

## Безопасность применения кондиционной среды, полученной при направленной остеогенной индукции мезенхимальных стволовых клеток костного мозга крыс

Л.А. Покровская<sup>1</sup>, Е.Ю. Шерстобоев<sup>1,2</sup>, С.В. Надеждин<sup>3</sup>, М.Г. Данилец<sup>2</sup>,  
Е.С. Трофимова<sup>2</sup>, А.А. Лигачева<sup>2</sup>, А.А. Чурин<sup>2</sup>, Т.Ю. Дубская<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Национальный исследовательский Томский государственный университет  
634050, г. Томск, просп. Ленина, 36

<sup>2</sup> НИИ фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга,  
Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН  
634028, г. Томск, просп. Ленина, 3

<sup>3</sup> Белгородский государственный национальный исследовательский университет  
308015, г. Белгород, ул. Победы, 85

### Резюме

Цель исследования: изучить цитотоксичность *in vitro* и подострую токсичность *in vivo* кондиционной среды (КС), полученной при направленной остеогенной индукции мезенхимальных стволовых клеток (МСК) костного мозга крыс. **Материал и методы.** Кондиционную среду получали при культивировании МСК костного мозга крыс, индуцированных в остеогенном направлении. **Результаты и их обсуждение.** КС МСК костного мозга крыс, индуцированных в остеогенном направлении, не обладает существенным цитотоксическим действием на культуру клеток аденокарциномы Эрлиха и мононуклеары периферической крови здоровых доноров *in vitro*. Введение КС МСК не оказывало негативного влияния на состояние экспериментальных крыс SD, общую массу животных и ее прирост. Патоморфологическое исследование не выявило отклонений от общепринятой нормы, связанных с действием вводимого препарата. **Заключение.** Применение КС МСК костного мозга крыс, стимулированных в остеогенном направлении, как *in vitro* в отношении линии опухолевых клеток (аденокарцинома Эрлиха) и мононуклеаров периферической крови здоровых доноров, так и *in vivo* при введении экспериментальным животным является безопасным.

**Ключевые слова:** мезенхимальные стволовые клетки костного мозга крыс, кондиционная среда, цитотоксичность, подострая токсичность, крысы SD.

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

**Благодарности.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ, соглашение № 14.575.21.0164, идентификатор RFMEFI57517X0164.

**Автор для переписки:** Шерстобоев Е.Ю., e-mail: sherstoboev\_eu@pharmso.ru

**Для цитирования:** Покровская Л.А., Шерстобоев Е.Ю., Надеждин С.В., Данилец М.Г., Трофимова Е.С., Лигачева А.А., Чурин А.А., Дубская Т.Ю. Безопасность применения кондиционной среды, полученной при направленной остеогенной индукции мезенхимальных стволовых клеток костного мозга крыс. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2020; 40 (2): 47–55. doi: 10.15372/SSMJ20200206

## The safety of the use of the conditioned medium obtained by directed osteogenic induction of rat bone marrow mesenchymal stem cells

L.A. Pokrovskaya<sup>1</sup>, E.Yu. Sherstoboev<sup>1,2</sup>, S.V. Nadezhdin<sup>3</sup>, M.G. Danilets<sup>2</sup>, E.S. Trofimova<sup>2</sup>, A.A. Ligacheva<sup>2</sup>, A.A. Churin<sup>2</sup>, T.Yu. Dubskaya<sup>2</sup>

<sup>1</sup> National Research Tomsk State University  
634050, Tomsk, Lenin av., 36

<sup>2</sup> Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine,  
Tomsk National Research Medical Center of RAS  
634028, Tomsk, Lenin av., 3

<sup>3</sup> Belgorod National Research University  
308015, Belgorod, Pobedy str., 85

### Abstract

The purpose of the study was to evaluate *in vitro* cytotoxicity and *in vivo* sub-acute toxicity of conditioned medium obtained from rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells directed to osteogenic differentiation. **Material and methods.** Conditioned medium was obtained by culturing rat bone marrow-derived MSCs induced under osteogenic condition. **Results and discussion.** Conditioned medium from rat bone marrow-derived MSCs was shown to have no significant cytotoxic effect on Ehrlich adenocarcinoma cell culture and *in vitro* expanded peripheral blood mononuclear cells from healthy donors. The use of MSC-CM did not have a significant effect on the state of experimental SD rats, the total body weight and growth rate of animals. A pathomorphologic study revealed no any abnormalities associated with MSC-CM injection. **Conclusion.** The use of conditioned medium from rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells stimulated under osteogenic condition was found to be safe for both *in vitro* studies (with respect to Ehrlich adenocarcinoma cell line and peripheral blood mononuclear cells from healthy donors) and *in vivo* studies (injection of MSC-CM to animals).

**Key words:** rat bone marrow mesenchymal stem cells, conditioned medium, cytotoxicity, subacute toxicity, SD rats.

**Conflict of interests.** Authors declare lack of the possible conflicts of interests.

**Acknowledgments.** The study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, agreement No. 14.575.21.0164, identifier RFMEFI57517X0164.

