

УДК 57.084.1

Исследование распределения донорских клеток при заживлении резаных ран после аллогенной и сингенной безоблучательной трансплантации цельного костного мозга с использованием мышей, несущих ген EGFP

Богданенко Е.В.¹, Сергиевич Л.А.², Карнаухов А.В.², Карнаухова Н.А.², Лизунова И.А.²

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии».

125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

² Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук».

142290, Московская область, Пушкино, ул. Институтская, д. 3

Мезенхимальные стволовые клетки костного мозга во всём мире исследуются с целью их возможного применения в регенеративной медицине. Однако знаний об их взаимодействии с клетками и тканями организма реципиента пока недостаточно.

Цель работы: изучить характер распределения донорских стволовых клеток цельного костного мозга (КМ) в организме животных-реципиентов и их вклад в заживление ран в зависимости от типа трансплантации.

Материалы и методы. В качестве доноров использовались мыши, несущие ген зеленого флуоресцентного белка (EGFP), в качестве реципиентов – мыши линий C57Bl/6 и CBA. Моделировалась сингенная (от мышей GFP+ мышам C57Bl/6) и аллогенная (от мышей GFP+ мышам CBA) трансплантация костного мозга (ТКМ) без предварительного нанесения ран и после их нанесения. Под флуоресцентным микроскопом оценивали скорость заселения GFP+ клетками области раны, селезёнки, костного мозга и крови через 1, 3, 5, 7, 9, 11 и 14 сут после внутривенного введения КМ. Определяли сроки заживления ран у мышей без ТКМ (контроль) и после ТКМ (опыт) и сравнивали их между собой.

Результаты. У всех животных наблюдали заселение округлыми GFP+ клетками всех исследуемых органов и тканей, в том числе области раны, уже на следующий день после трансплантации, за исключением интактной кожи с поясницы. После сингенной трансплантации донорские клетки наблюдались по крайней мере до 14-х сут, после аллогенной – в основном 3–5 сут. В то же время присутствие GFP+ фибробластов на дне раны детектировалось в течение 9 дней после аллогенной и во все сроки наблюдения после сингенной ТКМ. При этом на месте раны не было обнаружено дифференцировки донорских клеток в клетки структурных элементов кожи. В первом случае скорость заживления ран была почти одинаковой в опыте и контроле, а во втором – значительно выше, чем в контроле ($p = 0,0202$ по критерию Манна-Уитни).

Выводы. Только сингенная трансплантация цельного костного мозга была эффективной после получения травм кожи, так как ускоряла их заживление. Однако отсутствие полной дифференцировки донорских клеток в процессе лечения может говорить об отсутствии или недостатке необходимых для этого химических сигналов.

Ключевые слова: мыши; цельный костный мозг; стволовые клетки; раны; кожа; трансплантация; EGFP.

Для цитирования: Богданенко Е.В., Сергиевич Л.А., Карнаухов А.В., Карнаухова Н.А., Лизунова И.А. Исследование распределения донорских клеток при заживлении резаных ран после аллогенной и сингенной безоблучательной трансплантации цельного костного мозга с использованием мышей, несущих ген EGFP. *Патогенез.* 2022; 20(4): 69-77

DOI: 10.25557/2310-0435.2022.04.69-77

Для корреспонденции: Богданенко Елена Валентиновна, e-mail: lenabogdval@mail.ru

Финансирование. Исследование не имеет спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 27.10.2022

The distribution of donor cells during healing of incised wounds after allogeneic and syngeneic transplantation of whole bone marrow without irradiation, using mice carrying the EGFP gene

Bogdanenko E.V.¹, Sergievich L.A.², Karnaukhov A.V.², Karnaukhova N.A.², Lizunova I.A.²

¹ Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya St. 8, Moscow 125315, Russian Federation

² Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Institutskaya St. 3, Pushchino of Moscow Region 142290, Russian Federation

Mesenchymal stem cells of bone marrow have been studied worldwide for their possible use in regenerative medicine. However, the knowledge about their interaction with cells and tissues of the recipient's body is still insufficient.

The aim was to study the distribution of donor stem cells of whole bone marrow (BM) in the body of recipient animals and their contribution to wound healing depending on the kind of transplantation.

Materials and methods. Mice carrying the green fluorescent protein (EGFP) gene were used as donors, and C57Bl/6 and CBA mice were used as recipients. Syngeneic (from GFP+ to C57Bl/6 mice) and allogeneic (from GFP+ to CBA mice) bone marrow

transplantations (BMTs) were modeled without and with prior infliction of incised wounds in the interscapular zone. The rate of colonization of the wound area, thymus, spleen, BM, and blood with GFP+ cells was evaluated with a fluorescent microscope at 1, 3, 5, 7, 9, 11, and 14 days after the intravenous infusion of BM cells. The time of wound healing without and after BMT was determined and compared.

Results. Populations of roundish GFP+ cells of all the studied organs and tissues, including the wound area, were observed in all animals on the next day after transplantation, with the exception of intact skin from the lumbar zone. After syngeneic transplantation, donor cells were observed during at least 14 days, while after allogeneic BMT, mostly during 3–5 days. At the same time, GFP+ fibroblasts were detected in the wound bed during 9 days after allogeneic BMT and at all timepoints of follow-up after syngeneic BMT. However, no differentiation of donor cells into cells of skin structural elements was found in the wound area. In the first instance, the rate of wound healing in the experiment was almost the same as in the control, and in the second instance, it was significantly higher than in the control ($p = 0.0202$, Mann-Whitney test).

Conclusions. Only syngeneic BMT of whole bone marrow was effective after skin injuries, as it accelerated the healing. However, the lack of complete differentiation of donor cells during the treatment may indicate the absence or deficiency of necessary chemical signaling.

Key words: mice; whole bone marrow; stem cells; wounds; skin; allogeneic transplantation; GFP.

