

УДК 616-03; 616-003.9

ИЗУЧЕНИЕ ПУТЕЙ МИГРАЦИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК У ЖИВОТНЫХ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ЛУЧЕВЫМ ОЖОГОМ КОЖНЫХ ПОКРОВОВ

К.А. Лунёва^{1*}, А.С. Лунёв¹, О.Е. Клементьева¹, К.Э. Терновская¹,
Т.А. Астрелина¹

Резюме. Смоделированное местное лучевое поражение у кроликов контрастно визуализировалось через 48 ч после введения ¹¹¹In-меченых мезенхимальных стволовых клеток тремя различными способами (внутривенно, местно, внутрисердечно). Таким образом, проведение ОФЭКТ-исследования кроликов с местным лучевым поражением кожи визуально подтвердило возможность использования ¹¹¹In-меченых мезенхимальных стволовых клеток для визуализации и изучения процесса их миграции и достижения патологического очага.

Ключевые слова: индий-111, мезенхимальные стволовые клетки, лучевой ожог, ОФЭКТ.

STUDY OF THE WAYS OF MESENCHYMAL STEM CELLS MIGRATION IN ANIMALS WITH EXPERIMENTAL RADIATION SKIN BURNS

К.А. Lunyova^{1*}, А.С. Lunyov¹, О.Е. Klementyeva¹, К.Е. Ternovskaya¹, Т.А. Astrelina¹

Abstract. Rabbits' model of local radiation burn has been imaged clearly in 48 h past injection of ¹¹¹In-labeled mesenchymal stem cells using three methods of injection (intravenously, locally, intracardially). SPECT Imaging of rabbits with model of skin radiation burn has confirmed possibility to use ¹¹¹In-labeled mesenchymal stem cells for imaging and studying of its migration and accumulation in pathologic foci.

Keywords: indium-111, mesenchymal stem cells, radiation burn, SPECT Imaging.

1 – ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» (ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России), 123182, Россия, г. Москва, ул. Живописная, д. 46

1 – Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of FMBA of Russia, 46, Zhivopisnaya str., Moscow, 123182, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: christfmbc@gmail.com

Тел.: 8 (499) 190 95 82

ВВЕДЕНИЕ

Одним из серьезных осложнений дистанционной лучевой терапии являются местные лучевые поражения (МЛП). Трудности терапии обусловлены характерными для лучевых язв нарушениями обменных и пролиферативных процессов в тканях, изменениями в состоянии как тканевой, так и регионарной циркуляции в зоне повреждения [1]. В ряде случаев невозможно их избежать, поскольку приоритетом является лечение основного заболевания (злокачественного новообразования), связанного с неизмеримо большим риском для жизни пациента. Развивающиеся ранние и поздние лучевые повреждения часто приводят к потере трудоспособности у социально активных лиц и значительно снижают качество их жизни. Поэтому необходимо вести дальнейший поиск и проводить активное вне-

сение новых методов терапии и реабилитации данной категории онкологических больных [2].

Определение объема МЛП позволит наилучшим образом определить тактику его дальнейшего лечения с применением высокотехнологического метода – системного введения мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Область применения МСК в клинической практике достаточно широка, так как их способность восстанавливать функции органов и замещать поврежденные клетки и ткани может стать достойной альтернативой иным методам лечения [3]. К примеру, в литературе описано множество случаев позитивного применения МСК при инсульте, почечной недостаточности, болезни Альцгеймера и Паркинсона, аутоиммунных заболеваниях, в частности болезни Крона, псориазе и других [4–7].

Однако внедрение в клиническую практику трансплантации МСК во многом зависит от изучения эффективности их накопления в определенных мишенях. Одним из способов определения объема МЛП и исследования биораспределения МСК в организме является их мечение радионуклидом (γ -эмиттером), позволяющим впоследствии произвести регистрацию ионизирующего излучения методами прямой радиометрии или эмиссионной томографии (ОФЭКТ), предоставляющими возможность не только визуальной, но и количественной оценки накопления. Множество различных соединений и клеток, меченных изотопом индия ^{111}In , благодаря его выгодным ядерно-физическим характеристикам (таблица 1) более 20 лет применяются в ядерной медицине [8].