**Corresponding author:** Sherstoboev E.Yu., e-mail: sherstoboev\_eu@pharmso.ru

**Citation:** Pokrovskaya L.A., Sherstoboev E.Yu., Nadezhdin S.V., Danilets M.G., Trofimova E.S., Ligacheva A.A., Churin A.A., Dubskaya T.Yu. The safety of the use of the conditioned medium obtained by directed osteogenic induction of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2020; 40 (2): 47–55. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20200206

### Введение

В травматологии и ортопедии существует постоянная необходимость в использовании костных имплантатов при повреждениях и заболеваниях костно-суставной системы. Считается, что для замещения костного дефекта эффективно использование аутогенного костного трансплантата, которое до сих пор является «золотым стандартом» для процедур костной трансплантации. Однако известно, что при заборе аутокости увеличивается время оперативного вмешательства, потеря крови, продолжительность госпитализа-

ции. Кроме того, аутогенный трансплантат быстро резорбируется и, как правило, часто деградирует еще до полного заживления костного дефекта. В наши дни алло- и ксенотрансплантаты коммерчески доступны [1, 5]. Тем не менее, помимо того, что этим материалам трудно придать желаемую форму, костные аллоимплантаты отличаются медленной остеоинтеграцией, риском передачи от донора к реципиенту различных заболеваний бактериальной или вирусной этиологии, возможностью развития реакции гистонесовместимости и хронического гранулематозного воспаления, высокой стоимостью аллокости [5].

Использование синтетического биоинертного материала (полимеры, фосфаты кальция, пластмассы, металлы и т.д.) ксеногенного и аллопластического происхождения частично решает проблемы размера и формы, обеспечения механической прочности и иных специфических требований к имплантатам, но по остеоиндуктивным и остеокондуктивным свойствам они все же значительно уступают аутологичным или аллогенным материалам [4, 13]. В настоящее время данная проблема решается производством индивидуальных имплантатов с добавлением биоактивных веществ на основе носителей (скаффолдов) из синтетических биорезорбируемых материалов, которые заселяются аутологичными стволовыми клетками пациента, вследствие чего с большой точностью по структурным и биомеханическим особенностям соответствуют поврежденному участку, а также не имеют иммунологического отторжения [6]. В качестве биоактивных веществ, стимулирующих остеогенную дифференцировку, рассматривались такие ростовые факторы, как костные морфогенетические белки (BMP), инсулиноподобный фактор роста 1 и 2 (IGF-1, -2), трансформирующий фактор роста  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ), тромбоцитарный фактор роста (PDGF) и фактор роста фибробластов 2 (FGF-2), которые могут усилить остеогенную дифференцировку клеток [22, 24]. Однако эти остеогенные факторы роста имеют высокую стоимость, могут усиливать воспалительные реакции и для эффективности должны применяться в дозах, значительно превышающих их физиологический уровень [17, 23].

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) являются привлекательным кандидатом для регенерации тканей благодаря их способности дифференцироваться во многие типы клеток, включая кости, хрящи, жировую ткань и мышцы [7, 14]. Хотя и были показаны успехи в регенерации костей с использованием МСК, однако проведение этой процедуры сопряжено с рядом проблем, таких как большие капитальные вложения, дорогостоящее культивирование клеток, сложности в управлении безопасностью и качеством при обращении с клетками и инвазивность процедуры при сборе МСК из костного мозга у пациентов. Более того, недавние исследования трансплантации МСК при повреждении спинного мозга показали, что имплантированные клетки выживали лишь в течение 1–2-х недель после пересадки [9, 11]. Из-за ограниченной выживаемости и дифференцировки трансплантированных МСК предполагается, что паракринный эффект секреции МСК является основным механизмом регенерации ткани [8].

В некоторых исследованиях изучалось влияние кондиционной среды (КС) МСК на различные заболевания и состояния, такие как заживление ран, сердечные и ишемические заболевания [15], сращивание кости у крыс [20], повреждение спинного мозга [2], артрит [10]. Применение КС МСК имеет ряд преимуществ по сравнению с использованием стволовых клеток, таких как легкий сбор КС и транспортировка [15]. Однако кроме изучения эффективности применения КС МСК необходимо уделить большое внимание безопасности ее использования.

Целью данного исследования является изучение цитотоксических эффектов КС МСК в отношении ряда клеточных популяций *in vitro* и подострой токсичности на животных *in vivo*.