For citation: Bogdanenko E.V., Sergievich L.A., Karnaukhov A.V., Karnaukhova N.A., Lizunova I.A. [The distribution of donor cells during healing of incised wounds after allogeneic and syngeneic transplantation of whole bone marrow without irradiation, using mice carrying the EGFP gene]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2022; 20(4): 69–77 (in Russian)

DOI: 10.25557/2310-0435.2022.04.69-77

For correspondence: Bogdanenko Elena Valentinovna, e-mail: lenabogdval@mail.ru

Funding. The study had no sponsorship.

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

Received: 27.10.2022

Введение

Трансплантация костного мозга (ТКМ) чаще всего применяется для лечения приобретённых злокачественных или врождённых гематологических заболеваний. Успех этой процедуры невозможен без подавления функции кроветворной системы реципиента посредством облучения и/или химиотерапии, а также максимального совпадения показателей донора и реципиента по главному комплексу гистосовместимости – HLA. Однако в последнее время костный мозг стали использовать как источник не гематопоэтических, а мезенхимальных стромальных стволовых клеток (МССК). Большой интерес для регенеративной медицины представляет способность данных клеток превращаться в клетки различных тканей и органов. В частности, в клинических испытаниях получены обнадеживающие результаты по восстановлению и регенерации с их помощью суставного хряща [1]. На животных моделях показана возможность с помощью культивированных МССК ускорять заживление переломов [2], омолаживать стареющую кожу при подкожных инъекциях [3]. Что касается травм кожи, то для их лечения в экспериментальной медицине используют фибробласты, полученные из биоптатов кожи или из МССК и выращенные на специальной подложке, которые затем переносят в рану. При этом полное совпадение по всем аллелям HLA будет обеспечено, если культивируемые клетки принадлежат травмированному человеку или если донор и реципиент являются однойцевыми близнецами (т.н. аутологичная и сингенная трансплантация КМ). Однако в применении метода культивирования клеток для терапии ран есть существенные недостатки. Он очень дорог и сложен, так как включает в себя процедуру выделения фибробластов из кожи или МССК из цельного КМ соответственно, ряд манипуляций по пересеву образую-

щихся клеток, дорогих сред для культивирования, опытного персонала и т.д. Кроме того, от момента забора источника клеток до получения кожных эквивалентов с фибробластами проходит минимум 3–4 недели [4, 5], в течение которых организм травмированного человека может не справиться с шоком или будет заращивать рану с образованием грубых рубцов и потерей функциональности органов. Поэтому важно иметь возможность максимально приблизить время трансплантации клеток к моменту получения травмы. Одной из таких возможностей может быть системное введение цельного, оперативно полученного из банка или от родственников больного, костного мозга, в котором естественным образом содержатся МССК.

Поскольку в таком случае к пациенту нельзя применить иммуносупрессию, возникает вопрос, как поведут себя донорские клетки после трансплантации в организме реципиента и будут ли они участвовать в процессах заживления раны. Максимально успешной могла бы быть сингенная трансплантация цельного КМ, однако она довольно редка. Поэтому особый интерес представляет трансплантация КМ от донора, отличающегося от реципиента генетически, т.е. аллогенная ТКМ, причём проведённая без предварительного облучения. Миграция и дифференцировка клеток после такой процедуры исследованы недостаточно. В связи с этим целью данной работы является изучение поведения донорских клеток КМ в организме реципиента после безоблучательной аллогенной трансплантации цельного КМ мышам с резаными ранами спины в сравнении с сингенной. В качестве доноров были использованы мыши, несущие ген зелёного флуоресцентного белка (EGFP), разводимые на основе инбредной линии C57Bl/6. Аллогенная трансплантация КМ мышам CBA от GFP+ мышей моделировала неродственную аллогенную подсадку КМ у человека с неполным соот-

ветствием по HLA, так как известно, что линии C57Bl/6 и C57Bl/6 имеют несколько отличий по лейкоцитарным антигенам [6].

Материалы и методы исследования

Данное исследование проводилось в соответствии рекомендаций Этического комитета института общей патологии и патофизиологии, и было утверждено Комитетом по этике (протокол №4 от 12.09.2022).

Животных содержали в виварии ИБК РАН на рационе из гранулированного корма.

В эксперименте в качестве доноров использовались мыши в возрасте 2–10 мес, несущие ген зеленого флуоресцентного белка (Enhanced Green Fluorescent Protein – EGFP, Tg(АСТВ-EGFP)10sb/J) – чистопородные, разводимые на основе инбредной линии C57Bl/6. Реципиентами были самцы и самки линий C57Bl/6 и C57Bl/6. При всех типах подсадки учитывали пол донора и реципиента; подсадка КМ от самцов самкам не допускалась. Во всех группах белок EGFP использовался как витальная метка для детекции клеток донора в организме реципиента.

Костный мозг получали из бедренных костей донора. Реципиенту, находящемуся под общей анестезией после введения внутривенно препарата «Авертин», представляющего собой раствор 2,2,2-трибромэтанола в 2-метил-2-бутаноле, в дозе 2 мг действующего вещества на 20 г массы животного, в зоне между лопатками удаляли шерсть пинцетом и вырезали участок кожи до фасции мышц так, чтобы срез имел форму двояковыпуклой линзы длиной около 1 см и максимальной шириной около 7 мм, по бокам которой оставалась голая кожа шириной 2–3 мм. После этого реципиенту в хвостовую вену вводили суспензию клеток костного мозга донора в объёме 100 мкл ($1,5 \times 10^7$ клеток), используя инсулиновый шприц. Во избежание гипотермии до полного просыпания реципиент находился в отдельной клетке с подогревом. Методика подготовки клеток КМ и реципиента к процедуре введения описана нами ранее [7].

