученных из жировой ткани

Исследование клеточного состава периферической крови мышей на 30-е сутки после радиационного воздействия и клеточной терапии с использованием разного количества аллогенных стромальных клеток жировой ткани показало, что восстановления уровня лейкоцитов и тромбоцитов у облученных животных до показателей биологического контроля еще не происходило, однако у более 50% облученных животных содержание этих клеток крови превысило нижнюю границу физиологической нормы для грызунов данного вида (табл. 2). Клеточная терапия с использованием 30×10^3 клеток способствовала более быстрому восстановлению содержания лейкоцитов и их основных субпопуляций, а также эритроцитов в крови облученных животных. Наиболее низкий уровень оцениваемых показателей отмечен при использовании 120×10^3 клеток.

Результаты работы продемонстрировали хорошую переносимость экспериментальными животными трансплантации популяции аллогенных стромальных клеток, полученных из жировой ткани и отсутствие выраженных побочных эффектов. На 30-е сутки после облучения и клеточной терапии острого радиационного синдрома наиболее существенные изменения, вызванные радиационным воздействием, отмечались в легких и, в меньшей степени, в селезенке. Гистологические исследования не выявили у облученных животных патологических нарушений, которые могли быть ассоциированы с введением клеточного продукта на основе стромальных клеток жировой ткани.

Таблица 2

**КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ МЫШЕЙ
НА 30-е СУТКИ ПОСЛЕ ОБЩЕГО ОБЛУЧЕНИЯ В ДОЗЕ 7,8 Гр БЕЗ ЛЕЧЕНИЯ
ИЛИ С ВВЕДЕНИЕМ КЛЕТОЧНОГО ПРОДУКТА ЧЕРЕЗ 24 ЧАСА ПОСЛЕ
ОБЛУЧЕНИЯ, МЕ (Н25; Н75)**

Группы животных	Лейкоциты, $\times 10^9$ /л	Лимфоциты, $\times 10^9$ /л	Нейтрофилы, $\times 10^9$ /л	Эритроциты, $\times 10^{12}$ /л	Тромбоциты, $\times 10^9$ /л
Норма	3,5–13		7–11	200–800	
Биологический контроль	7,8 (7,1; 8,9)	5,2 (4,8; 7,0)	1,8 (1,4; 1,9)	9,1 (8,7; 9,3)	400 (353; 452)
Облучение + 30×10^3 кл./мышь	4,2 (4,1; 4,8) ** #	1,68 (1,65; 2,6) *	1,0 (0,5; 1,0) *	7,8 (6,8; 8,3)	219 (157; 263) **
Облучение + 60×10^3 кл./мышь	3,1 (2,6; 3,4) **	1,2 (0,96; 1,3) *	0,96 (0,96; 1,6)	6,1 (5,3; 8,1)	308 (227; 330) **
Облучение + 120×10^3 кл./мышь	2,6 (2,5; 2,9) **	1,3 (1,1; 1,6) *	0,78 (0,6; 0,8) *	4,6 (4,3; 8,6) **	172 (165; 182) **
Облучение (контроль)	3,1 (2,4; 3,9) **	1,1 (1,0; 1,6) *	0,7 (0,5; 0,9) *	6,0 (5,0; 6,9) **	204 (141; 269) **

* — отличия статистически значимы с группой биологического контроля, $p < 0,01$, ** — то же, $p < 0,05$; # — то же с группой «облучение (контроль)», $p < 0,05$ (критерий Манна — Уитни).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом результаты проведенного исследования показали, что клеточная терапия с применением стромальных клеток, полученных из жировой ткани, имеет перспективы для лечения костномозговой формы острой лучевой болезни, что согласуется с данными зарубежных авторов. В последнее время научные интересы исследователей концентрируются на поиске альтернативных костному мозгу источников стволовых клеток, одним из наиболее привлекательных из которых является жировая ткань. Преимуществами жировой ткани служат ее доступность, содержание большого количества стволовых клеток, относительная техническая простота их выделения и культивирования, минимальные этические аспекты [3, 4]. В работе [5] показана эффективность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, полученных из жировой ткани, для лечения острого радиационного синдрома у мышей линий C57BL/6 и FVB, вызванного общим гамма-облучением в дозах 9,25 Гр и 8,75 Гр. Повышение выживаемости экспериментальных мышей было отмечено после внутрибрюшинного введения клеточного продукта, содержащего 5×10^6 клеток, через 24 часа после летального облучения. Важным свойством стромальных клеток жировой ткани является отсутствие иммуногенности или низкая иммуногенность, что делает возможным проведение ксеногенной трансплантации с минимальными рисками развития нежелательных реакций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Москалев А. В., Гумилевский Б. Ю., Анчел А. А., Цыган В. Н. Стволовые клетки и их физиологические эффекты // Вестник Российской Военно-медицинской академии. 2019. Т. 58. № 4. С. 172–180.
2. Singh V. K., Seed T. M. Pharmacological management of ionizing radiation injuries: current and prospective agents and targeted organ systems. *Expert Opin Pharmacother.* 2020; 21(3):317–337.
3. Zuk P. A., Zhu M., Ashjian P. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002; 13(12):4279–4295.
4. 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.
5. 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; 10(7):1095–1114.