## Материал и методы

**МСК костного мозга крыс.** Первичную культуру МСК получали из бедренной и большеберцовой костей аутобредных крыс Wistar. Животное усыпляли передозировкой углекислого газа, обрабатывали шерсть 70%-м спиртовым раствором, разрезали кожу по средней линии живота, оголяли задние конечности. Кожу обрабатывали 70%-м спиртовым раствором. Стерильными остроконечными ножницами вскрывали кожу и мягкие ткани, выделяли трубчатые кости конечностей. Кости переносили в пробирку с культуральной средой DMEM/F12 («Росмедбио», РФ) с антибиотиками (100 ЕД/мл пенициллина, 100 ЕД/мл стрептомицина, «Sigma», США). Затем кости очищали от мягких тканей с помощью фосфатно-солевого буфера (ФСБ, «Sigma») и переносили в чашку Петри. Ножницами срезали эпифизы, при помощи шприца вымывали костный мозг средой DMEM/F12 в чистую пробирку, разбивали костный мозг на отдельные клетки с помощью пропускания через шприц. Полученную взвесь клеток центрифугировали при 250 g в течение 5 мин, надосадочную жидкость сливали, к клеткам добавляли 0,83%-й раствор хлорида аммония для разрушения кровяных клеток, перемешивали 5 раз. Дважды отмывали клетки от хлорида аммония ФСБ центрифугированием при 250 g в течение 5 мин, ресуспендировали в 10 мл полной культуральной среды (ПКС) DMEM/F12 с 10 % эмбриональной телячьей сыворотки («HyClone», США), 1 % антибиотика (Penicillin-Streptomycin, «Gibco», США) и 1 % глутамина («Lonza», Швейцария). Полученную суспензию клеток в ПКС переносили в отдельный флакон с площадью 25 см<sup>2</sup> и помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор, культивировали 2 суток при 37 °С, 5 % CO<sub>2</sub>, 100 % влажности. ПКС с не прилипшими к пластику

клетками сливали. В данном флаконе остались только прилипающие клетки, содержащие фракцию МСК. Было проведено фенотипирование культуры МСК крыс (определение положительной экспрессии CD90, CD29 и отрицательной экспрессии CD45, CD31) методом проточной цитофлуориметрии.

**КС МСК костного мозга крыс.** МСК культивировали в пластиковых культуральных флаконах в ПКС в условиях 5 % CO<sub>2</sub> во влажной атмосфере при 37 °С для получения достаточного количества клеток (около 700 млн клеток). Далее питательную среду удаляли, монослой клеток промывали ФСБ. Для стимуляции дифференцировки МСК в остеогенном направлении использовали полную питательную среду, содержащую дексаметазон (0,1 мкМ), аскорбиновую кислоту (50 мкМ) и β-глицерофосфат натрия (10 мМ) согласно протоколу M.F. Pittenger et al. [19]. Через несколько суток остеоиндуктивную среду удаляли, монослой клеток промывали ФСБ и добавляли такое же количество бессывороточной питательной среды DMEM без добавок. После завершения культивирования всю КС собирали и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Полученный супернатант пропускали через фильтр 0,22 мкм. КС концентрировали путем ультрафильтрации в тангенциальном потоке при помощи системы Vivaflow® 200 (Sartorius, Германия). Полученный концентрат подвергали диализу при помощи системы Vivaflow® 200 (Sartorius), добавляя деионизованную воду в емкость для пробы/диафильтрации. Очищенный от солей концентрат КС высушивали в вакуумном ротационном испарителе Rotavapor® R-210 (Buchi, Швейцария). Полученную фракцию хранили в морозильной камере при температуре –20 °С, для более длительного хранения – при –80 °С. Для изучения безопасности сухой образец белковых факторов КС разбавляли в бессывороточной среде DMEM/F12, пропускали через фильтр с размером пор 0,22 мкм в асептических условиях и использовали в конечной концентрации 0,33 мг/мл.

**Цитотоксичность КС МСК *in vitro*.** Для исследования цитотоксичности использовали линию клеток аденокарциномы Эрлиха и мононуклеарные лейкоциты крови здоровых доноров. Опухолевая клеточная линия до исследования хранилась при температуре –195 °С в жидком азоте в культуральной среде, содержащей криопротектор (диметилсульфоксид), затем была разморожена и культивировалась на мышах линии C57Bl/6 в асцитном варианте. Мононуклеарные лейкоциты выделяли из крови здоровых доноров (10 мужчин в возрасте 18–25 лет), взятой утром

натощак из локтевой вены и стабилизированной раствором гепарина (10 ЕД/мл). У доноров брали информированное согласие на участие в исследовании. 10 мл цельной крови инкубировали в термостате 37 °С 1 ч, затем осторожно снимали верхние 4 мл и наслаивали на 2 мл жидкости для сепарации клеток Histopaque-1077 (Sigma) с плотностью 1,077 г/мл. После 15-минутного центрифугирования на градиенте плотности при 400 g собирали клетки, сформировавшие кольцо на границе растворов, трижды отмывали холодной средой 199 с 5 % эмбриональной телячьей сыворотки, переносили и ресуспендировали в ПКС следующего состава: 90 % культуральной среды RPMI-1640 (Sigma), 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 10 мМ буфера Hepes (Sigma), 2 мМ L-глутамин (Sigma), 40 мкг/мл гентамицина (Sigma).