Анализировали различия в распределении и приживлении донорских клеток во внутренних органах после каждого типа трансплантации как после нанесения раны, так и без её нанесения (у интактных животных). На каждый срок (через 1, 3, 5, 7, 9, 11 и 14 сут после введения клеток КМ) исследовали селезёнку, костный мозг, интактную кожу с поясницы, кровь и область раны 2–3 мышей. Для этого животных забивали дислокацией шейных позвонков в соответствии с инструкцией American Physiological Society (1995 г). Сроки заживления ран после обоих типов трансплантации для оценки её эффективности сравнивали с таковыми у животных, которым такая трансплантация не проводилась. Всего в эксперименте участвовало 85 животных.

Для исследования тканей или цельных органов использовали флуоресцентный микроскоп Axio-Imager Z1

с цветной цифровой камерой AxioCam MRc5 (Carl Zeiss, Германия). Все образцы не подвергались никакой предварительной фиксации.

Математическая обработка данных проводилась с использованием программ Microsoft Office Excel 2003 и Statistica 8,0. Результаты представлены в виде медианы (М) и межквартильного размаха. Поскольку данные по срокам заживления ран животных в одной из двух или в обеих сравниваемых группах не подчинялись нормальному распределению, достоверность различий между ними определяли посредством непараметрического *U*-критерия Манна-Уитни.

Результаты исследования

В первой части работы мы изучали, в какие сроки донорские клетки детектировались в организме реципиента при сингенной и аллогенной ТКМ у животных с ранами и без ран.

На дне раны и в коже вокруг неё после сингенной ТКМ и округлые недифференцированные клетки, и фибробласты донорского происхождения появлялись уже через 1 сут и встречались до конца наблюдения – 14 сут после пересадки (табл. 1).

В то же время через 1 сут после аллогенной трансплантации в обоих этих местах появлялись только округлые недифференцированные клетки, которые исчезали значительно раньше, чем в случае с сингенной ТКМ. Фибробласты в коже вокруг раны и на дне раны в этом случае появлялись в незначительном количестве и с некоторым запозданием по сравнению с сингенной ТКМ – через 3 сут, и вокруг раны в другие сроки наблюдения больше не встречались. В интактной коже с поясницы мышей с раной и без неё донорские клетки появлялись только после сингенной трансплантации, причём фибробласты – только в случае наличия раны. На рис. 1 приведены микрофотографии кожи вокруг раны через 1 и 7 сут после аллогенной и сингенной трансплантации.

После нанесения раны и сингенной трансплантации КМ у мышей в селезёнке и костном мозге донорские округлые клетки обнаруживались во все сроки наблюдения. При этом в ряде случаев происходило колониеобразование и дифференцировка GFP-клеток в фибробласты. Интересно, что до 14-х суток в селезёнке наблюдались колонии и из округлых клеток, и из фибробластов. В костном мозге в случае нанесения раны и сингенной ТКМ наблюдалась некоторая задержка формирования колоний и более быстрое исчезновение фибробластов по сравнению с селезёнкой. В то же время после нанесения раны и аллогенной трансплантации донорские клетки вообще не образовывали фибробластов и колоний в КМ, а в селезёнке единичные GFP-колонию наблюдались только на третьи сутки после трансплантации и только из округлых клеток. При этом единичные донорские мегакариоциты наблюдались в КМ после всех видов трансплантации.

В крови начало появления донорских клеток после обоих вариантов ТКМ не отличалось – 1 сут. Но если при аллогенной ТКМ флуоресцирующие лейкоциты исчезали после 3-х сут, а тромбоциты – после 9-х сут, то при сингенной оба вида клеток встречались и через 14 сут, т.е. во все сроки наблюдения.

Поскольку в ряде случаев донорские клетки и их колонии встречались в различных количествах и в несколько сроков наблюдения подряд, то мы решили установить, в какие сроки наблюдался максимум их представительства в исследуемых органах и тканях (табл. 2).

Таблица 1

Сроки обнаружения донорских клеток (сутки) в органах и тканях мышей-реципиентов после различных типов трансплантации цельного костного мозга

Ткань, орган	Типы клеток и клеточных ассоциаций	Сингенная трансплантация		Аллогенная трансплантация	
		после нанесения раны	без раны	после нанесения раны	без раны
Кожа вокруг раны	округлые недифференцированные	1–14	—	1–7	—
	фибробласты	1–14	—	3	—
Дно раны	округлые недифференцированные	1–14	—	1–9	—
	фибробласты	1–14	—	3–9	—
Кожа интактная	округлые недифференцированные	3,9–14	7–14	—	—
	фибробласты	14	—	—	—
Селезёнка	округлые	1–14	1–14	1–3	1–5
	колонии	3–9	3–14	3	1–3
	фибробласты	1–14	3–14	3	1–3,7
Костный мозг	округлые	1–14	1–14	1–3	1–5
	колонии	5–14	3–14	—	3–5
	фибробласты	1–9	1–5	—	1
	мегакариоциты	5	3,9,14	3	3
Кровь	тромбоциты	1–14	1–14	1–9	1–9
	лейкоциты	1–14	1–14	1–3	1–3

Таблица 2

Сроки (сутки) максимального представительства GFP⁺-клеток в органах и тканях реципиентов

Ткань, орган	Типы клеток и клеточных ассоциаций	Сингенная трансплантация		Аллогенная трансплантация	
		после нанесения раны	без раны	после нанесения раны	без раны
Кожа вокруг раны	округлые недифференцированные	3,5,9 (++)	—	1 (++)	—
	фибробласты	3–7 (+)	—	—	—
Дно раны	округлые недифференцированные	1,3 (++)	—	3 (±)	—
	фибробласты	3 (++)	—	3,5 (±)	—
Кожа интактная	округлые недифференцированные	14 (+)	7(±)	—	—
	фибробласты	14 (±)	9(±)	—	—
Селезёнка	округлые	5–7 (++++)	1–9 (++++)	1 (++++)	1 (++)
	колонии	5	3,9	3	3
	фибробласты	3 (++)	3,9 (++)	3(±)	3 (±)
Костный мозг	округлые	1–14 (+)	1,9 (++)	1–2 (±)	1 (+)
	колонии	5–9	14	—	3,5
	фибробласты	1–9 (±)	1,5,9 (±)	—	1 (±)
Кровь	тромбоциты	14 (++++)	7,11 (++)	3 (++++)	1 (++)
	лейкоциты	3 (**)	1,9 (**)	1 (**)	1 (*-)

Условные обозначения: — отсутствие клеток (колоний); ± – единичные клетки в некоторых полях зрения; + – единичные клетки в поле зрения; ++ – десятки клеток в поле зрения; +++ – сотни клеток в поле зрения.