Таблица 1.

Ядерно-физические характеристики индия-111

Период полураспада, сутки	Тип распада	Энергии γ -излучения, кэВ (доля)	Дочерний радионуклид
2,8047	электронный захват (100%)	171 (90,7%) 245 (94,1%)	кадмий-111

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемый радиофармпрепарат (РФП) представляет собой комплекс индия-111 с 8-гидроксихинолином (^{111}In -оксин), используемый для последующего мечения им МСК (рисунок 1).

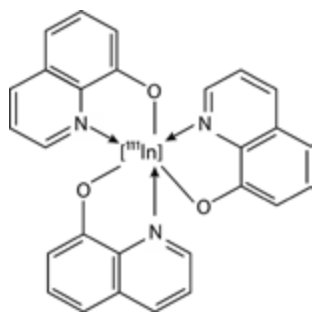


Рисунок 1. Предполагаемая формула комплекса индия-111 с 8-гидроксихинолином

Для приготовления радиофармпрепарата (раствора для мечения клеток) во флакон с лиофилизатом вводили 1,0 мл раствора индия хлорида, ^{111}In , с необходимой объемной активностью путем прокола иглой шприца резиновой пробки. Полученный раствор перемешивали. Препарат был готов к применению после полного растворения лиофилизата.

МСК человека были получены из специализированной лаборатории цитологии, генетики и иммунологии центра биомедицинских технологий ФМБЦ

им. А.И. Бурназяна (руководитель центра – Т.А. Астрелина, д.м.н). К суспензии стволовых клеток (~106 клеток), находящихся в бессывороточной среде, вносили 100 мкл раствора ^{111}In -оксина с заданной объемной активностью (37 МБк/мл), после чего полученную смесь инкубировали в течение 30 и 60 мин при комнатной температуре. Затем образцы центрифугировали в течение 5 мин со скоростью вращения 5000 об/мин на центрифуге MiniSpin plus (Eppendorf, Германия) и разделяли в приготовленные заранее пробирки на надосадочную жидкость с оставшимся в растворе свободным индием-111 (не связанным с СК), смыв с мембран и собственно клетки. В пробирки с осадком клеток вносили 1 мл охлажденного раствора Хэнкса и аккуратно ресуспендировали, затем центрифугировали и удаляли надосадок в еще одну пробирку. Для определения интернализированной фракции в суспензию клеток вносили глициновый буферный раствор (50 мМ глициновый буферный раствор в 0,1 М растворе хлорида натрия с pH 2,8). Клетки инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре, затем центрифугировали, супернатант удаляли в отдельную пробирку и добавляли по 1 мл раствора Хэнкса. Методом прямой радиометрии на автоматическом гамма-счетчике Wizard 2480 (PerkinElmer, США) определяли активность в каждой из пробирок и рассчитывали эффективность мечения клеток (в % от общей активности) и интернализацию (в % от суммы счета клеток и смыва с мембран).

Интернализацию I рассчитывали как отношение интернализированной активности к общей активности, связанной с клетками (то есть интернализированной активности и фракции, связанной с рецепторами, расположенными на мембранах).

$$I = \frac{N_C}{N_{MF} + N_C} \cdot 100\%.$$

Эффективность мечения рассчитывали по формуле:

$$\omega = \frac{N_{MF} + N_C}{\sum_i N_i} \cdot 100\%.$$

где N_{MF} – счет пробирок со смывами с мембран (membrane flushing), N_C – счет пробирок с клетками (cells), $\sum_i N_i$ – сумма счета всех исследуемых пробирок.

Жизнеспособность ^{111}In -меченых МСК оценивали путем их прижизненного окрашивания трипановым синим до процедуры мечения, сразу после мечения и через 3 ч после мечения. В данном исследовании использовали метод элиминации красителя трипановый синий, который позволяет количественно оценить соотношение жизнеспособных (неокрашенных) и мертвых (окрашенных) клеток путем их микроскопирования и подсчета в камере Горяева.