Пипетировали 10 раз клеточную линию с целью равномерного распределения клеток в ПКС перед смешиванием с объектом исследования. Добавляли взвесь выбранных для тестирования здоровых или опухолевых клеток в культуральную посуду, смешивали с КС МСК, взятой в конечном разведении 50, 25 и 12,5 %. Отдельно смешивали клетки с отрицательным или положительным контролем в конечном разведении 50, 25 и 12,5 %. Конечная концентрация применяемых клеток составила 1 × 10<sup>6</sup> кариоцитов (ядросодержащих клеток)/мл. Все пробы выполняли не менее чем в пяти дублях. В качестве отрицательного контроля цитотоксичности использовали культуральную среду, которая подвергалась воздействию тех же условий и процедур, что и культуральная среда, используемая для получения КС МСК. В качестве положительного контроля цитотоксичности, согласно ГОСТ ISO 10993-5-2011, применяли разведение фенола. В концентрации 0,01 % фенол вызывает 90 % гибель клеток.

Помещали культуры в CO<sub>2</sub>-инкубатор на 24 часа при 37 °С, 5 % CO<sub>2</sub> и 100 % влажности, далее определяли *in vitro* цитотоксичность объекта исследования методом качественной и количественной оценки. Качественная оценка цитотоксичности: осматривали клетки через световой микроскоп Ergaval Carl Zeiss Jena (Германия), оценивали общую морфологию, вакуолизацию, расщепление, лизис клеток и целостность мембран. Результаты выражали в процентах при подсчете 100 клеток. Количественная оценка цитотоксичности: подсчитывали число живых и погибших клеток с использованием суправитальной окраски 0,4%-м раствором трипанового синего, долю выживших (неокрашенных) клеток определяли по формуле  $V (\%) = 100 \% - П$ , где

В – процент выживших клеток; П – процент погибших (окрашенных) клеток.

**Животные.** Для получения МСК костного мозга использовали крысу-самца Wistar массой 330 граммов в возрасте 2,5 месяца. Для изучения безопасности КС МСК использовали аутбредных конвенциональных крыс стока SD, всего 24 животных обоего пола (по 6 самцов и 6 самок в опытной и контрольной группах) массой 200–350 г в возрасте 2,5 месяца. Эксперименты с животными выполнялись с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации, в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

**Подострая токсичность КС МСК *in vivo*.** КС МСК вводили 12 крысам обоего пола в объеме 1 мл/кг с концентрацией белковых компонентов 0,33 мг/мл внутримышечно в область бедра, ближе к надкостнице, так как предполагается использовать остеогенные свойства КС для эндогенной стимуляции костеобразования (опытная группа). Контрольной группе животных аналогичным образом вводили растворитель (культуральная среда DMEM/F12). Наблюдение за животными осуществляли в течение 28 дней после введения КС или растворителя.

Выявление смертности, тяжелого состояния, общего состояния здоровья и признаков токсичности проводили 1–2 раза в день (в первой и во второй половине дня) во всех группах в течение всего периода наблюдения. Животных осматривали в клетке, на руках и, при необходимости, на открытой поверхности. Оценивали характер экскреции, состояние шерсти, кожных покровов, слизистых оболочек, аппетит, дыхание, подвижность, нервно-мышечную возбудимость, походку, агрессивность, миоз/мидриаз/экзофтальм и другие признаки отклонений от здоровья. Массу тела регистрировали в опытной и контрольной группах перед первым введением, затем еженедельно на протяжении всего периода наблюдения. Потребление корма и воды оценивали визуально (отклонение от нормы) еженедельно в течение всего периода наблюдения. Эвтаназию выполняли через 28 суток наблюдения в CO<sub>2</sub>-камере.

**Статистический анализ.** Для всех данных применена описательная статистика: подсчитаны среднее значение (*M*) и стандартная ошибка среднего (*m*), результаты представлены в виде  $M \pm m$ . Проверку на нормальность распределения проводили с помощью критерия Шапиро – Уилка. Сравнение выборочных средних осуществляли с использованием *t*-критерия Стьюдента в случае нормального распределения или с помощью

непараметрического критерия Манна – Уитни в случае распределения, отличающегося от нормального. Критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы (*p*) принимали равным 0,05.

## Результаты

**Качественная оценка цитотоксичности КС МСК *in vitro*.** Исследование влияния КС МСК, стимулированных в остеогенном направлении, показало, что добавление ее в концентрациях 12,5 и 50 % от конечного объема в культуру опухолевых клеток достоверно повышало долю клеток, не имеющих отклонения в морфологии, по сравнению с отрицательным контролем, а при использовании концентрации 25 % относительное число клеток, не имеющих морфологических отклонений, было на уровне отрицательного контроля (табл. 1). При добавлении КС МСК в культуру мононуклеаров периферической крови здоровых доноров в различных концентрациях относительное число клеток, не имеющих морфологических отклонений, достоверно снижалось по сравнению со значениями отрицательного контроля, хотя при этом показатели опытных групп были в пределах целевых значений (80–100 %), представленных в ГОСТ ISO 10993-5-2011 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследования на цитотоксичность: методы *in vitro*». Добавление в культуру опухолевых клеток и мононуклеаров крови доноров раствора фенола (положительный контроль) в различных концентрациях значительно снижало процент клеток, не имеющих отклонения в морфологии, по сравнению с соответствующими показателями опытной группой.