* – 1–4 лейкоцита; * – 5–10 лейкоцитов; ** – 11–50 лейкоцитов на 10 проходов объективом микроскопа при ув. × 400 капли 10 мкл, равномерно распределённой под покровным стеклом 20 × 20 мм.

Для исследования области раны, интактной кожи, селезёнки использовалось ув. $\times 200$, для исследования костного мозга и крови – ув. $\times 400$. После нанесения раны и сингенной трансплантации раньше всего достигали своих максимумов концентрации округлых недифференцированных GFP-клеток на дне раны и в костном мозге – уже через 1 сутки после ТКМ. В этот же срок в КМ наблюдался максимум фибробластов, однако в абсолютном выражении это означало, что они встречались по 1–2 только в некоторых полях зрения. В селезёнке в случае наличия раны и сингенной трансплантации максимум представительства донорских округлых клеток и колоний сдвигался на более поздние сроки по сравнению с теми случаями, где GFP-клетки вводились интактным мышам: 5 и 5 сут против 1 и 3 соответственно. Что касается аллогенной трансплантации, то у реципиентов после нанесения раны вообще не происходило образования фибробластов и колоний из GFP-клеток в КМ, а в селезёнке и те, и другие наблюдались только через 3 сут после ТКМ. В случае отсутствия раны после аллогенной трансплантации следует отметить удлинение сроков присутствия донорских округлых недифференцированных клеток и колоний в селезёнке. Такое же явление наблюдалось и для колоний из GFP-клеток в КМ. В целом же аллогенная трансплантация КМ была намного менее успешной, так как химеризация органов продолжалась максимум до 7 сут, а кро-

ви – до 9. После нанесения раны и сингенной ТКМ в крови максимум GFP-тромбоцитов был детектирован к 14-м суткам наблюдения. Два пика в концентрации донорских лейкоцитов – на 1-е и 9-е сутки – были показаны после сингенной трансплантации без раны.

Эффективность трансплантации для заживления ран мы оценивали, сравнивая сроки полного их заживления у опытных (после ТКМ) и контрольных (без ТКМ) животных индивидуально для каждой линии (табл. 3). В случае сингенной трансплантации воспаление раны было незначительным, её площадь существенно сокращалась уже к 5-м суткам после нанесения, а медианный срок заживления составил 12,5 сут. В контроле воспаление тоже не было выраженным, но медианная скорость заживления была существенно ниже – 16,5 сут. Мыши линии СВА продемонстрировали более низкую способность к регенерации как в опыте, так и в контроле, а медианная скорость заживления была приблизительно равной в обеих группах. При этом у животных после аллогенной ТКМ существенное заживление ран начиналось только через 7–9 сут после их нанесения.

Обсуждение

Изучение распределения донорских СККМ в нашей работе показало, что они способны попадать с током крови во все исследованные органы. Это не противоречит результатам по сингенной безоблудательной

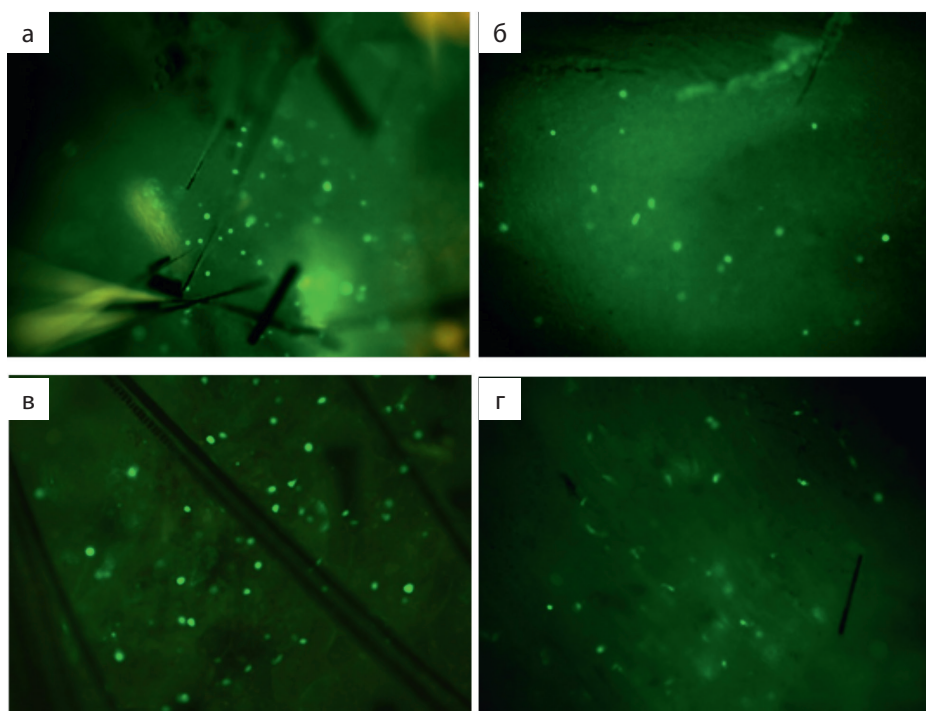


Рис. 1. Микрофотографии кожи вокруг раны: а – через 1 сут, б – через 7 сут после аллогенной трансплантации; в – через 1 сут, г – через 7 сут после сингенной трансплантации.