Эксперимент проводился на половозрелых кроликах (масса 1,2–1,5 кг), полученных из сертифицированного питомника лабораторных животных ООО «КролИнфо». Все манипуляции с животными проводили в соответствии с Директивой 2010/63/EU по охране животных, используемых в научных целях [9].

В исследовании использовалась стандартная модель тяжелых местных лучевых поражений (МЛП) кожи при действии относительно «мягкого» рентгеновского излучения на модифицированной установке РАП100-10 (ООО «Диагностика-М», Россия). Рентгеновский аппарат, используемый в данной установке, способен работать при напряжении от 30 до 100 кВ и токе трубки от 6,1 до 10 мА. Аппарат имеет бериллиевое выходное окно излучения.

В установке предусмотрен подъёмный столик для вертикального перемещения облучаемого животного, система коллимации излучения, позволяющая менять размер поля излучения от 5 до 50 мм на расстоянии 100 мм от излучателя, лазерный указатель центра поля излучения и цифровая видеокамера для наблюдения за животным в процессе облучения.

Дозиметрические характеристики установки исследовались с помощью фантома, состоящего из тонких термолюминесцентных детекторов ТТЛД-580 и прокладок из фторопласта общей толщиной 30 мм, помещенного в плексигласовый цилиндр. Облучение фантома производилось при напряжении на трубке 30 кВ и токе 6,1 мА, с алюминиевым фильтром толщиной 0,1 мм, в течение 60 с. Расстояние от источника излучения до поверхности сборки составляло 9 см.

Животных облучали в течение 380 с до достижения дозы на поверхности кожи 110 Гр (мощность дозы – 17,5 Гр/мин) с алюминиевым фильтром 0,1 мм.

Во время облучения животных фиксировали в специальном станке на животе. Локальное облучение проводилось после удаления шерсти, площадь облучения составляла 8,2–8,5 см².

Процедуру планарной сцинтиграфии проводили на ОФЭКТ/КТ-томографе Philips Precedence 16 с настройкой фотопиков 171/245 кэВ с кроликами с МЛП кожи через 48 ч после введения различными путями ¹¹¹In-меченых МСК: внутривенно, местно (непосредственно в область МЛП кожи) и внутрисердечно. После проведения процедуры ОФЭКТ животных выводили из эксперимента путем умерщвления с дальнейшим отбором крови, проб органов и участков здоровой и пораженной кожи для количественной оценки накопления методом прямой радиометрии на автоматическом гамма-счетчике Wizard 2480 (PerkinElmer, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После проведения методологических процедур по мечению МСК с использованием ¹¹¹In-оксина были получены следующие результаты, представленные в таблице 2.

Таблица 2.

Эффективность мечения мезенхимальных стволовых клеток и интернализация

Время инкубирования, мин	Эффективность мечения, %	Интернализация, %
30	68,4±1,2	90,2±2,0
60	69,7±2,5	87,6±1,8

Анализ полученных результатов показал, что эффективность мечения, достигаемая для равных объемных активностей инкубационной среды, не зависит от времени инкубирования, поэтому в целях сокращения времени пребывания МСК вне организма достаточно инкубировать их в растворе РФП в течение 30 мин. Эксперименты по изучению интернализации показали, что изученный РФП достаточно быстро и в значительной степени проникает внутрь стволовых клеток. Столь существенная доля интернализированной активности связана с химической природой органического носителя индия-111 – 8-оксихинолина (оксина), который, как известно, является жирорастворимым соединением, что позволяет ему свободно диффундировать через клеточную мембрану, после чего радионуклид внутри клеток связывается с фосфолипидами клеточных мембран и внутренних структур клетки.

Показатели жизнеспособности стволовых клеток приведены в таблице 3.

Таблица 3.