**Количественная оценка цитотоксичности КС МСК *in vitro*.** Исследование влияния КС МСК, стимулированных в остеогенном направлении, показало, что добавление ее в концентрациях 25 и 50 % от конечного объема в культуру опухолевых клеток достоверно повышало количество живых клеток по сравнению с соответствующими значениями отрицательного контроля, а в концентрации 12,5 % не влияло на изучаемый показатель (см. табл. 1). При добавлении КС МСК в культуру мононуклеаров периферической крови здоровых доноров в различных концентрациях относительное число живых клеток достоверно не изменялось по сравнению со значениями отрицательного контроля. Добавление в культуру опухолевых клеток и мононуклеаров крови доноров раствора фенола (положительный контроль) значительно увеличивало процент гибели клеток по сравнению с опытной группой.

**Таблица 1.** Влияние КС МСК на количество клеток аденокарциномы Эрлиха и мононуклеаров периферической крови здоровых доноров

**Table 1.** The effect of MSC conditioned medium on the number of cells (%) of Ehrlich adenocarcinoma and healthy donor peripheral blood mononuclear cells

Экспериментальная группа	Концентрация, %	Клетки, не имеющие отклонений в морфологии		Живые клетки	
		Опухоль Эрлиха	Мононуклеары	Опухоль Эрлиха	Мононуклеары
Отрицательный контроль (культуральная среда)	12,5	92,20 ± 1,20	91,80 ± 1,07	94,60 ± 1,44	95,40 ± 1,08
	25	88,80 ± 2,08	92,00 ± 0,89	87,80 ± 2,31	91,80 ± 1,24
	50	87,00 ± 1,48	91,60 ± 0,81	85,20 ± 2,29	90,20 ± 1,16
Опыт (кондиционная среда)	12,5	95,40 ± 0,68*#	82,00 ± 2,02*#	97,20 ± 0,58#	95,80 ± 0,86#
	25	92,80 ± 1,07#	83,20 ± 1,28*#	95,20 ± 0,73*#	92,20 ± 1,02#
	50	91,00 ± 0,84*#	85,80 ± 0,86*#	91,80 ± 0,80*#	86,20 ± 1,71#
Положительный контроль (фенол)	12,5	35,20 ± 1,39	35,20 ± 4,14	34,00 ± 1,61	35,00 ± 4,55
	25	31,40 ± 1,12	30,20 ± 2,35	29,20 ± 1,83	29,60 ± 2,29
	50	14,20 ± 1,53	13,80 ± 0,97	12,80 ± 0,86	12,40 ± 1,63

Примечание. Обозначены статистически значимые ( $p < 0,05$ ) отличия от величин соответствующих показателей: \* – отрицательного контроля, # – положительного контроля.

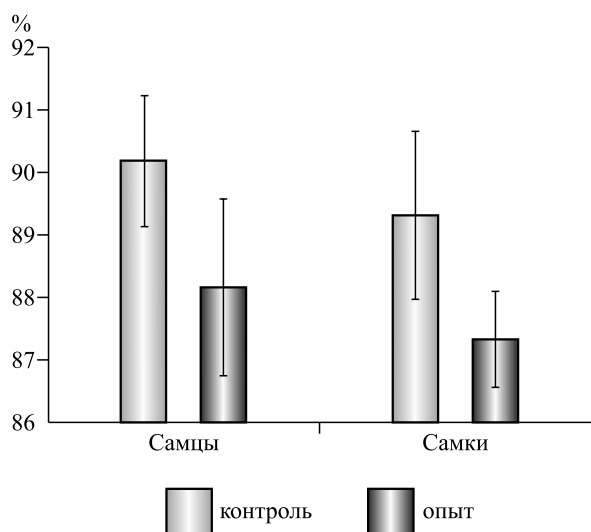
**Таблица 2.** Общая масса тела (г) и прирост массы тела (%) самцов и самок крыс в течение 28 дней после введения КС МСК

**Table 2.** Total body weight (g) and weight gain (%) of male and female rats during 28 days after the injection of MSC conditioned medium

День взвешивания	Самцы		Самки	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
1-й	299,67 ± 11,43	307,33 ± 9,58	241,00 ± 5,63	246,33 ± 5,16
7-й	319,83 ± 11,80	337,67 ± 7,76	265,17 ± 5,49	256,67 ± 4,00
14-й	334,67 ± 14,73	350,50 ± 6,08	273,33 ± 5,90	271,00 ± 4,91
21-й	351,50 ± 16,75	369,17 ± 6,35	282,33 ± 4,84	284,33 ± 6,04
28-й	370,17 ± 16,76	391,50 ± 5,54	300,00 ± 3,41	299,33 ± 4,39
Прирост на 7-е сутки	6,80 ± 1,53	10,05 ± 1,40	10,12 ± 1,52	4,27 ± 1,03
Прирост на 14-е сутки	11,64 ± 2,25	14,35 ± 2,14	13,57 ± 2,51	10,06 ± 0,94
Прирост на 21-е сутки	17,16 ± 2,28	20,46 ± 2,37	17,35 ± 2,47	15,45 ± 1,06
Прирост на 28-е сутки	23,45 ± 2,46	27,80 ± 2,79	24,72 ± 2,32	21,62 ± 1,35