трансплантации GFP-клеток мышам линии C57Bl/6 у других авторов [8]. Сравнивая сроки присутствия таких клеток при аллогенной безоблучательной ТКМ с ранее полученными нами данными по наличию донорских клеток в суспензии органов [9], мы обнаружили, что они очень близки. Однако изучение цельных ничем не окрашенных органов даёт возможность точнее определить, что происходит с клетками донора в организме реципиента, типы клеток и колоний без дополнительных реактивов. Так, нами показано, что после нанесения раны, независимо от типа трансплантации, под струпом и в коже вокруг раны находились не только донорские недифференцированные округлые клетки, но и фибробласты, хотя дальнейшей дифференцировки в структурные элементы кожи, такие как потовые железы или мышечные волокна, наблюдавшейся нами при заживлении ран после облучения и сингенной ТКМ [7], обнаружить не удалось. Этот результат частично совпадает с результатами по трансплантации донорских клеток КМ после полулетальной дозы облучения для экспериментального лечения буллёзы у мышей, когда в коже реципиентов обнаруживались только овальные недифференцированные клетки [10]. В то же время есть работа, подтверждающая возможность превращения донорских клеток КМ в фибробласты в повреждённой коже реципиента [11]. Дифференцировка СККМ в кератиноциты после ТКМ, вероятно, вообще проблематична, поскольку после травмирования кожи даже у мышей, облучённых летально, только 0,1% кератиноцитов на месте раны определялись как донорские, причём они не флуоресцировали, хотя несли ген GFP, и были выявлены иммунофлуоресцентным окрашиванием на цитокератин и Y-хромосому [12]. После облучения, нанесения ран и ТКМ от мышей, несущих одновременно гены кератина-5 (K5), экспрессирующего рекомбиназу под промотором K5 и ген красного флуоресцентного белка, который работал только в случае экспрессии кератина, было обнаружено, что все донорские клетки на месте раны не экспрессировали ген K5, но экспрессировали фактор стволовых гематопоэтических клеток CD45 через 12 недель после трансплантации и поэтому были иммунными. Из этого делает-

ся вывод, что дифференцировки донорских КМ-клеток в кератиноциты на месте раны не происходит [13]. Этим данным противоречит работа по трансплантации МССК людям, когда биопсия кожи пациентов показала наличие донорских CD45⁺ клеток, экспрессировавших коллаген VII типа [14].

Формирование колоний из донорских клеток, в том числе из фибробластов, как в селезёнке, так и в КМ после сингенной безоблучательной ТКМ, оказалось неожиданным, поскольку считается, что без облучения отсутствие свободных ниш мешает их размножению в органах [15]. Однако есть работа, подтверждающая, что в этих органах через 5–7 дней после такого типа трансплантации находится множество донорских клеток [8]. В то же время некоторая задержка в формировании колоний в селезёнке и КМ после нанесения раны и сингенной безоблучательной ТКМ позволяет предположить, что к ране привлекается значительная часть донорских клеток, вероятно, посредством выделяемых ею цитокинов. Это подтверждается тем фактом, что и в случае использования облучения и лечения ран с помощью введения цельного костного мозга в селезёнке наблюдалась аналогичная задержка формирования колоний по сравнению с ТКМ интактным облучённым животным [7].

Быстрый уход донорских клеток из внутренних органов после аллогенной трансплантации по сравнению с сингенной в нашей работе очевидно, объясняется их распознаванием иммунной системой хозяина [16], однако обнаружение донорских мегакариоцитов в КМ через 3 суток и тромбоцитов в крови через 9 суток как после нанесения раны, так и без неё показывает, что в течение нескольких дней даже генетически чужеродные клетки способны полноценно дифференцироваться, по крайней мере в КМ. Из этого следует, что причиной нарушения дифференцировки донорских клеток в коже может быть не только работа иммунной системы хозяина, но и отсутствие необходимых для этого сигналов в нужной концентрации или нужного качества. Поскольку после сингенной ТКМ (и в отсутствие иммунного ответа) в ране также не происходит дифференцировки донорских клеток, хотя в ней определённа есть потребность в стволовых клетках, такое объяснение

Таблица 3

Сроки заживления ран у мышей после и без трансплантации костного мозга

Реципиенты	C57Bl/6		СВА	
	после ТКМ	без ТКМ	после ТКМ	без ТКМ
<i>n</i>	6	6	8	6
Сроки заживления (сут), <i>Me</i>	12,5	16,5	18	19
Нижняя квартиль (25%)	11	16	16	15
Верхняя квартиль (75%)	15	17	20,5	21
<i>p</i> (Манн–Уитни)	0,0202		0,8973	

кажется весьма вероятным. Понимание этой проблемы присутствует в других работах, когда для стимулирования дифференцировки пересаживаемых культивированных СКМ используют физические, механические, химические факторы или даже предварительное трансфицирование таких клеток [5, 17–19].

Безоблучательная аллогенная ТКМ не привела к ускорению заживления ран. При этом наблюдалось намного более сильное воспаление краёв раны, чем после сингенной ТКМ, уменьшение которого совпадало по срокам с исчезновением донорских клеток. Подобный результат был получен в работе на бестимусных крысах (у которых отсутствовали Т-лимфоциты), когда для лечения дефекта нижнечелюстной кости контактно использовались МССК свиньи (т.е. моделировали аллогенную ТКМ с неполным соответствием по HLA). У таких крыс наблюдалась сильная инфильтрация нейтрофилов и макрофагов в область раны, хотя это происходило позже, чем у иммунокомпетентных крыс. Следовательно, при ксеногенной трансплантации чужеродные МССК определяются врождённым иммунитетом хозяина [16]. Вероятно, в нашем случае после безоблучательной аллогенной ТКМ имеет место такой же механизм обнаружения и отторжения донорских клеток.