Показатели жизнеспособности мезенхимальных стволовых клеток

Время инкубирования, мин	Жизнеспособные клетки, %		
	До процедуры мечения	Сразу после процедуры мечения	Через 3 ч после процедуры мечения
30	90,6±1,3	90,1±0,9	86,3±1,6
60	92,9±1,8	83,6±1,6	72,5±1,8

Исследования, проведенные с целью выяснения влияния условий процедуры инкубирования МСК с индиймеченым комплексом, показали определенную зависимость сохранения их жизнеспособности от времени инкубирования и срока пребывания вне организма после его окончания. Отмечено некоторое снижение жизнеспособности МСК, находящихся в условиях *in vitro* в течение трех часов после окончания процедуры мечения.

Полученные ¹¹¹In-меченые МСК вводили кроликам со смоделированным МЛП кожи. Клиническая картина течения лучевого поражения кожи кроликов, облученных в дозе 110 Гр, развивалась по обычному сценарию. Латентный период длился 7–9 суток, когда поражения кожи не определяли визуально. Затем появлялась гиперемия, нарушался нормальный то-

нус кожи. На 12–13-е сутки после облучения у кроликов регистрировали проявления сухого дерматита, а к 14–16-м суткам сухой дерматит переходил во влажный. К 17–25-м суткам после облучения на коже кроликов образовывались язвы, которые представляли собой слившиеся очаги с серозно-геморрагическим отделяемым, быстро ссыхающиеся в тонкие коричневые корочки.

После внутривенного введения ^{111}In -меченых МСК происходила их миграция из кровотока, и уже через 3 ч после введения они регистрировались в легких и почках. В течение последующих двух суток активность в легких заметно снижалась, а в лучевом ожоге, напротив, увеличивалась, однако активность в почках оставалась на высоком уровне (рисунок 2).

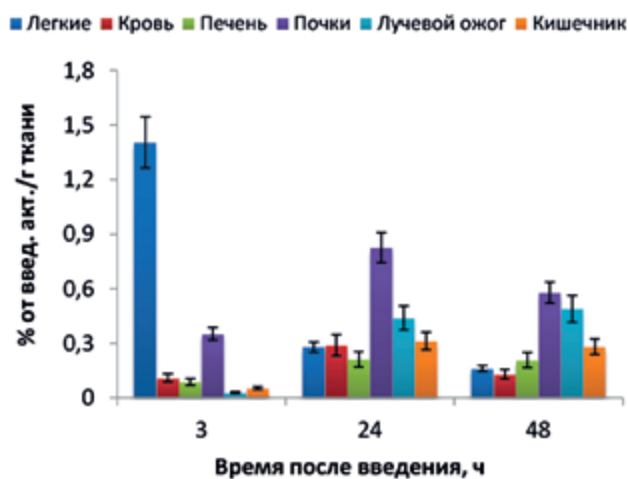


Рисунок 2. Гистограмма накопления ^{111}In -меченых МСК (внутривенное введение) в органах и тканях кроликов

После сканирования кролика с моделью патологии через 48 ч после внутривенного введения ^{111}In -меченых МСК получили изображение, подтверждающее количественные характеристики его фармакокинетики (рисунок 3).

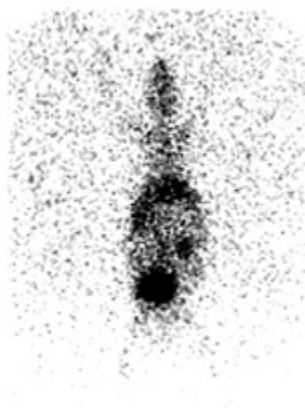


Рисунок 3. Сцинтиграмма кролика через 48 ч после внутривенного введения ^{111}In -меченых МСК

На сцинтиграмме отчетливо видны отдельные локусы почек и печени, а также самого лучевого поражения кожи (отмечено стрелкой). При расчете коэффициентов дифференциального накопления (КДН), показывающих отношение накопления между различными органами и тканями, видно (таблица 4), что визуализация

лучевого поражения с использованием ОФЭКТ возможна уже через 24 ч после внутривенного введения ^{111}In -меченых МСК.