**Исследование подострой токсичности КС МСК *in vivo*.** Введение КС МСК, стимулированных в остеогенном направлении, не вызвало гибели животных, изменений состояния шерсти, кожи, слизистых оболочек и других показателей, включая массу тела животных, как самцов, так и самок (табл. 2). Отклонений в потреблении корма и воды в сравнении с контрольными группами животных не наблюдалось. В ходе визуального исследования внешнего состояния тела животных, внутренних поверхностей и проходов, поло-

сти черепа, грудной, брюшной и тазовой полостей с находящимися в них органами и тканями, шеи с органами и тканями, каркаса и скелетно-мышечной системы при плановой некропсии через 28 сут после введения КС МСК морфологических признаков отклонения от общепринятой нормы, связанных с действием вводимого препарата, выявлено не было. Различий в цитотоксичности *in vivo* в отношении миелокариоцитов костного мозга крыс между контрольными и экспериментальными группами не выявлено (рисунок).



**Рис.** Влияние КС МСК на количество живых клеток (%) костного мозга у аутбредных крыс через 28 дней после внутримышечного введения в объеме 1 мл/кг

**Fig.** The effect of MSC conditioned medium on the number of living cells (%) of bone marrow in outbred rats after intramuscular injection in a volume of 1 ml/kg after 28 days

## Обсуждение

Тканевая инженерия является многообещающей стратегией для лечения заболеваний костей и восстановления их дефектов [3, 16]. Как правило, тканеинженерные конструкции включают в себя культуру МСК, которую часто выращивают на каркасах из биоматериалов в условиях *in vitro* в присутствии остеогенных факторов роста и питательных веществ. Стандартная процедура для индукции остеогенной дифференцировки МСК *in vitro* заключается в культивировании клеток в присутствии смеси дексаметазона, аскорбиновой кислоты и  $\beta$ -глицерофосфата [18, 21]. Однако *in vivo* ни одна из этих добавок не регулирует физиологическую дифференцировку остеогениторных клеток. Вместо этого паракринные факторы, продуцируемые различными типами клеток, такими как МСК, эндотелиальные клетки-предшественники и хондроциты, вносят вклад в остеогенную дифференцировку.

Показано, что КС МСК обладает высоким потенциалом заживления кости, опосредованным цитокинами, такими как TGF- $\beta$ 1, IGF-1, VEGF и BMP-1. Эти факторы регулируют процесс остеогенеза, ангиогенез, миграцию клеток, а также пролиферацию и дифференцировку остеобластов [12]. Таким образом, положительные эффекты МСК при регенерации поврежденных тканей, включая костную, обусловлены не непосредственным участием МСК в процессах реге-

нерации, а опосредованы паракринными механизмами путем продукции ростовых факторов и цитокинов. На основании этого для целей регенеративной медицины можно будет использовать не сами МСК, а полученную при их культивировании КС. Возможность усиления регенерации кости путем имплантации КС МСК, а не стволовых клеток, является новой концепцией в тканевой инженерии и регенеративной медицине. Этот биомедицинский продукт для регенерации костей может значительно снизить стоимость терапии и сократить ее продолжительность. Доставка КС МСК к месту перелома или дефекта кости возможна в составе тканеинженерных конструкций при заключении КС, содержащей факторы роста, в полимерные биodeградируемые капсулы. Однако необходимо изучить безопасность применения КС МСК в начале животного, а затем и человеческого происхождения в отношении различного типа клеток *in vitro* и общетоксические свойства *in vivo*.

В результате проведенных исследований показано, что добавление КС МСК крыс, стимулированных в остеогенном направлении, в различных объемах в культуру клеток аденокарциномы Эрлиха и мононуклеаров периферической крови здоровых доноров не оказывает существенного негативного влияния на их морфологию и жизнеспособность. Введение исследуемой КС крысам не оказывало существенного влияния на их состояние: не вызвало гибели, изменения состояния шерсти, кожи, слизистых оболочек и др., общая масса и процент прироста животных опытных групп не отличались от данных показателей в контрольной группе животных в течение всего исследования. В ходе визуального исследования внешнего состояния тела животных, внутренних поверхностей и проходов, полости черепа, грудной, брюшной и тазовой полостей с находящимися в них органами и тканями, шеи с органами и тканями, каркаса и скелетно-мышечной системы при плановой некропии на 28-е сутки морфологических признаков отклонения от общепринятой нормы, связанных с действием вводимого препарата, не выявлено. Местнораздражающее действие КС не оказывала. При изучении влияния на жизнеспособность клеток костного мозга крыс, которым была введена КС МСК, цитотоксичности в отношении миелокариоцитов не обнаружено.