Ускорение заживления после сингенной ТКМ даже при том, что в области ран обнаруживались только фибробласты, подтверждается данными о том, что при совместном выращивании с кератиноцитами на коллагеновом геле они не только стимулируют их пролиферацию, но и способствуют стратификации эпидермиса на базальный, шиповатый, зернистый и роговой слои. Кроме того, фибробласты обладают паракринной активностью за счет секреции факторов роста эндотелия сосудов (VEGF) [20].

Заключение

Сингенная трансплантация цельного костного мозга может быть эффективной после получения травм кожи, так как ускоряет их заживление. Однако отсутствие полной дифференцировки донорских клеток в процессе лечения может говорить об отсутствии или недостатке необходимых для этого химических сигналов. Аллогенную ТКМ можно использовать после получения травм, сопряжённых с облучением. В этом случае возможно превращение донорских стволовых клеток в клетки практически всех органов, но существует большая вероятность развития реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ).

Авторский вклад

Богданенко Е.В. — идея, приготовление и введение наркоза, нанесение травмы, помощь при проведении инъекций, забой животных, отбор образцов кожи для исследования, трактовка полученных результатов,

подбор литературных данных, написание текста. Сергиевич Л.А. — извлечение костного мозга из бедренных костей, приготовление суспензии клеток, введение костного мозга в хвостовую вену, работа на флуоресцентном микроскопе, ведение записей по эксперименту, подбор литературы, отбор фотографий для статьи. Карнаухов А.В. — обсуждение полученных результатов, сравнение с результатами по использованию культивированных стволовых клеток костного мозга, утверждение окончательной версии статьи. Карнаухова Н.А. — обсуждение микрофотографий, помощь в написании резюме, утверждение окончательной версии статьи. Лизунова И.А. — подготовка животных для эксперимента, ведение мышей после наркоза и трансплантации, обсуждение полученных результатов.

Список литературы

1. Doyle E.C., Wragg N.M., Wilson S.L. Intraarticular injection of bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhances regeneration in knee osteoarthritis. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 2020; 28(12): 3827–3842. DOI: 10.1007/s00167-020-05859-z
2. Mohammed S.A., Elsattar M.A., Abd-Allah S.H., Habashy O.Y., Abdelghany E.M.A., Hussein S., Abdullah O. Effect of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells on the healing of bone fractures. *J. Interferon Cytokine Res.* 2021; 41(9): 336–346. DOI: 10.1089/jir.2021.0093
3. Liu Z., Hu G.-D., Luo X.-B., Yin B., Shu B., Guan J.-Z., Jia C.-Y. Potential of bone marrow mesenchymal stem cells in rejuvenation of the aged skin of rats. *Biomed. Rep.* 2017; 6: 279–284. DOI: 10.3892/br.2017.842
4. Reddy S.H.R., Reddy R., Babu N.C., Ashok G.N. Stem-cell therapy and platelet-rich plasma in regenerative medicines: A review on pros and cons of the technologies. *J. Oral Maxillofac. Pathol.* 2018; 22(3): 367–374. DOI:10.4103/jomfp.JOMFP_93_18
5. Мельникова Е.В., Меркулова О.В., Борисевич И.В., Меркулов В.А. От клеточных технологий к биомедицинским клеточным продуктам: опыт использования препаратов на основе жизнеспособных клеток человека в Российской Федерации. *Цитология.* 2018. 60(4): 231–240. DOI:10.31116/tsitol.2018.04.01
6. Бландова З.К., Душкин В.А., Малашенко А.М., Шмидт Е.Ф. Линии лабораторных животных для медико-биологических исследований. М.: Наука; 1983. 189 с.
7. Богданенко Е.В., Сергиевич Л.А., Карнаухов А.В., Карнаухова Н.А., Лизунова И.А., Карнаухов В.Н. Изучение регенеративного потенциала стволовых клеток цельного костного мозга для лечения механических травм кожи в модельных экспериментах на мышах. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(1): 31–38. DOI: 10.25557/0031-2991.2020.01.31-38
8. Миллер Т.В., Повешенко А.Ф., Лыков А.П., Повешенко О.В., Бондаренко Н.А., Петровская И.Ф., Завьялов Е.Л., Деметьева Е.В., Захарова И.С., Грицык О.Б., Шурлыгина А.В., Коненков В.И. Сравнительный анализ миграционной активности популяций клеток костного мозга в лимфоидные и нелимфоидные органы в норме и на модели сахарного диабета. *Современные проблемы науки и образования.* 2016; 2: 137.
9. Карнаухов А.В., Карнаухова Е.В., Сергиевич Л.А., Карнаухова Н.А., Богданенко Е.В., Манохина И.А., Карнаухов В.Н. Сравнительный анализ эффективности безоблучательной сингенной и аллогенной трансплантации EGFP+ клеток костного мозга мышей с использованием метода микроспектрального флуоресцентного анализа для исследования. *Биофизика.* 2014; 59(6): 1135–1142.
10. Hünefeld C., Mezger M., Müller-Hermelink E., Schaller M., Müller I., Amagai M., Handgretinger R., Röcken M.J. Marrow-derived stem cells migrate into intraepidermal skin defects of a desmoglein-3 knockout mouse model but preserve their mesodermal differentiation. *J. Invest. Dermatol.* 2018; 138(5): 1157–1165. DOI: 10.1016/j.jid.2017.10.035