Таблица 4.

Значения коэффициентов дифференциального накопления для кроликов с внутривенным введением ^{111}In -меченых МСК

КДН	3 ч	24 ч	48 ч
Л. ожог/Мышца	5,24±2,50	14,88±3,72	20,13±1,15
Л. ожог/Кровь	0,32±0,05	1,42±0,56	3,81±0,42

При местном введении ^{111}In -меченых МСК удалось подтвердить практически полное отсутствие распределения и миграции МСК из места введения (рисунок 4).

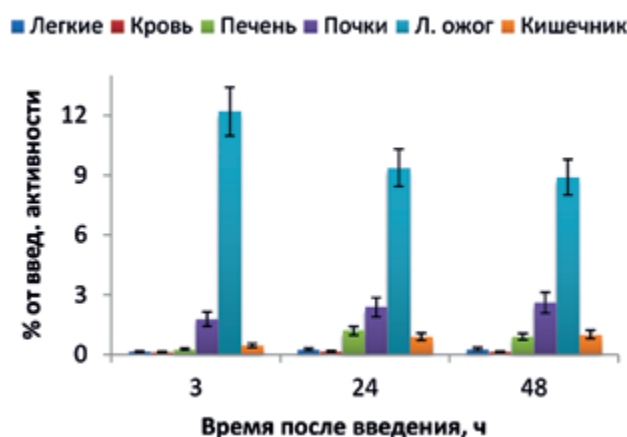


Рисунок 4. Гистограмма накопления ^{111}In -меченых МСК (местное введение) в органах и тканях кроликов

Заметные количества активности регистрировались в почках через 24 и 48 ч после введения, что подтвердилось при получении сцинтиграммы кролика (рисунок 5).

Однако согласно исследованиям *in vitro* по определению жизнеспособности меченых МСК (таблица 3) можно предположить, что через 48 ч после введения некоторая доля МСК погибает, вследствие чего радиоактивность из них попадает в кровоток и аккумулируется в почках. При анализе значений КДН (таблица 5) можно сделать вывод о постепенной миграции

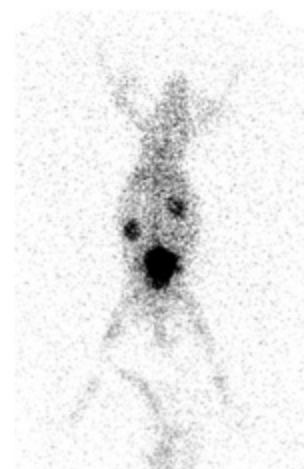


Рисунок 5. Сцинтиграмма кролика через 48 ч после местного введения ^{111}In -меченых МСК

активности из места введения в кровь и мышечную ткань, так как их значения во времени уменьшаются, однако остаются значительно больше единицы, что подразумевает возможность проведения процедуры визуализации в течение длительного периода после местного введения ^{111}In -меченых МСК.

Таблица 5.

Значения коэффициентов дифференциального накопления для кроликов с внутривенным введением ^{111}In -меченых МСК

КДН	3 ч	24 ч	48 ч
Л. ожог/Мышца	406,67±47,08	234,50±33,31	222,50±29,65
Л. ожог/Кровь	101,67±14,21	58,63±7,12	68,46±7,68

При внутрисердечном введении ^{111}In -меченых МСК происходит их быстрая миграция в кровоток, откуда они аккумулируются в смоделированном ожоге, а также заметно – в почках, печени и легких (рисунок 6).