## Заключение

Таким образом, показана безопасность применения КС МСК костного мозга крыс, стимулированных в остеогенном направлении, как *in vitro* в отношении линии опухолевых клеток

(аденокарцинома Эрлиха) и мононуклеаров периферической крови здоровых доноров, так и *in vivo* при введении КС МСК экспериментальным животным.

## Список литературы/References

1. Athanasiou V.T., Papachristou D.J., Panagopoulos A., Saridis A., Scopa C.D., Megas P. Histological comparison of autograft, allograft-DBM, xenograft, and synthetic grafts in a trabecular bone defect: an experimental study in rabbits. *Med. Sci. Monit.* 2010; 16: 24–31.
2. Cantinieaux D., Quertainmont R., Blacher S., Rossi L., Wanet T., Noël A., Brook G., Schoenen J., Franzen R. Conditioned medium from bone marrow derived mesenchymal stem cells improves recovery after spinal cord injury in rats: an original strategy to avoid cell transplantation. *PLoS One.* 2013; 8: e69515, doi: 10.1371/journal.pone.0069515
3. Dawson J.I., Oreffo R.O. Bridging the regeneration gap: stem cells, biomaterials and clinical translation in bone tissue engineering. *Arch. Biochem. Biophys.* 2008; 473: 124–131. doi: 10.1016/j.abb.2008.03.024
4. Eppley B.L., Morales L., Wood R., Pensler J., Goldstein J., Havlik R.J., Habal M., Losken A., Williams J.K., Burstein F., Rozzelle A.A., Sadove A.M. Resorbable PLLA-PGA plate and screw fixation in pediatric craniofacial surgery: clinical experience in 1883 patients. *Plast. Reconstr. Surg.* 2004; 114: 850–856. doi: 10.1097/01.prs.0000132856.69391.43
5. Eppley B.L., Pietzak W.S., Blanton M.W. Allograft and alloplastic bone substitutes: a review of science and technology for the craniomaxillofacial surgeon. *J. Craniofac. Surg.* 2005; 16: 981–989. doi: 10.1097/01.scs.0000179662.38172.dd
6. Grayson W.L., Frohlich M., Yeager K., Bhuriratana S., Chan M.E., Cannizzaro C., Wan L.Q., Liu X.S., Guo X.E., Vunjak-Novakovic G. Engineering anatomically shaped human bone grafts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010; 107: 3299–3304. doi: 10.1073/pnas.0905439106
7. Han Y., Li X., Zhang Y., Han Y., Chang F., Ding J. Mesenchymal stem cells for regenerative medicine. *Cells.* 2019; 13; 8 (8). doi: 10.1007/5584\_2018\_213
8. Horie M., Choi H., Lee R.H., Reger R.L., Ylostalo J., Muneta T., Sekiya I., Prockop D.J. Intra-articular injection of human mesenchymal stem cells (MSCs) promote rat meniscal regeneration by being activated to express Indian hedgehog that enhances expression of type II collagen. *Osteoarthritis Cartilage.* 2012; 20: 1197–1207. doi: 10.1016/j.joca.2012.06.002
9. Ide C., Nakai Y., Nakano N., Seo T.B., Yamada Y., Endo K., Noda T., Saito F., Suzuki Y., Fukushima M., Nakatani T. Bone marrow stromal cell transplantation for treatment of sub-acute spinal cord injury in rat. *Brain Res.* 2010; 1332: 32–47. doi: 10.1016/j.brainres.2010.03.043
10. Kay A.G., Long G., Tyler G., Stefan A., Broadfoot S.J., Piccinini A.M., Middleton J., Kehoe O. Mesenchymal stem cell-conditioned medium reduces disease severity and immune responses in inflammatory arthritis. *Sci. Rep.* 2017; 7: e18019. doi: 10.1038/s41598-017-18144-w
11. Kinnaird T., Srabile E., Burnett M.S., Shou M., Lee C.W., Barr S., Fuchs S., Epstein S.E. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation.* 2004; 109: 1543–1549. doi: 10.1161/01.CIR.0000124062.31102.57
12. Linero I., Chaparro O. Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration. *PLoS One.* 2014; 10: e107001, doi: 10.1371/journal.pone.0107001
13. Minenna L., Herrero F., Sanz M., Trombelli L. Adjunctive effect of a polylactide/polyglycolide copolymer in the treatment of deep periodontal intraosseous defects: a randomized clinical trial. *J. Clin. Periodontol.* 2005; 32: 456–461. doi: 10.1111/j.1600-051X.2005.00696.x
14. Patel D.M., Shah J., Srivastava A.S. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells in regenerative medicine. *Stem. Cells Int.* 2013; 2013: 496218. doi: 10.1155/2013/496218
15. Pawitan J.A. Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine. *BioMed. Res. Int.* 2014; 2014: 1–14. doi: 10.1155/2014/965849
16. Perez J.R., Kouroupis D., Li D.J., Best T.M., Kaplan L., Correa D. Tissue Engineering and Cell-Based Therapies for Fractures and Bone Defects. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2018; 6: 105. doi: 10.3389/fbioe.2018.00105
17. Perri B., Cooper M., Laurysen C., Anand N. Adverse swelling associated with use of rh-BMP-2 in anterior cervical discectomy and fusion: a case study. *Spine J.* 2007; 7: 235–239. doi: 10.1016/j.spinee.2006.04.010
18. Peter S.J., Liang C.R., Kim D.J., Widmer M.S., Mikos A.G. Osteoblastic phenotype of rat marrow stromal cells cultured in the presence of dexamethasone, beta-glycerolphosphate, and L-ascorbic acid. *J. Cell Biochem.* 1998; 71: 55–62. doi: 10.1002/(sici)1097-4644(19981001)71:1<55::aid-jcb6>3.0.co;2-0
19. Pittenger M.F., Mbalaviele G., Black M., Mosca J.D., Marshak D.R. Mesenchymal Stem Cells. *In: Human cell culture.* Eds. M.R. Koller, B.O. Palsson, J.R.W. Masters. Dordrecht: Springer, 2001. Vol. 5: 189–207. doi: 10.1007/0-306-46870-0\_9
20. Sanchooli T., Norouzi M., Ardeshirylajimi A., Ghoreish S.K., Abdollahifar M.A., Nazarian H., Piryaei A. Adipose derived stem cells conditioned media in combination with bioceramic collagen scaffolds improved calvarial bone healing in hypothyroid rats. *Iran. Red. Crescent. Med. J.* 2017; 19: e45516. doi: 10.5812/ircmj.45516