11. Tolar J., Ishida-Yamamoto A., Riddle M., McElmurry R.T., Osborn M., Xia L., Lund T., Slattery C., Uitto J., Christiano A.M., Wagner J.E., Blazar B.R. Amelioration of epidermolysis bullosa by transfer of wild-type bone marrow cells. *Blood*. 2009; 113: 1167–1174. DOI: 10.1182/blood-2008-06-161299
12. Harris R.G., Herzog E.L., Bruscia E.M., Grove J.E., Van Arnem J.S., Krause D.S. Lack of a fusion requirement for development of bone marrow–derived epithelia. *Science*. 2004; 305: 90–93. DOI: 10.1126/science.1098925
13. Egawa G., Kabashima K. A study to detect bone marrow-derived keratinocyte: negative evidence of direct differentiation from bone-marrow cells to keratinocytes in normal and wounded skin using keratin 5-specific reporter mice. *J. Invest. Dermatol.* 2018; 138(5): 1228–1231. DOI: 10.1016/j.jid.2017.12.032
14. Tolar J., Wagner J.E. Allogeneic blood and bone marrow cells for the treatment of severe epidermolysis bullosa: repair of the extracellular matrix. *Lancet*. 2013; 382: 1214–1223. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)61897-8
15. Boulais P.E., Frenette P.S. Making sense of hematopoietic stem cell niches. *Blood*. 2015; 125(17): 2621–2629. DOI: 10.1182/blood-2014-09-570192
16. Tee B.C., Sun Z. Xenogeneic mesenchymal stem cell transplantation for mandibular defect regeneration. *Xenotransplantation*. 2020; 27(5): e12625. DOI: 10.1111/xen.12625
17. Zhang B., Luo Q., Deng B., Morita Y., Ju Y., Song G. Construction of tendon replacement tissue based on collagen sponge and mesenchymal stem cells by coupled mechano-chemical induction and evaluation of its tendon repair abilities. *Acta Biomater.* 2018, 74: 247–259. DOI: 10.1016/j.actbio.2018.04.047
18. Liu N., Wang H., Han G., Cheng J., Hu W., Zhang J. Enhanced proliferation and differentiation of HO-1 gene-modified bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the acute injured kidney. *J. Mol. Med.* 2018; 42(2): 946–956. DOI: 10.3892/ijmm.2018.3670
19. Meng X., Chen M., Su W., Tao X., Sun M., Zou X., Ying R., Wei W., Wang B. The differentiation of mesenchymal stem cells to vascular cells regulated by the HMGB1/RAGE axis: its application in cell therapy for transplant arteriosclerosis. *Stem Cell Res. Ther.* 2018, 9: 85–99. DOI: 10.1186/s13287-018-0827
20. Зорин В.Л., Зорина А.И., Петракова О.С., Черкасов В.Р. Дермальные фибробласты для лечения дефектов кожи. *Гены и клетки*. 2009; 4(4): 26–40.
7. Bogdanenko E.V., Sergievich L.A., Karnaukhov A.V., Karnaukhova N.A., Lizunova I.A., Karnaukhov V.N. [The regenerative potential of stem cells from the whole bone marrow for the treatment of skin mechanical trauma in a murine model]. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya [Pathological Physiology and Experimental Therapy]*. 2020; 64(1): 31–38. DOI: 10.25557/0031-2991.2020.01.31-38. (in Russian)
8. Miller T.V., Poveshchenko A.F., Lykov A.P., Poveshchenko O.V., Bondarenko N.A., Petrovskaya I.F., Zavyalov E.L., Dementieva E.V., Zakharova I.S., Gritsyk O.B., Shurygina A.V., Konenkov V.I. [Comparative analysis of the migration activity of bone marrow cell populations to lymphoid and non-lymphoid organs in normal and experimental diabetes mellitus models]. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya [Modern Problems of Science and Education]*. 2016; 2: 137–143. (in Russian)
9. Karnaukhov A.V., Karnaukhova E.V., Sergievich L.A., Karnaukhova N.A., Bogdanenko E.V., Lizunova I.A., Karnaukhov V.N. [Comparative analysis of syngeneic and allogeneic transplantation without irradiation of the EGFP+ mice bone marrow cells with microspectral fluorescence method]. *Biofizika [Biophysics]*. 2014; 59(6): 1135–1142. (in Russian)
10. Hünefeld C., Mezger M., Müller-Hermelink E., Schaller M., Müller I., Amagai M., Handgretinger R., Röcken M.J. Marrow-derived stem cells migrate into intraepidermal skin defects of a desmoglein-3 knockout mouse model but preserve their mesodermal differentiation. *J. Invest. Dermatol.* 2018; 138(5): 1157–1165. DOI: 10.1016/j.jid.2017.10.035
11. Tolar J., Ishida-Yamamoto A., Riddle M., McElmurry R.T., Osborn M., Xia L., Lund T., Slattery C., Uitto J., Christiano A.M., Wagner J.E., Blazar B.R. Amelioration of epidermolysis bullosa by transfer of wild-type bone marrow cells. *Blood*. 2009; 113: 1167–1174. DOI: 10.1182/blood-2008-06-161299
12. Harris R.G., Herzog E.L., Bruscia E.M., Grove J.E., Van Arnem J.S., Krause D.S. Lack of a fusion requirement for development of bone marrow–derived epithelia. *Science*. 2004; 305: 90–93. DOI: 10.1126/science.1098925
13. Egawa G., Kabashima K. A study to detect bone marrow-derived keratinocyte: negative evidence of direct differentiation from bone-marrow cells to keratinocytes in normal and wounded skin using keratin 5-specific reporter mice. *J. Invest. Dermatol.* 2018; 138(5): 1228–1231. DOI: 10.1016/j.jid.2017.12.032
14. Tolar J., Wagner J.E. Allogeneic blood and bone marrow cells for the treatment of severe epidermolysis bullosa: repair of the extracellular matrix. *Lancet*. 2013; 382: 1214–1223. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)61897-8
15. Boulais P.E., Frenette P.S. Making sense of hematopoietic stem cell niches. *Blood*. 2015; 125(17): 2621–2629. DOI: 10.1182/blood-2014-09-570192
16. Tee B.C., Sun Z. Xenogeneic mesenchymal stem cell transplantation for mandibular defect regeneration. *Xenotransplantation*. 2020; 27(5): e12625. DOI: 10.1111/xen.12625
17. Zhang B., Luo Q., Deng B., Morita Y., Ju Y., Song G. Construction of tendon replacement tissue based on collagen sponge and mesenchymal stem cells by coupled mechano-chemical induction and evaluation of its tendon repair abilities. *Acta Biomater.* 2018, 74: 247–259. DOI: 10.1016/j.actbio.2018.04.047
18. Liu N., Wang H., Han G., Cheng J., Hu W., Zhang J. Enhanced proliferation and differentiation of HO-1 gene-modified bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the acute injured kidney. *J. Mol. Med.* 2018; 42(2): 946–956. DOI: 10.3892/ijmm.2018.3670
19. Meng X., Chen M., Su W., Tao X., Sun M., Zou X., Ying R., Wei W., Wang B. The differentiation of mesenchymal stem cells to vascular cells regulated by the HMGB1/RAGE axis: its application in cell therapy for transplant arteriosclerosis. *Stem Cell Res. Ther.* 2018, 9: 85–99. DOI: 10.1186/s13287-018-0827
20. Зорин В.Л., Зорина А.И., Петракова О.С., Черкасов В.Р. [Dermal fibroblasts for the treatment of skin defects]. *Geny i клетки [Genes and Cells]*. 2009; 4(4): 26–40. (in Russian)