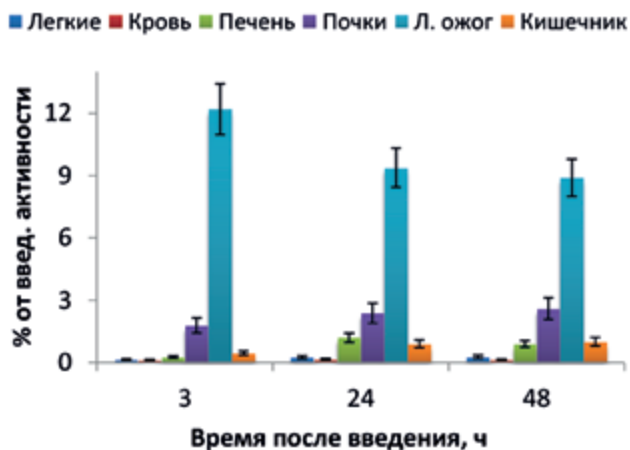


Рисунок 6. Гистограмма накопления ^{111}In -меченых МСК (местное введение) в органах и тканях кроликов



Рисунок 7. Сцинтиграмма кролика через 48 ч после внутрисердечного введения ^{111}In -меченых МСК

Полученная сцинтиграмма подтвердила количественные данные биораспределения ^{111}In -меченых МСК и позволила провести анализ, в результате которого стало очевидно, что фармакокинетика при внутрисердечном введении меченых МСК отчасти схожа с фармакокинетикой при внутривенном введении (рисунок 7).

Расчет КДН показал, что контрастная визуализа-

ция патологического очага с использованием ОФЭКТ возможна через 24–48 ч после введения ^{111}In -меченых МСК (таблица 6).

Таблица 6.

Значения коэффициентов дифференциального накопления для кроликов с внутривенным введением ^{111}In -меченых МСК

КДН	3 ч	24 ч	48 ч
Л. ожог/Мышца	1,00±0,09	7,00±0,11	19,00±0,99
Л. ожог/Кровь	0,12±0,02	1,75±0,10	7,60±0,16

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведение ОФЭКТ с кроликами с МЛП кожи визуально подтвердило возможность использования ^{111}In -меченых МСК для визуализации процесса их миграции при различном пути введения и достижения патологического очага.

ЛИТЕРАТУРА

1. П.С. Еремин, Н.А. Пигалева, М.Б. Мурзабеков и др. Исследование эффективности применения клеточных продуктов на основе жировой ткани для терапии тяжелых местных лучевых поражений // Саратовский научно-медицинский журнал. 2014. Т. 10. № 4. С. 838–844.
2. K.V. Kotenko, B.B. Moroz, N.F. Nadezhina et al. Successful treatment of localized radiation lesions in rats and humans by mesenchymal stem cell transplantation // Radiation Protection Dosimetry. 2012. V. 151(4). P. 661–665.
3. Y. Sasaki, M. Sasaki, Y. Kataoka-Sasaki et al. Synergic Effects of Rehabilitation and Intravenous Infusion of Mesenchymal Stem Cells After Stroke in Rats // Physical therapy. 2016. V. 96(11). P. 1791–1798.
4. S. Wray, N.C. Fox et al. Stem cell therapy for Alzheimer's disease: hope or hype? // Lancet Neurology. 2016. V. 15(2). P. 133–133.
5. S. Cerri, R. Greco, G. Levandis et al. Intracarotid Infusion of Mesenchymal Stem Cells in an Animal Model of Parkinson's Disease, Focusing on Cell Distribution and Neuroprotective and Behavioral Effects // Stem Cells translational Medicine. 2015. V. 4. P. 1–13.
6. О.В. Князев, А. А. Чурикова. Антицитокиновая терапия и качество жизни больных воспалительными заболеваниями кишечника // Доказательная гастроэнтерология. 2014. Т. 2. С. 17–23.
7. A. Campanati, M. Orciani, J. Ganzetti et al. The effect of etanercept on vascular endothelial growth factor production by cutaneous mesenchymal stem cells from patients with psoriasis // Journal of International Medical Research. 2016. V. 44(15). P. 6–9.
8. V. Fong, L. Johnson. Indium-111 labeled leukocyte accumulation in extremity soft tissue sarcoma // Radiology Case Reports. 2017. V. 12. № 2. P. 383–385.
9. Directive 2010/63/EU of 22/09/2010 Guide for the care and use of laboratory animals 8th edition. National Academy of Sciences. Washington, D.C. 2010.