21. Song I.H., Caplan A.I., Dennis J.E. *In vitro* dexamethasone pretreatment enhances bone formation of human mesenchymal stem cells *in vivo*. *J. Orthop. Res.* 2009; 27: 916–921. doi: 10.1002/jor.20838
22. Um S., Kim H.Y., Seo B.M. Effects of BMP-2 on the osteogenic differentiation of bone marrow stem cells in fibrous dysplasia. *Oral. Dis.* 2018; 6: 1057–1067. doi: 10.1111/odi.12869
23. Visser R., Rico-Llanos G.A., Pulkkinen H., Becerra J. Peptides for bone tissue engineering. *J. Controlled Release.* 2016; 244: 122–135. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.10.024
24. Yun Y.R., Jang J.H., Jeon E., Kang W., Lee S., Won J.E., Kim H.W., Wall I. Administration of growth factors for bone regeneration. *Regen. Med.* 2012; 7: 369–385. doi: 10.2217/rme.12.1

#### **Сведения об авторах:**

**Любовь Анатольевна Покровская**, e-mail: pokrovskaya@ect-center.com  
**Евгений Юрьевич Шерстобоев**, д.м.н., проф., ORCID: 0000-0002-6178-5329,  
e-mail: sherstoboev\_eu@pharmso.ru  
**Сергей Викторович Надеждин**, к.б.н., e-mail: sergey\_nadezhdin@yahoo.com  
**Марина Григорьевна Данилец**, д.б.н., e-mail: danilets\_mg@pharmso.ru  
**Евгения Сергеевна Трофимова**, к.м.н., e-mail: eugenie76@mail.ru  
**Анастасия Александровна Лигачева**, к.б.н., e-mail: vittelli@mail.ru  
**Алексей Александрович Чуринов**, д.м.н., e-mail: churin\_aa@pharmso.ru  
**Татьяна Юрьевна Дубская**, к.м.н., e-mail: tatatox@mail.ru

#### **Information about the authors:**

**Lyubov' A. Pokrovskaya**, e-mail: pokrovskaya@ect-center.com  
**Evgeniy Yu. Sherstoboev**, doctor of medical sciences, professor, ORCID: 0000-0002-6178-5329,  
e-mail: sherstoboev\_eu@pharmso.ru  
**Sergey V. Nadezhdin**, candidate of biological sciences, e-mail: sergey\_nadezhdin@yahoo.com  
**Marina G. Danilets**, doctor of biological sciences, e-mail: danilets\_mg@pharmso.ru  
**Evgeniya S. Trofimova**, candidate of medical sciences, e-mail: eugenie76@mail.ru  
**Anastasiya A. Ligacheva**, candidate of biological sciences, e-mail: vittelli@mail.ru  
**Aleksey A. Churin**, doctor of medical sciences, e-mail: churin\_aa@pharmso.ru  
**Tat'yana Yu. Dubskaya**, candidate of medical sciences, e-mail: tatatox@mail.ru

*Поступила в редакцию* 05.11.2019  
*После доработки* 12.12.2019  
*Принята к публикации* 16.02.2020

*Received* 05.11.2019  
*Revision received* 12.12.2019  
*Accepted* 16.02.2020