References

1. Doyle E.C., Wragg N.M., Wilson S.L. Intraarticular injection of bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhances regeneration in knee osteoarthritis. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 2020; 28(12): 3827–3842. DOI: 10.1007/s00167-020-05859-z
2. Mohammed S.A., Elsattar M.A., Abd-Allah S.H., Habashy O.Y., Abdelghany E.M.A., Hussein S., Abdullah O. Effect of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells on the healing of bone fractures. *J. Interferon Cytokine Res.* 2021; 41(9): 336–346. DOI: 10.1089/jir.2021.0093
3. Liu Z., Hu G.-D., Luo X.-B., Yin B., Shu B., Guan J.-Z., Jia C.-Y. Potential of bone marrow mesenchymal stem cells in rejuvenation of the aged skin of rats. *Biomed. Rep.* 2017; 6: 279–284. DOI: 10.3892/br.2017.842
4. Reddy S.H.R., Reddy R., Babu N.C., Ashok G.N. Stem-cell therapy and platelet-rich plasma in regenerative medicines: A review on pros and cons of the technologies. *J. Oral Maxillofac. Pathol.* 2018; 22(3): 367–374. DOI: 10.4103/jomfp.JOMFP_93_18
5. Melnikova E.V., Merkulova O.V., Borisevich I.V., Merkulov V.A. [From cellular technologies to biomedical cell products. Practice in the use of drugs based on viable human cells in the Russian Federation]. *Tsitologiya [Cytology]*. 2018. 60(4): 231–240. DOI: 10.31116/tsitol.2018.04.01 (in Russian)
6. Blandova Z.K., Dushkin V.A., Malashenko A.M., Schmidt E.F. [Strains of laboratory animals for biomedical research]. Moscow: Nauka; 1983. 189 p. (in Russian)
1. Doyle E.C., Wragg N.M., Wilson S.L. Intraarticular injection of bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhances regeneration in knee osteoarthritis. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 2020; 28(12): 3827–3842. DOI: 10.1007/s00167-020-05859-z
2. Mohammed S.A., Elsattar M.A., Abd-Allah S.H., Habashy O.Y., Abdelghany E.M.A., Hussein S., Abdullah O. Effect of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells on the healing of bone fractures. *J. Interferon Cytokine Res.* 2021; 41(9): 336–346. DOI: 10.1089/jir.2021.0093
3. Liu Z., Hu G.-D., Luo X.-B., Yin B., Shu B., Guan J.-Z., Jia C.-Y. Potential of bone marrow mesenchymal stem cells in rejuvenation of the aged skin of rats. *Biomed. Rep.* 2017; 6: 279–284. DOI: 10.3892/br.2017.842
4. Reddy S.H.R., Reddy R., Babu N.C., Ashok G.N. Stem-cell therapy and platelet-rich plasma in regenerative medicines: A review on pros and cons of the technologies. *J. Oral Maxillofac. Pathol.* 2018; 22(3): 367–374. DOI: 10.4103/jomfp.JOMFP_93_18
5. Melnikova E.V., Merkulova O.V., Borisevich I.V., Merkulov V.A. [From cellular technologies to biomedical cell products. Practice in the use of drugs based on viable human cells in the Russian Federation]. *Tsitologiya [Cytology]*. 2018. 60(4): 231–240. DOI: 10.31116/tsitol.2018.04.01 (in Russian)
6. Blandova Z.K., Dushkin V.A., Malashenko A.M., Schmidt E.F. [Strains of laboratory animals for biomedical research]. Moscow: Nauka; 1983. 189 p. (in Russian)
7. Zorin V.L., Zorina A.I., Petraкова O.S., Cherkasov V.R. [Dermal fibroblasts for the treatment of skin defects]. *Geny i клетки [Genes and Cells]*. 2009; 4(4): 26–40. (in Russian)

Сведения об авторах:

Богданенко Елена Валентиновна — доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физико-химической и экологической патофизиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; <https://orcid.org/0000-0002-3351-3916>

Сергиевич Лариса Анатольевна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории микроспектрального анализа клеток и клеточных систем Института биофизики клетки Российской академии наук — обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»; <https://orcid.org/0000-0001-7710-4703>

Карнаухов Алексей Валерьевич — кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории микроспектрального анализа клеток и клеточных систем Института биофизики клетки Российской академии наук — обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»; <https://orcid.org/0000-0003-3488-2067>

Карнаухова Наталья Алексеевна — старший научный сотрудник лаборатории микроспектрального анализа клеток и клеточных систем Института биофизики клетки Российской академии наук — обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»; <https://orcid.org/0000-0002-8606-4739>

Лизунова Ирина Анатольевна — младший научный сотрудник лаборатории микроспектрального анализа клеток и клеточных систем Института биофизики клетки Российской академии наук — обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»